



UFSM

Dissertação de Mestrado

**EFEITO DA DIACEREÍNA SOBRE A FEBRE INDUZIDA POR
SUSPENSÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* E POR
PROSTAGLANDINA E₂ EM RATOS JOVENS**

Juliana Saibt Martins Pasin

PPGBT

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2005

**EFEITO DA DIACEREÍNA SOBRE A FEBRE INDUZIDA POR
SUSPENSÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* E POR
PROSTAGLANDINA E₂ EM RATOS JOVENS**

por

Juliana Saibt Martins Pasin

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial para a obtenção do grau de **MESTRE em Bioquímica Toxicológica.**

PPGBT

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DA DIACEREÍNA SOBRE A FEBRE INDUZIDA POR
SUSPENSÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* E POR
PROSTAGLANDINA E₂ EM RATOS JOVENS**

elaborada por

Juliana Saibt Martins Pasin

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Dr. Carlos Fernando de Mello
(Orientador)**

Dr. Juliano Ferreira (UFSM)

Dr^a Carla Dalmaz (UFRGS)

Santa Maria, 10 de junho de 2005.

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente a Deus. Ele que não tem nome nem religião, mas que demonstrou estar sempre junto de mim, nos momentos difíceis e também naqueles alegres, nas decisões e nas conquistas, inspirando-me e fazendo com que escolhesse sempre os melhores caminhos. Sou eternamente grata por mais esta conquista!

Ao Marcelo, que representou força, otimismo, paciência, amor e acalanto, ingredientes fundamentais para a minha vitória. A ele ofereço o sonho, o abraço, o beijo... e o futuro!

Aos meus pais, Marino e Teresinha, pela lição de amor que ensinaram durante toda a vida. Aos meus irmãos Eduardo e Gustavo e suas famílias, agradeço pelo apoio, incentivo, carinho, e, principalmente por encher de cor o meu dia-a-dia! Amo vocês!

Agradeço ao meu orientador, professor Carlos Mello, por acolher-me no grupo e apresentar-me à pesquisa. Agradeço pela oportunidade de crescimento, pelos momentos descontraídos e também pelos “puxões de orelha”. Estes últimos, às vezes não tão suaves, mas recheados de boas intenções.

Aos queridos alunos de iniciação científica Daiana, Rosália, André, Ana Maria e Renan, que foram importantíssimos para a realização deste trabalho: obrigada pela colaboração, pela companhia, por acreditar... Em especial, agradeço à Ana Paula, pela infinita disponibilidade, dedicação e amizade!

À Jorgete, agradeço pelo acolhimento no grupo da pirexia, pelas palavras de incentivo que só ela sabia dizer, pela ajuda experiente, enfim, pela nossa rica convivência. Agradeço também à Vivi, que chegou trazendo uma bagagem de boa vontade, companheirismo e amizade.

À Ale, Flávia, Lia, Valéria e Nádia: o convívio com vocês tornou o caminho mais alegre e cheio de entusiasmo. Isso já bastaria para dizer que “valeu a pena”! No entanto, teve também o carinho e a amizade sincera! Agradeço a vocês o incentivo e por compartilharem comigo dúvidas, angústias e, é claro, as muitas alegrias!

Aos colegas Patrícia, Aledson, Nando, Michele, Ana Flávia, Mauro, Gustavo, Gerusa, Kely, Ana Paula, Carla, Julie... e às já distantes Marinei, Sheila, Daiane e Jociane. Agradeço o sorriso, o carinho, a ajuda com o computador (ufa! Aprendi a usar o Corel!).

À Cristine Knopka, agradeço por mostrar-me o caminho da terra fértil. Lá pude plantar a semente e ir adubando-a com dedicação e esforço. Obrigada por tua generosidade e carinho!

Agradeço a ajuda técnica dos funcionários Srs. Paulino, Florindo e Rinaldo.

Aos demais professores do PPGBT, por tudo o que aprendi com vocês.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de crescimento e aprendizado.

Agradeço à CAPES, pelo apoio financeiro.

CAMINHO

*Andei,
Ando,
Andarei...
Fui,
Sou,
Serei,
Não eu,
Um outro
Diferente
De mim.
Que mudei,
Mudo,
E mudarei.*

Prado Veppo

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I – INTRODUÇÃO.....	01
I.1 FEBRE.....	02
I.1.1 Mecanismo de febre.....	04
I.1.2 Prostaglandina E.....	07
I.1.3 Óxido Nítrico e febre.....	10
I.1.4 Antipirese endógena.....	12
I.1.5 Modelos de indução de febre.....	14
I.2 DIACERÉINA.....	16
II – OBJETIVOS.....	21
II.1 Objetivo geral.....	22
II.2 Objetivos específicos.....	22
III – ARTIGO.....	24

IV – DISCUSSÃO.....	48
V – CONCLUSÃO.....	52
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH -	Hormônio adrenocorticotrópico
APOH -	Área pré-óptica do hipotálamo anterior
AVP -	Arginina vasopressina
BHE -	Barreira hemato-encefálica
COX -	Enzima ciclooxigenase
DAINES -	Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais
ECI -	Enzima conversora de interleucina
HHA -	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IL -	Interleucina
LPS -	Lipopolissacarídeo bacteriano
MIP-1 -	Proteína inflamatória de macrófagos-1
NF- κ B -	Fator nuclear kappa B
NO -	Óxido nítrico
NOS -	Enzima óxido nítrico sintase
OVLT -	Lâmina terminal do órgão vascular
PGE ₂ -	Prostaglandina E ₂
PGHS -	Prostaglandina endoperóxido sintase
SNA -	Sistema Nervoso Autônomo
SNC -	Sistema Nervoso Central
TGF- β -	Fator transformador de crescimento- β
TNF- α -	Fator de necrose tumoral- α
α - MSH -	Hormônio α -melanócito estimulante

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração esquemática do mecanismo da febre com origem infecciosa.....	5
Figura 2 – Síntese de prostaglandinas.....	9
Figura 3 – Fórmulas químicas da diacereína e reína.....	17
Figura 4 – Ilustração esquemática do provável mecanismo de ação da diacereína....	20
Figura 5 – Efeito da administração subcutânea de veículo (tween 80 a 5%) ou diacereína (1,3,10 mg/kg) sobre a variação da temperatura retal de ratos jovens, ao longo do tempo.....	34
Figura 6 – Efeito da administração subcutânea de NaCl (0,9%), veículo (tween 80 a 5%), dipirona (100 mg/kg) ou diacereína (5 mg/kg) na reversão da febre induzida por suspensão de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , em ratos jovens.....	35
Figura 7 – Efeito da administração subcutânea de veículo (tween 80 a 5%) ou diacereína (5 mg/kg) na prevenção da febre induzida por suspensão de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , em ratos jovens.....	36
Figura 8 – Efeito da administração subcutânea de veículo (tween 80 a 5%) ou diacereína (5 mg/kg) sobre a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por suspensão de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , em ratos jovens.....	37

- Figura 9** – Falta de efeito da administração subcutânea de veículo (tween 80 a 5%) ou diacereína (5 mg/kg) na reversão da febre induzida por prostaglandina E₂ (10 ng/100µl, intratecal), em ratos jovens..... 38
- Figura 10** - Falta de efeito da administração subcutânea de veículo (tween 80 a 5%) ou diacereína (5 mg/kg) na prevenção da febre induzida por prostaglandina E₂ (10 ng/100µl, intratecal), em ratos jovens..... 39

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DA DIACEREÍNA SOBRE A FEBRE INDUZIDA POR SUSPENSÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* E POR PROSTAGLANDINA E₂ EM RATOS JOVENS.

AUTORA: Juliana Saibt Martins Pasin
ORIENTADOR: Carlos Fernando de Mello
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de junho de 2005.

A febre é uma resposta sistêmica que resulta de uma cascata de eventos que inicia, geralmante, com infecção patogênica. Seu desenvolvimento representa um importante aspecto de defesa do hospedeiro, que é mediado pelo sistema nervoso central. No entanto, medicações antipiréticas são rotineiramente prescritas porque a febre está associada com desconforto e ansiedade, além de representar um risco iminente de convulsões febris. O presente estudo objetivou investigar o efeito da administração subcutânea de diacereína sobre a temperatura retal e sobre a febre induzida por suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de padeiro) e por prostaglandina-E₂ em ratos machos jovens da linhagem Wistar (28 – 30 dias). A administração subcutânea de diacereína (5mg/kg) não alterou a temperatura retal dos animais, ao longo das medidas. Esta dose atenuou a resposta febril induzida por fermento de pão, no entanto não reverteu a febre induzida pela administração intratecal de prostaglandina-E₂. Além disso, diacereína (5mg/kg, s.c.) prolongou a latência para o início da febre induzida por fermento de padeiro, mas não preveniu a sua instalação. Interessantemente, a diacereína inibiu o aumento da migração leucocitária que ocorreu no grupo controle, após a administração intraperitoneal de fermento de padeiro. Estes dados sugerem que a diacereína exerce um fraco efeito antipirético, o qual pode ocorrer através da inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias. Porém, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo preciso da ação antipirética da diacereína.

Palavras-chave: diacereína; febre; *Saccharomyces cerevisiae*; antipiréticos.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

**EFFECT OF DIACEREIN ON BAKER YEAST- AND PROSTAGLANDIN E₂-INDUCED
FEVER IN YOUNG RATS.**

AUTHOR: Juliana Saibt Martins Pasin

ADVISOR: Carlos Fernando de Mello

Date and place of dissertation: Santa Maria, Junho 10th , 2005.

Fever is a systemic response that results of a cascade of events that usually begins with pathogenic infection. Its development represents an important aspect of host defense that is mediated by the central nervous system. However, antipyretic medication are routinely prescribed because fever is associated with discomfort and anxiety, apart from to represent a imminent risk of febrile seizures. The present study aimed to investigate the effect of diacerein on body temperature and Baker's Yeast- and prostaglandin E₂-induced fever in young male Wistar rats (28 – 30 days of age). The subcutaneous administration of diacerein (5mg/kg) did not alter basal rectal temperature. This dose attenuated the febrile response induced by Baker Yeast, however did not reversed prostaglandin E₂ -induced fever. Moreover, diacerein (5mg/kg, s.c.) delayed the onset of fever induced by Baker Yeast, but it did not prevent their installation. Interestingly, diacerein inhibited the leukocyte migration enhancement that occurred in the control group after the intraperitoneal administration of Baker's Yeast. These data suggest that the diacerein exert a weak antipyretic effect, which may occur through inhibition of synthesis of proinflammatory cytokines. However, further studies are needed to elucidate the precise mechanism of this antipyretic action of diacerein.

Keywords: diacerein; fever; Baker yeast; antipyretics.

I - INTRODUÇÃO

1. FEBRE

A febre é uma elevação da temperatura corporal acima da variação circadiana normal (Beutler & Beutler, 1992; Gelfand et al., 1997; Dinarello et al., 1999; Zeisberger, 1999), a qual resulta de uma alteração no centro termoregulatório (Kluger et al., 1998a; Hasday et al., 2000; Blatteis, 2003) localizado no hipotálamo anterior (Gelfand et al., 1997). Sob a influência do hipotálamo, funções fisiológicas e comportamentais são estimuladas até o organismo alcançar a temperatura estabelecida pelo termostato do centro termoregulatório (Saper & Breder, 1994; Kluger et al., 1998a; Dinarello et al., 1999).

As alterações fisiológicas que favorecem a produção e a retenção de calor são vasoconstrição cutânea, piloereção e tremores (Beutler & Beutler, 1992; Aronoff & Neilson, 2001), as quais ocorrem acompanhadas de sensação de frio (Gelfand et al., 1997) e busca por ambientes quentes (Beutler & Beutler, 1992).

Ao conjunto das respostas comportamentais e neurovegetativas desencadeadas pela infecção, incluindo o próprio processo febril, dá-se o nome de “resposta de fase aguda” (Zeisberger, 1999).

Liebermeister (1887) diferenciou febre do aumento passivo da temperatura corporal. Hipertermia é um distúrbio no controle da temperatura, como por exemplo: produção excessiva de calor durante exercício físico intenso, perda da capacidade de dissipação de calor que ocorre na desidratação (Dale, 1992). Além disso, a temperatura corporal pode aumentar após exposição a ambientes quentes (Cooper, 2002), sem elevar o termostato hipotalâmico (Gelfand et al., 1997).

A febre é um sinal comum de doenças infecciosas (Zeisberger, 1999; Blatteis, 2003), inflamação e trauma (Kluger et al., 1998b), podendo ser desencadeada também pelo estresse (Kluger, 1991; Blatteis, 2003). Tem sido evidenciado que a febre desenvolve-se como uma resposta de defesa do hospedeiro (Rowsey, 1997; Kluger et

al., 1998b). De fato, a existência da febre em vertebrados e invertebrados sugere que ela é filogeneticamente antiga (Hasday et al., 2000), pois seria pouco provável à febre se manter dentro do processo evolutivo se não trouxesse benefícios ao hospedeiro (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 mobilidade e atividade leucocitária (Elmquist et al., 1997; Blatteis, 2003), estimulação da produção e liberação do interferon- α 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 autores sugerem que elevações da temperatura corporal durante infecções reduzem a taxa de mortalidade de lagartos, de camundongos e de cães recém-nascidos (Kluger et al., 1998b; Hasday et al., 2000).

Por outro lado, enquanto vários estudos propõem que a febre é benéfica, alguns trabalhos sugerem que o aumento da temperatura corporal a níveis febris pode ser nocivo em algumas situações (Hasday et al., 2000), além de acarretar desconforto (Blatteis, 2003).

A geração e a manutenção da temperatura febril requer um aumento de aproximadamente 13% no consumo de oxigênio para cada 1°C de elevação da temperatura corporal (Beutler & Beutler, 1992; Manthous et al., 1995; Gelfand et al., 1997; Mackowiak & Plaisance, 1998). Este custo metabólico aumentado é particularmente prejudicial aos indivíduos com doenças cardiopulmonares (Mackowiak & Plaisance, 1998), podendo resultar em isquemia tecidual (Schumacker et al., 1987). Da mesma forma, Hasday e colaboradores (2000) afirmam que a febre pode acarretar uma redução progressiva na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, podendo reduzir a liberação deste para os tecidos.

As convulsões constituem um risco iminente durante o processo febril, particularmente para as crianças, as quais são altamente susceptíveis (Styrt & Sugarman, 1990; Aronoff & Neilson, 2001). Estudos revelam que as convulsões febris

ocorrem com uma frequência de 2 a 5% nas crianças com idade entre 6 e 36 meses, sendo que a maioria delas apresenta temperaturas acima de 39°C no momento da convulsão (Rosman, 1997). Assim, a profilaxia das convulsões febris com antipiréticos tem sido defendida por muitos autores.

O uso de antipiréticos na clínica alivia o desconforto e a ansiedade associados à reação febril (Rowsey, 1997). A recuperação do indivíduo após terapia com antipiréticos é vinculada geralmente à diminuição da temperatura corporal, embora a maior parte desses medicamentos possua propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (Vane et al., 1998).

1.1 Mecanismo da febre

A indução e a regulação de febre resultam de uma complexa interação entre o sistema imunológico e o sistema nervoso central (SNC) (Beutler & Beutler, 1992). Um estímulo invasor ao hospedeiro induz a ativação do sistema imunológico e a liberação de mediadores pró-inflamatórios, que por sua vez, entre outras respostas, induzirão a febre por mecanismos que envolvem o SNC (Figura 1) (Jansky et al., 1995; Goehler et al., 1999).

A febre pode ser desencadeada por diversos estímulos que invadem o organismo do hospedeiro. Microorganismos como vírus, bactérias, fungos, alguns agentes não microbianos e produtos sintéticos são exemplos de agentes pirogênicos (Zeisberger, 1999) exógenos. Em contato com estes estímulos, as células do endotélio vascular e os leucócitos são ativados (Aronoff & Neilson, 2001).

Uma vez que o sistema imunológico está ativado, células, como os macrófagos e linfócitos, produzem e liberam na circulação polipeptídeos que se comportam como pirógenos endógenos (Beutler & Beutler, 1992; Gelfand et al., 1997). O termo citocina é utilizado para este grupo diversificado de proteínas (Kluger, 1991; Blatteis, 2003), que agem localmente nos tecidos onde são produzidos ou à distância (Zeisberger, 1999).

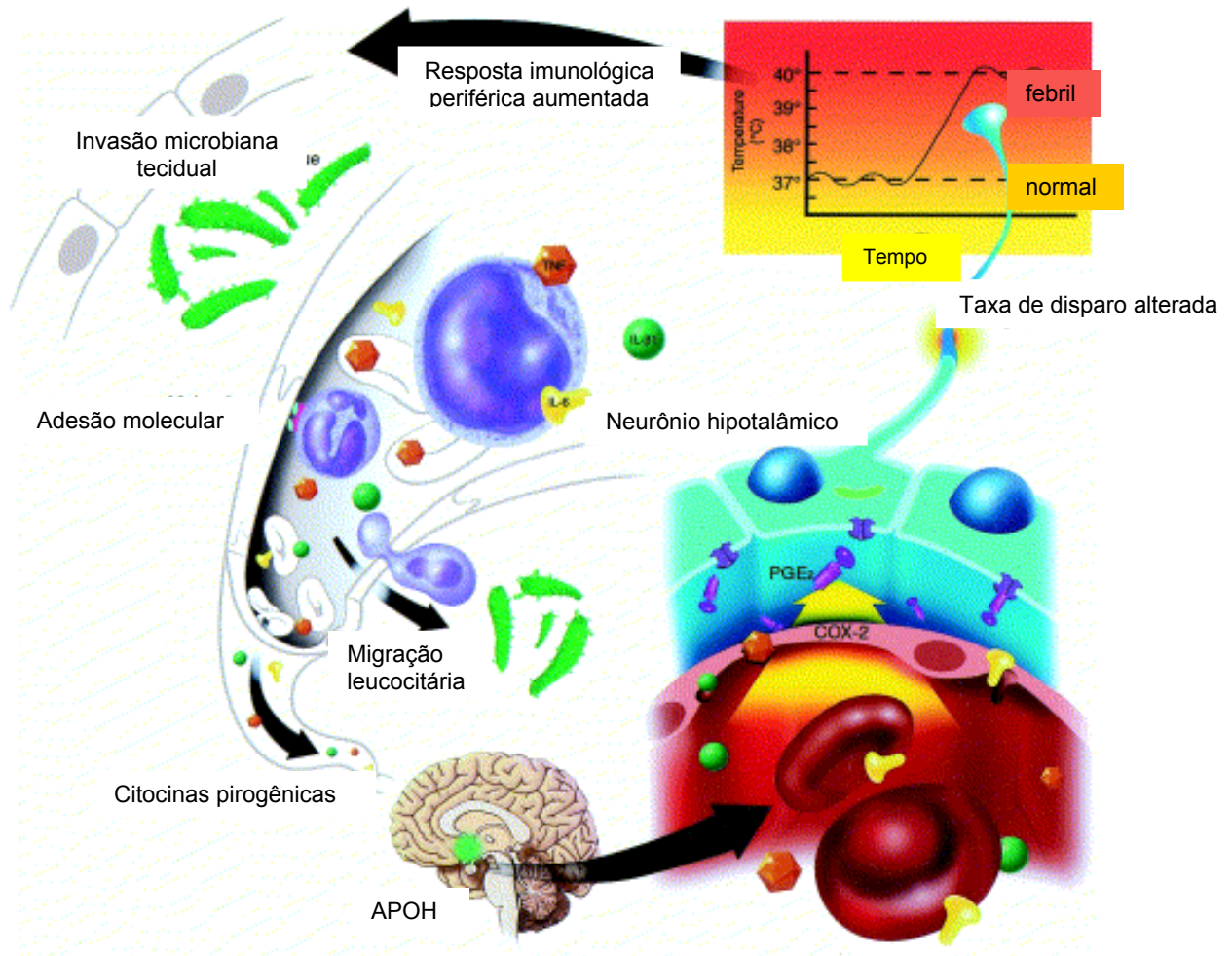


Figura 1. Ilustração esquemática do mecanismo da febre com origem infecciosa. A invasão microbiana periférica aciona a resposta imunológica não específica, ativando aos leucócitos e fazendo com que as mesmas liberem substâncias pró-inflamatórias, tais como as citocinas pirogênicas, IL-6, IL-1 β e TNF α . Estas, por sua vez, estimulam a produção de PGE₂ dentro da área pré-óptica do hipotálamo anterior (APOH). Os neurônios situados nessa região orquestram a resposta febril após a PGE ligar-se aos seus receptores [adaptado por Aronoff & Neilson (2001)].

As citocinas agem em seqüência, onde uma delas pode influenciar a síntese ou a liberação de muitas outras citocinas (Haddad et al., 2002), constituindo a chamada “cascata de citocinas” (Zeisberger, 1999), a qual está associada com o processo febril (Turrin & Plata-Salamán, 2000). Como por exemplo, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) amplia a resposta imunológica, estimulando sua própria síntese e também a produção de outras citocinas, incluindo a interleucina-1 β (IL-1 β) (Cohen, 2002), e ambos induzem a síntese de IL-6 (Dinarello, 2000).

Pela disseminação hematogênica, as citocinas estimulam as células do endotélio vascular cerebral a produzir prostaglandina E₂ (PGE₂) (Aronoff & Neilson, 2001). No entanto, os mecanismos pelos quais as citocinas influenciam o SNC para o desencadeamento da resposta pirética pelo cérebro ainda é fonte de estudo.

Na tentativa de explicar este fenômeno, algumas teorias têm sido propostas. A primeira delas sugere a existência de um mecanismo de transporte específico para determinadas citocinas, possibilitando sua passagem através da barreira hematoencefálica (BHE), alcançando o cérebro (Banks et al., 1995; Plotkin et al., 1996). No entanto, sabe-se que as citocinas são polipeptídeos de alto peso molecular e que possuem propriedades hidrofílicas. Estas características dificultariam sua passagem pela BHE (Blatteis et al., 2004). Por outro lado, o acesso através de orifícios na BHE, localizadas na lâmina terminal do órgão vasculoso (OVLT), poderia se constituir em outro possível mecanismo pelo qual as citocinas periféricas passariam a BHE, e exerceriam seus efeitos sobre o cérebro (Zeisberger, 1999). O OVLT é uma região adjacente à área pré-óptica do hipotálamo anterior (APOH), órgão circumventricular constituído de regiões neurais especializadas, as quais possuem fenestras ao longo da margem do sistema ventricular, formando a parede interna do terceiro ventrículo (Elmqvist et al., 1997).

Atualmente acredita-se que as citocinas não penetram no SNC, mas se ligam a receptores específicos localizados nas células gliais, dentro do espaço perivascular dos órgãos circumventriculares, ou a receptores localizados sobre a superfície das células endoteliais nos vasos cerebrais, na BHE. Tais receptores participariam na transdução dos sinais para o cérebro, através de mensageiros secundários produzidos pelas

células gliais, ou endoteliais, em resposta à ligação de citocinas (Zeisberger, 1999).

Há, ainda, evidências de que o nervo vago esteja envolvido na comunicação entre as citocinas e o SNC (Milligan et al., 1997; Zeisberger, 1999; Cooper, 2002), e que a maioria das informações carregadas por ele sejam transferidas para o núcleo do trato solitário, uma estrutura importante envolvida na modulação de respostas metabólicas (Fyda et al., 1991).

Dessa forma, tem sido demonstrado que a vagotomia subdiafragmática é capaz de suprimir a resposta febril induzida por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e por citocinas pró-inflamatórias (Watkins et al., 1995). A resposta de fase aguda, do mesmo modo, é inibida ou atenuada em ratos, camundongos e porcos da Índia após vagotomia (Watkins et al., 1995; Blatteis & Sehic, 1997b). Além disso, a vagotomia também bloqueia a expressão de RNAm para IL-1 β no tronco encefálico e no hipocampo e a atenua no hipotálamo após administração sistêmica de IL-1 β (Hansen et al., 1998).

Interessantemente, foram encontrados receptores para IL-1 β no paraglânglio abdominal do nervo vago (Goehler et al., 1999), sugerindo que a ligação da IL-1 β aos seus receptores induz uma ativação vagal (Ek et al., 1998) que conduz o estímulo pirogênico ao cérebro (Blatteis et al., 1998).

1.2 Prostaglandina

Tem sido sugerido que o OVLT é o local no qual ocorre a síntese e ação da PGE na febre (Stitt, 1986). Confirmando esta evidência, Matsumura e colaboradores (1992) encontraram inúmeros sítios de síntese de PGE₂, assim como receptores para prostaglandinas no OVLT.

A PGE, especificamente do subtipo E₂, é considerada o mediador final da febre no SNC (Blatteis & Sehic, 1997; Coceani & Akarsu, 1998; Aronoff & Neilson, 2001). Essa possibilidade tem sido sustentada pelo fato que os níveis de PGE₂ nos fluidos cerebrospinal (Coceani et al., 1983) e hipotalâmico (Sirko et al., 1989) aumentam durante a febre induzida por diferentes pirógenos, e também porque os níveis de PGE

diminuem juntamente com a febre, em resposta a inibidores da enzima ciclooxigenase (COX) (Vane & Botting, 1996).

O precursor das prostaglandinas é o ácido araquidônico, o qual é liberado da membrana fosfolipídica por fosfolipases A (Campbell & Halushka, 1996; Aronoff & Neilson, 2001), que são ativadas por uma variedade de mediadores intra e extracelulares (Axelrod et al., 1988), tal como o aumento nos níveis de cálcio intracelular (Zeisberger, 1999).

O ácido araquidônico é metabolizado por duas isoformas da COX, a COX-1 e a COX-2 (Aronoff & Neilson, 2001). No entanto, mais recentemente houve a descoberta de uma terceira enzima da família das ciclooxigenases, a COX-3, que se expressa no córtex cerebral humano e no coração (Chandrasekharan et al., 2002). A COX-1 é expressa constitutivamente e gera prostanóides importantes para as funções relacionadas à homeostase. Por outro lado, a COX-2 além de ser produzida sob condições normais no SNC, é também induzida por sinais inflamatórios (Simon, 1999).

A COX, atualmente referida como prostaglandina endoperóxido sintase (PGHS), possui duas atividades distintas. A primeira delas inclui a síntese do endoperóxido cíclico PGG₂ a partir do ácido araquidônico. Outra função inclui a reação da peroxidase, a qual reduz o PGG₂ formando PGH₂. A PGH₂, por sua vez é utilizada para a síntese de tromboxanos e vários subtipos de prostaglandinas (Vane et al., 1998; Marnett et al., 1999) (Figura 2).

Uma vez sintetizada e liberada dentro do cérebro, a PGE₂ liga-se a receptores específicos nas células gliais (Scammell et al., 1996). No entanto, os eventos intracelulares que ocorrem após a ligação da PGE₂ aos seus receptores no hipotálamo não estão bem esclarecidos (Aronoff & Neilson, 2001). É possível que a PGE₂ altere os níveis de segundos mensageiros, tais como o AMP cíclico, o qual, por sua vez, ativaria os neurônios termosensíveis para aumentar o termostato central a níveis febris (Gelfand et al., 1997; Dinarello et al., 1999).

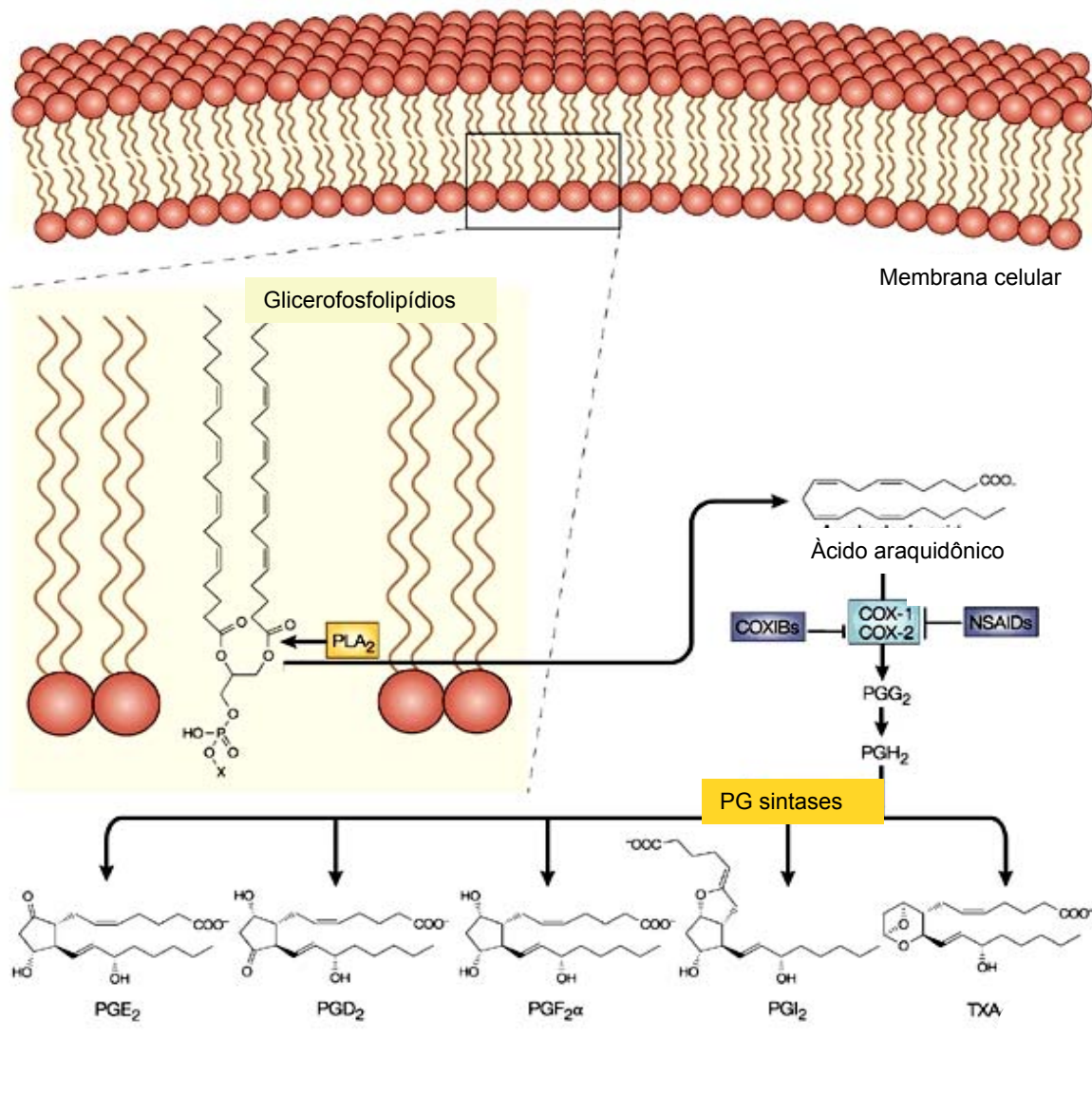


Figura 2. Síntese de prostaglandinas. O ácido araquidônico é liberado dos fosfolípidios de membrana pela ação da enzima fosfolipase A₂. As enzimas COX-1 ou -2 catalisam a biossíntese de endoperóxidos bicíclicos (PGG₂) reduzindo-os até PGH₂. PGH₂ é convertido até Prostaglandina subtipo E₂ (PGE₂), Prostaglandina subtipo D₂ (PGD₂), Prostaglandina subtipo F_{2α} (PGF_{2α}), Prostaglandina subtipo I₂ (PGI₂) e Tromboxano A₂ (TXA₂), pela atividade de prostaglandina sintases específicas [adaptado por Gupta & Dubois, 2001].

Há quatro subtipos de receptor para a prostaglandina, EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄ (Coleman et al., 1994), entre os quais os subtipos EP₁, EP₃ e EP₄ têm sido encontrados na APOH de ratos (Oka et al., 2000), sugerindo um possível papel na resposta febril. Confirmando esta hipótese, Oka e colaboradores (2003) demonstraram que os receptores EP₁, EP₃ e EP₄ contribuem para a resposta febril induzida por PGE₂. Já estudos, utilizando camundongos geneticamente modificados, mostraram que o EP₃ é o principal receptor envolvido na febre, já que os animais desprovidos deste receptor não produzem febre após injeção de PGE₂ (Dinarello et al., 1999), IL-1 β e LPS (Ushikubi et al., 1998).

Por outro lado, tem sido mostrado que a injeção intravenosa de LPS produz febre em camundongos desprovidos de genes para os receptores EP₁ ou EP₄ (Ushikubi et al., 1998).

Há, porém, dados na literatura que sugerem que as prostaglandinas não estão envolvidas no desenvolvimento da febre (Zeisberger, 1999) desencadeada por alguns agentes. De fato, a febre induzida por proteína inflamatória de macrófagos-1 (MIP-1) (Davatellis et al. 1989; Miñano et al., 1991), por interleucina-8 (Zampronio et al., 1994) ou mediada por substância P (Szelényi et al., 1997) não dependem de prostaglandina e não são revertidas por inibidores da COX.

1.3 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa (Moncada et al., 1991), envolvida na regulação do tônus vascular, na proteção celular contra apoptose e na modulação das respostas imunológicas (MacMicking et al., 1997; Bodgan et al., 2000). Além disso, ele exibe propriedades sinalizadoras nos sistemas biológicos (Kluger, 1991; Dawson & Snyder, 1994) e tem papel importante na termorregulação e febre (Steiner & Branco, 2001).

O NO endogenamente formado provém do catabolismo da L-arginina, resultando na formação de L-citrulina e NO, em uma reação catalizada pela enzima óxido nítrico

sintase (NOS)(Moncada et al., 1991; Coleman, 2001).

Têm sido identificados três tipos de NOS. A NOS endotelial e a NOS neuronal são expressas constitutivamente nos tecidos, enquanto a NOS induzível, originalmente encontrada nos macrófagos de camundongos (Stuhr & Marlette, 1985), é sintetizada apenas em resposta a alguns estímulos (Coleman, 2001). Vários agentes, incluindo LPS e citocinas como IL-1 e TNF- α , podem desencadear a expressão da NOS induzível (Stuhr & Marlette, 1985; Nathan & Xie, 1994). Ao contrário da NOS endotelial e neuronal, a ativação da forma induzível da NOS independe da sinalização pelo cálcio (Moncada et al, 1991), sendo necessário um período de algumas horas entre a ativação celular e a produção de NO, o que reflete o intervalo de tempo para a síntese de RNA e a síntese protéica (Stuhr & Marlette, 1987; Nathan & Xie, 1994). Além disso, diferentemente da NOS endotelial e neuronal, a NOS induzível produz altas concentrações de NO (Coleman, 2001).

Há evidências de que o NO exerce muitos dos seus efeitos biológicos interagindo com os sistemas de mensageiros secundários, mais especificamente ativando a guanilato ciclase e, conseqüentemente, aumentando os níveis de GMP cíclico (Murad, 1999).

Estudos têm evidenciado que a administração sistêmica de inibidores não-seletivos da NOS revertem ou, ao menos, atenuam a febre induzida por endotoxina em ratos e porcos da Índia (Roth et al., 1998a; Kamerman & Fuller, 2000). Da mesma forma, a febre induzida por fermento (Ataoglu et al., 2000) e por interleucina-1 (Roth et al, 1998b) em ratos é prejudicada pelos inibidores da NOS. Além disso, Perotti e colaboradores (1999) têm demonstrado que a administração intraperitoneal de 7-Ni, um inibidor da NOS neuronal, bloqueia principalmente a primeira fase da resposta febril induzida por LPS, em ratos.

Por outro lado, quando inibidores da NOS são administrados via intracerebroventricular, ocorre aumento da febre induzida por endotoxina em ratos (Almeida et al., 1999) e em coelhos (Gourine, 1995). Além disso, animais tolerantes à endotoxina desenvolvem febre quando tratados com inibidores da NOS (Almeida et al., 1999).

Estas evidências permitem especular que o NO tem efeitos termorregulatórios distintos, atuando como uma molécula pirética na periferia e como antipirética a nível central (Steiner & Branco, 2001).

Além disso, o NO é um importante neurotransmissor (Dawson & Snyder, 1994; Flora Filho & Zilberstein, 2000), atravessando livremente as membranas celulares (Coleman, 2001). Acredita-se que o NO atua também como uma molécula sinalizadora nas fibras aferentes vagais, as quais são consideradas importantes vias de sinalização à presença de pirógenos (Blatteis et al., 1998).

1.4 Antipirese endógena

Muitos estudos têm evidenciado que a febre exerce um importante papel na resposta imunológica de defesa do hospedeiro. No entanto, para que a temperatura corporal não alcance limites letais, alguns peptídeos endógenos podem agir como antipiréticos (Kluger, 1991; Gelfand et al., 1997; Kluger et al., 1998b).

Citocinas anti-inflamatórias incluindo a IL-4, a IL-10, IL-13 e o fator de crescimento- β (TGF- β) (Turrin & Plata-Salamán, 2000; Nathan, 2002), podem inibir ou bloquear a indução e/ou ação de citocinas pró-inflamatórias. De fato, há relatos que a IL-10 inibe a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Leon et al., 1998). Camundongos injetados com IL-10 não desenvolvem febre quando administrado LPS (Leon et al., 1997).

Além disso, mecanismos neuroendócrinos que incluem a ativação da divisão simpática do sistema nervoso autônomo (SNA) e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e a liberação de alguns hormônios, regulam o processo inflamatório e protegem contra os efeitos deletérios dos mediadores pró-inflamatórios (Pavlov & Tracey, 2004). Da mesma forma, Safieh-Garabedian e colaboradores (2002) afirmam que o SNC regula, em parte, o sistema imunológico atuando principalmente via eixo HHA e sistema nervoso simpático. Givalois e colaboradores (1994) têm demonstrado, ainda, que a

ativação do eixo HHA precede o aparecimento das citocinas no plasma sanguíneo, por pelo menos 15 minutos.

Substâncias como a arginina vasopressina (AVP), o hormônio α -melanócito estimulante (α -MSH) e o hormônio liberador de corticotropina podem agir central ou periféricamente para limitar a febre (Kluger, 1998b), provavelmente alterando a habilidade dos pirógenos endógenos de estimular a produção de prostaglandina (Gelfand et al, 1997).

A AVP é um hormônio peptídico sintetizado nos neurônios hipotalâmicos (Kluger, 1991), o qual suprime a febre em várias espécies (Roth et al., 2004). Naylor e colegas (1987) demonstraram que altos níveis plasmáticos de AVP estão correlacionados com a supressão da febre durante a gravidez de ovelhas. Além disso, a administração intracerebroventricular de AVP em ratos febris, resulta em antipirese em temperatura ambiente. Este estudo evidencia, então, a AVP como um antipirético endógeno.

Os hormônios adrenocorticotrópico (ACTH) e o α -MSH são peptídeos encontrados na hipófise e em outras áreas cerebrais (Kluger, 1991), os quais impedem a produção de pirógenos endógenos pelas células fagocíticas (Beutler & Beutler, 1992). Estudos realizados em coelhos demonstraram que ACTH e α -MSH, quando injetados intracerebroventricularmente, impedem a febre induzida por pirógenos endógenos (Kluger, 1991).

Outra substância capaz de agir como antipirético é o antagonista endógeno para o receptor da IL-1 β , o IL 1Ra, que inibe a resposta febril induzida por IL-1 β (Arend, 2002), bloqueando a ligação da IL-1 aos seus receptores (Gelfand et al., 1997).

O papel do TNF- α na febre é controverso. Dependendo das condições experimentais, essa citocina pode agir como um pirógeno ou como um antipirético endógeno (Kluger et al., 1998a; Gourine et al., 2000). O TNF- α é capaz de induzir febre após injeção periférica em ratos (Cooper et al., 1994). No entanto, em camundongos geneticamente modificados para a não expressão do gene para receptores TNF- α , ocorre um aumento exacerbado da temperatura corporal após injeção de altas doses de LPS (Leon et al., 1997). Estas evidências sugerem que o TNF- α pode limitar o aumento

da temperatura corporal (Kluger, 1991).

Por outro lado, têm sido sugerido que os níveis de TNF- α aumentam nas primeiras fases da febre induzida por polímeros de manose de *Saccharomyces cerevisiae* em ratos (Ataoglu et al., 2000).

1.5 Modelos de indução de febre

Os modelos experimentais de pirexia têm grande importância para a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta febril, bem como para a triagem de compostos antipiréticos.

O padrão de resposta febril depende de vários fatores como a espécie e a idade do animal, o tipo e a dose do pirógeno a ser administrado, a temperatura ambiente e o estresse (Kluger, 1991).

A administração de LPS ou endotoxina, componente isolado da parede de bactérias gram-negativas (Rietschel et al., 1994), é o modelo de indução de febre mais conhecido e utilizado na literatura (Elmqvist et al., 1997). Seus efeitos são mais uniformes do que aqueles causados por bactéria intacta. Além disso, formas altamente purificadas de LPS estão disponíveis comercialmente (Zeisberger, 1999). Apesar da administração de LPS produzir febre em roedores, gatos e coelhos (Kluger, 1991; Tocco-Bradley et al., 1985; Stitt & Shimada, 1987), alguns animais não respondem com aumento da temperatura corporal após injeção de LPS (Kluger, 1991). De fato, os camundongos dificilmente desenvolvem febre após administração periférica de LPS (Fraifeld & Kaplanski, 1998) e, quando a desenvolvem, a febre é discreta, com aumento de 0,5 a 0,7°C na temperatura retal (Souza et al., 2002). Além disso, os camundongos não desenvolvem febre de forma padronizada e uniforme em resposta à injeção intraperitoneal de suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* (Tomazetti et al., dados não publicados).

A parede celular da *Candida Albicans* e do *Saccharomyces cerevisiae* contém polímeros de manose, os quais são responsáveis pelas alterações fisiopatológicas

induzidas por estas leveduras no organismo do hospedeiro (Domer, 1989). Dessa forma, estes polímeros de manose, quando administrados central (Dogan et al., 1999) ou periféricamente (Bruguerolle & Roucoules, 1994; Ataoglu et al., 2000) são capazes de induzir febre em animais. Além disso, estudos prévios de nosso grupo mostraram que a administração intraperitoneal de suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de padeiro), induz febre consistente em ratos jovens (Tomazetti et al., 2005).

Outras substâncias são também comumente usadas para induzir febre em animais de laboratório. A administração de IL-1 β , de PGE₂, de TNF- α , de IL-6 e outras, produz febre em diversas espécies (Kluger, 1991). Estes modelos de pirexia têm sido utilizados para evidenciar o papel destes pirógenos na resposta febril, bem como para elucidar o mecanismo pelo qual a febre se desenvolve e não para prospecção de drogas antipiréticas.

Há, ainda, relatos na literatura de que a citocina RANTES, um polipeptídeo cuja expressão e secreção é regulada pela ativação das células T normais, produz febre quando administrada na área pré-óptica do hipotálamo anterior de ratos (Tavares & Miñano, 2000).

Quanto ao sujeito experimental, a melhor resposta febril após a administração de um pirógeno se dá no coelho. Por exemplo, uma dose de LPS, na faixa de nanogramas, causa uma importante febre em coelhos. Esta mesma dose, porém, não é capaz de alterar a temperatura corporal de ratos (Kluger, 1991). No entanto, a utilização de coelhos nos modelos de pirexia acarreta algumas desvantagens, como seu alto custo de manutenção, além de demandar uma maior quantidade de drogas necessária aos experimentos.

A idade dos animais é outro fator que interfere na resposta febril. Há relatos de que coelhos Nova Zelândia, com menos de um ano, apresentam pico febril maior do que aqueles com dois anos de idade, após injeção de endotoxinas (Ferguson et al., 1980). Ratos Fischer com 24 a 28 meses de idade desenvolvem febre mais branda, após administração de endotoxinas, quando comparados a ratos mais jovens (2 a 4 meses de idade) (Tocco-Bradley et al., 1985). Além disso, a febre apresentada por ratos Long-Evans adultos jovens (3 a 5 meses de idade), após injeção de fungo, têm latência

menor do que aquela desenvolvida pelos ratos com idade superior (Refinetti et al., 1990).

A manipulação dos animais, bem como a sua exposição a um novo ambiente, pode causar elevação da temperatura corporal (Endo & Shiraki, 2000; Singer et al., 1986). Ainda, estudos comprovam que o procedimento de medidas da temperatura retal (Thompson et al., 2003) causa hipertermia em animais. Portanto, os fatores que desencadeiam estresse psicológico no animal, se não controlados, podem acarretar prejuízos aos modelos de pirexia.

2. DIACEREÍNA

A diacereína é um composto encontrado em plantas do gênero *Cássia* (Spencer & Wilde, 1997), cuja molécula contém um anel antraquinônico (Yaron et al, 1997; Nicolas et al 1998). A diacereína sofre desacetilação, dando origem a reína, seu metabólito ativo, quimicamente denominado de 1,8-di-hidróxi-3-carboxiantraquinona (Moore et al., 1998) (Figura 3). Estudos revelam que, após administração oral, não são detectados traços de diacereína nos fluidos biológicos (Nicolas et al., 1998). O local exato onde ocorre a desacetilação da diacereína não é precisamente conhecido. No entanto, verificou-se que ela não acontece no plasma (Magnard et al., 1993).

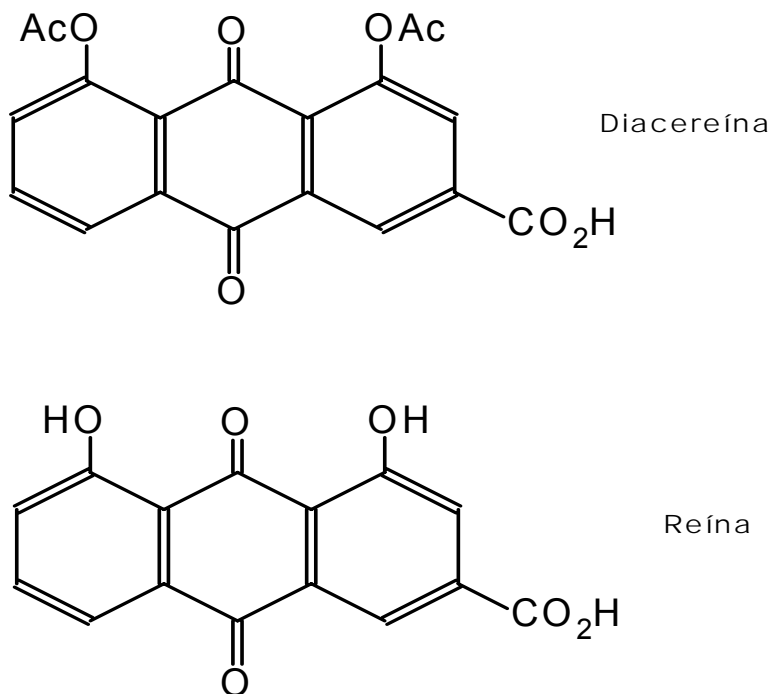


Figura 3: Fórmulas químicas da diacereína e reína [adaptado por Nicolas et al., 1998].

Utilizada na Itália desde a década de setenta no tratamento sintomático da osteoartrite (Moldovan et al., 2000; Tamura et al., 2002), a diacereína passou a ser comercializada na França e outros países a partir de 1992 (Nicolas et al., 1998).

Estudos realizados a fim de elucidar o mecanismo de ação da diacereína têm revelado que este composto exhibe propriedades anti-inflamatórias por inibir a síntese, bem como a liberação de IL-1 β (Nicolas et al., 1998; Moore et al., 1998; Yaron et al., 1999; Moldovan, 2000) (Figura 4). De fato, a diacereína mostra-se capaz de inibir significativamente a produção de IL-1 β induzida por LPS em cultura de cartilagem humana (Yaron et al., 1999). Além disso, experimentos têm revelado que a diacereína pode inibir a atividade da enzima conversora de interleucina (ECI), a qual exerce papel central no processo de maturação da IL-1 β na cartilagem osteoartítica (Moldovan et al., 2000).

Um dos mecanismos pelos quais a IL-1 produz seus efeitos pró-inflamatórios é pela estimulação da produção de ON (Tamura & Ohmori, 2001). A ON é encontrada nos tecidos somente após sua indução, como por exemplo na presença de citocinas pró-inflamatórias (Stadler et al., 1991). Neste contexto, estudos têm mostrado que a diacereína é capaz de diminuir o aumento dos níveis plasmáticos de ON produzidos durante o desenvolvimento de artrite induzida pela injeção de *Mycobacterium butilicum* em ratos (Tamura & Ohmori, 2001). Além disso, a diacereína inibe significativamente os níveis de nitrato na primeira fase da resposta inflamatória induzida por carragenina na cavidade pleural de camundongos (Saleh et al., 1999).

Há evidências que a diacereína atua também sobre outras citocinas. Moore e colaboradores (1998) demonstraram que a diacereína, em várias concentrações, é capaz de reduzir significativamente as concentrações de TNF- α e IL-6 no modelo de artrite induzida por granuloma, em ratos.

O potencial anti-inflamatório da diacereína é relatado em vários estudos. Modelos animais de inflamação aguda, como edema de pata induzido por carragenina, dextrana e zimosan (Tamura et al., 2002), ou crônica, como artrite induzida por granuloma (Moore et al., 1998) ou pela injeção de *Mycobacterium butilicum* em ratos

(Tamura et al., 2002), confirmam o efeito da diacereína.

Enquanto as drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINES), naproxeno e ibuprofeno (Tamura et al., 2002) inibem a atividade da COX (Vane et al., 1998; Aronoff & Neilson, 2001) a diacereína não inibe a síntese de prostaglandinas (Franchi-Micheli et al., 1983; Pelletier et al., 1998). Anteriormente, Pomarelli e colaboradores (1980) já haviam revelado que a diacereína e seu metabólito não alteram a habilidade do tecido pulmonar de cobaias de metabolizar o ácido araquidônico *in vitro*.

Evidências adicionais revelam que a diacereína, bem como seu metabólito, previnem a ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) em cultura de condrócitos, assim, inibindo a expressão da NOS induzível e a produção de NO (Pelletier et al., 1998; Mendes et al., 2002a). O NF- κ B exerce um importante papel na mediação das respostas induzidas por IL-1 β (Eberhardt et al., 1998; Mendes et al., 2002b), além de regular a expressão de outros genes relacionados à inflamação, como aquele da COX-2, citocinas pró-inflamatórias (Siebenlist et al., 1994) e moléculas de adesão (Iademarco et al., 1992; Kaszubska et al., 1993;).

Tendo como base os achados mencionados acima e levando em consideração que as citocinas têm papel importante no desencadeamento e manutenção da resposta febril, o presente trabalho tem por objetivo investigar o efeito da diacereína sobre a febre induzida por fermento de pão (*Saccharomyces cerevisiae*) e por PGE₂ em ratos jovens. Dessa forma, buscando indícios adicionais acerca do mecanismo de ação da diacereína.

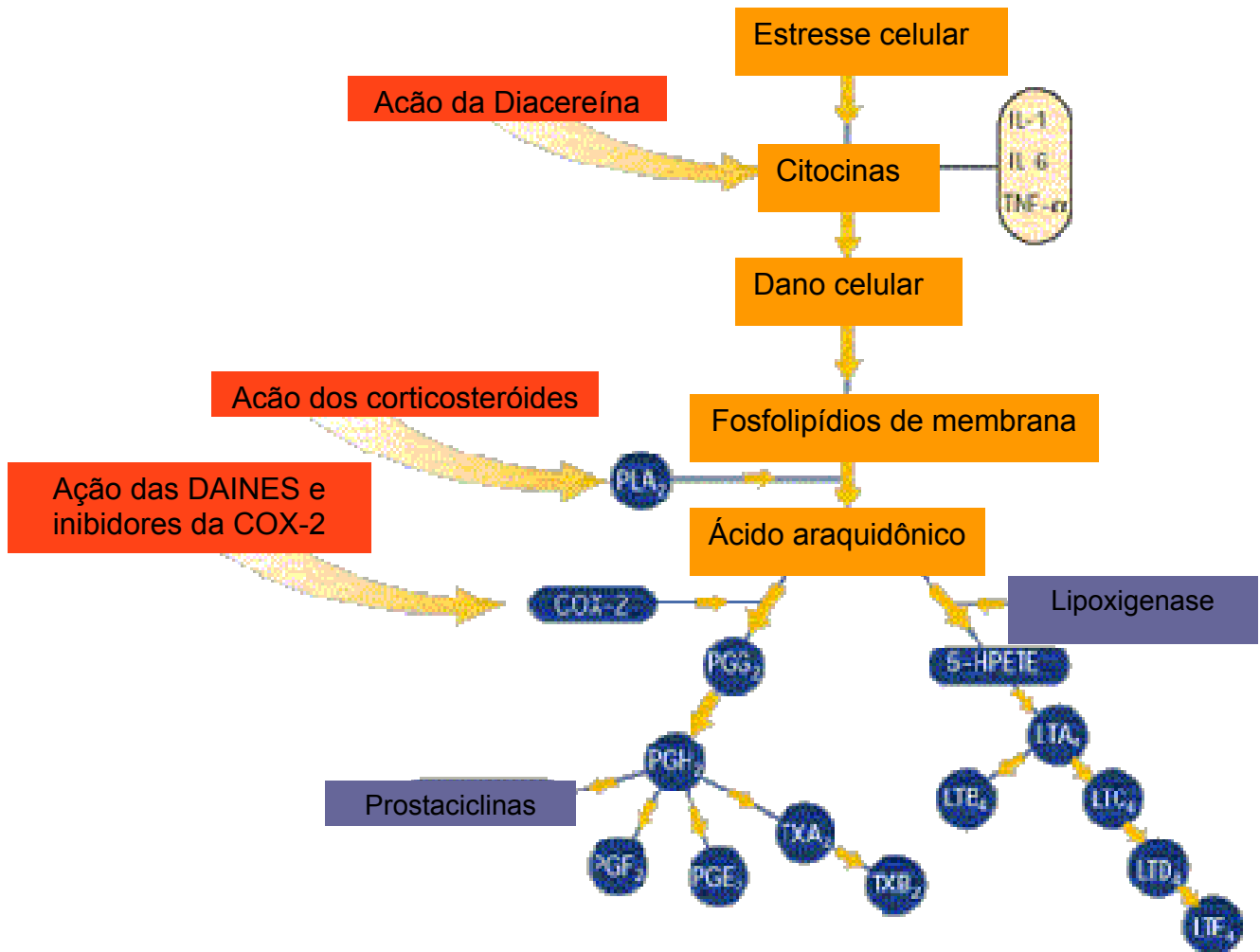


Figura 4: Ilustração esquemática do provável mecanismo de ação da diacereína [adaptado em www.trbchemmedica.com].

II - OBJETIVOS

1. Objetivo geral:

Este estudo tem como objetivo geral avaliar o efeito da injeção subcutânea de diacereína sobre a febre induzida por suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* e por prostaglandina E₂ em ratos jovens.

2. Objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito da injeção subcutânea de diacereína, em concentrações crescentes, sobre a temperatura retal de ratos jovens (curva dose-efeito).

2. Avaliar o efeito da injeção subcutânea de diacereína na reversão da febre induzida pela administração intraperitoneal de suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de padeiro) em ratos jovens.

3. Avaliar o efeito da injeção subcutânea de diacereína na prevenção da febre induzida pela administração intraperitoneal de suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* em ratos jovens.

4. Avaliar o efeito da diacereína sobre o crescimento, *in vitro*, do *Saccharomyces cerevisiae*.

5. Investigar o efeito da injeção subcutânea de diacereína na migração leucocitária para a cavidade peritoneal após administração intraperitoneal de suspensão de *Saccharomyces cerevisiae*.

6. Investigar o efeito da injeção subcutânea de diacereína na reversão da febre induzida pela administração intratecal de prostaglandina E₂ em ratos jovens.

7. Investigar o efeito da injeção subcutânea de diacereína na prevenção da febre induzida pela administração intratecal de prostaglandina E₂ em ratos jovens.

Diacerein prevents Baker yeast-induced fever in young rats

Juliana Saibt Martins Pasin^a, Ana Paula Oliveira Ferreira^a, Daiana Silva Ávila^a,
Rosália Andrighetto^a, Jorgete Tomazetti^a, Viviane Ratzlaff^a, Sydney Hartz Alves^b,
Maribel Antonello Rubin^c, Adair R. S. Santos^d, Carlos Fernando Mello^{a*}

^aDepartamento de Fisiologia,

^bDepartamento de Microbiologia e Parasitologia,

Centro de Ciências da Saúde,

^cDepartamento de Química,

Centro de Ciências Naturais e Exatas

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

^dDepartamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas,

Universidade Federal de Santa Catarina, 88015-420 Florianópolis, SC, Brasil.

*Corresponding author: cf.mello@smail.ufsm.br

Phone +55 55 3220 9378

FAX: +55 55 3220 8241

Abstract

Diacerein, due to its recognized antiinflammatory activity, has been routinely used for treatment of osteoarthritis. However, it is poorly known whether it interferes with other inflammation-dependent responses, such as fever. The present study aimed to investigate the effect of diacerein on body temperature and Baker yeast- and prostaglandin E₂-induced fever in young male Wistar rats (28–30 days of age). The subcutaneous administration of diacerein to febrile animals, at a dose that had no effect on basal rectal temperature along time (5 mg/kg, s.c.), attenuated Baker yeast-induced fever, but did not alter prostaglandin E₂ -induced fever. Diacerein (5 mg/kg, s.c.) prevented the development of Baker yeast-induced fever and attenuated Baker yeast-induced leukocyte peritoneal migration. Diacerein had no antifungal activity *in vitro*. These data suggest that diacerein partially protects against Baker yeast-induced fever and peritoneal leukocyte migration, but not against PGE₂-induced fever.

Keywords: Diacerein; Fever; Baker yeast; Antipyretics; Young rats

1. Introduction

Diacerein is an anthraquinone (Moldovan et al., 2000) that has been considered a reference drug for the treatment of osteoarthritis (Chantre et al. 2000; Nicolas et al., 1998), a disease in which cytokines seems to play a key role (Moore et al., 1998). There are data supporting that interleukin-1 β (IL1- β) and TNF- α are the major catabolic systems involved in the destruction of joint tissues (Martel-Pelletier, 1998). In fact, IL1- β and TNF- α contributes to the degeneration of articular cartilage by stimulating the cells to produce proteolytic enzymes and also by decreasing the anabolism of chondrocytes (Pelletier et al., 1991; Pelletier et al., 1997).

Rhein (1,8-dihydroxy-3-carboxyanthraquinone) is the active metabolite of diacerein (Moore et al., 1998; Nicolas et al., 1998), which is found in plants of the genus *Cassia* and has moderate antiinflammatory and analgesic activity (Spencer and Wilde, 1997). Although their precise mechanism of action remains unknown, lines of evidence (Spencer and Wilde, 1997) have suggested that the antiinflammatory activity of diacerein is due its ability to inhibit cytokine synthesis (Moore et al., 1998; Nicolas et al., 1998). Accordingly, diacerein interferes with molecular pathways leading to cytokine production in monocyte-macrophages (Pietrangelo et al., 1998) as well as in synovial cells and chondrocytes (Martel-Pelletier et al., 1998). In fact, there is a consensus that the inhibition of pro-inflammatory cytokine production is the basis of the chondroprotective (Nicolas et al., 1998; Yaron et al., 1997) and antiinflammatory effects of diacerein (Moore et al., 1998).

Interleukin-1 β and TNF α , besides being involved in cartilage degradation (Yaron et al., 1999), play a role in the generation of fever (Kluger, 1991). Accordingly, the systemic (Kluger, 1991), intracerebroventricular (Dascombe et al., 1989) and intra-hypothalamic (Kluger, 1991) injections of IL1 β cause fever. In addition, while systemic (Cannon et al., 1990) and cerebral (Nakamori et al., 1994) IL1 β levels increases induced by LPS correlate with the appearance of fever, the injection of the IL1 β antagonist, IL 1Ra, antagonizes LPS- (Luheshi et al., 1996; Smith and Kluger, 1992)

and IL1 β -induced fever (Kluger et al., 1998). In line with this view, IL 1 receptor knockout animals fail to develop fever in response to LPS (Kozak et al., 1998). Although significantly less is known about the role of cytokines in Baker yeast-induced fever, there is evidence that TNF α , but not IL1 β , plays a role in this process (Ataoglu et al., 2000). This is consistent with the view that TNF α is an endogenous pyrogen (Kluger, 1991), although there is an intense debate regarding this point in the literature, since some authors find it an endogenous cryogen (Holt et al., 1989; Kluger, 1991).

It is interesting that although diacerein has been proposed to decrease cytokine-mediated responses, until the present moment no study have addressed whether this compound is an antipyretic. Therefore, in this study we investigated whether diacerein alters Baker yeast- and PGE₂-induced fever in young rats.

2. Materials and methods

2.1 Drugs

Commercially available dried Baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, Saf do Brasil Produtos Alimentícios Ltda) was suspended in pyrogen-free 0.9% NaCl in a water bath at 37° C for 5 min. Diacerein was kindly donated by TRB Pharma (São Paulo, Brazil) and was solubilized in 5% Tween 80. Dipyrone (Hoechst, São Paulo, Brazil) was diluted in 0.9% NaCl. Prostaglandin E₂ (Akros Organics, New Jersey, USA) was prepared in pyrogen-free 0.9% NaCl.

2.2 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 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 *ad libitum*. The animals were transferred to the experimental room one day before the experiments, for acclimation to the environment. All temperature measures were taken between 8:00 and 17:00 h and room temperature was kept 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. The experiments were approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of our University.

2.3. Rectal temperature measurement

Rectal temperature (T_R) was measured by inserting a lubricated thermistor probe (external diameter: 3 mm) 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°C precision. The values displayed were manually recorded. In order to minimize the effects of the 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.

2.4. Effect of diacerein on basal rectal temperature

The animals had their T_R measured for five hours, and after the fifth T_R measurement they were subcutaneously (s.c.) injected with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 ml/kg) or diacerein (1, 3, or 10 mg/kg). T_R changes were recorded every hour up to five hours, and expressed as the difference from the basal value.

2.5. Effect of diacerein on Baker yeast-induced fever

In the first protocol, we assessed whether diacerein reverts Baker yeast-induced fever (Tomazetti et al., 2005). Immediately after measuring the initial T_R the animals were intraperitoneally (i.p.) injected with a pyrogenic dose of Baker yeast (0.135 g/kg). T_R changes were recorded every hour until 12:00 h, when the animals were expected to present a full febrile response. Only those animals that presented an elevation of rectal temperature of at least 0.5°C in relation to its basal value were used. The animals were then injected with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, s.c.) or diacerein (5 mg/kg, s.c.). T_R was recorded every hour up to five hours after drug injections.

In the second protocol, we assessed whether diacerein prevents Baker yeast-induced fever. After measuring the basal T_R , the animals were injected with Baker yeast (0.135 g/kg, i.p.). At 9:00 h, the animals were subcutaneously injected with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl) or diacerein (5 mg/kg, s.c.) and T_R was recorded every hour up to eight hours. It is important to point out that at 9:00 none of the animals developed fever (see Figure 7).

2.6. Evaluation of the antifungal activity of diacerein

In order to investigate the antifungal activity of diacerein we used the macrodilution technique (NCCLS- 2002). RPMI 1640 medium containing L-glutamine was prepared according to manufacturer instructions. After reconstitution, the medium was supplemented with glucose to obtain a final concentration of 2%, and buffered to pH 7.0 with 3- (N-morpholino)propanesulfonic acid to a final concentration of 165 mM and *Saccharomyces cerevisiae* was added. The procedures of inoculum preparation and incubation were those of the M 27-A2 methodology. Increasing concentrations of diacerein (15.6 – 1000 µg/ml) in the medium were tested.

2.7. Effect of diacerein on peritoneal leukocyte migration

In order to investigate whether diacerein alters leukocyte migration into the peritoneal cavity, we injected a pyrogenic dose of Baker yeast (0.135 g/kg, i.p.) or vehicle (0.9% NaCl, i.p.). One hour after the animals were injected with diacerein (5 mg/kg, s.c.) or vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 ml/kg, s.c.). Three hours after the diacerein injection, animals were anaesthetized with ether and, through a midline abdominal incision, the peritoneal cavity was washed with 5 ml of apyrogenic saline with the aid of a sterile airway catheter and a 10 ml syringe. The washed volume (2-3 ml) was aspirated, and leukocyte number was manually estimated by a subject (Dr. S. H. Alves) who was not aware of animals' previous treatment.

2.8. Effect of diacerein on prostaglandin E₂-induced fever

In the first protocol, we assessed whether diacerein reverts prostaglandin E₂ -induced fever. The basal T_R was measured and, immediately thereafter, a pyrogenic dose of PGE₂ (10 ng/animal) or vehicle (NaCl 0.9%, 100 µl) was intrathecally (i.t.) administered according to Mestre et al. (1994). This dose of PGE₂ was chosen based on a pilot study, in which the 10 ng dose proved to cause significant hiperthermia. Ninety minutes after the administration of PGE₂, the rats were injected with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 ml/kg) or diacerein (5 mg/kg, s.c.). T_R changes were recorded every thirty minutes up to four hours. In the subsequent three hours the T_R was measured at one-hour intervals.

In the second protocol, we assessed whether diacerein prevents prostaglandin E₂ -induced fever. After measuring the basal T_R the animals were injected with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 5 ml/kg) or diacerein (5 mg/kg, s.c.). Thirty minutes thereafter, they received PGE₂ (10 ng/animal, i.t.). T_R changes were recorded every thirty minutes up to four hours, and in the subsequent three hours T_R was measured at one-hour intervals.

2.9. Statistical analysis

Basal rectal temperature and changes in rectal temperature were expressed as means \pm S.E.M. of the differences from T_R at 8:00 h. 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 and by the Student-Newman-Keuls test, when appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

The effect of the administration of diacerein (10 mg/kg, s.c.) on the basal T_R of young rats along time is shown in Figure 5. For the sake of clarity, 1 mg/kg and 3 mg/kg diacerein data were omitted. Statistical analysis (two-way ANOVA with repeated measures) revealed a significant diacerein dose by time interaction: [F(15,220)= 2.63 ; $p < 0.05$]. *Post hoc* analysis (F test for simple effect) showed 10 mg/kg diacerein altered T_R along time compared with the control group [F(5,220)= 4.68; $p < 0.05$].

Since 3 mg/kg diacerein did not reverse Baker yeast-induced fever (data not shown), we decided to test whether an intermediate dose of diacerein between 3 mg/kg and 10 mg/kg could alter fever. The effect of administration of diacerein (5 mg/kg, s.c.) on Baker yeast-induced fever is shown in Figure 6. Statistical analysis of T_R change showed that diacerein attenuated the Baker's yeast-induced fever in young rats [F(15,305) = 9.24; $p < 0.01$] along time. However, compared with dypirone (100 mg/kg, s.c.), a classical antipyretic, diacerein proved to have a low antipyretic activity [F(5,305)= 7.64; $p < 0.001$]. In a parallel experiment, we determined that 5 mg/kg diacerein had no effect on basal rectal temperature along time compared to vehicle [F(5,110)= 0.34; $p > 0.05$ – data not shown].

Figure 7 shows the effect of diacerein (5 mg/kg, s.c.) on the onset of Baker yeast-induced fever. Statistical analysis revealed that diacerein delayed Baker yeast-induced

fever for two hours [$F(8,200)= 13.63$; $p<0.001$], but did not prevent the development of fever. Such a short duration of effect of diacerein may be explained by its low half-life (4 hours) and by the fact that a small dose of diacerein was used in these experiments.

In order to investigate possible mechanisms by which diacerein delayed the onset of Baker yeast-induced fever, we evaluated whether this compound has antifungal activity and whether it alters Baker yeast-induced leukocyte migration into the peritoneal cavity. The antifungal assay based on M27-A2 methodology (NCCLS, 2002) showed that none of the concentrations of diacerein tested (15.6 – 1000 $\mu\text{g/ml}$) altered *Saccharomyces cerevisiae* growth *in vitro*.

Figure 8 shows the effect of diacerein (5 mg/kg, s.c.) on Baker yeast-induced peritoneal leukocyte migration. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed that diacerein attenuated Baker yeast-induced leukocyte migration [significant drug (diacerein or vehicle) by pyrogen (Baker yeast or vehicle) interaction: [$F(1,9)= 8.33$; $p< 0.05$].

The effect of diacerein on PGE_2 (10 $\eta\text{g/animal}$, i.t.)-induced fever is shown in Figure 9. Ninety minutes after the administration of PGE_2 , the rats were injected with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl) or diacerein (5 mg/kg, s.c.) and had their T_R followed up for 5h. Statistical analysis of T_R change showed that diacerein did not revert PGE_2 -induced hyperthermia [$F(6,156)= 1.13$; $p>0.05$]. Diacerein did not affect PGE_2 – induced fever when given before the prostaglandin [$F(10,350)= 0.9$; $p>0.05$ – Figure 10].

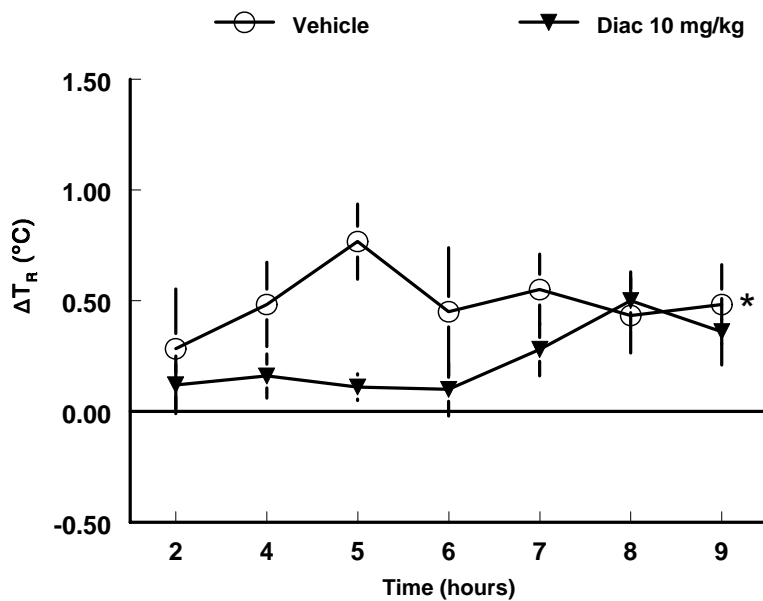


Figure 5: Effect of the subcutaneous administration of vehicle (5% Tween 80) or 10 mg/kg diacerein on rectal temperature change (ΔT_R) along time. Values represent mean \pm S.E.M. change from baseline rectal temperature (n=11-13 per group). * $P < 0.05$ compared with vehicle (F values in the text). For the sake of clarity, 1 and 3 mg/kg diacerein data were omitted.

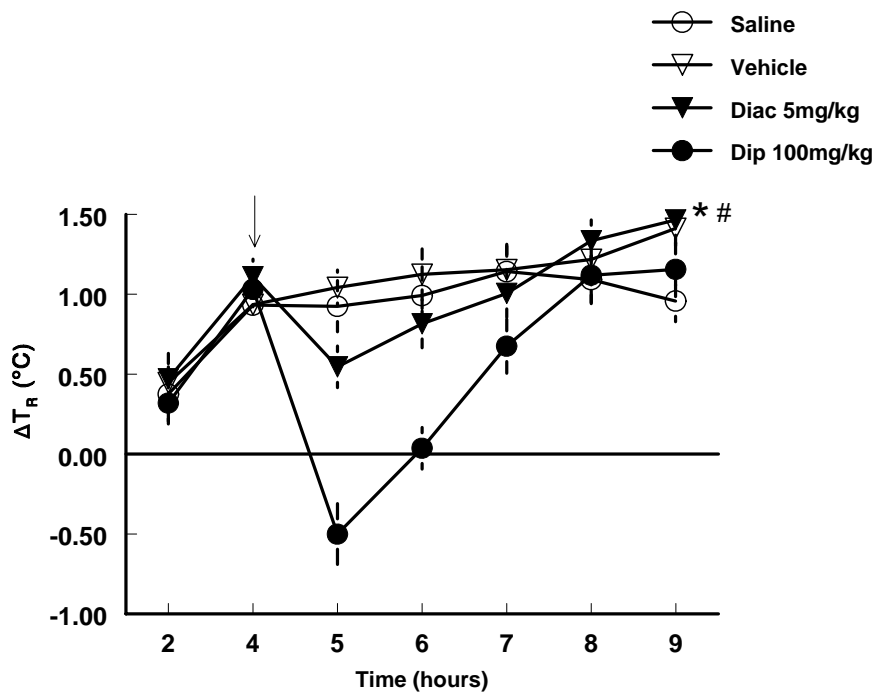


Figure 6: Effects of the subcutaneous administration of saline (0.9% NaCl), vehicle (5% Tween 80), diacerein (5 mg/kg) or dipyrone (100 mg/kg) on Baker yeast-induced fever (0.135 g/kg). Baker yeast was injected (i.p.) at zero time. The arrow indicates time of injection of testing drugs. Values represent mean \pm S.E.M. change from baseline rectal temperature (n=12-20 per group). * P<0.01 compared with vehicle. # P<0.001 compared with dipyrone (F values in the text).

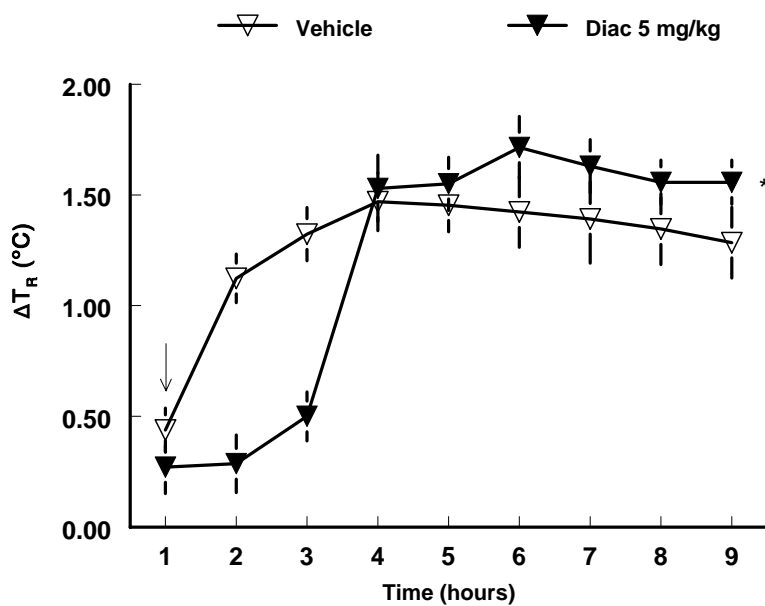


Figure 7: Effect of the subcutaneous administration of vehicle (5% Tween 80) or diacerein (5 mg/kg) on the development of Baker yeast-induced fever (0.135 g/kg). The arrow indicates time of injection of vehicle or diacerein. Values represent mean \pm S.E.M. change from baseline rectal temperature (n=12-20 per group). * P<0.001 compared with vehicle (F values in the text).

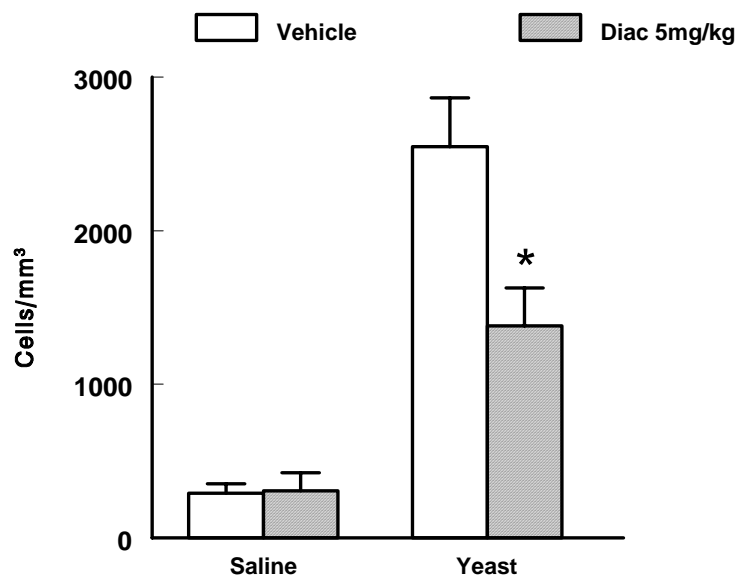


Figure 8: Effect of subcutaneous administration of vehicle (5% Tween 80) or diacerein (5 mg/kg) on Baker yeast-induced peritoneal leukocyte migration (0.135 g/kg). Values represent the mean number of cells/mm³ (n=2-4 per group). * P<0.05 compared with vehicle (F values in the text).

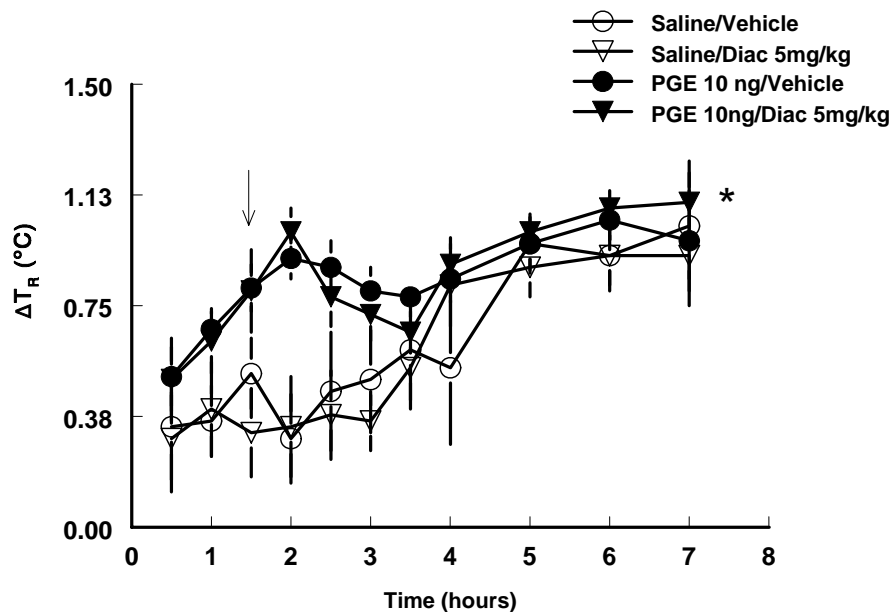


Figure 9: Lack of effect of the subcutaneous administration of vehicle (5% Tween 80) or diacerein (5 mg/kg) on prostaglandin E_2 -induced fever (10 $\eta\text{g}/100\mu\text{l}$, i.t.). Prostaglandin E_2 was injected (i.t.) at zero time. The arrow indicates time of injection of vehicle or diacerein. Values represent mean \pm S.E.M. change from baseline rectal temperature (n=5-10 per group). * $P > 0.05$ compared with vehicle (F values in the text).

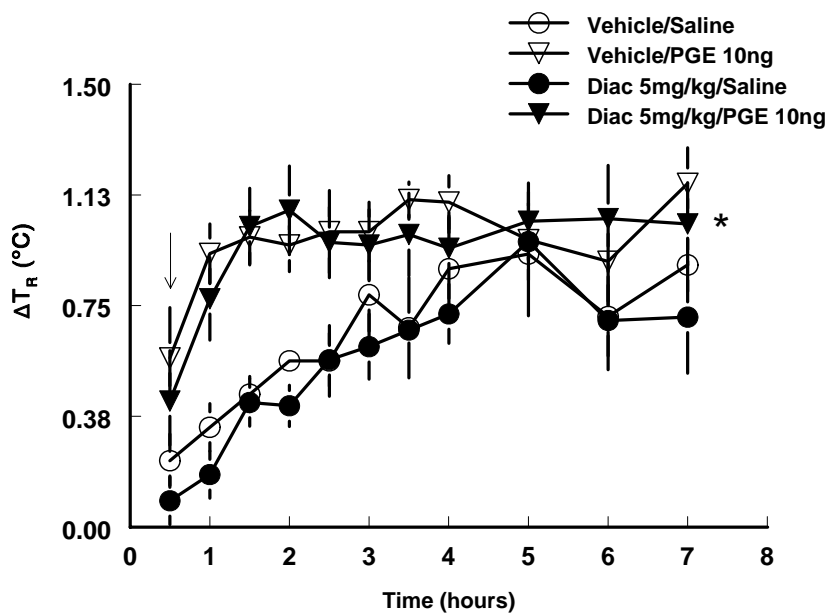


Figure 10: Lack of effect of the subcutaneous administration of vehicle (5% Tween 80) or diacerein (5 mg/kg) on the development of prostaglandin E_2 –induced fever (10 $\eta\text{g}/100 \mu\text{l}$, i.t.). The arrow indicates time of injection of vehicle or diacerein. Values represent mean \pm S.E.M. change from baseline rectal temperature (n=8-11 per group). * $P > 0.05$ compared with vehicle (F values in the text).

5. Discussion

In the current study we describe that systemic diacerein attenuates Baker yeast-induced fever and delays its onset in young male rats. Baker yeast-induced fever coincided with increased peritoneal leukocyte migration, which was also attenuated by diacerein. Diacerein, however, neither prevented nor reverted PGE₂-induced fever.

A significant body of evidence suggests that diacerein has anti-inflammatory properties (Nicolas et al., 1998; Spencer and Wilde, 1997; Tamura et al., 2002), though it does not inhibit PGE synthesis (Pelletier et al., 1998) and paradoxically increases COX-2 synthesis (Pelletier et al., 1998). In fact, diacerein and rhein decrease cytokine response by inhibiting TNF- α , IL-1 β and IL-1 β -induced NO synthesis and the maturation of IL1- β (Martel-Pelletier et al., 1998; Moldovan et al., 2000; Pelletier et al., 1998; Yaron et al., 1999). Regarding this point, it has been shown that serum levels of TNF- α , but not of IL1- β , increase in the early phases of the fever induced by *Saccharomyces cerevisiae* mannans, the pyrogenic component of Baker Yeast (Ataoglu et al., 2000). Therefore, since *Saccharomyces cerevisiae* mannan-induced fever is concomitant to increased serum TNF α levels and is prevented by NOS inhibitors, we may speculate that inhibition of TNF- α or NO synthesis (Tamura and Ohmori, 2001) may underlie the currently reported prevention of Baker yeast-induced fever. In addition, the fact that diacerein prevents, but barely attenuates fever after its development, suggests that it may act in the first steps of Baker's yeast-induced pyrogenic response, where TNF α seems to play a role.

It is worth remarking, however, that diacerein significantly attenuated Baker yeast-induced leukocyte migration into the peritoneal cavity. This is in accordance with the findings that diacerein inhibits leukocyte and neutrophil migration induced by carrageenan in the mouse pleural cavity (Saleh et al., 1999) and that diacerein dose-dependently inhibits human neutrophils chemotaxis *in vitro* (Mian et al., 1987). Since fever depends on local leukocyte migration (Morimoto et al., 1986), it is possible that the currently described delay of Baker yeast-induced fever by diacerein may be related

to its ability to inhibit leukocyte migration. Pro-inflammatory cytokines, including TNF- α and IL-1 β , are stimulators of cell surface E-selectin expression (Bevilacqua et al., 1987; Mantovani and Dejana, 1989). E-selectin promotes the capture of neutrophils in the microcirculation and initiates the inflammatory response (Bevilacqua and Nelson, 1993). Following this step, other adhesion molecules including ICAM-1 (intercellular adhesion molecule -1), PECAM-1 (platelet-endothelial adhesion molecule - 1), and VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule – 1) mediate the firm adhesion of neutrophils into the interstitium, causing local inflammation (Albelda et al., 1994; Butcher, 1993; Tedder et al., 1995). Therefore, if diacerein decreases cytokine levels, the E-selectin expression may be impaired and, accordingly, the local inflammatory response that triggers fever may also be attenuated. Consequently, one might argue that inhibition of cytokine production by diacerein might underlie its both effects: prevention of Baker's yeast – induced fever and leukocyte migration.

Since prostaglandins are probably the final mediators of Baker yeast-induced fever (Ataoglu et al., 2000), we decided to investigate whether diacerein alters PGE₂–induced fever. Diacerein neither prevented nor reverted PGE₂–induced fever, suggesting that mechanisms upstream the EP receptors mediate the antipyretic effect of this compound.

In this study we also investigated whether diacerein altered *Saccharomyces cerevisiae* growth. This experiment was carried out because if diacerein had antifungal activity, it would certainly prevent Baker yeast infection, and its consequent fever response. Since diacerein did not alter *Saccharomyces cerevisiae* growth *in vitro*, the possibility that it inhibits yeast growth *in vivo* sounds unlikely.

In summary, in this study we describe that a low dose of diacerein prevents and attenuates Baker yeast-induced fever. The antipyretic action of diacerein, at a dose that had no effect per se on rectal temperature, was small compared with dipyrone, at a dose that also had no effect per se on rectal temperature. Since the anthraquinone derivative was more effective to prevent fever response than to revert it, we suggest that it may act in the early stages of fever development. These data suggest that diacerein may impair fever development in patients who chronically receive it to treat rheumatic disorders.

However, diacerein does not seem to be a promising antipyretic because it slightly attenuates established fever, compared with dipyrone.

Acknowledgements

The authors thank Paulino Aguiar, Florindo Duarte and Rinaldo Moreira for competent technical support. Research supported by CNPq, CAPES and FAPERGS. C.F.M. and M.A.R. are the recipients of CNPq fellowships, grant numbers 500120/2003-0 and 500096/2003-1, respectively.

References

- Albelda, S. M., Smith, C. W., Ward, P. A., 1994. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8, 504 – 512.
- 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.
- Bevilacqua, M.P., Pober, P.S., Mendric, D.L., Cotran, R.S., Gimbrone, N.A., 1987. Identification of an inducible endothelial leukocyte adhesion molecule, ELAM-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 9238-9242.
- Bevilacqua, M.P., Nelson, R.M., 1993. Selectins. *J. Clin. Invest.* 91, 379-387.
- Butcher, E. C., 1993. Specificity of leukocyte-endothelial interactions and diapedesis: physiologic and therapeutic implications of an active decision making process. *Res. Immunol.* 144, 695 – 698.
- Cannon, J.G., Tompkins, R.G., Gelfand, J.A., Michie, H.R., Stanford, G.G., Van Der Meer, J.W., Endres, S., Lonnemann, G., Corsetti, J., Chernow, B., 1990. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J. Infect. Dis.* 161, 79-84.
- Chantre, P., Cappelarre, A., Leblan, D., Guedon, D., Vandermander, J., Fournie, B., 2000. Efficacy and tolerance of *Harpagophytum procumbens* versus diacerhein in treatment of osteoarthritis. *Phytomedicine* 7, 177-183.
- Dascombe, M.J., Rotwell, N.J., Sagay, B.O., Stock, M.J., 1989. Pyrogenic and themogenic effects of interleukin-1 β in the rat. *Am. J. Physiol.* 256, 7-11.

- Holt, S.J., Grimble, R.F., York, D.A., 1989. Tumour necrosis factor- α and lymphotoxin have opposite effects on sympathetic efferent nerves to brown adipose tissue by direct action in the central nervous system. *Brain Res.* 497, 183-186.
- Kozak, W., Kluger, M.J., Soszynski, D., Conn, C.A., Rudolph, K., Leon, L.R., Zheng, H., 1998. IL-6 and IL-1[β] in fever: studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 856, 33-47.
- Kluger, M.J., 1991. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.* 71, 93-127.
- Kluger, M.J., Kozak, W., Leon, L.R., Conn, C.A., 1998. The use of knockout mice to understand the role of cytokines in fever. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 25, 141-144.
- Luheshi, G.N., Hammond, E., Van Dam, A.M., 1996. Cytokines as messengers of neuroimmune interactions. *Trends Neurosci.* 19, 46-47.
- Mantovani, A., Dejana, E., 1989. Cytokines as communication signals between leukocyte and endothelial cells. *Immunol. Today* 10, 370-375.
- Martel-Pelletier, J., 1998. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarth. Cartil.* 6, 374-376.
- Martel-Pelletier, J., Mineau, F., Jolicouer, F.C., Cloutier, J.M., Pelletier, J.P., 1998. In vitro effects of diacerhein and rhein on interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha systems in human osteoarthritic synovium and chondrocytes. *J. Rheumatol.* 25, 756-762.
- Mestre, C., Pélissier, T., Fialip, J., Wilcox, G., Eschalier, A., 1994. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Met.* 32,

197-200.

Mian, M., Azzara, A., Benetti, D., 1987. Studies in vitro on the effects of rhein on the chemotaxis of human leukocytes. *Int. J. Tissue React.* 9, 459-463.

Moldovan, F., Pelletier, J.-P., Jolicoeur, F.-C., Cloutier, J.-M., Martel-Pelletier, J., 2000. Diacerhein and rhein reduce the ICE-induced IL-1 β and IL-18 activation in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarth. Cartil.* 8, 186-196.

Morimoto, A., Murakami, N., Watanabe, T., 1986. Dehydration enhances endotoxin fever by increased production of endogenous pyrogen. *Am. J. Physiol.* 251, 41-47.

Moore, A.R., Greenslade, K.J., Alam, C.A.S., Willoughby, D.A., 1998. Effects of diacerhein on granuloma induced cartilage breakdown in the mouse. *Osteoarth. Cartil.* 6, 19-23.

Nakamori, T., Morimoto, A., Yamaguchi, K., Watanabe, T., 1994. Interleukin-1 beta production in the rabbit brain during endotoxin-induced fever. *J. Physiol.* 476, 177-186.

National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS), 2002. Reference method for dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. Documents M27-A2. Villanova, PA. V.17. n.9

Nicolas, P., Tod, M., Padoin, C., Petitjean, O., 1998. Clinical pharmacokinetics of diacerein. *Clin. Pharmacokinet.* 35, 347-359.

Pelletier, J.P., Roughley, P.J., Dibattista, J.A., McCollum, R., Martel-Pelletier, J., 1991. Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology. *Semin. Arthritis Rheum.* 20, 12-25.

- Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., Howell, D.S., 1997. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman, W.J. (Ed.), *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1969-1984.
- Pelletier, J.P., Mineau, F., Fernandes, J.C., Duval, N., Martel-Pelletier, J., 1998. Diacerhein and rhein reduce the interleukin-1 beta stimulated inducible nitric oxide synthesis level and activity while stimulating cyclooxygenase-2 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. *J. Rheumatol.* 25, 2417-2424.
- Pietrangelo, A., Montosi, G., Recalcati, S., Garuti, C., Cairo, G., 1998. Diacerhein blocks iron regulatory protein activation in inflamed human monocytes. *Life Sci.* 63, 213-219.
- Saleh, T.S., Calixto, J.B., Medeiros, Y.S., 1999. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides* 20, 949-956.
- Smith, B.K., Kluger, M.J., 1992. Human IL-1 receptor antagonist partially suppresses LPS fever but not plasma levels of IL-6 in Fischer rats. *Am. J. Physiol.* 263, 653-655.
- Spencer, C.M., Wilde, M.I., 1997. Diacerein. *Drugs* 53, 98-106.
- Tamura, T., Ohmori, K., 2001. Diacerein suppresses the increase in plasma nitric oxide in rat adjuvant-induced arthritis. *Eur. J. Pharmacol.* 419, 269-274.
- Tamura, T., Shirai, T., Kosaka, N., Ohmori, K., Takafumi, N., 2002. Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. *Eur. J. Pharmacol.* 448, 81-87.

Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A., Engel, P., 1995. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 9, 866-873.

Tomazzeti, J., Ávila, D.S., Ferreira, A.P.O., Martins, J.S., Souza, F.R., Royer, C., Rubin, M.A., Oliveira, M.R., Bonacorso, H.G., Martins, M.A.P., 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* (IN PRESS).

Yaron, M., Shirazi, I., Yaron, I., 1997. Effets anti-interleukin-1 de la diacérhéine in vitro. *Rev. Prat.* 47, 20-23.

Yaron, M., Shirazi, I., Yaron, I., 1999. Anti-interleukin-1 effects of diacerein and rhein in human osteoarthritic synovial tissue and cartilage cultures. *Osteoarth. Cartil.* 7, 272-280.

O presente estudo mostra que a administração subcutânea de diacereína atenua a febre induzida por suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de padeiro) em ratos jovens, além de prolongar a latência para seu início. O desenvolvimento da febre induzida por fermento de padeiro acontece com o aumento concomitante da migração leucocitária para a região peritoneal. Tal migração foi, também, atenuada no grupo de animais tratados com diacereína. Entretanto, no modelo de febre induzida pela administração intratecal de PGE₂, a diacereína não apresentou efeito antipirético.

Evidências experimentais têm mostrado que a diacereína possui propriedades anti-inflamatórias (Spencer & Wilde, 1997); Nicolas et al., 1998; Tamura et al., 2002), embora não seja capaz de inibir a síntese de PGE e, paradoxalmente, aumente a síntese de COX-2 (Pelletier et al., 1998). De fato, a diacereína e seu metabólito, a reína, inibem a síntese de TNF- α , IL-1 β , a síntese de ON induzida pela administração de LPS, bem como a maturação da IL-1 β (Martel-Pelletier et al., 1998; Yaron et al., 1999; Pelletier et al., 1998; Moldovan et al., 2000).

Além disso, há relatos de que os níveis de TNF- α , mas não de IL-1 β , aumentam no soro de ratos, nas primeiras fases da febre induzida pela administração de polímeros de manose provenientes do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, o componente pirogênico do fermento de padeiro (Ataoglu et al., 2000). Já que este aumento nos níveis de TNF- α é prevenido pelo tratamento dos animais com inibidores da ONS, especulou-se que a inibição da síntese de TNF- α ou de ON (Tamura & Ohmori, 2001) poderiam estar envolvidos no efeito antipirético da diacereína contra a febre induzida por suspensão de *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, o achado que a diacereína previne o desenvolvimento da febre e a atenua quando já está estabelecida, sugere que seu efeito pode ocorrer nos primeiros estágios da resposta febril, onde o TNF- α parece exercer um papel importante.

É relevante salientar, entretanto, que a diacereína atenuou significativamente a migração leucocitária na cavidade peritoneal, induzida pela administração de fermento de padeiro. Corroboram este achado, os relatos de que a diacereína é capaz de inibir a migração de leucócitos induzida por carragenina na cavidade pleural de camundongos

(Saleh et al., 1999), e a quimiotaxia de neutrófilos humanos *in vitro*, de maneira dose-dependente (Mian et al., 1987).

Já que o desenvolvimento da febre depende da migração local de leucócitos (Morimoto et al., 1986), é possível que a diacereína tenha atrasado o início da febre induzida por fermento de padeiro por inibir a migração leucocitária peritoneal.

Além disso, citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β , estimulam a expressão de células de superfície da família da selectina-E (Bevilacqua et al., 1987; Mantovani & Dejana, 1989). A selectina-E promove a captura de neutrófilos na microcirculação e inicia a resposta inflamatória (Bevilacqua & Nelson, 1993). Após este estágio, outras moléculas de adesão incluindo a ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), a PECAM-1 (molécula de adesão plaqueta-endotélio-1) e a VCAM-1 (molécula de adesão vascular-1) medeiam a adesão dos neutrófilos no interstício, causando inflamação local (Albelda et al., 1994; Tedder et al., 1995). Portanto, se a diacereína diminui os níveis de citocinas, a expressão da selectina-E pode ser prejudicada e, conseqüentemente, a resposta inflamatória local que dá origem à febre pode ser, também, atenuada. Assim, pode-se sugerir que a inibição da produção de citocinas pela diacereína pode explicar seu efeito de prevenir a febre induzida por fermento de padeiro e a migração leucocitária.

Como as prostaglandinas são, provavelmente, os mediadores finais da febre induzida por fermento de padeiro (Ataoglu et al., 2000), decidiu-se investigar o efeito da diacereína sobre a febre induzida pela administração intratecal de PGE₂. Os experimentos mostraram que este composto não foi capaz de prevenir ou reverter a febre induzida por PGE₂, sugerindo que mecanismos acima dos receptores para PGE₂ medeiam o efeito antipirético da diacereína.

Neste estudo também investigou-se o efeito da diacereína sobre o crescimento do *Saccharomyces cerevisiae*. Este experimento foi realizado porque a diacereína certamente preveniria a infecção pelo fungo e, conseqüentemente, a resposta febril, caso tivesse atividade antifúngica. No entanto, como a diacereína não inibiu o crescimento do *Saccharomyces cerevisiae in vitro*, a possibilidade que ela iniba o seu desenvolvimento *in vivo* parece improvável.

Em conclusão, este estudo demonstrou que uma baixa dose de diacereína previne e atenua a febre induzida por fermento de padeiro em ratos jovens. A ação antipirética da diacereína, em uma dose que não tem efeito sobre a temperatura retal, foi pequena se comparada à dipirona, também em dose sem efeito *per se*. Já que a diacereína foi mais efetiva em prevenir a resposta febril do que revertê-la, sugere-se que ela possa agir nos primeiros estágios do desenvolvimento da febre. O fato que a diacereína pode prejudicar o desenvolvimento da resposta febril encontra aplicação clínica naqueles pacientes artríticos, os quais usam-na cronicamente. Nestes pacientes, há a possibilidade que a resposta febril seja prejudicada e mascare um eventual quadro infeccioso, dificultando seu diagnóstico.

V - CONCLUSÃO

A avaliação dos resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1. A administração subcutânea de diacereína em concentrações crescentes não alterou a temperatura retal dos animais ao longo do tempo, exceto a dose de 10 mg/kg.
2. A administração subcutânea de diacereína, na dose de 5 mg/kg, atenuou, ao longo do tempo, a resposta febril induzida por suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* em ratos jovens. Além disso, provou ter fraca atividade antipirética, quando comparada à dipirona.
3. A administração subcutânea de diacereína, na dose de 5 mg/kg, aumentou a latência para o início da febre induzida por suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* em ratos jovens.
4. A diacereína, nas concentrações de 15,6 a 1000 µg/ml, não apresentou efeito antifúngico sobre o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, *in vitro*.
5. A administração subcutânea de diacereína, na dose de 5 mg/kg, atenuou a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida pela injeção de *Saccharomyces cerevisiae*.
6. A administração subcutânea de diacereína, na dose de 5 mg/kg, não foi capaz de reverter ou prevenir a febre induzida pela injeção intratecal de PGE₂.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBELDA, S. M.; SMITH, C. W.; WARD, P. A. Adhesion molecules and inflammatory injury. **FASEB J.**, **8**: 504-512, 1994.
- ALMEIDA, M. C.; TREVISAN, F. N.; BARROS, R. C. H.; CARNIO, E. C.; BRANCO, L. G. S. Tolerance to lipopolysaccharide is related to the nitric oxide pathway. **Neuroreport**, **10**: 3061-3065, 1999.
- AREND, W. P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. **Cytokine Growth Factor Rev.**, **13**: 323-340, 2002.
- ARONOFF, D. M.; NEILSON, E. G. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. **Am. J. Med.**, **111**: 304-315, 2001.
- ATAOGLU, H.; DOGAN, M. D.; MUSTAFA, F.; AKARSU, E. S. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannans produce fever in rats. Role of nitric oxide and cytokines. **Life Sci.**, **67**: 2247-2256, 2000.
- AXELROD, J.; BURCH, R. M.; JELSEMA, C. L. Receptor-mediated activation of phospholipase A₂ via GTP-binding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. **Trends Neurosci.**, **11**: 117-123, 1988.
- BANKS, W. A.; PLOTKIN, S. R.; KASTIN, A. J. Permeability of the blood-brain-barrier to soluble cytokine receptors. **Neuroimmunomodulation**, **2**: 161-165, 1995.
- BEUTLER, B.; BEUTLER, S. M. The pathogenesis of fever. In: WYNGAARDEN J. B.; SMITH, L. H.; BENNETT, J. C. (Eds). **Cecil Textbook of Medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992. p. 1568-1573.
- BEVILACQUA, M. P.; POBER, P. S.; MENDRIC, D. L.; COTRAN, R. S.; GIMBRONE, N. A. Identification of an inducible endothelial leukocyte adhesion molecule, ELAM-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **84**: 9238-9242, 1987.
- BEVILACQUA, M. P.; NELSON, R. M. Selectins. **J. Clin. Invest.**, **91**: 379-387, 1993.
- BLATTEIS, C. M. Fever: pathological or physiological, injurious or beneficial? **J. Therm. Biol.**, **28**: 1-13, 2003.

- BLATTEIS, C. M.; FELEDER, C.; PERLIK, V., LI, S. Possible sequence of pyrogenic afferent processing in the POA. **J. Therm. Biol.**, **29**: 391-400, 2004.
- BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. Prostaglandin E₂: a putative fever mediator, In: MACKOWIAK, P. A. (Ed.) **Fever: Basic Mechanism and Management**. New York: Raven-Lippincott, 1997a. p. 117-148.
- BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. Fever: how many circulating pyrogens signal the brain? **N. Physiol. Sci.**, **12**: 1-9, 1997b.
- BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E.; LI, S. Afferent pathways of pyrogen signaling. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **856**: 95-107, 1998.
- BODGAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, **12**: 64-76, 2000.
- BRUGUEROLLE, B.; ROUCOULES, X. Time-dependent changes in body temperature rhythm induced in rats by Brewer's Yeast injection. **Chronobiol. Int.**, **11**: 180-186, 1994.
- CAMPBELL, W. B.; HALUSHKA, P. V. Lipid-derived autacóids, eicosanoids and platelet-activating factor. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P.B et al (Eds). **The pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: McGRAW-HILL, 1996. p. 601-616.
- CHANDRASEKHARAN, N. V.; HU, D.; ROSS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/ antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **PNAS**, **99**: 13926-13931, 2002.
- COCEANI, F.; BISHAI, I.; DINARELLO, C. A.; FITZPATRICK, F. A. Prostaglandin E₂ and thromboxane B₂ in cerebrospinal fluid of afebrile and febrile cat. **Am. J. Physiol.**, **244**: R785-R793, 1983.

- COCEANI, F.; AKARSU, E. S. Prostaglandin E₂ in the pathogenesis of fever. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **856**: 76-82, 1998.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, **420**: 885-891, 2002.
- COLEMAN, R. A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology Classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol. Rev.**, **46**: 205-229, 1994.
- COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int. Immunopharmacol.**, **1**: 1397-1406, 2001.
- COOPER, A. L.; BROUWER, S.; TURNBULL, A. V.; LUHESHI, G. N.; HOPKINS, S. J.; KUNKEL, S. L.; ROTHWELL, N. J. Tumor necrosis factor- α and fever after peripheral inflammation in the rat. **Am. J. Physiol.**, **267**: R1431-R1436, 1994.
- COOPER, K. E. Molecular biology of thermoregulation: some historical perspectives on thermoregulation. **J. Appl. Physiol.**, **92**: 1717-1724, 2002.
- DALE, C. The pathogenesis of fever. In: BENNETT, C.; PLUM, F. (Eds). **Cecil Textbook of Medicine**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. p. 1543-1555.
- DAVATELIS, G.; WOLPE, S. D.; SHERRY, B.; DAYER, J.; CHICHEPORTICHE, R.; CERAMI, A. Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. **Science**, **243**: 1066-1068, 1989.
- DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci.**, **14**: 5147-5159, 1994.
- DINARELLO, C. A.; GATTI, S.; BARTFAI, T. Fever: links with an ancient receptor. **Curr. Biol.**, **9**: R147-R150, 1999.
- DINARELLO, C. A. Pro-inflammatory cytokines. **Chest**, **118**: 503-508, 2000.

- DOGAN, M. D.; ATAOGU, H.; ATAOGU, Ö.; AKARSU, E. S. Polysaccharide mannan components of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* cell wall produce fever by intracerebroventricular injection in rats. **Brain Res. Bull.**, **48**: 509-512, 1999.
- DOMER, J. E. Candida cell wall mannan: A polysaccharide with diverse immunologic properties. **Crit. Rev. Microbiol.**, **17**: 33-51, 1989.
- EBERHARDT, W.; PWSS, C.; HUMMEL, R. Molecular mechanism of inducible nitric oxide synthase gene expression by interleukine-1 β and cAMP in the rat mesangial cells. **J. Immunol.**, **160**: 4961-4969, 1998.
- EK, M.; KUROSAWA, M.; LUNDEBERG, T.; ERICSSON, A. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 β : Role of endogenous prostaglandins. **J. Neurosci.**, **18**: 9471-9479, 1998.
- ELMQUIST, J. K.; SCAMMELL, T. E.; SAPER, C. B. Mechanisms of CNS response to a systemic immune challenge: the febrile response. **Trends Neurosci.**, **20**: 565-570, 1997.
- ENDO, Y.; SHIRAKI, K. Behavior and body temperature in rats following chronic foot shock or psychological stress exposure. **Physiol. Behav.**, **71**: 263-268, 2000.
- FERGUSON, A. V.; VEALE, W. L.; COOPER, K. E. Age-related differences in the febrile response of the New Zealand white rabbit to endotoxin. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **59**: 613-614, 1980.
- FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, **46**: 265-271, 2000.
- FRAIFELD, V.; KAPLANSKI, J. Brain eicosanoids and LPS fever: species and age differences. **Prog. Brain Res.**, **91**: 141-147, 1998.

- FRANCHI-MICHELI, S.; LAVACCHI, L.; FRIEDMANN, C. A. The influence of rhein on the biosynthesis of prostaglandin-like substances in vitro. **J. Pharm. Pharmacol.**, **35**: 262-264, 1983.
- FYDA, D. M.; COOPER, K. E.; VEALE, W. L. Modulation of brown adipose tissue-mediated thermogenesis by lesions to the nucleus tractus solitarius in the rat. **Brain Res.**, **546**: 203-210, 1991.
- GELFAND, J. A.; DINARELLO, C. A.; WOLFF, S. M. Fever, including fever of unknown origin. In: ISSELBACHER, K. J.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J. D.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L. (Eds). **Harrison's: Principles of Internal Medicine**. 13. ed. McGraw-Hill, 1997. p. 81-87.
- GIVALOIS, L.; DORNAND, J.; MCKAOUICHE, M. Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats. **Am. J. Physiol.**, **267**: R164-R170, 1994.
- GOEHLER, L.E.; GAYKEMA, R.P.; NGUYEN, K.T.; KIECHLE, R., TARTAGLIA, N., MAIER, S.F., WATKINS, L.R. Interleukin-1 β in immune cells of abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? **J. Neurosci.**, **19**: 2799-2806, 1999.
- GOURINE, A. V. Pharmacological evidence that nitric oxide can act as an endogenous antipyretic factor in endotoxin-induced fever in rabbits. **Gen. Pharmacol.**, **26**: 835-841, 1995.
- GOURINE, A. V.; LEON, L. R.; RUDOLPH, K.; TESFAIGZI, J.; KLUGER, M. J. Cytokine cascade induced by endotoxin in TNF double receptor knockout mice: evidence supporting a role for IL-10 in mediating antipyretic action of TNF. **J. Therm. Biol.**, **25**: 21-27, 2000.
- HADDAD, J. J.; SAADÉ, N. E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. **J. Neuroimmunol.**, **133**: 1-19, 2002.
- HANSEN, M. K.; TAISHI, P.; CHEN, Z.; KLUGER, M. J. Vagotomy blocks the induction of interleukin-1 β mRNA in the brain of rats in response to systemic IL-1 β . **J. Neurosci.**, **6**: 2247-2253, 1998.

- HASDAY, J. D.; FAIRCHILD, K. D.; SHANHOLTZ, C. The role of fever in the infected host. **Microbes Infect.**, **2**: 1891-1904, 2000.
- IADEMARCO, M. F.; McQUILLAN, J. J.; ROSEN, G. D.; DEAN, D. C. Characterization of promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), **J. Biol. Chem.**, **267**: 16323-16329, 1992.
- JANSKY, L.; VYBIRAL, S.; POSPISILOWA, D.; ROTH, J.; DORNAND, J.; ZEISBERGER, E.; KAMINKOWA, J. Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever. **Neuroendocrinology**, **62**: 55-61, 1995.
- KAMERMAN, P.; FULLER, A. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on the febrile response to lipopolysaccharide and muramyl dipeptide in guinea pigs. **Life Sci.**, **67**: 2639-2645, 2000.
- KASZUBSKA, W.; VAN HUIJSDUIJNEN, H. R.; GHERSA, P.; DERAEMY-SCHENCK, A. M. Cyclic AMP-independent ATF family members interact with NF- κ B and function in the activation of the E-selectin promoter in response to cytokine. **Mol. Cell. Biol.**, **13**: 7180-7190, 1993.
- KLUGER, M.J. Fever: Role of Pyrogens and Cryogens. **Physiol. Rev.**, **71**: 93-127, 1991.
- KLUGER, M. J.; KOZAK, W.; LEON, L. R.; CONN, C. A. The use of knockout mice to understand the role of cytokines in fever. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, **25**: 141-144, 1998a.
- KLUGER, M. J.; KOZAK, W.; CONN, C. A.; LEON, L. R.; SOSZYNSKI, D. Role of Fever in Disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **856**: 224-233, 1998b.
- LEON, L. R.; KOZAK, W.; PECHON, J., KLUGER, M. J. Exacerbated febrile response to LPS, but not turpentine in TNF double receptor knockout mice. **Am. J. Physiol.**, **272**: 563-569, 1997.

- LEON, L. R.; KOZAK, W.; KLUGER, M. J. Role of IL-10 in inflammation studies using cytokine knockout mice. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **856**: 69-75, 1998.
- LIEBERMEISTER, C. Vorlesungen uber specielle pathologie und therapie. **Leipzig, Germany: Verlag-Vogel**, 1887.
- MACKOWIAK, P. A.; PLAISANCE, K. I. Benefits and risks of antipyretic therapy. **Ann. N. Y. Sci.**, **856**: 214-223, 1998.
- MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Ann. Rev. Immunol.**, **15**: 323-350, 1997.
- MAGNARD, O.; LOUCHAHI, K.; TOD, M. Pharmacokinetics of diacerein in patients with liver cirrhosis. **Biopharm. Drug Dispos.**, **14**: 401-408, 1993.
- MANTHOUS, C.; HALL, J.; OLSON, D.; SINGH, M.; CHATILA, W.; POHLMAN, A.; KUSHNER, R.; SCHMIDT, G.; WOOD, L. Effect of cooling on oxygen consumption in febrile critically ill patients. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.**, **151**: 10-14, 1995.
- MANTOVANI, A.; DEJANA, E. Cytokines as communication signals between leukocyte and endothelial cells. **Immunol. Today**, **10**: 370-375, 1989.
- MARNETT, L. J.; ROWLINSON, S. W.; GOODWIN, D. C; KALGUTKAR, A. S., LANZO, A. C. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2, mechanism of catalysis and inhibition. **J. Biol. Chem.**, **274**: 22903-22906, 1999.
- MARTEL-PELLETIER, J.; MINEAU, F.; JOLICOUER, F. C.; CLOUTIER, J. M.; PELLETIER, J. P. In vitro effects of diacerhein and rhein on interleukin-1 and tumor necrosis factor- alpha systems in human osteoarthritic synovium and chondrocytes. **J. Rheumatol.** **25**: 756-762, 1998.
- MATSUMURA, K.; KOBAYASHI, S.; ONOE, H. Distribution and functional properties of prostaglandin receptors in the central nervous system. **Neurosci. Res. Suppl.**, **17**: 25, 1992.

- MENDES, A. F.; CARAMONA, M. M.; CARVALHO, A. P.; LOPES, M. C. Diacerhein and rhein prevent interleukin-1 β -induced nuclear factor-NF-K $_B$ activation by inhibiting the degradation of inhibitor KB- β . **Pharmacol. Toxicol.**, **91**: 22-28, 2002a.
- MENDES, A. F.; CARAMONA, M. M.; CARVALHO, A. P.; LOPES, M. C. Role of mitogen-activated protein kinases and tyrosine kinases on interleukine-1 β -induced NF-K $_B$ activation and iNOS expression in the bovine articular chondrocytes. **Nitric Oxide**, **6**: 35-44, 2002b.
- MIAN, M.; AZZARA, A.; BENETTI, D. Studies in vitro on the effects of rhein on the chemotaxis of human leukocytes. **Int. J. Tissue React.**, **9**: 459-463, 1987.
- MILLIGAN, E. D.; Mc GORRY, M. M.; FLESHNER, M.; GAYKEMA, R. P. A.; GOEHLER, L. E.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Subdiaphragmatic vagotomy does not prevent fever following intracerebroventricular prostaglandin E $_2$: further evidence for the importance of vagal afferents in immune-to-brain communication. **Brain Res.**, **766**: 240-243, 1997.
- MIÑANO, F. J.; SANCIBRIAN, M.; MYERS, R. D. Fever induced by macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) in rats: hypothalamic sites of action. **Brain Res. Bull.**, **27**: 701-706, 1991.
- MOLDOVAN, F.; PELLETIER, J. P.; JOLICOEUR, F. C.; CLOUTIER, J. -M.; MARTEL-PELLETIER, J. Diacerhein and rhein reduce the ICE-induced IL-1 β and IL-18 activation in human osteoarthritic cartilage. **Osteoarthr. Cartil.**, **8**: 186-196, 2000.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43**: 109-141, 1991.
- MOORE, A. R.; GREENSLADE, K. J.; ALAM, C. A. S.; WILLOUGHBY, D. A. Effects of diacerhein on granuloma induced cartilage breakdown in the mouse. **Osteoarthr. Cartil.**, **6**: 19-23, 1998.
- MORIMOTO, A.; MURAKAMI, N.; WATANABE, T. Dehydration enhances endotoxin fever by increased production of endogenous pyrogen. **Am. J. Physiol.**, **251**: 41-47, 1986.

- MURAD, F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **32**: 1317-1327, 1999.
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, **420**: 864-852, 2002.
- NATHAN, C.; XIE, Q. W. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. **Cell**, **78**: 915-918, 1994.
- NAYLOR, A. M.; COOPER, K. E.; VEALE, W. L. Vasopressin and fever: evidence supporting the existence of an endogenous antipyretic system in the brain. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **65**: 1333-1338, 1987.
- NICOLAS, P.; TOD, M.; PADOIN, C.; PETITJEAN, O. Clinical Pharmacokinetics of Diacerein. **Clin. Pharmacokinet.**, **35**: 347-359, 1998.
- OKA, T.; OKA, K.; SCAMMELL, T. E.; LEE, C.; KELLY, J. F.; NANTEL, F.; ELMQUIST, J. K.; SAPER, C. B. Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in the lipopolysaccharide fever responses. **J. Comp. Neurol.**, **428**: 20-32, 2000.
- OKA, T.; OKA, K.; SAPER, C. B. Contrasting effects of E type of prostaglandin (EP) receptor agonists on the core temperature in rats. **Brain Res.**, **968**: 256-262, 2003.
- PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. **Cell. Mol. Life Sci.**, **61**: 2322-2331, 2004.
- PELLETIER, J. P. F.; MINEAU, J. C.; FERNANDES, N.; DUVAL, N.; MARTEL-PELLETIER, J. Diacerein and rhein reduce the interleukin-1 β stimulated inducible nitric oxide synthesis level and activity while stimulating cyclooxygenase-2 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. **J. Rheumatol.**, **25**: 2417-2424, 1998.
- PEROTTI, C. A. A.; NOGUEIRA, M. S.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CÁRNIO, E. C. Effects of a neuronal nitric oxide synthase inhibitor on lipopolysaccharide- induced fever. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **32**: 1381-1387, 1999.

- PLOTKIN, S. R.; BANKS, N. A.; KASTIN, A. J. Comparison of saturable transport and extracellular pathways in the passage of interleukin-1alpha across the blood-brain-barrier. **J. Neuroimmunol.**, **67**: 41-47, 1996.
- POMARELLI, P.; BERTI, M.; GATTI, M. T.; MOSCONI, P. A nonsteroidal anti-inflammatory drug that stimulates prostaglandin release. **Farmaco**, **35**: 836-842, 1980.
- REFINETTI, R.; HUA, M.; SATINOFF, E. Body temperature rhythms, cold tolerance, and fever in young and old rats of both genders. **Exp. Gerontol.**, **25**: 533-543, 1990
- RIETSCHEL, E. T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, U.; MAMAT, W.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A. J.; ZHRINGER, U.; SEYDEL, U. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB J.**, **8**: 217-225, 1994.
- ROSMAN, P. Febrile convulsions. In: MACKOWIAK, P. A. (Ed). **Fever: Basic Mechanism and Management**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p. 267-277.
- ROTH, J.; STORR, B.; VOIGT, K.; ZEISBERGER, E. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates lipopolysaccharide-induced fever without reduction of circulating cytokines in guinea pigs. **Pflugers Arch.**, **436**: 858-862, 1998a.
- ROTH, J.; STORR, B.; VOIGT, K.; ZEISBERGER, E. Inhibition of nitric oxide synthase results in a suppression of interleukin-1 beta-induced fever in rats. **Life Sci.**, **62**: PL345-PL350, 1998b.
- ROTH, J.; ZEISBERGER, E.; VYBÍRAL, S. Endogenous antipyretics: neuropeptides and glucocorticoids. **Front. Biosci.**, **9**: 816-826, 2004.
- ROWSEY, P. J. Pathophysiology of fever – Parte 2: Relooking at cooling interventions. **Dim. Crit. Care Nurs.**, **16**: 251-256, 1997.
- SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; HADDAD, J. J. The role of the sympathetic efferents in endotoxin-induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. **Neuropharmacology**, **42**: 864-872, 2002.

- SALEH, T. S. F.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**, **20**: 949-956, 1999.
- SAPER, C. B.; BREDER, C. D. The neurologic basis of fever. **N. Engl J. Med.**, **330**: 1880-1886, 1994.
- SCAMMEL, T. E.; ELMQUIST, J. K.; GRIFFIN, J. D.; SAPER, C. B. Ventromedial preoptic prostaglandin E₂ activates fever-producing autonomic pathways. **J. Neurosci.**, **16**: 6246-6254, 1996.
- SCHUMACKER, P.; ROWLAND, J.; SALTZ, S.; NELSON, D.; WOOD, L. Effects of hyperthermia on oxygen extraction by tissues during hypovolemia. **J. Appl. Physiol.**, **63**: 1246-1252, 1987.
- SIEBENLIST, U.; FRANZOSO, G.; BROWN, K. Structure, regulation and function of NF- κ B. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, **10**: 405-455, 1994.
- SIMON, L. S. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. **Am. J. Med.**, **106** (suppl): 375-425, 1999.
- SINGER, R.; HARKER, C. T.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. Hyperthermia induced by open-field stress is blocked by salicylate. **Physiol. Behav.**, **6**: 1179-1182, 1986.
- SIRKO, S.; BISHAI, I.; COCEANI, F. Prostaglandin formation in the hypothalamus in vivo: effect of pyrogens. **Am. J. Physiol.**, **256**: 616-624, 1989.
- SOUZA, F. R.; SOUZA, V. T.; RATZLAFF, V.; BORGES, L. P.; OLIVEIRA, M. R.; BONACORSO, H. G.; ZANATTA, N.; MARTINS, M. A. P.; MELLO, C. F. Hypothermic and antipyretic effects of 3-methyl- and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboxyamides in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, **451**: 141-147, 2002.
- SPENCER, C. M.; WILDE, M. I. Diacerein. **Drugs**, **53**: 98-106, 1997.

- STADLER, J.; STEFANOVIC-RACIC, M.; BILLIAR, T. R.; CURRAN, R. D.; McINTYRE, L. A.; GEORGESCU, H. I.; SIMMONS, R. L.; EVANS, C. H. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, **147**: 3915-3920, 1991.
- STEINER, A. A.; BRANCO, L. G. S. Nitric oxide in the regulation of body temperature and fever. **J. Therm. Biol.**, **26**: 325-330, 2001.
- STITT, J. T. Prostaglandin E as the neural mediator of the febrile response. **Yale J. Biol. Med.**, **59**: 137-149, 1986.
- STITT, J. T.; SHIMADA, S. G. A comparison of the febrile responses of the Brattleboro and Sprague-Dawley strains of rats to endotoxin and endogenous pyrogens. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **65**: 1377-1381, 1987.
- STUCHR, D. J.; MARLETTE, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82**: 7738-7742, 1985.
- STUCHR, D. J.; MARLETTE, M. A. Induction of nitrite/ nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon- γ . **J. Immunol.**, **39**: 518-525, 1987.
- STYRT, B.; SUGARMAN, B. Antipyresis and Fever. **Arch. Intern. Med.**, **150**: 1589-1597, 1990.
- SZELÉNYI, Z; SZÉKELY, M.; BALASKÓ, M. Role of substance P (SP) in the mediation of endotoxin (LPS) fever in rats. In: BLATTEIS, C.M. (Ed). Thermoregulation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **813**: 316-323, 1997.
- TAMURA, T.; OHMORI, K. Diacerein suppresses the increase in plasma nitric oxide in rat adjuvant-induced arthritis. **Eur. J. Pharmacol.**, **419**: 269-274, 2001.
- TAMURA, T.; SHIRAI, T.; KOSAKA, N.; OHMORI, K.; TAKAFUMI, N. . Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. **Eur. J. Pharmacol.**, **448**: 81-87, 2002.

- TAVARES, E.; MIÑANO, F. J. Rantes: a new prostaglandin dependent endogenous pyrogen in the rat. **Neuro Pharmacol.**, **39**: 2505-2513, 2000.
- TEDDER, T. F.; STEEBER, D. A.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. **FASEB J.**, **9**: 866-873, 1995.
- THOMPSON, C. I.; BRANNON, A. J.; HECK, A. L. Emotional fever after habituation to temperature-recording procedure. *Physiol. Behav.*, **80**: 103-108, 2003.
- TOCCO-BRADLEY, R.; KLUGER, M. T.; KAUFFMAN, C. A. Effect of age on fever and acute phase response of rats to endotoxin and *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immunol.**, **47**: 106-111, 1985.
- TOMAZETTI, J.; ÁVILA, D.; FERREIRA, A. P. O.; MARTINS, J. S.; SOUZA, F. R.; ROYER, C.; RUBIN, M. A.; OLIVEIRA, M. R.; BONACORSO, H. G.; MELLO, C. F. Baker Yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. *Journal of Neuroscience Methods*, 2005. IN PRESS.
- TURRIN, N. P.; PLATA-SALAMÁN, C. R. Cytokine-cytokine interaction and the brain. **Brain Res. Bull.**, **51**: 3-9, 2000.
- USHIKUBI, F.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; MURATA, T.; MATSUOKA, T.; KOBAYASHI, T.; HIZAKI, H.; TUBOI, K.; KATSUYAMA, M.; ICHIKAWA, A.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; NARUMIYA, S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP₃. **Nature**, **395**: 281-284, 1998.
- VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **38**: 97-120, 1998.
- VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **J. Rheumatol.**, **25**: 9-21, 1996.
- WATKINS, L. R.; MAIER, S. F.; GOEHLER, L. E. Cytokine-to-brain communication: a review and analysis of alternative mechanism. **Life Sci.**, **57**: 1011-1026, 1995.

YARON, M.; SHIRAZI, I.; YARON, I. Effets anti-interleukine 1 de la diacérhéine in vitro. **Rev. Prat.**, **47**: 20-23, 1997.

YARON, M.; SHIRAZI, I.; YARON, I. Anti-interleukin-1 effects of diacerein and rhein in human osteoarthritic synovial tissue and cartilage cultures. **Osteoarthr. Cartil.**, **7**: 272-280, 1999.

ZAMPRONIO, A. R.; SOUZA, G. E. P.; SILVA, C. A. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. **Am. J. Physiol.**, **266**: R1670-R1674, 1994.

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