

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPOALGESIA
INDUZIDA POR INIBIDORES SELETIVOS DE
CICLOOXIGENASE-2 EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO
EM PATA DE RATOS**

Dorothea Schmidt França

Belo Horizonte

- 2007 -

DOROTHÉA SCHMIDT FRANÇA

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPOALGESIA
INDUZIDA POR INIBIDORES SELETIVOS DE
CICLOOXIGENASE-2 EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO
EM PATA DE RATOS**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito parcial à
obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dra. Janetti Nogueira de Francischi

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas

2007

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com o apoio financeiro da CAPES, CNPq e Fapemig.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. OBJETIVOS.....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4. RESULTADOS.....	65
5. DISCUSSÃO.....	117
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
7. ANEXOS	

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho,

A Deus, presença constante em minha vida, bênçãos concedidas, este olhar
desconcertante, deixando-me sem jeito ao dizer que me ama. "Quando a noite esconde a
luz, Deus acende as estrelas".

Aos meus filhos, Gabriel e Miguel, que participaram de todos os meus sonhos. Para

vocês fico sem palavras...

Pensei em tudo que é possível falar
que sirva apenas para nós dois (quatro, né!)

Sinais de bem, desejos vitais

Pequenos fragmentos de luz

Falar da cor dos temporais
do céu azul, das flores de abril

Pensar além do bem e do mal

Lembrar de coisas que ninguém viu

O mundo lá sempre a rodar

e em cima dele tudo vale

Quem sabe isso quer dizer amor?

(Milton Nascimento)

AGRADECIMENTOS

Como já dizia o escritor norte-americano *Ambrose G. Bierce* “Nenhuma obrigação é mais urgente do que retornar agradecimentos”.

Assim meus sinceros e carinhosos agradecimentos,

À Prof. Dra. Janetti Nogueira de Francischi, pela grande oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela orientação e pelo espírito cientista. Pela sua permanente disponibilidade e paciência, exemplo de profissionalismo, mesmo em momentos difíceis, onde me ajudou a superar todos os obstáculos. Seus ensinamentos não só científicos, mas também de vida foram preciosos. Aprendi com você que “Nunca se deve engatinhar quando o impulso é voar” (Helen Keller).;

Aos membros julgadores da tese, Prof. Dr. Marco Aurélio Martins, Prof^a Dr^a Sandra Oliani, Prof^a Dr^a Denise Carmona e Prof. Dr. Igor Dimitri Duarte, pela leitura desta pró-forma, pelas valiosas sugestões e correções. Elas serão bem-vindas!

À CAPES, CNPq e FAPEMIG que colaboraram financeiramente com o projeto e pela concessão de bolsa durante o período de doutoramento;

Aos Professores do departamento de morfologia, Prof^ª Dr^a Rosa Arantes e Prof. Dr. Greg Kitten por permitirem a realização dos experimentos de imunocitoquímica, pelo apoio técnico e pelos valiosos ensinamentos. Agradeço ao aluno André e Camila pela ajuda e dedicação na microscopia confocal e cultura de neurônios;

Aos professores do Departamento de Farmacologia pelos ensinamentos passados em suas disciplinas e pelo apoio técnico oferecido. Um agradecimento especial à Prof^ª Dr^a Maria Salete, Prof^ª Dr^a Andréa e Prof. Dr. Igor pela participação na minha banca de qualificação, orientações científicas e pelo alegre convívio durante o período que morei em BH;

Ao Prof. Dr. Rômulo e Prof. Dalton pelos ensinamentos, pela disponibilidade em realizar experimentos em seus laboratórios e fornecimento de drogas para as pesquisas.

Ao pesquisador do Imperial College Mick Bakhle, pelo fornecimento do SC 236 para os experimentos, correção de artigos, resumos de congressos, orientações aqui no Brasil e também à distância.

Às amigas Júlia e Daniela Alves, pelo apoio, disposição em ajudar de alguma forma, pelo companheirismo e amizade. A vida sempre encarrega de me apresentar pessoas como vocês! Obrigada mesmo!!!

Aos meus colegas e amigos do laboratório, Gustavo, Cíntia, Rafael, Patrícia. Pelas incansáveis conversas, pelas palavras encorajadoras;

Aos colegas do laboratório de analgesia e dor, pela alegre convivência durante este período;

A Webster, por todo suporte técnico e organização. Suporte que permitiu que este trabalho fosse desenvolvido com qualidade;

Ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas –Fisiologia e Farmacologia pela oportunidade. Agradeço à Celinha pela ajuda na parte burocrática.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para concretização desta etapa da minha vida e que, por ventura não foram citados, o meu muito obrigado.

“O bom da vida é quando percebemos que nós nos misturamos com outras pessoas ao longo de nossas vidas, que não ficamos sozinhos, isolados. Somos como uma palavra,

cada palavra de uma frase representa um de nós, quando nos unimos as outras pessoas, nos tornamos uma frase, uma oração, algo que passa a fazer diferença no mundo, algo que nos ajuda a ser melhor.”

“Há algo mais interessante que as mais belas descobertas:

é o conhecimento da maneira pela qual são feitas”.

Leibniz

“Eu escrevo sem esperança de que o que eu escrevo altere qualquer coisa.

Não altera nada...Porque no fundo a gente não está querendo
alterar as coisas. A gente está querendo desabrochar de um modo ou de
outro...”

Clarice Lispector

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho foi compreender os mecanismos envolvidos na resposta hipoalgésica induzida por inibidores seletivos de COX-2 (ICOX-2). A hiperalgésia, em patas de ratos, induzida por carragenina (250 µg) foi revertida pelo pré-tratamento com os inibidores seletivos de COX-2, celecoxibe e SC 236. Estes inibidores elevaram o limiar nociceptivo acima do normal e foi chamada de hipoalgésia. Este efeito foi observado em diferentes linhagens de ratos (Holtzman, Wistar e Sprague-Dawley) e em diferentes vias de administração do inibidor de COX-2 (local ou sistemicamente). O inibidor seletivo de COX-1 SC 560 (1, 5 e 10 mg/Kg) reduziu a hiperalgésia, porém não induziu a hipoalgésia e não afetou o edema de pata. A hipoalgésia apareceu mesmo quando o estímulo hiperalgésico foi a PGE₂ (200ng/pata). Esses resultados em conjunto sugeriram que a hipoalgésia não está relacionada com a síntese de prostaglandinas. O pré-tratamento com os inibidores da NO sintase L-NAME e L-NMMA revertem a hiperalgésia e reduziram a hipoalgésia, mostrando a contribuição do óxido nítrico nesta resposta. O antagonista de receptor opióide naltrexona (3 mg/Kg) não afetou a hiperalgésia induzida por carragenina em animais controles, porém reverteu a hipoalgésia induzida pelos ICOX-2 celecoxibe, rofecoxibe, SC 236. O efeito antinociceptivo da indometacina não foi alterado pela naltrexona. Em ratos tolerantes à morfina, o efeito hipoalgésico do SC 236 foi abolido, porém o efeito antinociceptivo da indometacina e SC 560 ficaram inalterados. Neste modelo de hiperalgésia, o efeito hipoalgésico induzido por ICOX-2 envolve a participação de

opióides endógenos. Com o objetivo de observar se elementos do citoesqueleto estariam envolvidos com o efeito hipoalgésico, desestabilizadores de microtúbulos foram utilizados. O paclitaxel (taxol), a colchicina e o nocodazol reverteram a hipoalgesia por celecoxibe de forma dose-dependente. Utilizando técnica de imunocitoquímica e microscopia confocal visualizou-se neurônios sensitivos (α -tubulina) com inibidores seletivos e não seletivos de ciclooxigenase. Foram observados pontos de interrupção nos prolongamentos e redução da fluorescência em células tratadas com ICOX-2, mostrando que estes inibidores provavelmente atuam na estrutura do microtúbulo e esta alteração poderia estar relacionada com a hipoalgesia. Nós concluímos que a resposta hipoalgésica induzida por ICOX-2 está envolvida com a participação de opióides endógenos, com a contribuição de óxido nítrico. A interação dos coxibes e agentes perturbadores do citoesqueleto ficou evidente.

PALAVRAS-CHAVE: inibidores de COX-2, hiperalgesia, hipoalgesia, opióides, microtúbulos.

ABSTRACT

The aim of this work was elucidated the mechanism involved in hypoalgesic response induced by selective inhibitors of COX-2 (ICOX-2). Hyperalgesia induced by carrageenan (250 µg) was modified by pre-treatment with three selective inhibitors of COX-2, celecoxib e SC 236. These inhibitors raised the nociceptive threshold above the normal and was called hypoalgesia. This effect was observed in different strains of rat (Holtzman, Wistar and Sprague-Dawley) and different modes of administration of the inhibitor of COX-2 (locally or systemically). A selective inhibitor of COX-1 SC 560 (1, 5 and 10 mg/Kg) reduced the hyperalgesia, but did not induced hypoalgesia and did not affect paw oedema. The hypoalgesia was induced when the hyperalgesic stimuli was PGE₂ (200ng/pata). This results suggested that hypoalgesia did not envolved the synthesis of prostaglandins. Pre-treatment with inhibitors of synthase NO L-NAME e L-NMMA reverted the hyperalgesia and reduced the hypoalgesia, showing the contribution of nitric oxide in this response. The antagonist of opioid receptor naltrexone (3 mg/Kg) did not affect the hyperalgesia induced by carrageenan in control animals, however, abolished the hypoalgesia induced by ICOX-2 celecoxib, rofecoxib, SC 236. The antinociceptive effect of indometacin did not affect by naltrexone. In rats tolerant to the morphine, the hypoalgesic effect by SC 236 was abolished, however the antinociceptive effect by indometacin and SC 560 were unaffected. In this model of hyperalgesia, the effect hypoalgesic induced by ICOX-2 envolved the participation of endogenous opioids. With the aim to observe if the microtubule was envolved with

hypoalgesic, drug which affect microtubule was used. Paclitaxel (taxol), colchicina and nocodazol reverted the hypoalgesia induced by celecoxib. Using imunohistochemistry techniques and confocal microscopic, was observed sensitive neurons (α -tubuline) treated with selective or not-selective inhibitors of cyclooxygenases. Was observed points of interruption on prolongaments and reduced of fluorescence in cells treated with ICOX-2, showing that inhibitors probably affect the structure of microtubule and this effect could was relationed with hypoalgesia. We conclude that the hypoalgesic response induced by ICOX-2 was involved endogenous opioids with contribution of nitric oxide. The interaction of coxibs and perturbing agents of microtubules was evidenced.

KEY WORDS: inhibitors of COX-2, hyperalgesia, hypoalgesia, opioids, microtubule.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -Representação dos vários mediadores inflamatórios liberados após uma lesão tecidual, que sensibilizam as terminações nervosas, causando a hiperalgesia.....	25
FIGURA 2 - Biossíntese das Prostaglandinas.....	28
FIGURA 3 - Aparelho algosimétrico da Ugo Basile.....	53
FIGURA 4 - Obtenção das medidas de edema usando o hidropletismômetro.....	56
FIGURA 5 -Injeção intraplantar.....	63
FIGURA 6 – Cultura A de neurônios sensitivos que foi tratada com veículo ou salina.....	109
FIGURA 7 – Cultura B de neurônios sensitivos que foi tratada com veículo ou salina.....	110
FIGURA 8 - Cultura de neurônios sensitivos que foram tratados com SC 236.....	111
FIGURA 9 - Cultura de neurônios sensitivos que foram tratados com rofecoxibe (A e B).....	112
FIGURA 10 - Cultura de neurônios sensitivos que foram tratados com SC 560 (A e B).....	113
FIGURA 11 - Cultura de neurônios sensitivos que foram tratados com piroxicam (A e B).....	114
FIGURA 12 - Cultura de neurônios sensitivos que foram tratados com colchicina (A e B).....	115

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Identificação de hiperalgesia em ratos injetados com carragenina. e hipotalgesia induzida por inibidores seletivos de COX-2.....	55
GRÁFICO 2 - Hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de diferentes doses de carragenina (CG) em ratos.....	67
GRÁFICO 3 - Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses de carragenina por carragenina (CG) em ratos.....	68
GRÁFICO 4 - Efeito do inibidor de COX-2 (SC 236, 12 mg/Kg, s.c) na hiperalgesia induzida por carragenina em ratos de diferentes linhagens.....	71
GRÁFICO 5 - Efeito do inibidor de COX-2 (SC 236, 12 mg/kg; s.c) no edema de pata induzido por carragenina em ratos de diferentes linhagens.....	72
GRÁFICO 6 – Efeito da administração intraplantar de celecoxibe e SC 236 sobre a hiperalgesia induzida por carragenina.....	74
GRÁFICO 7 – Efeito da administração intraplantar de celecoxibe e SC 236 sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	75
GRÁFICO 8 - Efeito do SC 560 sobre a hiperalgesia induzida por carragenina.....	78
GRÁFICO 9 - Efeito do SC 560 sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	79
GRÁFICO 10 - Hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de PGE ₂ em ratos.....	81
GRÁFICO 11 -Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de PGE ₂ em ratos...	82
GRÁFICO 12 - Efeito do celecoxibe (12 mg/Kg, s.c) na hiperalgesia induzida por PGE ₂ em ratos.....	83
GRÁFICO 13 - Efeito do celecoxibe (12 mg/Kg, s.c) no edema de pata induzido por PGE ₂ em ratos.....	84
GRÁFICO 14 - Efeito da administração oral de L-NAME (30 mg/Kg, oral) sobre a hipotalgesia induzida por celecoxibe.....	86

GRÁFICO 15 - Efeito da administração oral de L-NAME (30 mg/Kg, oral) sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	87
GRÁFICO 16 - Efeito da administração oral de L-NMMA (10 mg/Kg, SC) sobre a hipotalgesia induzida por celecoxibe.....	89
GRÁFICO 17 - Efeito da administração oral de L-NMMA (10 mg/Kg, sc) sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	90
GRÁFICO 18 - Efeito de Naltrexona sobre a hipotalgesia induzida por celecoxibe.....	92
GRÁFICO 19 - Efeito de Naltrexona sobre a hipotalgesia induzida por SC 236.....	93
GRÁFICO 20 – Efeito de Naltrexona sobre a hipotalgesia induzida por rofecoxibe.....	94
GRÁFICO 21 –Efeito de Naltrexona sobre o efeito antinociceptivo induzido por indometacina.....	95
GRÁFICO 22 – Desenvolvimento de tolerância à morfina e a resposta em ratos tratados com SC 236.....	97
GRÁFICO 23 – Desenvolvimento de tolerância à morfina e a resposta em ratos tratados com SC 560 ou indometacina.....	98
GRÁFICO 24 – Efeito do paclitaxel (taxol) na hipotalgesia induzida por celecoxibe.	100
GRÁFICO 25 – Efeito da administração intraplantar de paclitaxel (taxol) sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	101
GRÁFICO 26 – Efeito da colchicina na hipotalgesia induzida por celecoxibe.....	103
GRÁFICO 27 – Efeito da administração intraplantar de colchicina sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	104
GRÁFICO 28 – Efeito do nocodazol na hipotalgesia induzida por celecoxibe.....	106
GRÁFICO 29 – Efeito da administração intraplantar de nocodazol sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	107
GRÁFICO 30 - Quantificação da fluorescência no corpo celular (A) e em axônio (B) dos neurônios sensitivos cultivados com inibidores de ciclooxigenases ou colchicina	117

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Resumo dos protocolos experimentais.....64

TABELA 2 - Administração de celecoxibe na pata contralateral não induz hipoalgesia em ratos.....76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

AC ⇒ adenililciclase

ADRAC ⇒ Adverse Drug Reactions Advisory Committee

AINE ⇒ antiinflamatórios não esteróides

AMPc ⇒ 3'5'-adenosina-monofosfato cíclico

CEBIO ⇒ Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Cg ⇒ carragenina

CLASS ⇒ Celecoxib Long-Term Arthritis Safety Study

COL ⇒ colchicina

COX ⇒ ciclooxigenase

Cx ⇒ celecoxibe

E.P.M. ⇒ Erro padrão da média

g ⇒ Gramas

GABA ⇒ Ácido γ -aminobutírico

GMPc ⇒ 3'5'-guanosina monofosfato cíclico

Gs ⇒ Proteína regulatória estimulatória

HEPES ⇒ ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico

IASP ⇒ Associação Internacional para Estudo da Dor

ICOX-2 ⇒ inibidor de ciclooxigenase 2

IL ⇒ interleucina

INDO ⇒ indometacina

ipl ⇒ Intraplantar

L-NIO \Rightarrow N-iminoetil- L-ornitina

L-NMMA \Rightarrow N^G-monometil-L-arginina

L-NAME \Rightarrow N^G nitro -L- arginina metil ester

LPS \Rightarrow lipopolissacarídios

MEM \Rightarrow Minimum Essential Medium

mg \Rightarrow miligramas

mL \Rightarrow mililitros

NAL \Rightarrow Naltrexona

NCZ \Rightarrow nocodazol

NO \Rightarrow Óxido nítrico

NO-sintase \Rightarrow Óxido nítrico sintase

PGE₁ \Rightarrow Prostaglandina E₁

PGE₂ \Rightarrow Prostaglandina E₂

PGG \Rightarrow prostaglandina G

PGH \Rightarrow prostaglandina H

PGI \Rightarrow prostaciclina

PGs \Rightarrow prostaglandinas

PK-A \Rightarrow Proteína quinase dependente de AMPc

PK-C \Rightarrow Proteína quinase C

PPARs \Rightarrow receptores ativadores de proliferação do peroxissomo

ROFE \Rightarrow rofecoxibe

SAL \Rightarrow Salina

s.c. \Rightarrow subcutânea

SFB \Rightarrow soro fetal bovino

SNC \Rightarrow Sistema Nervoso Central

TNF α \Rightarrow fator de necrose tumoral α

TXA₂ ⇒ tromboxana

Tx ⇒ taxol

Veic ⇒ Veículo

VIGOR ⇒ Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial ou de fato (IASP, 1986). Sendo, portanto uma percepção subjetiva e com aspectos psicológicos.

A dor possui dois componentes: o perceptivo-discriminativo, que permite identificar o estímulo doloroso e localizar o ponto onde a lesão ocorreu, e a reação à dor, que compreende respostas simples como a retirada do segmento lesado até respostas emocionais complexas, além de inatas de cada espécie e envolvem aprendizagem e memória.

Normalmente, quando as fibras aferentes são ativadas por um estímulo breve e de alta intensidade, a dor resultante funciona como um aviso fisiológico. No entanto, durante o processo inflamatório, as fibras aferentes são ativadas por estímulos de menor intensidade e a dor produzida difere em magnitude e pode ser mais persistente (DRAY, 1995).

A percepção pelos nociceptores de uma injúria tecidual e a transmissão desses sinais ao sistema nervoso central constitui o processo de nocicepção. É proposto, dessa forma, a utilização do termo nocicepção para animais de experimentação em substituição ao termo dor, mais indicado para seres humanos visto que nesses há como discriminar o componente emocional (NOBACK *et al.*, 1996).

A nocicepção envolve a transmissão de sinais específicos e geração de potencial de ação pelos nociceptores, cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios da raiz

dorsal e gânglio trigeminal (JULIUS & BASBAUM, 2001; BASBAUM & JESSEL, 2000).

A informação nociceptiva é convertida em potenciais de ação pelos nociceptores (transdução) e transmitida pelos nervos espinais e cranianos à medula espinal e tronco encefálico respectivamente. Os nociceptores são terminações livres de neurônios pseudo-unipolares, cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios das raízes dorsais da medula espinal e nos gânglios trigeminais (KANDEL *et al.*, 2000). As fibras aferentes primárias que conduzem a informação nociceptiva possuem pequeno diâmetro e são classificadas em fibras A δ , pouco mielinizadas, e fibras C, não mielinizadas. As fibras C respondem a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica ou química sendo chamadas por esta razão, de polimodais. As fibras A δ , respondem a estímulos nocivos térmicos e mecânicos (BASBAUM & JESSEL, 2000). Uma outra classe de nociceptores, chamados silenciosos. Esses nociceptores referem-se a um conjunto de fibras C, não mielinizadas, presentes na pele, articulações e vísceras, as quais normalmente não respondem a estímulos mecânicos e térmicos. Sob condições inflamatórias e de injúria tecidual esses nociceptores são sensibilizados e ativados por vários mediadores químicos (MILLAN, 1999; SCHAIBLE & SCHMIDT, 1998; HABLER *et al.* 1990).

Na medula espinal, os neurônios primários fazem sinapses com neurônios no corno dorsal que, por sua vez, transmitem a informação nociceptiva para centros cerebrais, incluindo a formação reticular, tálamo e finalmente córtex cerebral (BASBAUM & JESSEL, 2000).

1.2 HIPERALGESIA

A hiperalgesia é o aumento da sensação dolorosa por estímulos nocivos aplicados em tecidos periféricos. As características da hiperalgesia são: um estado de sensibilidade alterado, diminuição do limiar doloroso e um aumento na dor induzida por estímulos nociceptivos (RAJA *et al.*, 1999; HARDY *et al.*, 1967).

A idéia atual é que a hiperalgesia resulta da sensibilização de neurônios primários e secundários associados com a transmissão de dor e esses últimos aumentam a resposta nociceptiva para estímulos nocivos e não nocivos (AANONSESN *et al.*, 1990; SHER & MITCHELL, 1990). O aumento da resposta dolorosa em nível do corno dorsal da medula, por mediadores excitatórios liberados na sinapse central capazes de ampliar a resposta dolorosa é conhecido como “wind up” ou facilitação neuronal (REN & DUBNER, 1993; MURRAY *et al.* 1991; AKERMAN *et al.*, 1982).

A sensibilização dos nociceptores é o denominador comum após uma lesão ou inflamação e resulta da liberação de mediadores originados de diferentes células. Entre estes, pode-se citar a bradicinina, prostaglandinas (PGs), leucotrienas, serotonina, histamina, substância P, tromboxanas, fator de ativação de plaquetas, prótons e radicais livres. Citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF α) também são produzidas durante a inflamação (figura 1). Alguns destes agentes podem sensibilizar ou até mesmo ativar direta ou indiretamente os nociceptores (para revisão ver RAJA *et al.*, 1999).

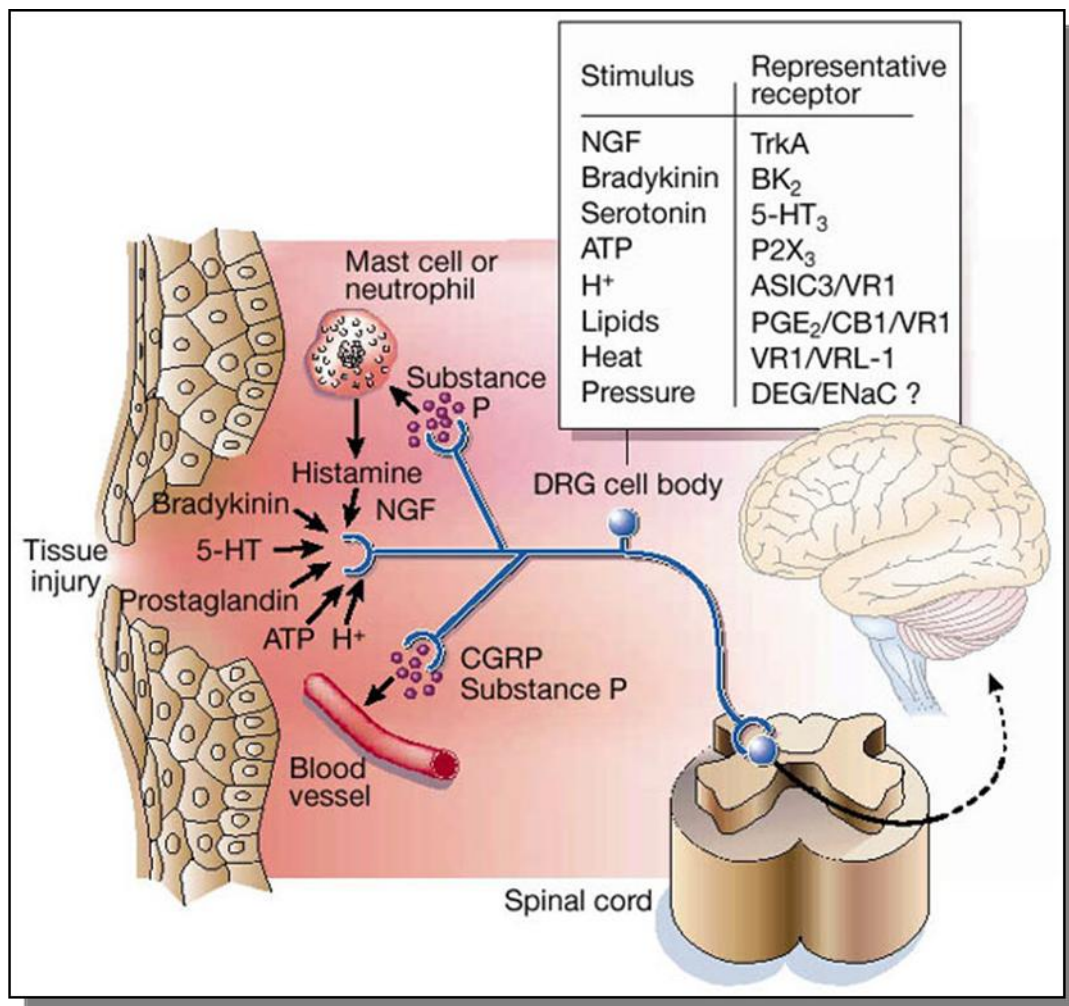


Figura 1 – Representação dos vários mediadores inflamatórios liberados após uma lesão tecidual, que sensibilizam as terminações nervosas, causando a hiperalgesia. (Extraído de JULIUS & BASBAUM, 2001)

Vários estudos demonstram que as PGs, principalmente da série E, são mediadores que causam hiperalgesia por meio de sítios específicos de ligação (receptores) nos terminais aferentes primários (Tyers & Haywood, 1979). Sua administração não provoca dor declarada (Crunkhorn & Willis, 1971), mas diminui

o limiar nociceptivo em testes comportamentais em animais (Taiwo & Levine, 1989; Taiwo et al., 1987; Ferreira & Nakamura, 1979).

A bradicinina foi estudada por Ferreira e colaboradores (1993), e os resultados demonstraram que é um potente agente hiperalgésico e está presente na inflamação induzida por carragenina. Contribui indiretamente para a dor inflamatória pela estimulação da liberação de PGs e aminas simpaticomiméticas a partir da ação de citocinas hiperalgésicas (FERREIRA *et al*, 1993).

Foram descritas várias citocinas com atividade hiperalgésica como a interleucina (IL) -1, talvez a primeira citocina descrita como hiperalgésica (FERREIRA *et al*, 1988), TNF- α , IL-2, IL-6 e IL-8 (DAVIS & PERKINS, 1994; CUNHA *et al*, 1992). Entretanto, outras citocinas como IL-4 e IL-10, tem demonstrado uma capacidade em limitar a hiperalgesia inflamatória pela inibição da produção de citocinas e PG`s (POOLE *et al*, 1995). Pequenos neurônios (interneurônios), que contém encefalinas ou ácido γ -aminobutírico (GABA), fazem sinapses inibitórias com neurônios primários e secundários existentes na superfície da medula espinhal constituindo uma outra fonte de modulação da hiperalgesia.

1.3 PROSTAGLANDINAS

Os compostos da família das prostaglandinas e das leucotrienas são denominadas eicosanóides, derivadas de ácidos graxos essenciais esterificados em fosfolipídios da membrana celular, em particular o ácido 5, 8, 11, 14 eicosatetraenóico, ou ácido araquidônico. A síntese dos eicosanóides pode ser desencadeada por diversos estímulos que ativam receptores de membrana, acoplados a uma proteína regulatória ligada a um nucleotídeo guanínico (proteína G), resultando na ativação da fosfolipase A₂

ou elevação da concentração intracelular do Ca^{2+} . A fosfolipase A_2 hidrolisa fosfolipídios da membrana, particularmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, liberando o ácido araquidônico. A PGE_2 induz hiperalgesia por meio da ativação da via adenililciclase (AC) - 3'5'-adenosina-monofosfato cíclico (AMPC) - proteína quinase A (PKA). A ativação da AC ocorre via proteína G regulatória estimulatória (Gs) (TAIWO & LEVINE, 1989b). Estudos demonstram que por meio do aumento da concentração de AMPC e ativação da PKA, as prostaglandinas ativam correntes de sódio resistentes à tetrodotoxina, inibem correntes de potássio dependentes de voltagem e aumentam correntes de cálcio dependente de voltagem, levando a uma diminuição do limiar nociceptivo (ENGLAND *et al.*, 1996; GOLD *et al.*, 1996; VANEGAS & SCHAIBLE, 2001; JULIUS & BASBAUM, 2001; BASBAUM & WOOLF, 2001).

O ácido araquidônico liberado serve como substrato para duas vias enzimáticas distintas: a via das ciclooxygenases, que desencadeia a biossíntese das prostaglandinas e da tromboxana, e a via das lipoxigenases, responsável pela síntese das leucotrienas, lipoxinas e outros compostos (figura 2) (SAMUELSSON *et al.*, 1975).

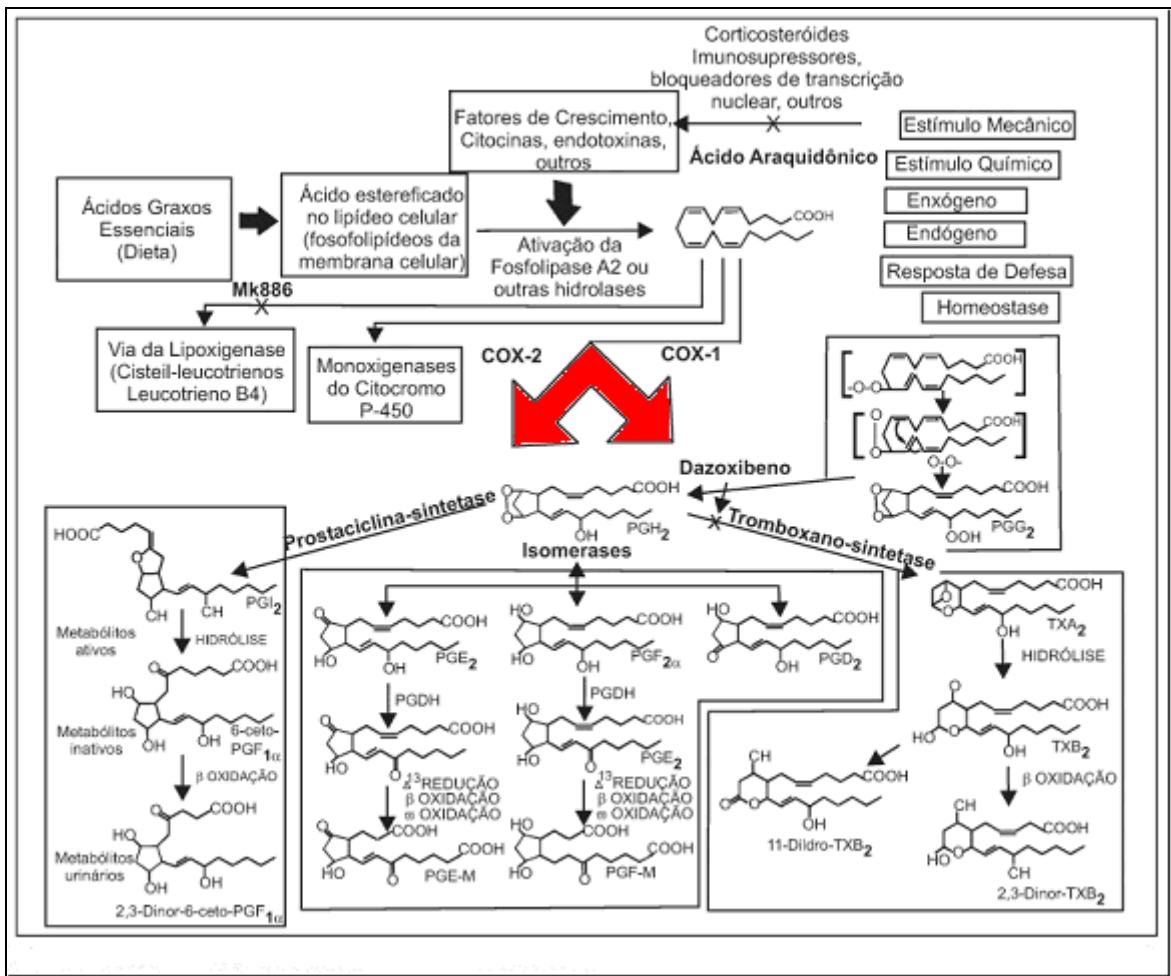


FIGURA 2 – Biossíntese das Prostaglandinas (Adaptado de VANE *et al.*, 1998).

A existência de uma isoforma induzida da COX foi inicialmente descrita por Needleman e colaboradores, os quais demonstraram a sua indução por estímulos inflamatórios e por citocinas (RAZ *et al.*, 1989). Em virtude das características distintas de sua expressão, a existência das isoformas COX-1 e COX-2 foi confirmada (MITCHEL *et al.*, 1993; XIE *et al.*, 1991; RAZ *et al.*, 1989). A COX-1 é expressa constitutivamente, ou seja, está presente nas células em condições fisiológicas, principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins. A COX-2 pode ser induzida na presença de citocinas (IL-1, IL-2 e TNF α), ésteres do forbol, fatores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa caracteristicamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos. Por outro lado, a expressão da COX-2 pode ser inibida por glicocorticóides, IL-4, IL-13 e IL-10,

enquanto a PGE₂ promove aumento da regulação (*up-regulation*) na expressão da COX-2 (FITZGERALD & PATRONO, 2001; MORISSET *et al.*, 1998; JOUZEAU *et al.*, 1997; VANE & BOTTING, 1995; KUJUBU *et al.*, 1991; RAZ *et al.*, 1989).

A COX-1 e a COX-2 são proteínas integrais que se localizam dentro do folheto interno da bicamada lipídica de fosfolípidos da membrana celular. O número de aminoácidos que compõe as duas isoenzimas é bastante semelhante, com 599 aminoácidos para a COX-1 e de 604 aminoácidos para a COX-2 (JOUZEAU *et al.*, 1997). A estrutura das ciclooxigenases consiste de três domínios distintos: um domínio amino terminal, seguido por domínio de ligação da membrana e domínio catalítico carboxílico terminal, que contém os centros de atividade ciclooxigenase e peroxidase. A COX-1 contém uma seqüência de 17 aminoácidos em sua cadeia peptídica amino-terminal, que não está presente na COX-2, enquanto a COX-2 tem uma inserção adicional de 18 aminoácidos em sua terminação carboxila. A seqüência remanescente da COX-1 e COX-2, entretanto, é cerca de 60% idêntica e todos os resíduos identificados como essenciais para a atividade catalítica são conservados (HINZ & BRUNE, 2002; CRYER & DUBOIS, 1998; VANE *et al.*, 1998; CROFFORD *et al.*, 1997; KURUMBAIL *et al.*, 1996; KUJUBU *et al.*, 1991).

As ciclooxigenases possuem duas atividades distintas. Uma atividade de endoperóxido redutase que forma o endoperóxido cíclico PGG (prostaglandina G), e uma outra atividade peroxidase que converte o PGG em H (PGH). A PGH apresentam pouca atividade e serve como substrato para a formação de diferentes prostaglandinas e tromboxana ativas, incluindo PGD₂, PGE₂, PGF₂□, prostaciclina (PGI₂) e tromboxana (TX) (KULKARNI *et al.*, 2000; CROFFORD *et al.*, 1997; JOUZEAU *et al.*, 1997; KURUMBAIL *et al.*, 1996; DEWITT & SMITH, 1988). As isoformas COX-1 e COX-2

apresentam homologia genética de cerca de 60% em suas regiões codificantes, e seus genes estão localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente (KULKARNI *et al.*, 2000; VANE *et al.*, 1998; JOUZEAU *et al.*, 1997).

As prostaglandinas, formadas a partir da ação das ciclooxigenases, ligam-se a receptores prostanóides que se encontram localizados na membrana celulares. Estes receptores já foram clonados e estão organizados em cinco grupos de acordo com a PG com os quais eles apresentam maior afinidade, designados de DP (PGD₂), FP (PGF₂), IP (PGI₂), TP (TXA₂) e EP (PGE₂). Embora a maioria dos receptores das prostaglandinas seja receptores de superfície da membrana celular, alguns podem estar localizados na membrana nuclear, cujos ligantes atuam como fatores de transcrição, alterando a expressão gênica celular. Mais recentemente, foi demonstrado que determinados eicosanóides são ligantes endógenos de uma família de receptores nucleares denominada de receptores ativadores de proliferação do peroxissomo (PPARs - *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*), que regulam o metabolismo lipídico, a diferenciação e proliferação celular. São conhecidos atualmente três isoformas do receptor PPAR, denominadas de α , δ e γ (MORROW & ROBERTS, 2001; HLA *et al.*, 1999; DEVCHAND *et al.*, 1996).

A COX-3, uma variante da COX-1 (pois é derivada do mesmo gene dessa isoforma), encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração, sendo mais sensível ao acetaminofeno (paracetamol) do que a COX-1 e COX-2. Levantou-se a hipótese que a inibição da COX-3 poderia representar o mecanismo central primário pelo qual as drogas analgésicas e antipiréticas do tipo AINE desenvolveriam suas atividades de redução da dor e da febre (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

1.4 AÇÕES FISIOLÓGICAS E PATOLÓGICAS DAS PROSTAGLANDINAS

As prostaglandinas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo, por exemplo, vasodilatação ou vasoconstrição; contração ou relaxamento da musculatura brônquica ou uterina; hipotensão; ovulação; metabolismo ósseo; aumento do fluxo sanguíneo renal (resultando em diurese, natriurese, caliurese e estimulação da secreção de renina); proteção da mucosa gástrica e regulação do fluxo sanguíneo local; inibição da secreção ácida gástrica; crescimento e desenvolvimento neural; resposta imunológica; hiperalgesia; regulação da atividade quimiotáxica celular; resposta endócrina; angiogênese; progressão metastásica, febre, dentre outras (WILLOUGHBY *et al.*, 2000; FERREIRA & VANE 1979; MONCADA *et al.*, 1978; MONCADA & VANE, 1978; FISCHER & GROSS, 1977; PIPER & VANE, 1971).

Na maioria dos leitos vasculares a PGE₂ é uma potente prostaglandina vasodilatadora. A atividade vasodilatadora envolve principalmente arteríolas, esfíncteres pré-capilares. A PGD₂ causa geralmente vasodilatação na vasculatura mesentérica, coronariana e renal, e vasoconstrição na circulação pulmonar. A PGI₂ é um eficiente vasodilatador, podendo causar importante hipotensão arterial, enquanto o TXA₂ apresenta potente atividade vasoconstritora. No sangue, as prostaglandinas modulam também a função plaquetária. A PGE₂, PGD₂ e a PGI₂ são inibidoras da agregação de plaquetas, ao passo que o tromboxano A₂ é forte indutor da sua agregação. A PGI₂ é sintetizada pelo endotélio vascular, controlando a adesão de células ao endotélio e a agregação plaquetária, contribuindo como mecanismo antitrombogênico da parede vascular intacta (MONCADA & VANE, 1978).

As PGEs e as prostaciclina PGI₂ inibem a secreção ácida gástrica, reduzem o volume de secreção, a acidez, conteúdo de pepsina e também aumenta a secreção de

mucosa no estômago e intestino delgado. Estes efeitos ajudam a manter a integridade da mucosa gástrica, conferem proteção às células epiteliais e são referidos como propriedades citoprotetoras das prostaglandinas sintetizadas pela COX-1. Os efeitos adversos gastrintestinais dos AINE estão associados à supressão da atividade da COX-1, resultando em lesão gástrica, hemorragia e ulceração (MORROW & ROBERTS, 2001; COHN *et al.*, 1997; PIPER & VANE, 1971).

As prostaglandinas também influenciam a distribuição do fluxo sanguíneo renal, reabsorção de sódio e água e liberação de renina. A PGI₂, PGE₂ e PGD₂ determinam secreção de renina no córtex renal, provavelmente por efeito direto nas células glomerulares. A COX-2 tem sido localizada na vasculatura renal, na mácula densa cortical, nas células intersticiais dos rins, no ducto coletor e na porção delgada da alça de Henle, apresentando aumento da sua expressão em determinadas áreas, com a progressão da idade (FITZGERALD & PATRONO, 2001; MORROW & ROBERTS, 2001; VANE *et al.*, 1998).

Estudos demonstram que as prostaglandinas são produzidas em neurônios e vasos do SNC com importante participação em diversas funções centrais, incluindo o controle do ciclo do sono e do despertar, a termogênese febril e a transmissão nociceptiva. As prostaglandinas e citocinas (IL-6) estão relacionadas com a fisiopatologia de algumas doenças degenerativas encefálicas, como a esclerose múltipla e doença de Alzheimer (KULKARNI *et al.*, 2000; CROFFORD LJ, 1997; JOUZEAU *et al.*, 1997; KURUMBAIL *et al.*, 1996; YAMAGATA *et al.*, 1993).

Estudos revelaram que os lipopolissacarídeos (LPS) e as citocinas podem induzir a COX-2 em várias regiões do encéfalo. A COX-1 é distribuída prevalentemente no prosencéfalo, onde as prostaglandinas podem estar envolvidas em funções de

integração, como modulação do sistema nervoso autônomo e de vias sensoriais de transmissão. A COX-2 é expressa constitutivamente em algumas regiões do encéfalo, destacando-se principalmente córtex, hipocampo, complexo amígdala-hipocampo (importante para a memória e comportamento), hipotálamo e medula espinhal. A liberação de IL-1 β , a partir do estímulo de pirógenos, induz a síntese de PGE₂ e esta, por sua vez, ativa o centro termorregulador situado na área pré-óptica do hipotálamo anterior, desencadeando a febre (CROFFORD LJ, 1997; FIEBICH *et al.*, 1997; BREDER & SAPER, 1996; KAUFMANN *et al.*, 1996).

1.5 MECANISMOS ENDÓGENOS DE ANTINOCICEPÇÃO

1.5.1 OPIÓIDES E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

O efeito antinociceptivo induzido por opióides está associado à ativação de receptores supraespinhais e espinhais (HERTZ & TESCHEMACHER, 1971; YAKSH *et al.*, 1980) e também periféricos (FERREIRA & NAKAMURA, 1979). O efeito antinociceptivo periférico de agonistas opióides tem sido demonstrado durante os estágios iniciais da resposta inflamatória (SCHÄFER *et al.*, 1995; LEVINE & TAIWO, 1989).

FERREIRA e colaboradores (1991) verificaram que o efeito antinociceptivo de baixas doses de morfina, na hiperalgesia induzida por PGE₂, foi inibido por bloqueadores da síntese do óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina. Tais observações permitiram propor o envolvimento da via L-arginina/NO/GMPc na antinocicepção induzida por morfina.

Os receptores opioidérgicos podem ser ativados por opióides exógenos bem como por peptídeos opióides endógenos como as endorfinas (μ), dinorfinas (κ) e as encefalinas (δ) liberados pela hipófise, pela glândula adrenal ou por linfócitos T,

monócitos e macrófagos infiltrados no tecido inflamado. Durante o processo inflamatório ocorre um aumento de receptores opióides em terminais das fibras aferentes primárias e centrais (STEIN *et al.*, 1990; HASSAN *et al.*, 1993; KANJHAN, 1995; LAW & LOH, 1999).

A percepção dos estímulos nocivos pelo SNC ocorre por meio da ativação de nociceptores de fibras aferentes primárias. Os receptores opioidérgicos são sintetizados no corpo celular destes neurônios e posteriormente transportados para terminais centrais e periféricos (HASSAN *et al.*, 1993; LEVINE *et al.*, 1993).

Em adição às demonstrações de que os opióides podem produzir efeito analgésico potente e clinicamente mensurável pela ativação de receptores em terminais periféricos, ligantes endógenos destes receptores foram descobertos em células imunes (STEIN, *et al.*, 2000). Leucócitos são recrutados no sítio da inflamação e secretam peptídeos opióides que se ligam a terminais sensoriais que expressam receptores opióides (STEIN, *et al.*, 2003). O processo inflamatório parece regular o aumento nos sítios de ligação de receptores μ opióides no gânglio da raiz dorsal (ZÖLLNER, 2003), um aumento no transporte de receptores opióides do gânglio da raiz dorsal através do nervo ciático (HASSAN *et al.*, 1993; MOUSA *et al.*, 2001), um aumento na antinocicepção provocada por ligantes de receptores opióides (SCHÄFER *et al.*, 1995).

1.5.2 ÓXIDO NÍTRICO e NOCICEPÇÃO

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima NO-sintase (NOS) que por sua vez, ativa a enzima guanililciclase,

responsável pelo aumento de 3'5' guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (MONCADA *et al.*, 1991).

O envolvimento da via L-arginina/NO/GMPc no efeito antinociceptivo periférico de drogas opióides tem sido demonstrado. A antinocicepção periférica induzida pela morfina foi revertida pelos inibidores da NOS, L-NMMA e L-NIO e azul de metileno. Essa ação antinociceptiva foi potencializada pelo inibidor específico da fosfodiesterase de GMPc MY5445 (FERREIRA *et al.*, 1991). AMARANTE & DUARTE (2002) observaram que a administração intraplantar de L-NOARG e azul de metileno reduziram de maneira dose-dependente a antinocicepção induzida pela bremazocina, agonista do receptor κ -opióide, sugerindo o envolvimento desses receptores na antinocicepção periférica induzida por opióides. Zaprinast, inibidor da fosfodiesterase de GMPc, potencializou esse efeito da bremazocina.

O efeito antinociceptivo de drogas antiinflamatórias não esteróides como a dipirona e diclofenaco também está relacionado com a síntese de NO e conseqüente ativação da guanililciclase. DUARTE *et al.* (1992) demonstraram que a antinocicepção periférica induzida pela dipirona foi revertida por L-NMMA e azul de metileno. O efeito antinociceptivo periférico induzido pelo diclofenaco foi antagonizado pelo L-NOARG e azul de metileno, no teste de compressão da pata do rato (ALVES *et al.*, 2004).

Em contraste a ação antinociceptiva do NO, outros estudos sugerem que na periferia ele atua como um mediador pró-nociceptivo. ALEY *et al.* (1998) demonstraram que níveis baixos de NO facilitam a hiperalgesia induzida por PGE₂ dependente de AMPc, enquanto níveis altos de NO produz uma hiperalgesia dependente de GMPc. A redução do limiar mecânico induzido pela administração intradérmica de

PGE₂, no teste de Von Frey, foi bloqueada pelo L-NMMA sugerindo que o NO contribui para a sensibilização induzida pela PGE₂ (CHEN & LEVINE, 1999).

1.6 ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTERÓIDES

A descoberta das isoformas de COX foi útil para o desenvolvimento de inibidores seletivos para COX-2, sendo uma classe de fármacos seguros para o tratamento da dor, sintomas da osteoartrite e artrite reumatóide (VANE *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 2000).

Do ponto de vista da terapêutica, os antiinflamatórios não-esteróides (AINES) são drogas de escolha para reduzir a hiperalgesia devido à liberação de prostaglandinas nas diversas fases do processo fisiopatológico, com um favorável impacto no tratamento de doenças relacionadas com a reumatologia (KURITZKY & WEAVER, 2003), ortopedia (GIMBEL *et al.*, 2001) e odontologia (MALMSTROM *et al.*, 2002). O mecanismo de ação destas drogas está relacionado com o seu efeito inibitório na síntese de PGs por meio da inibição das ciclooxigenases celulares (VANE, 1971).

A pesquisa de novos AINE continua em franco desenvolvimento, contando atualmente com grande número de compostos comercializados em diversos países do mundo. Embora os primeiros antiinflamatórios, como os salicilatos, sejam bastante eficazes como analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios, o uso destes compostos por períodos mais prolongados é limitado, na grande maioria dos pacientes, por desenvolverem efeitos gastrintestinais bastante desagradáveis, como dispepsia, dor abdominal, sangramento, úlcera e perfuração gástrica ou duodenal. Os efeitos gastrintestinais foram atribuídos à inibição destes compostos sobre a isoforma de COX-

1 (FITZGERALD & PATRONO, 2001; KULKARNI *et al.*, 2000; CRYER & DUBOIS, 1998).

O ácido acetilsalicílico promove inibição irreversível da atividade da ciclooxigenase pela ligação covalente com uma molécula de serina do sítio ativo da enzima. Na estrutura da COX-1, o ácido acetilsalicílico acetila a serina na posição 530, prevenindo a ligação do ácido araquidônico ao sítio ativo da enzima e na COX-2, acetila uma molécula de serina na posição 516. Embora não deva ser recomendada como droga de primeira escolha para o tratamento de processos inflamatórios crônicos, como o reumatismo e artrite, devido à sua potente ação inibitória sobre a COX-1 constitui importante alternativa para o tratamento profilático de doenças de elevado risco tromboembólico, como o infarto do miocárdio, beneficiando-se, nestes casos, do mecanismo anti-COX-1 para prevenção da agregação plaquetária. (MORROW & ROBERTS, 2001).

Outros AINEs como o diclofenaco e ibuprofeno agem como inibidores competitivos reversíveis de ambas isoformas, competindo com a ligação do ácido araquidônico no sítio ativo da COX. Uma terceira classe de AINE, representada pelo flurbiprofeno e indometacina, causa inibição reversível lenta e tempo-dependente da COX-1 e COX-2, resultado da formação de uma ponte entre o carboxilato da droga e a arginina na posição 120 do sítio ativo, seguida por alterações de conformação (HINZ & BRUNE, 2002).

1.6.1 INIBIDORES SELETIVOS DA CICLOOXIGENASE-2

A primeira geração propriamente dita dos inibidores específicos da COX-2 (ICOX-2) foram representadas pelo nimesulide, etodalaco e meloxicam. A descoberta da especificidade destes produtos foi, na realidade, constatada após a comercialização, sendo decorrente, principalmente, de observações clínicas e experimentais da reduzida incidência de efeitos colaterais gastrintestinais, sendo posteriormente confirmada por estudos *in vitro*. O nimesulide é considerado exemplo dos AINE, com boa potência *in vivo* em modelos inflamatórios, mas com fraca inibição *in vitro* de preparações da COX. Baseando-se em estudos *in vitro*, inicialmente sugeriu-se que o meloxicam inibia seletivamente a COX-2. No entanto, quando testado *in vivo*, em seres humanos, sua especificidade para a COX-2 foi somente cerca de dez vezes maior do que aquela para a COX-1, apresentando ainda inibição plaquetária (PANARA *et al.*, 1999). A modificação molecular destes produtos, notadamente do nimesulide, visando o aumento de sua seletividade sobre a COX-2, originou estruturas sem um grupamento carboxílico e com a presença de grupos sulfonamida ou de sulfona, originando os chamados inibidores seletivos de segunda geração. Este grupo inclui o celecoxibe, rofecoxibe, valdecoxibe, parecoxibe (pró-droga do valdecoxibe) e etoricoxibe (KULKARNI *et al.*, 2000). Tais medicamentos possuem um potente efeito analgésico (CHAN *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 1998), antitérmico e antiinflamatório (PENNING *et al.*, 1999).

O conhecimento das estruturas da COX-1 e da COX-2 e de seus sítios ativos constitui a base fundamental para o desenvolvimento de inibidores mais seletivos para a COX-2 e para a elaboração de estudos de relação estrutura-atividade destes produtos. Durante a atividade enzimática, o ácido araquidônico liga-se a uma arginina na posição 120 e a uma serina na posição 530. Uma transferência de elétrons da tirosina na posição 385 para um heme oxidado, que também está ligado dentro da enzima, inicia a reação de ciclooxigenase. Diversos estudos tentam elucidar como e onde os AINE agem na

ciclooxigenase para bloquear a síntese de prostaglandinas. Dentro do canal hidrofóbico da COX, uma diferença de aminoácido na posição 523 (isoleucina na COX-1 e valina na COX-2) pode ser de importância crítica na seletividade de diversas drogas (CRYER & DUBOIS, 1998; JOUZEAU *et al.*, 1997; RAZ *et al.*, 1989).

Na doença de Alzheimer todos os sinais de inflamação da microglia e ativação da astróglia com deposição de proteína amilóide estão associados à patogênese da doença. Um evento crucial encontrado nesta doença é que a proteína β amilóide é capaz de ativar a microglia, resultando na elevação da expressão neuronal de COX-2, potencializando o estresse oxidativo mediado pela proteína amilóide. Informações recentes sugerem que as prostaglandinas derivadas da COX-2 aumentam o processo inflamatório neurodegenerativo, induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias nas células da astróglia e potencializam a excitotoxicidade do glutamato acelerando a neurodegeneração. Os inibidores seletivos da COX-2 podem oferecer importante alternativa na terapêutica profilática de redução da produção central de prostaglandinas nestes pacientes (HINZ & BRUNE, 2002; HULL *et al.*, 2000; HAWKEU, 1999; DUBOIS *et al.*, 1998).

Estudos evidenciam a participação da COX-2 no desenvolvimento de processos neoplásicos, abrindo a perspectiva do uso dos inibidores seletivos da COX-2 na prevenção e no tratamento de diversos tipos de câncer. A explicação estaria principalmente relacionada com a elevada expressão e produção de COX-2 pelo tecido tumoral, como acontecem no adenocarcinoma de esôfago e em neoplasias colorretais. Durante o desenvolvimento do câncer colorretal, a ocorrência sequencial de múltiplas alterações genéticas culmina na transformação de um pólipo em câncer e também induz a expressão do receptor δ ativador de proliferação do peroxissomo (PPAR δ). Os ligantes do PPAR δ incluem certos eicosanóides originados da ativação da COX-2 e

alguns ácidos graxos (WU, 2000; HE *et al.*, 1999; BARNES & LEE, 1998). Um dos mecanismos propostos para atividade antineoplásica dos AINE seria a inibição da ligação do PPAR δ com o DNA da célula, impedindo a ativação dos genes responsáveis pelo desenvolvimento, metabolismo, crescimento e diferenciação celular. Um outro mecanismo seria a capacidade dos AINE de induzir apoptose das células cancerosas, pela inibição da função do PPAR δ . Além disso, os AINE, inibindo a COX-2, estariam também impedindo a formação de PGE₂ no tecido tumoral, prevenindo a estimulação do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), que induz a angiogênese (BARON *et al.*, 2003; WU, 2000; HE *et al.*, 1999; BARNES & LEE, 1998).

Considera-se que as prostaglandinas derivadas da COX-1 conferem citoproteção ao trato gastrointestinal. Dois grandes estudos clínicos multicêntricos foram realizados com a finalidade de avaliar a eficácia clínica e as complicações gastrointestinais dos coxibes (celecoxibe e rofecoxibe), o denominado *Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research* (VIGOR) e o *Celecoxib Long-Term Arthritis Safety Study* (CLASS). No ensaio VIGOR foram observados 8076 pacientes com artrite reumatóide, tratados, em média, durante nove meses, com uma dose diária de 50 mg de rofecoxibe, comparada com uma dose de 500 mg de naproxeno, administrada duas vezes ao dia. Neste grupo, a média de idade dos pacientes era de 58 anos e 80% deles era do sexo feminino. Cerca de 60% haviam recebido terapia com glicocorticóide durante longo período e 8% tinham história de perfuração gastrointestinal, hemorragia ou sintomas de úlcera péptica. Os resultados deste estudo revelaram incidência de perfuração e hemorragia gastrointestinal ou sintomas de úlcera péptica em 4,5 por 100 pacientes/ano do grupo do naproxeno e de 2,1 por 100 pacientes/ano do grupo do rofecoxibe, uma diferença de 54%, estatisticamente significativa (FITZGERALD & PATRONO, 2001).

O ensaio *CLASS* consistiu de dois estudos separados. Em um deles, o celecoxibe (400 mg duas vezes ao dia) foi comparado ao diclofenaco (75 mg duas vezes ao dia). No outro, o celecoxibe foi comparado ao ibuprofeno (800 mg, três vezes ao dia). Dos pacientes estudados, 72% tinham osteoartrite e 68,5% eram do sexo feminino. A duração do estudo foi de 13 meses e neste caso era permitido o uso de aspirina na dose de até 325 mg/dia. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação à incidência de úlcera gástrica, obstrução ou sangramento gastrointestinal alto (FITZGERALD & PATRONO, 2001).

De acordo com a *ADRAC* (*Adverse Drug Reactions Advisory Committee*), desde o início da comercialização do celecoxibe (Celebra^R), em outubro de 1999, já foram registrados mais de 919 relatos sobre os efeitos adversos e colaterais relacionados com o seu uso. Poucos pacientes relataram alterações gastrintestinais como náusea, dor abdominal, diarréia e dispepsia. No entanto, outros efeitos adversos mais proeminentes com o uso do celecoxibe e de outros inibidores específicos da COX-2 puderam ser observados, entre eles a urticária, alergia e insuficiência renal (AHMAD *et al.*, 2002; ERNST & EGGE, 2002; SCHNEIDER *et al.*, 2002; MUKHERJEE *et al.* 2001a; MUKHERJEE *et al.*, 2002b; ROCHA & FERNANDEZ-ALONSO, 2001; WHELTON, 2001; KNOWLES *et al.*, 2001; GROB *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos com o estudo *VIGOR* demonstraram maior risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares trombóticos com o uso do rofecoxibe, incluindo infarto do miocárdio, angina instável, trombos cardíacos, morte súbita e ataques isquêmicos transitórios (MUKHERJEE *et al.*, 2001). Porém, os resultados dos estudos envolvendo esses compostos não são conclusivos. A falta de estudos básicos e clínicos em longo prazo tem culminado na retirada de alguns desses compostos do mercado (FITZGERALD, 2004), indicando que mais estudos envolvendo os inibidores

de ciclooxigenases serão necessários, além de alvos alternativos para ação dessas enzimas em outros sistemas.

Os inibidores específicos da COX-2, de forma semelhante aos demais AINEs, podem promover alterações da função renal, resultando principalmente em edema periférico, hipertensão, inibição da excreção renal de água e sódio e hipercalemia. A hipercalemia pode ser resultante da redução na liberação de renina mediada por prostaglandina, que por sua vez promove uma redução na formação de aldosterona e decréscimo na excreção de potássio no túbulo distal. O celecoxibe e o rofecoxibe produzem modesta hipercalemia (HINZ & BRUNE, 2002).

Em um recente estudo com inibidores específicos de COX-2, foi observado que celecoxibe e rofecoxibe, não somente reduziram a hiperalgesia induzida por carragenina em patas de ratos, mas os animais demonstraram um aumento no limiar à estimulação mecânica, apresentado por animais controles, que foi descrito como “hipoalgesia” (FRANCISCHI *et al.*, 2002). Esta hipoalgesia foi observada somente em animais tratados com compostos com atividade inibitória de COX-2 e não em animais tratados com compostos com atividade inespecífica como indometacina ou com atividade pronunciada para COX-1 como o piroxicam (FRANCISCHI *et al.*, 2002).

Hipoalgesia foi também observada experimentalmente em ratos pela injeção intratecal de antagonista de substância P (AKERMAN *et al.*, 1982) e com agonistas canabinóides anandamida, metanandamida e o composto WIN-55212-2 (ZENOR *et al.*, 1999). CORCHERO *et al.* (1997) demonstraram que a hipoalgesia induzida por agonistas canabinóides está relacionada com o sistema opioidérgico, já que ocorreu o

aumento da expressão do gene para opióides endógenos após o tratamento com 9- delta tetrahydrocannabinol.

1.7 INIBIDORES SELETIVOS DE COX-2 E O CITOESQUELETO CELULAR

O movimento celular é um importante mecanismo para o desenvolvimento de organismos multicelulares, especialmente durante a gastrulação e formação do sistema nervoso, vasos e músculos. Na vida adulta apresenta importante papel no reparo tecidual e nas respostas do sistema imunológico (AFFOLTER & WEIJER, 2005).

As células devem organizar-se no espaço e interagir mecanicamente com o ambiente ao seu redor. Todas estas funções estruturais e mecânicas apresentam-se altamente desenvolvidas em células eucarióticas, que são dependentes de um sistema de filamentos denominado citoesqueleto (JOHNSON *et al.*, 2004).

O citoesqueleto é uma malha interna que suporta a membrana celular ou forma trilhas para que organelas e outros elementos se movam pelo citoplasma. Sendo assim, a sua organização é dinâmica, sofrendo constantes rearranjos, promovendo assim a mobilidade da célula (LODISH *et al.*, 1995).

Três estruturas compõem basicamente a estrutura do citoesqueleto: actina, microtúbulos e filamentos intermediários (BRINKLEY, 1997). Os filamentos do citoesqueleto são formados de pequenas subunidades. Monômeros de actina e tubulina se unem para formar microfilamentos (de diâmetros entre 7-9 nm) e microtúbulos (com 24nm de diâmetro), respectivamente. Dentre estas estruturas, os microtúbulos estão notavelmente em todas as células e são os elementos que promovem o movimento

celular, tráfego vesicular e divisão celular. Para LAUFFENBURGER & HORWITZ (1996), os microtúbulos são os coordenadores físicos de todas as células vivas.

Os microtúbulos estão localizados no citoplasma, sendo um dos componentes do citoesqueleto. São essenciais para muitas funções celulares durante a interfase, incluindo a manutenção da forma, mobilidade, ligações celulares e transporte intracelular. Os microtúbulos citoplasmáticos também podem ser importantes na modulação das interações de fatores de crescimento com receptores na superfície da célula e nos sinais proliferativos transmembrânicos, gerados por essas interações. Também são componentes importantes do eixo mitótico, que se forma durante a mitose.

Os microtúbulos são constituídos por proteínas heterodiméricas compostas de duas subunidades: α e β -tubulina, de 440 aminoácidos cada uma, com peso molecular de 50 kD (CARVALHO *et al.*, 2003). A polimerização dos dímeros de tubulina possibilita o alongamento do microtúbulo e a despolimerização seu encurtamento. O sentido da polimerização da tubulina vai conferir uma polaridade ao microtúbulo, com uma extremidade + (positiva) onde continua a polimerização e outra (-) negativa. É essa polaridade que possibilita proteínas motoras trafegarem vesículas, organelas ou complexos protéicos.

A actina é a proteína intracelular mais abundante de uma célula eucariótica, sendo formada por subunidades globulares chamadas de actina G, que se polimerizam de forma helicoidal formando um filamento chamado de actina F. A sua função está relacionada com a mobilidade celular, microvilosidades e contração de células musculares.

Os filamentos intermediários são mais abundantes em células que sofrem estresses mecânicos, proporcionando resistência física a células e tecidos.

Nas células vivas, todos os três tipos de filamentos do citoesqueleto sofrem remodelação constante pela associação e dissociação de suas subunidades. Os microtúbulos e os filamentos de actina adicionam e perdem subunidades apenas em suas extremidades.

Tendo em vista que a sobrevivência de uma célula eucariótica depende de um equilíbrio entre a associação e dissociação de filamentos do citoesqueleto altamente conservados, formados a partir de actina e tubulina, estes dois tipos de filamentos comumente são alvos de drogas. Estas drogas, de modo geral, perturbam as reações de polimerização dos filamentos.

A latrunculina, extraída da esponja marinha *Latrunculia magnifica*, liga-se a monômeros de actina estabilizando-os e conseqüentemente isto provoca despolimerização efetiva dos filamentos (JOHNSON *et al.*, 2003). O tratamento com essa droga é capaz de inibir a polimerização de actina e ainda altera migração de neutrófilos em direção a um agente quimiotático (PRING *et al.*, 2002).

Usando um mecanismo complementar, a faloidina, produzida pelo fungo *Amanita phalloides*, e a citocalasina B estabiliza os filamentos de actina, promovendo a polimerização (HOFMAN *et al.*, 1999; MUELLER *et al.*, 1994). A colchicina liga-se a tubulina livre, estabilizando-a e provoca a despolimerização dos microtúbulos.

Em presença do paclitaxel (taxol), ocorre uma estabilização dos núcleos α e β tubulinas pela intercalação deste fármaco resultando, assim, em distúrbio tanto na formação do microtúbulo como na sua despolimerização.

Os agentes desestabilizadores de microtúbulos como o paclitaxel (taxol), colchicina, nocodazol, vinblastina, vincristina, 17- β -estradiol são utilizados no

tratamento do câncer. As propriedades anticarcinogênicas destes fármacos são atribuídas à capacidade de interferência com a organização dos microtúbulos, dificultando a mitose e outras alterações no citoesqueleto (JORDAN e WILSON, 1998).

Outros trabalhos envolvendo desestabilizadores de microtúbulos demonstraram que a fragmentação desses filamentos aumenta a expressão e transcrição de COX-2 (SUBBARAMAIAH *et al*, 2000), culminando em síntese elevada de PGE₂ e PGI₂. Esses dados sugerem que há uma correlação íntima entre a integridade desses filamentos e a produção de mediadores inflamatórios lipídicos (SAWER *et al*, 2001), sendo que parte dos efeitos colaterais apresentados pelos usuários desses agentes pode estar relacionada à síntese de prostaglandinas.

Estudos recentes relacionam a atividade da COX-2 para o desenvolvimento de certos tipos de tumores e a terapia contra o câncer envolvendo os inibidores de COX-2 (BAKHLE, 2001). Foi demonstrado que a atividade da COX-2 no tratamento e prevenção desses tumores pode estar relacionada à dinâmica do citoesqueleto. A diminuição da taxa de invasão de células derivadas de tumores malignos de cólon é reduzida pelo tratamento com inibidor de COX-2. Ainda, foi observada uma fragmentação do citoesqueleto nas células tratadas com o ICOX-2, que poderia dificultar o processo de invasão e metástase (JIA *et al*, 2004).

Estudos demonstrando a participação da COX-2 na dinâmica do citoesqueleto são raros na literatura, e a interação entre coxibes e agentes perturbadores do citoesqueleto parece oferecer um campo promissor para pesquisa e futuras terapêuticas no tratamento de tumores e outras patologias.

2.0 OBJETIVOS

Compreender os mecanismos envolvidos na hipoalgesia que decorre, em ratos, da administração de inibidores seletivos de COX-2 (ICOX-2). Para isso, os seguintes objetivos específicos foram desenvolvidos:

- a) Verificar se o efeito hipoalgésico derivado da administração de ICOX-2 seletivos ocorre em linhagens de ratos.
- b) Estudar se a hipoalgesia aos ICOX-2 seletivos também é observada em animais injetados com PGE₂, como agente hiperalgésico.
- c) Estudar a participação de óxido nítrico no efeito hipoalgésico dos ICOX-2 seletivos através do uso de inibidores da síntese de NO.
- d) Verificar a participação de opióides endógenos, no efeito hipoalgésico de ICOX-2.
- e) Verificar a atividade destes inibidores específicos de COX-2 sobre a resposta edematogênica à carragenina, observada em paralelo.
- f) Verificar se organelas subcelulares, entre elas os componentes dos microtúbulos, estariam envolvidas na ação hipoalgésica dos ICOX-2 seletivos verificou ou confirmou:
 - a. A participação do citoesqueleto no efeito hipoalgésico dos ICOX-2 por meio do uso de inibidores de microtúbulos.
 - b. A participação “in vitro” do citoesqueleto no efeito hipoalgésico dos ICOX-2 usando a técnica de imunocitoquímica.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos das linhagens Holtzman e Wistar, machos, pesando entre 140 e 180 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Cebio-ICB/UFMG) e ratos da linhagem Sprague Dawley, machos, pesando entre 140 e 180 gramas, provenientes da Universidade Federal de São Paulo. Esses animais foram mantidos em caixas plásticas com forração, tendo livre acesso à ração e água, em número de seis /caixa. Dois dias antes da realização dos experimentos, os animais foram levados a uma sala controlada termicamente (22 a 24°C) e com ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas, para ambientalização. Todos os experimentos foram realizados de 9-16 horas, na fase clara do dia. Para os experimentos de imunocitoquímica, foram utilizados animais (Holtzman) neonatos (1-4 dias).

O protocolo experimental utilizado no presente estudo está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (nº 99/04) (ANEXO 1).

3.2 – MODELOS EXPERIMENTAIS DE NOCICEPÇÃO E EDEMA

3.2.1 Teste Nociceptivo: Hiperalgisia da pata do rato

Para a medida de nocicepção foi utilizada uma modificação do método de retirada da pata do rato submetida à compressão crescente, descrito originalmente por RANDALL & SELITTO (1957), conforme descrito a seguir. A avaliação consiste na medida do limiar de escape ou retirada da pata à pressão crescente (em g) em pata previamente inflamada.

No teste, o animal é mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a superfície plantar da pata sob teste é submetida à parte compressora do aparelho. A parte compressora consiste de duas superfícies opostas, sendo uma plana, sobre a qual se apóia a pata do animal, e outra cônica, com uma área de $1,75 \text{ mm}^2$ na extremidade, por meio da qual é aplicada a pressão na superfície plantar da pata do rato. A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 32 g/s , mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador. Ao observar a resposta nociceptiva do animal, o experimentador interrompe a pressão sobre o pedal, cessando assim o aumento da pressão imposta à pata, sendo que o último valor, que corresponde ao limiar nociceptivo, fica indicado na escala do aparelho (em cm) e é posteriormente expresso em gramas (g).

O aprendizado para a medida da hiperalgesia na pata do rato, consiste no treinamento do experimentador para detectar o momento em que o animal desenvolve essa reação. Nesse momento, observa-se o reflexo de retirada da pata e, eventualmente o animal pode desenvolver fasciculação (sucessivas ondas de contração muscular, sensíveis ao tato através da pele do dorso). É importante ressaltar que o animal é também ambientalizado ao aparelho no dia que antecede o teste. Essa ambientalização consiste em submeter o animal à mesma situação que será vivenciada no dia do experimento, sendo muito importante, portanto, para adaptar o animal à nova situação e

a resposta final observada reflita apenas a sensação dolorosa do animal e não a resposta a uma situação nova vivenciada pelo mesmo.

A intensidade de resposta nociceptiva foi avaliada pela diferença (\square) do limiar nociceptivo medido na zero hora e 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após a injeção de carragenina ou zero, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após a injeção de prostaglandina.

Os resultados foram expressos como média da diferença de limiar entre a pata testada e contralateral \pm erro padrão da média em cada animal (cinco a seis /grupo), em cada tempo.

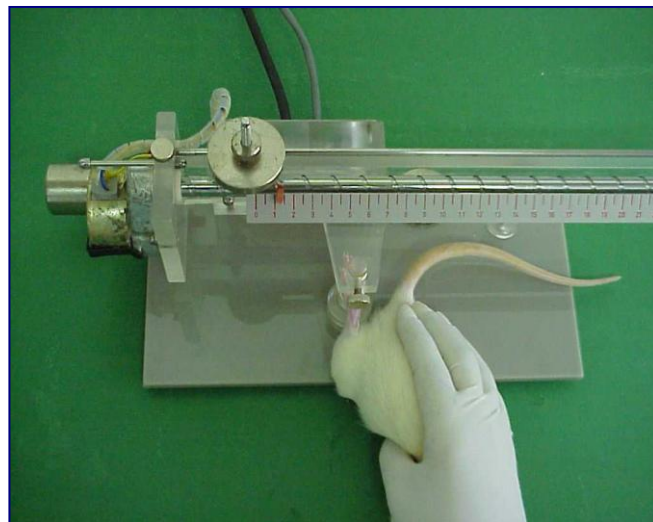


Figura 3: Aparelho algométrico da Ugo Basile. Método da compressão da pata do rato (Randall & Selitto, 1957). Observar que a pressão do aparelho é imposta à superfície plantar da pata, na região da injeção do estímulo algogênico e que o animal é colocado na posição horizontal na bancada.

3.2.2 Hiperalgisia e hipoalgisia

Como mencionado anteriormente, em um estudo anterior com inibidores específicos de COX-2, foi observado que celecoxibe e rofecoxibe, não somente reduziram a hiperalgisia induzida por carragenina em patas de ratos, mas também os animais apresentaram um aumento no limiar à estimulação mecânica, em relação à resposta de animais controles. Esse aumento do limiar que ultrapassou o valor de zero (ou valores basais) foi denominado como “hipoalgisia” (FRANCISCHI *et al.*, 2002). No gráfico 1 observar-se a hiperalgisia e a hipoalgisia. A administração intraplantar de um estímulo hiperalgésico, como por exemplo, a carragenina na pata de ratos reduziu limiar nociceptivo (valores negativos). Entretanto, a administração de ICOX-2 induz hipoalgisia, ou seja, um aumento do limiar nociceptivo em relação ao grupo controle (valores positivos).

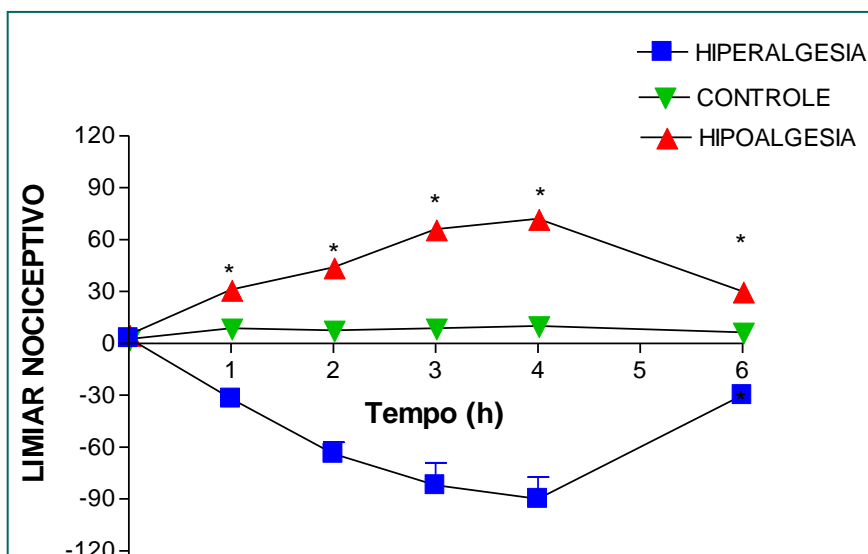


Gráfico 1: Identificação de hiperalgesia induzida por carragenina e da hipotalgesia induzida por inibidor seletivo de ciclooxygenase 2 em ratos. Os ratos foram previamente tratados com ICOX-2 seletivos ou veículo e submetidos sob as mesmas condições. Valores positivos demonstram a hipotalgesia e valores negativos a hiperalgesia.

3.2.3 Obtenção das medidas de edema na pata posterior de ratos

O aumento do volume (em ml) das patas posteriores dos animais induzido pela injeção intraplantar de carragenina e prostaglandina foi aferido pela imersão das patas em pletismômetro (Ugo Basile, modelo 1750) nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após a injeção do agente flogogênico. Dependendo do volume das patas, nos diferentes tempos, o fluido deslocado pela introdução das patas na cubeta do aparelho, que contém uma solução salina, aciona um eletrodo, cujo sinal é transformado em mililitros e pode ser lido em um mostrador digital que se encontra acoplado. A média (\pm erro

padrão da média) das patas de 5 animais por grupo foi encontrada, nos mesmos tempos testados para a hiperalgesia.

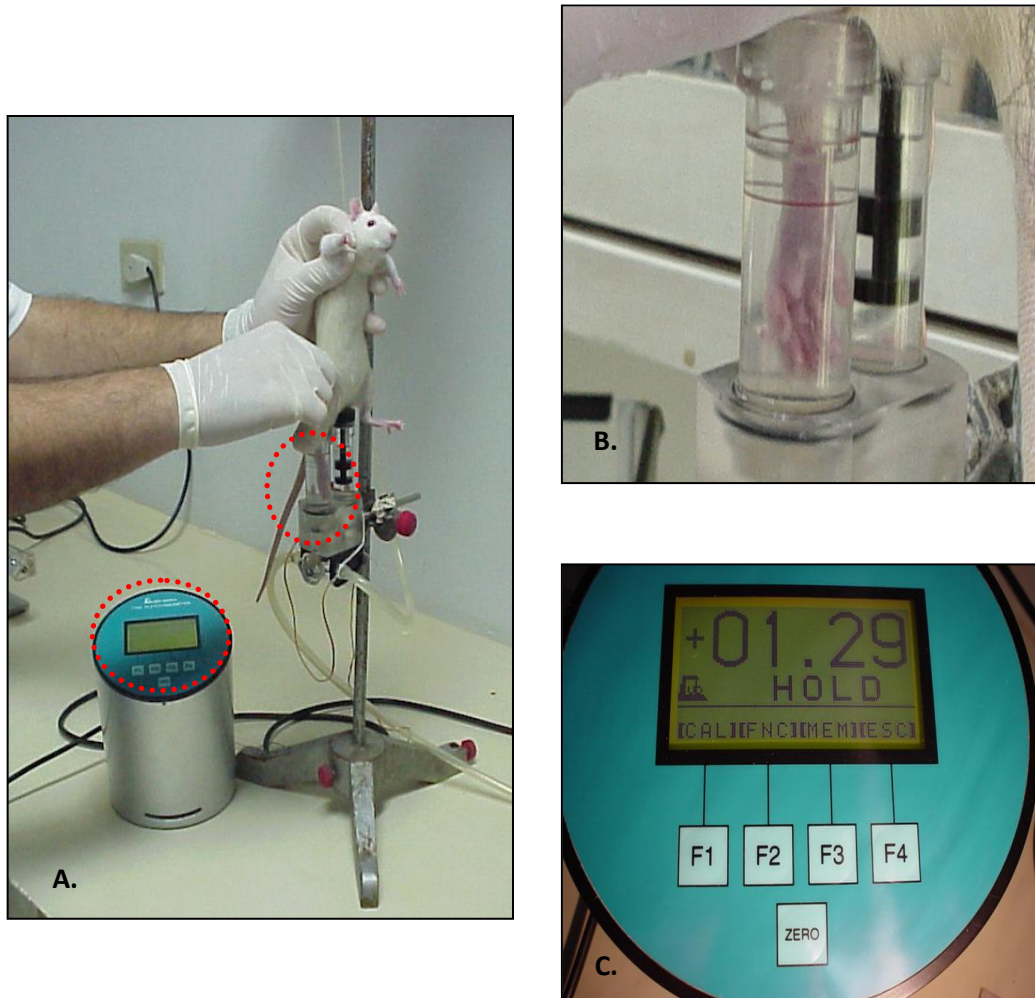


Figura 4 – Obtenção das medidas de edema usando o hidropletismômetro. **A.** Visão geral do aparelho, em **B.** detalhe da cubeta onde é imersa a pata e **C.** Leitura no monitor digital do valor do volume das patas em mililitros.

3.3 PREPARAÇÃO DE RATOS TOLERANTES À MORFINA

Os experimentos seguiram os protocolos descritos por TERMAN *et al.* (1984). Os ratos foram tratados com duas injeções diárias de morfina, ou seja, 10 mg/Kg/dia (s.c.), dividida em duas doses, 2 mg/Kg as 8:00 horas e 8 mg/Kg as 17:00 horas ou salina fisiológica estéril (animais controle) por cinco dias seguidos. Nos dias 1, 3 e 5 a resposta nociceptiva induzida por PGE₂ (200 ng/pata) foi avaliada na 3^a hora após a injeção do estímulo inflamatório. No sexto dia, os animais receberam por via subcutânea os inibidores de COX, SC 236, SC 560 ou indometacina e o limiar nociceptivo foi novamente avaliado na 3^a hora após a injeção de PGE₂ nos grupos tolerantes à morfina ou que foram tratados com salina.

3.4 PADRONIZAÇÃO DE CULTURAS DE NEURÔNIOS SENSITIVOS

3.4.1 Animais

Foram utilizados ratos neonatos, entre um e quatro dias de vida (n=6), para obtenção dos gânglios da raiz dorsal. A técnica utilizada para obtenção dos gânglios foi adaptada do trabalho de ARANTES *et al.* (2000).

3.4.2 Sacrifício e dissecação dos gânglios

Após decapitação, o dorso foi imediatamente posicionado sob a lupa ZP101 (PRIOR Scientific Instruments Ltd), para localização e retirada dos gânglios da raiz dorsal. Solução de Hanks (Gibco) tamponada com 10 mM HEPES (ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico, Gibco, pH 7,35), foi utilizada para lavar a região, facilitar a localização anatômica e a retirada dos gânglios.

Após obtidos, os gânglios foram colocados em uma placa de cultura de 60 mm tampada e mantidos em gotas de MEM (minimum Essential Medium, Gibco) enriquecido com SFB 10% (soro fetal bovino, Gibco), NGF e antibióticos penicilina

(100UI/ml, Gibco) e estreptomicina (1000 μ g/ml, Gibco) por 23 horas, sendo o mesmo referido como meio completo.

Uma hora antes do encerramento da cultura (24 horas), antiinflamatórios não esteróides, colchicina ou veículo foram adicionados à cultura. Ao término da cultura, os neurônios foram fixados em metanol (80%) e guardados em congelador para posterior utilização em reação de imunohistoquímica (vide a seguir).

3.4.3 Imunohistoquímica dos neurônios sensitivos

Os neurônios foram submetidas à reação imunohistoquímica para constituintes do citoesqueleto. Neste caso, foi realizada a marcação da α -tubulina. A sequência das reações foi desenvolvida no departamento de morfologia do ICB/UFMG, como se segue:

- 1- As células fixadas em metanol 80% foram lavadas duas vezes com PBS (0,15M) e hidratar com concentrações decrescentes de álcool (70, 50, 25%, água e PBS) por cinco minutos cada.
- 2- Foi adicionado 500 μ L de Triton X (0,5%) por 10 minutos.
- 3- Foi feito bloqueio com BSA (1%) e Tween 20 (0,1%) por 45 minutos.
- 4- Foi adicionado anticorpo monoclonal primário anti α -tubulina (1:500) por 2 horas.
- 5- Foram feitas quatro lavagens de 5 minutos com PBS.
- 6- Foi adicionado o anticorpo secundário (1:500) por 1 hora.
- 7- Foram feitas quatro lavagens de 5 minutos com PBS.
- 8- Foi adicionado 3 μ L de iodeto de propídio diluído em PBS.
- 9- Foram feitas quatro lavagens de 5 minutos com PBS e as lâminas foram montadas.

3.4.4 Determinação da fluorescência em neurônios primários, sob microscopia confocal (análise das imagens).

Os neurônios submetidos à coloração por imunocitoquímica foram observadas em microscópio confocal (CEMEL-UFMG). Em cada lâmina, foram coletadas três imagens que foram gravadas (Zeiss LSM Image Examiner) para análise da fluorescência em programa apropriado.

A quantificação da fluorescência no corpo celular e no axônio dos neurônios derivou da determinação da área da imagem na região delimitada pelo experimentador que desconhecia o tratamento a que as células haviam sido submetidas, utilizando programa apropriado. A média da área da imagem do corpo celular ou do prolongamento foi obtida de 3 a 4 experimentos realizados em dias diferentes.

3.5 DROGAS E SOLVENTES

3.5.1 Agentes hiperalgésicos

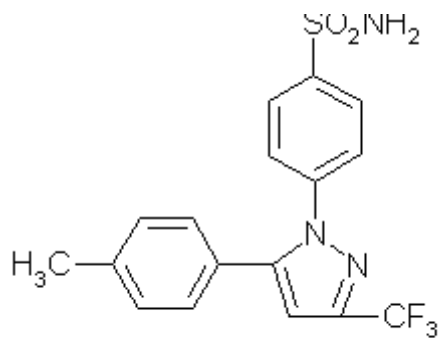
Carragenina □ □(Cg, 250 □g, Sigma, EUA), dissolvida em salina fisiológica estéril até a formação de uma solução homogênea.

Prostaglandina E₂ (PGE₂, Sigma, EUA). A solução estoque foi mantida no “freezer” (-20 °C), dissolvida em etanol (500 □g/ml). Imediatamente antes das injeções, a PGE₂ foi diluída em salina fisiológica, de forma a se obter as concentrações desejadas.

3.5.2 Antiinflamatórios não esteróides

3.5.2.1 Inibidores Seletivos de COX-2

Celecoxibe (4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]benzenosulfonamida, Celebra, Searle & Co – Porto Rico). Diluído em salina fisiológica estéril.



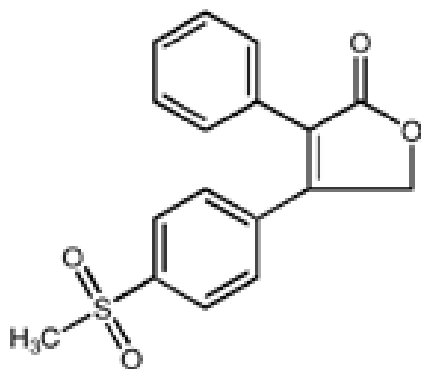
:

SC 236 (4-[5-(4-Clorofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]benzenesulfonamida

Caymann Chemical Co – EUA). Dissolvida em uma mistura de salina, etanol e Tween 80 (90: 8: 2, v/v).

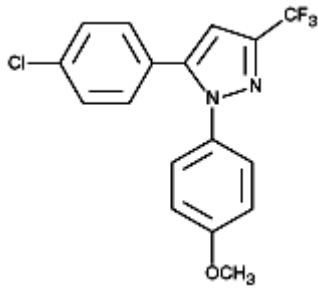


Rofecoxibe (4-[4-(metilsulfonil) fenil]- 3- fenil- 2(5H)- furanona, Vioxx, Merck Sharp & Dohme – México). Dissolvido em salina.



3.8.2.2 Inibidor Seletivo de COX-1

SC 560 [5-(4-Clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-3 trifluorometilpirazolona (Caymann Chemical Co – EUA). Dissolvido em uma mistura de salina, etanol e Tween 80 (90: 8: 2, v/v).



3.5.2.3 Inibidor não seletivo de ciclooxigenase

Indometacina (Sigma, EUA). Dissolvida em tampão Tris básico.

3.5.3 Antagonista de receptor opióide

Naltrexona (Sigma, EUA). Dissolvida em salina fisiológica estéril.

3.5.4 Agonista de receptor opióide

Morfina (Merck, Alemanha). Dissolvida em salina fisiológica estéril.

3.5.5 Inibidor de NO sintase

L-NAME (Sigma, EUA). Dissolvida em salina fisiológica estéril.

L-NMMA (Sigma, EUA). Dissolvida em salina fisiológica estéril.

3.5.6 Drogas que agem no citoesqueleto celular, ou seja, desestabilizadores de microtúbulos

Paclitaxel (taxol, Zodiac, Brasil). Dissolvida em mistura de cremophor EL, etanol em uma proporção de 50:50, v:v. Devido a interferência do veículo nos testes de hiperalgesia, vários experimentos foram realizados, alterações nesta proporção foram realizadas e o cremophor EL foi reduzido em 50% e a salina foi adicionada.

Colchicina (Sigma, EUA). Dissolvida em salina fisiológica estéril.

Nocodazol (Sigma, EUA). Dissolvida em salina fisiológica estéril.

3.6 ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS

Muitos métodos para a avaliação da atividade analgésica e antiinflamatória em animais têm sido idealizados. Estes modelos envolvem a aplicação de estímulos hiperalgésicos e a observação da resposta nociceptiva ou de inflamação do animal aos mesmos, e então, a observação da capacidade da droga sob teste em abolir ou diminuir a intensidade da resposta inflamatória.

A carragenina (250 µg/pata) e prostaglandina E₂ (50-200 ng/pata) foram administradas na superfície plantar da pata posterior direita do rato (via intraplantar, ipl, figura 3), num volume de 0,1 ml.

Os antiinflamatórios não esteróides foram administrados por via subcutânea (0,1 ml/100 g animal) ou por via intraplantar (0,1 ml/pata), ½ hora antes da injeção de carragenina.

L-NMMA foi administrado por via oral (*per os*), 1 hora antes de carragenina, em um volume de 1,0 ml/100 g de animal.

A naltrexona foi administrada por via subcutânea (0,1 ml/100 g animal) 1 hora antes da injeção de carragenina.

As drogas que agem no citoesqueleto celular, paclitaxel (taxol), colchicina e nocodazol, foram administradas por via intraplantar (0,1 ml/pata), 1 hora antes da injeção de carragenina.

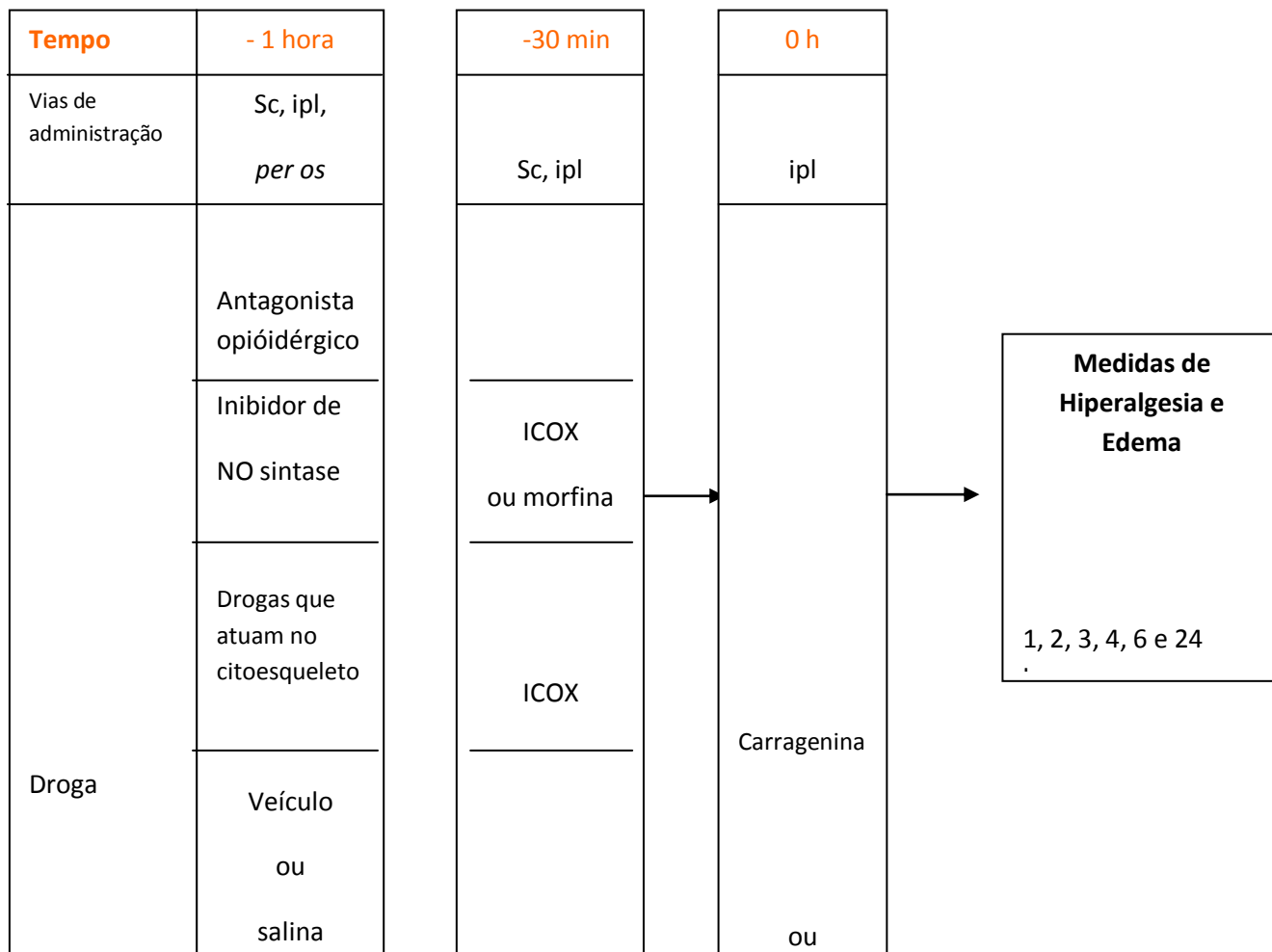


Figura 5: Local da injeção intraplantar na pata de ratos.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias \pm SEM dos animais submetidos aos testes de hiperalgesia, edema de pata bem como médias de imnofluorescência foram comparados com seus respectivos controles pela Análise de Variância (one way ANOVA – e pós teste Student-Newman-Keuls test). A diferença estatística entre médias foi aceita quando $P < 0,05$.

Tabela 1: Resumo dos protocolos experimentais



4.0 RESULTADOS

4.1-Hiperalgisia e edema de pata induzidos pela administração intraplantar de diferentes doses de carragenina.

No gráfico 2 observa-se que a administração intraplantar de carragenina (Cg, 100-500 μ g) na pata de ratos Holtzman reduziu, de maneira dose-dependente, o limiar nociceptivo em relação ao grupo controle (salina). Esse efeito hiperalgésico foi detectado já a partir da primeira hora, com a maior dose tendo atingido intensidade máxima entre a terceira e quarta horas encontram-se em valores basais em 24 horas após a injeção de carragenina.

Com relação à atividade edematogênica, podemos observar no gráfico 3 que a carragenina induziu a formação de edema, que também se iniciou após a primeira hora da administração, alcançando um valor máximo já na 2^a hora e retornou aos valores basais em 24 horas.

A dose de 250 μ g/pata foi escolhida como estímulo inflamatório padrão para os experimentos subsequentes.

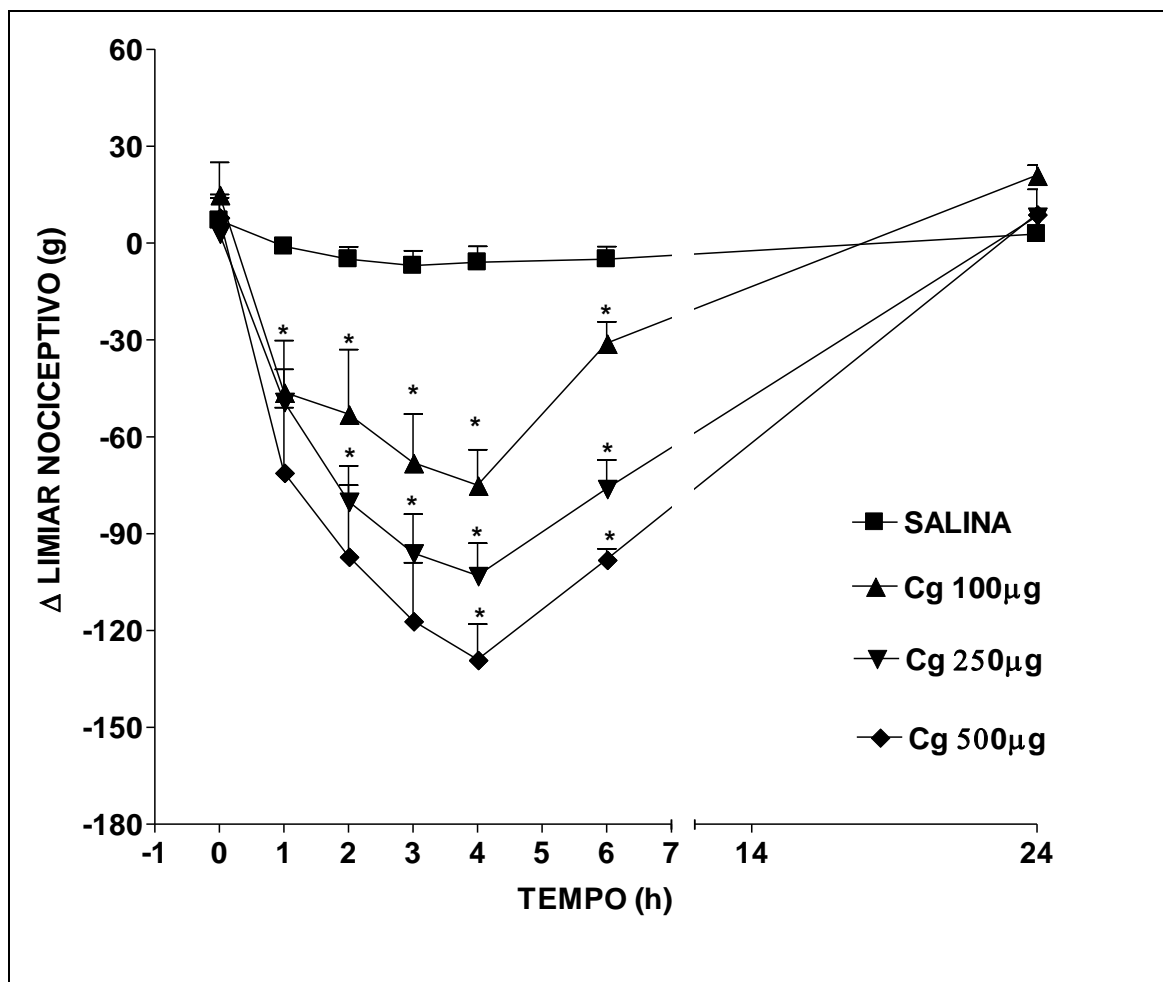


Gráfico 2: Hiperálgia induzida pela injeção intraplantar de carragenina (Cg) em ratos Holtzman. Para a medida de hiperálgia foi utilizado o método de retirada da pata do rato submetida à compressão crescente apresentada em gramas. Carragenina (100, 250 e 500µg em 0,1 ml) foi injetada na pata traseira direita e salina na pata contralateral, sendo que a intensidade de resposta de hiperálgia das patas posteriores dos animais foi medida na zero hora e 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após a injeção do estímulo. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de 5-6 animais por grupo.

* Valores estatisticamente significativos, em relação ao grupo salina, $P < 0,05$.

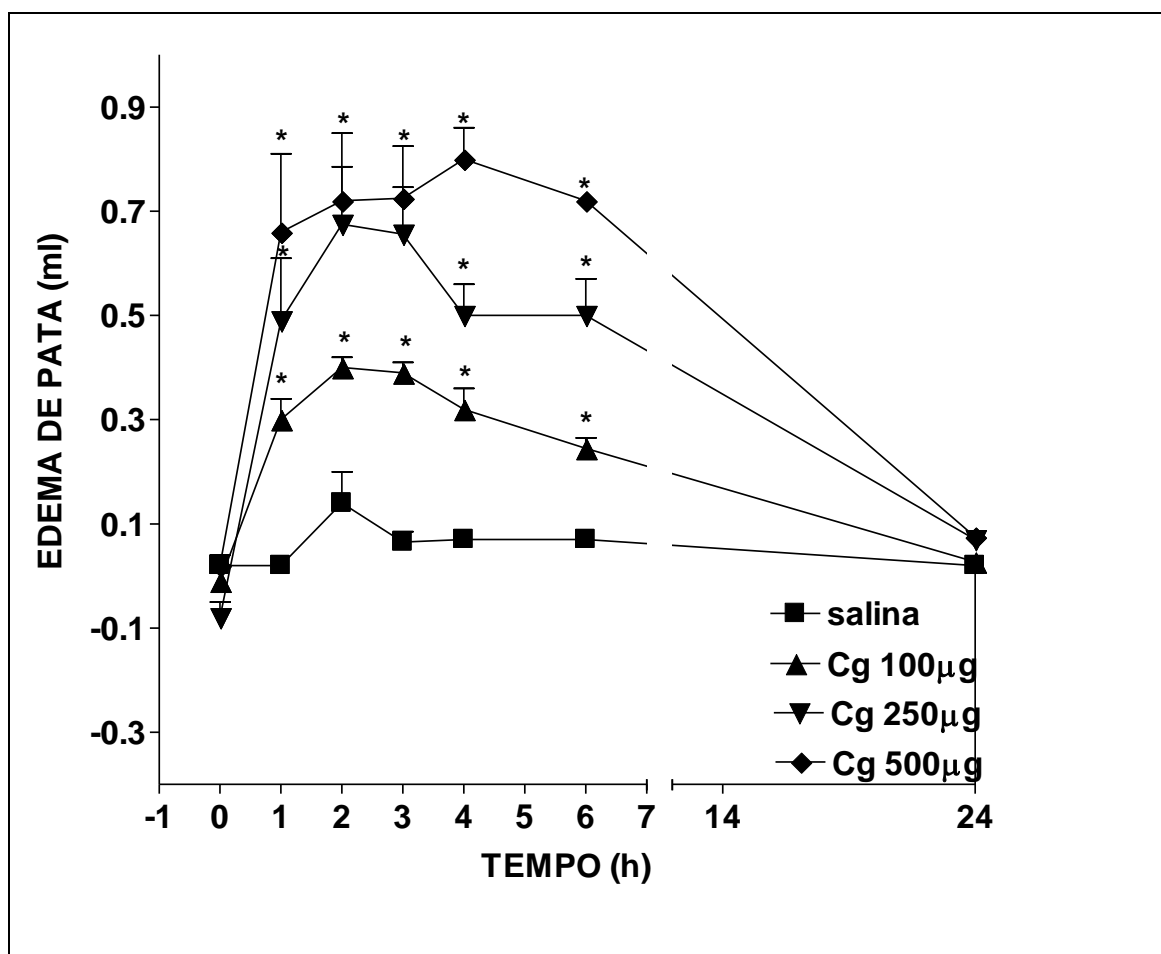


Gráfico 3: Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina por carragenina (Cg) em ratos O aumento do volume (em ml) das patas posteriores dos animais induzido pela injeção intraplantar de carragenina ou salina foi aferido pela imersão das patas em pletismômetro (Ugo Basile, modelo 1750) nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após a injeção. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de 5-6 animais por grupo.

* Valores estatisticamente significativos, em relação ao grupo salina, $P < 0,05$.

4.2-Efeito do SC 236 sobre a hiperalgesia e edema de pata induzidos por carragenina em diferentes linhagens de ratos.

Francischi e colaboradores (2002) demonstraram previamente que os inibidores seletivos de COX-2 induziram um fenômeno denominado hipoalgesia, ou seja, aumento do limiar basal de resposta nociceptiva no modelo de carragenina em ratos.

Com o objetivo de detectar se fatores relacionados com o tipo de linhagem dos ratos podem contribuir com a resposta hipoalgésica, ratos Wistar e Sprague-Dawley foram comparados com ratos Holtzman, utilizando o mesmo modelo experimental.

A mesma dose padrão de carragenina foi administrada por via intraplantar (250 μ g/pata) em ratos Holtzman, (H), Wistar (W) e Sprague-Dawley (SD), linhagens estas que são comumente usadas em experimentos de hiperalgesia e edema. O gráfico 4 mostra que houve um decréscimo no limiar nociceptivo nas três linhagens testadas. A hiperalgesia foi observada na 1^a hora e obteve valor máximo entre a 3^a e 4^a hora após a administração de carragenina. Os dados, portanto, confirmaram os achados anteriores. Por outro lado, o pré-tratamento com o composto experimental puro SC 236 (12 mg/Kg, sc), inibidor seletivo de COX-2, não somente reverteu a hiperalgesia, como levou a um aumento do limiar nociceptivo à estimulação mecânica além do apresentado além do basal, isto é, hipoalgesia, sendo observada nas três linhagens de ratos estudadas. Entretanto, o efeito hipoalgésico apresentados em ratos Wistar foi de menor intensidade quando comparado aos ratos Holtzman e Sprague-Dawley.

O edema de pata induzido por carragenina também foi observado na 1^a hora de experimento e a resposta máxima foi alcançada na 2^a hora e permaneceu até a 6^a hora.

Entretanto ratos SD mostraram-se menos sensíveis quanto à formação de edema de pata nas primeiras duas horas de teste (gráfico 5)

O inibidor seletivo de COX-2 SC 236 (12 mg/Kg), por via sc, não induziu efeito antiedematogênico nas linhagens pesquisadas (gráfico 5). Os experimentos subsequentes foram desenvolvidos em animais Holtzman.

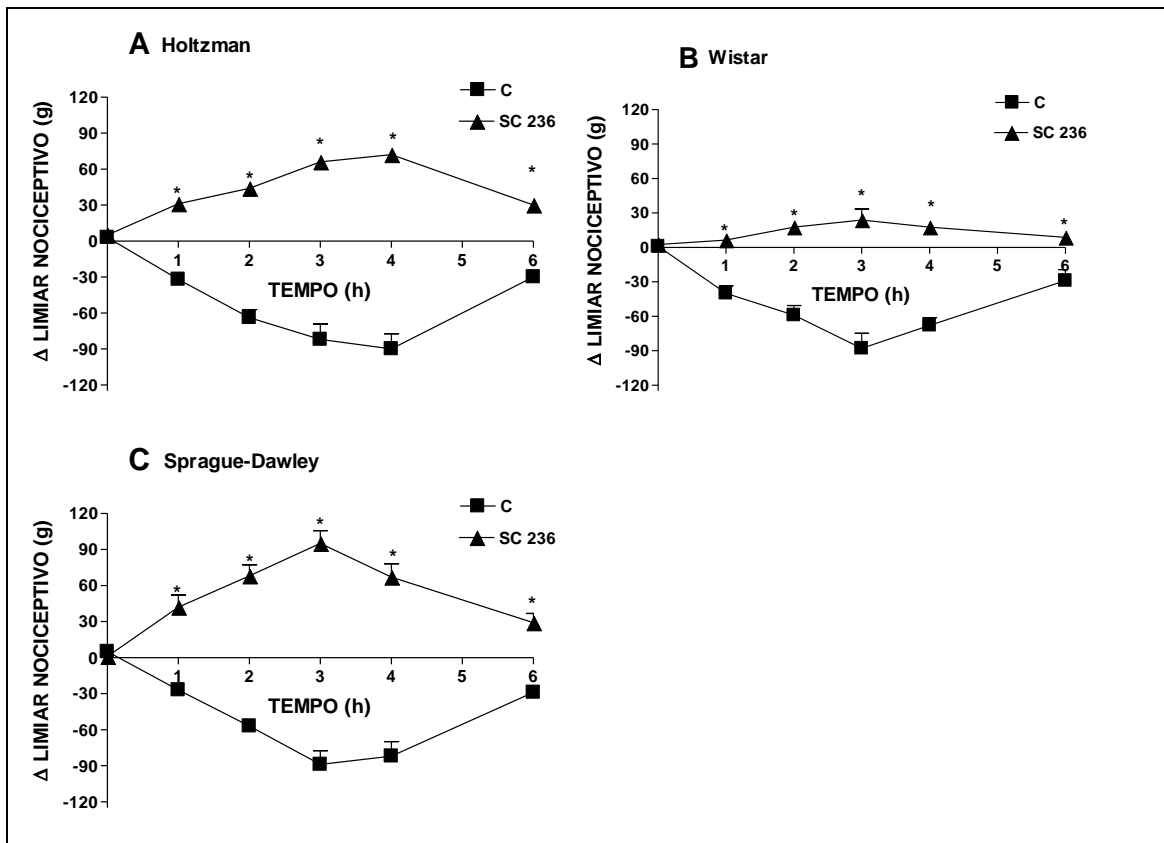


Gráfico 4: Efeito do inibidor de COX-2 (SC 236) na hiperalgesia induzida por carragenina em diferentes linhagens de ratos. Para medida de hiperalgesia foi utilizado o método de retirada da pata do rato submetida à compressão crescente. O inibidor seletivo de COX-2, SC 236, foi administrado por via subcutânea (12mg/kg) nas diferentes linhagens de animais (A, Holtzman, B, Wistar e C Sprague-Dawley) e o grupo controle (C) recebeu apenas veículo.

Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de 5-6 animais por grupo.

* Valores estatisticamente significativos, em relação ao grupo salina, $P < 0,05$.

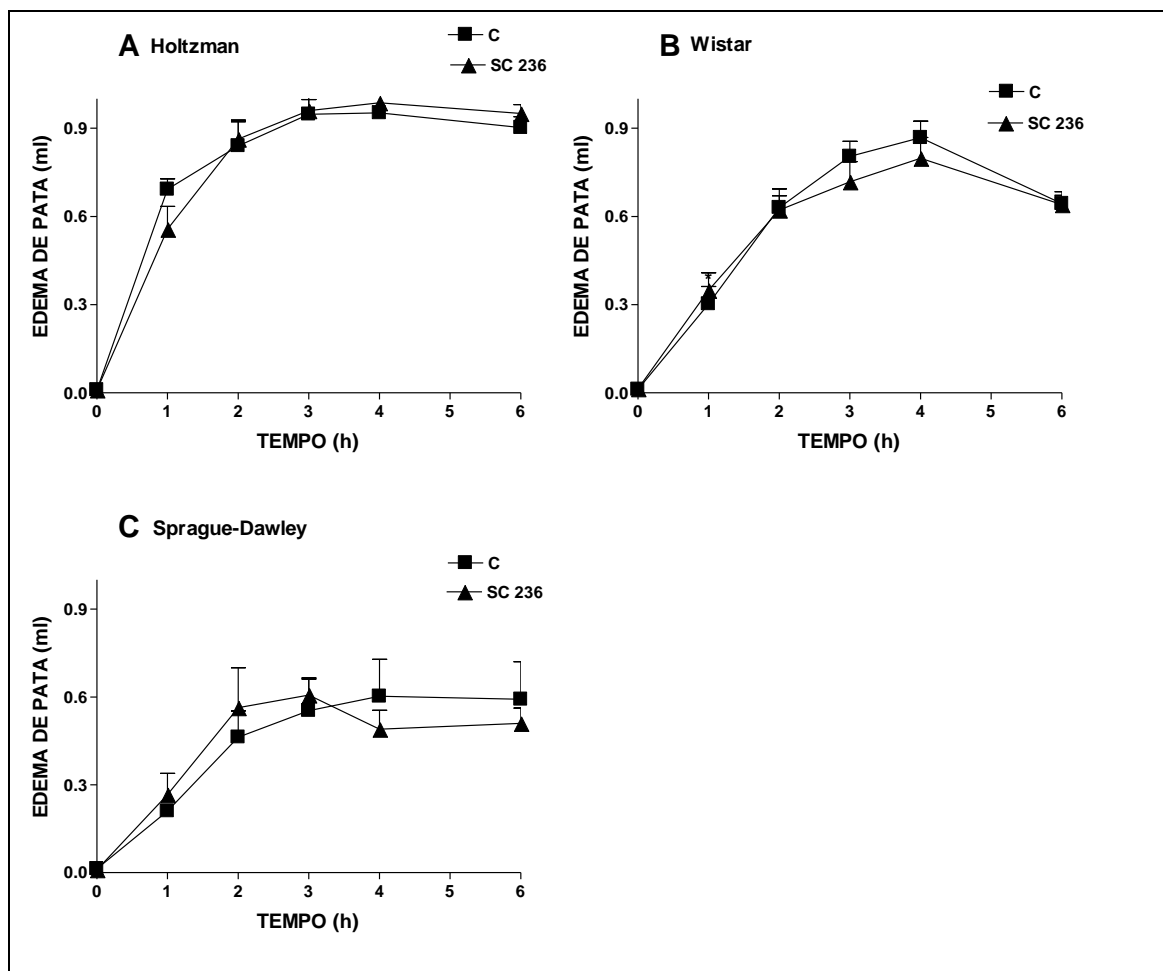


Gráfico 5: Efeito do inibidor de COX-2 (SC 236) no edema de pata induzido por carragenina em diferentes linhagens de ratos. O aumento do volume (em ml) das patas posteriores dos animais induzido pela injeção intraplantar de carragenina foi aferido pela imersão das patas em pletismômetro (Ugo Basile, modelo 1750) nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após a injeção. O inibidor seletivo de COX-2, SC 236, foi administrado por via subcutânea (12mg/kg, -30 min) nas diferentes linhagens de animais (A, Holtzman, B, Wistar e C Sprague-Dawley) e o grupo controle (c) recebeu apenas veículo.

Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de 5-6 animais por grupo.

4.3-Efeito da administração intraplantar de celecoxibe e SC 236 sobre a hiperalgesia e edema de pata induzido por carragenina.

Para verificar se o efeito hipoalgésico observado com drogas inibidoras seletivas de COX-2 ocorreria após sua administração periférica, celecoxibe, nas doses de 300 e 600 µg, bem como o composto experimental SC 236 (300 µg) foram injetados por via intraplantar. Pode-se observar no gráfico 6 que a administração intraplantar de celecoxibe e SC 236 (, em ratos Holtzman, induziu o aparecimento de um efeito antinociceptivo, isto é, houve uma redução da resposta hiperalgésica induzida pela administração intraplantar com carragenina. Confirmando os resultados obtidos em nosso laboratório, o pré-tratamento com celecoxibe não somente reverteu a hiperalgesia, como levou a um aumento do limiar nociceptivo à estimulação mecânica além do apresentado por animais controles, isto é, hipoalgesia. Além disso, o composto SC 236 (300 µg/pata) reduziu o edema de forma estatisticamente significativa contrastando com o efeito sistêmico que não foi capaz de reduzir o edema de pata. Entretanto, somente a dose de 600 µg/pata de celecoxibe apresentou atividade antiedematogênica (gráfico 7).

Para verificar se o efeito hipoalgésico observado nos animais após a administração periférica dos inibidores seletivos de COX-2 (celecoxibe e SC 236) não é devido a um efeito sistêmico, o celecoxibe (600 µg/pata) foi administrado em uma das patas posteriores que foram injetadas com carragenina (250 µg/pata). O celecoxibe induziu hipoalgesia somente na pata que foi injetado (Tabela 1). Em conjunto, esses dados indicam que o efeito hipoalgésico observado após a injeção periférica (na pata inflamada) dos inibidores seletivos de COX-2 ocorreu localmente.

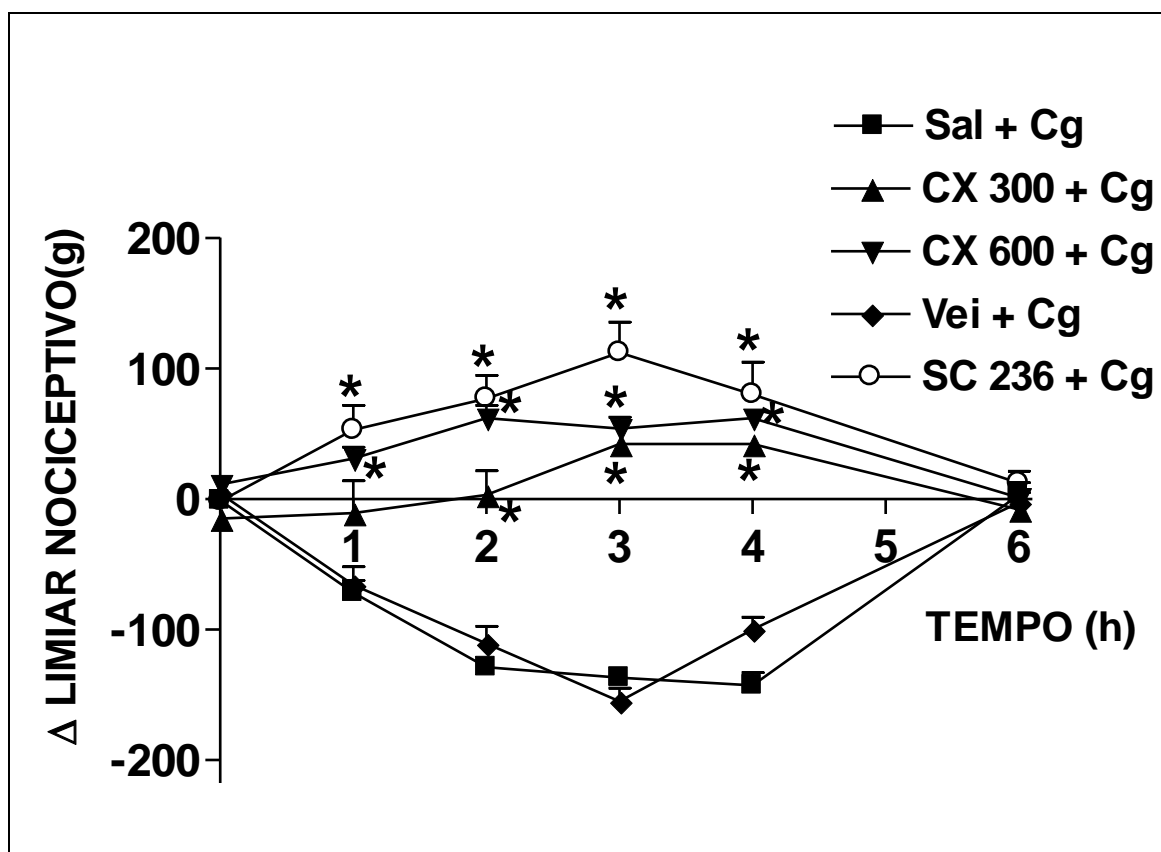


Gráfico 6: Efeito da administração intraplantar de celecoxibe e SC 236 sobre a hiperalgesia induzida por carragenina. Valores negativos representam hiperalgesia e valores positivos hipoalgesia. Dois inibidores seletivos de COX-2, SC236 (300 µg/pata) e celecoxib (CX, 300-600 µg/pata), foram administrados por via intraplantar e o grupo controle (C) recebeu carragenina e veículo (250 µg/pata).

Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de 5-6 animais por grupo.

* Valores estatisticamente significativos, $P < 0,05$.

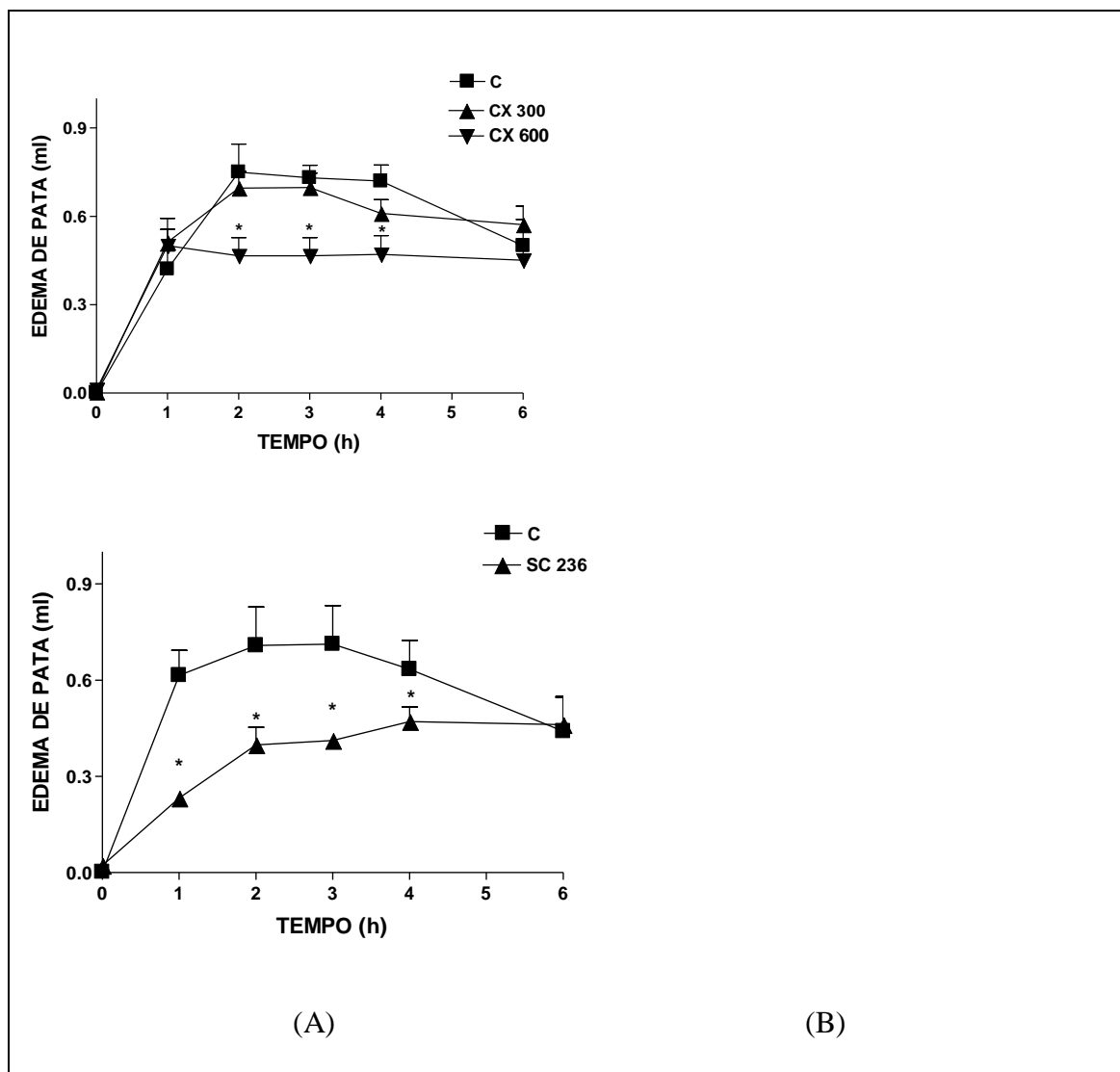


Gráfico 7: Efeito da administração intraplantar de celecoxibe e SC 236 sobre o edema de pata induzido por carragenina. O aumento do volume (em ml) das patas posteriores dos animais induzido pela injeção intraplantar de carragenina foi aferido pela imersão das patas em pletismômetro, nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 6 horas após a injeção. Dois inibidores seletivos de COX-2, celecoxib (CX, A) ou SC 236 (B), foram administrados por via intraplantar (300-600 μ g) e o grupo controle (C) recebeu carragenina e veículo (250 μ g/pata).

Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de 5-6 animais por grupo.

* Valores estatisticamente significativos, $P < 0,05$.

Tabela 2: Administração de celecoxibe na pata contralateral não induz hipotalgesia em ratos.

	Média do Limiar Nociceptivo (g ± SEM)			
	Grupo 1		Grupo 2	
	veículo	Salina	Celecoxib	salina
Tempo	Pata Direita	Pata esquerda	Pata direita	Pata esquerda
0	126.7 ± 3.3	120 ± 5.8	123.3 ± 3.3	133.3 ± 8.8
1	66.7 ± 3.3	76.7 ± 8.8	193.3 ± 8.8*	70 ± 5.8
2	43.3 ± 3.3	43.3 ± 3.3	216.7 ± 12*	46.7 ± 6.7
3	31.7 ± 1.7	36.7 ± 3.3	223.3 ± 8.8*	26.7 ± 3.3
4	53.3 ± 3.3	53.3 ± 3.3	200.0 ± 0.0*	53.3 ± 8.8
6	93.3 ± 3.3	76.7 ± 3.3	156.7 ± 3.3*	63.3 ± 3.3

O celecoxib (600µg/pata) ou veículo foram injetados na pata direita e a carragenina (250µg/pata) foi injetada nas duas patas traseiras. A hiperalgesia foi avaliada pelo limiar nociceptivo na pata direita e esquerda, medido na zero hora e 1, 2, 3, 4 e 6 horas após a injeção do estímulo.

Os valores apresentados são as médias (± e.p.m.) de cada grupo tratado (3 animais por grupo).

* Valores estatisticamente significativos, , em relação ao veículo do grupo 1, P<0,05.

4.4-Efeito de SC 560 sobre a hiperalgesia e edema de pata induzido por carragenina.

O composto SC 560 (1, 5 e 10 mg/Kg), inibidor seletivo de COX-1, foi administrado 30 minutos antes da injeção de carragenina. A menor dose de SC 560 alterou o limiar nociceptivo, entretanto as doses de 5 e 10 mg/kg reverteram a hiperalgesia sem induzir hipoalgesia (gráfico 8). As doses de SC 560 utilizadas não reduziram o edema de pata induzido por carragenina (gráfico 9).

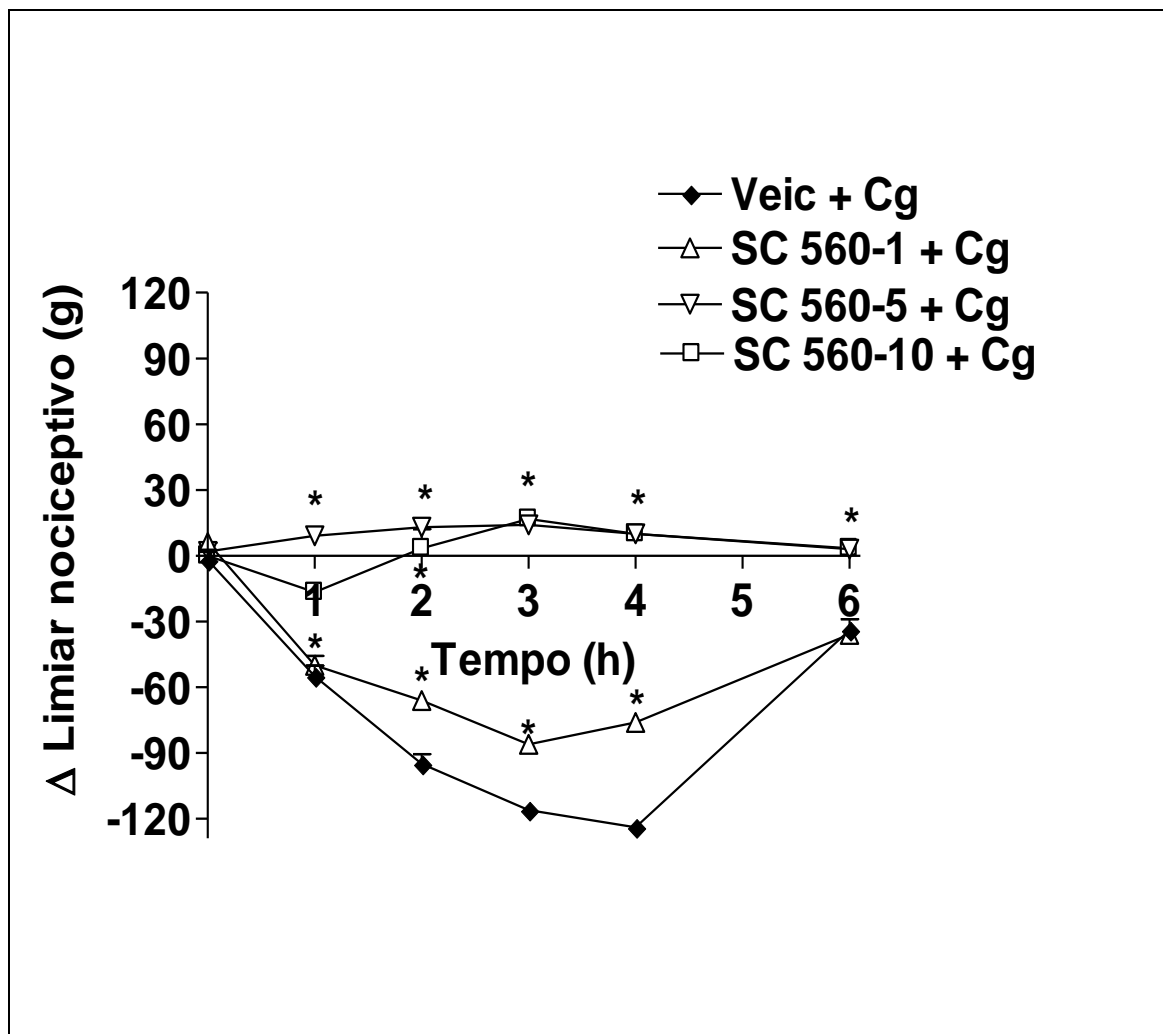


Gráfico 8: Efeito do SC 560 sobre a hiperalgesia induzida por carragenina. O composto SC 560 (1, 5 e 10 mg/Kg, sc), inibidor seletivo de COX-1, foi administrado 30 minutos da injeção de carragenina (250 μ g/pata). A intensidade de resposta de hiperalgesia foi avaliada pela diferença (Δ) do limiar nociceptivo medido na zero hora e 1, 2, 3, 4 e 6 horas após a injeção do estímulo.

Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de 5-6 animais por grupo.

*Valores estatisticamente significativos, $P < 0,05$.

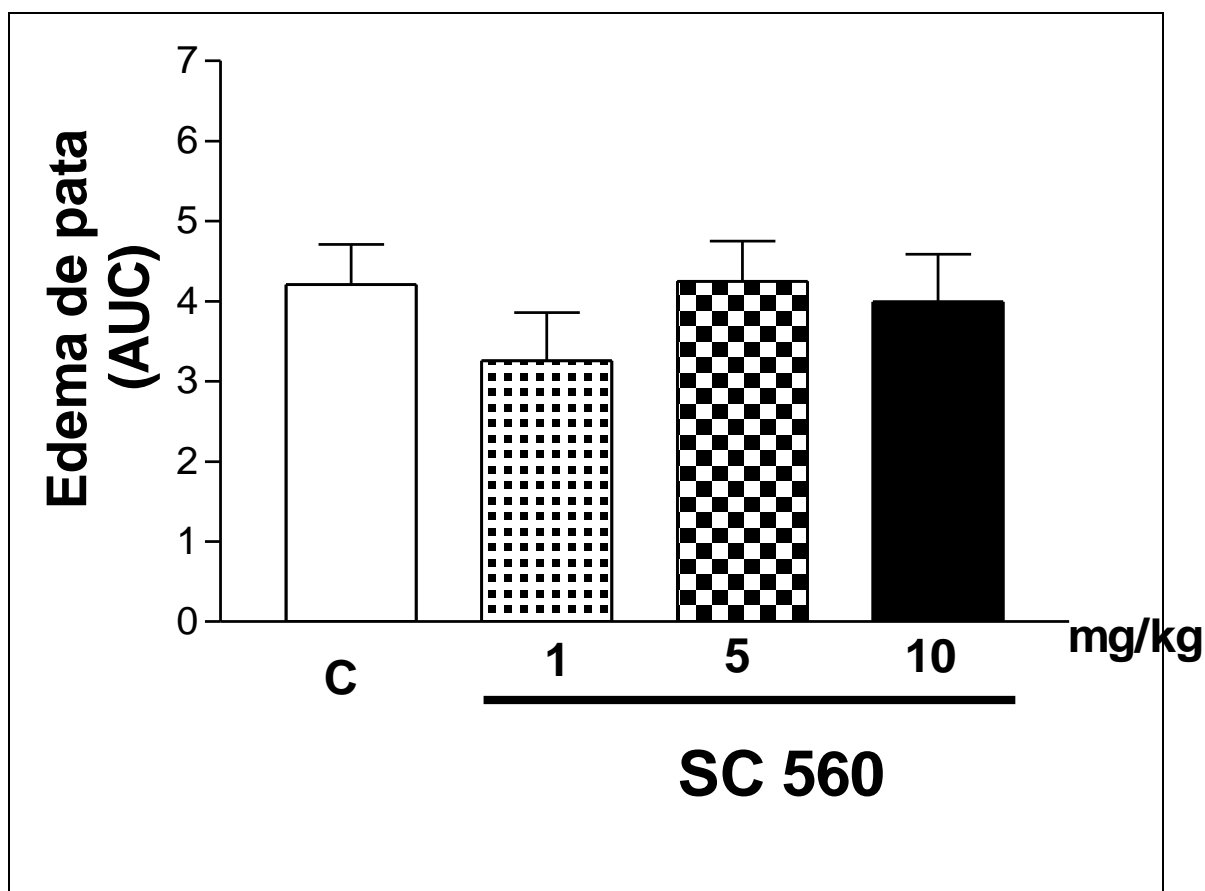


Gráfico 9: Efeito do SC 560 sobre o edema de pata induzido por carragenina.

Os resultados foram apresentados em AUC em unidades de (ml x t). O composto SC 560 (1, 5 e 10 mg/Kg, sc), inibidor seletivo de COX-1, foi administrado 30 minutos da injeção de carragenina (250µg/pata). O aumento do volume (em ml) das patas posteriores dos ratos foi medido na zero hora e 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após a injeção do estímulo.

4.5 Hiperalgesia e edema de pata induzida pela administração intraplantar de diferentes doses de PGE₂.

No gráfico 10 observa-se que a administração intraplantar de PGE₂ (50-200 ng/pata) nas patas traseiras reduziu, de maneira dose-dependente, o limiar nociceptivo em relação ao grupo controle (salina). Esse efeito hiperalgésico foi detectado já a partir da primeira hora, com a maior dose tendo atingido intensidade máxima na terceira hora e retornou aos valores basais em 24 horas (dados não mostrados).

Com relação à atividade edematogênica, podemos observar no gráfico 11 que a PGE₂ induziu a formação de edema, que também se iniciou após a primeira hora da administração, alcançando um valor máximo já na 2^a hora, que se manteve estável até a 3^a hora e retornou aos valores basais em 24 horas. Entretanto, o edema máximo de pata induzido por PGE₂ foi de menor intensidade quando comparado ao edema da carragenina, em doses que o mediador induziu resposta máxima de hiperalgesia.

4.6 Efeito do celecoxibe sobre a hiperalgesia e edema de pata induzido por PGE₂.

O celecoxibe injetado por via subcutânea (12 mg/Kg) reverteu a hiperalgesia induzida por PGE₂ e induziu hipoalgesia. Entretanto, o celecoxibe não foi capaz de reduzir o edema de pata induzido por PGE₂ (200 ng/pata) (gráficos 12 e 13).

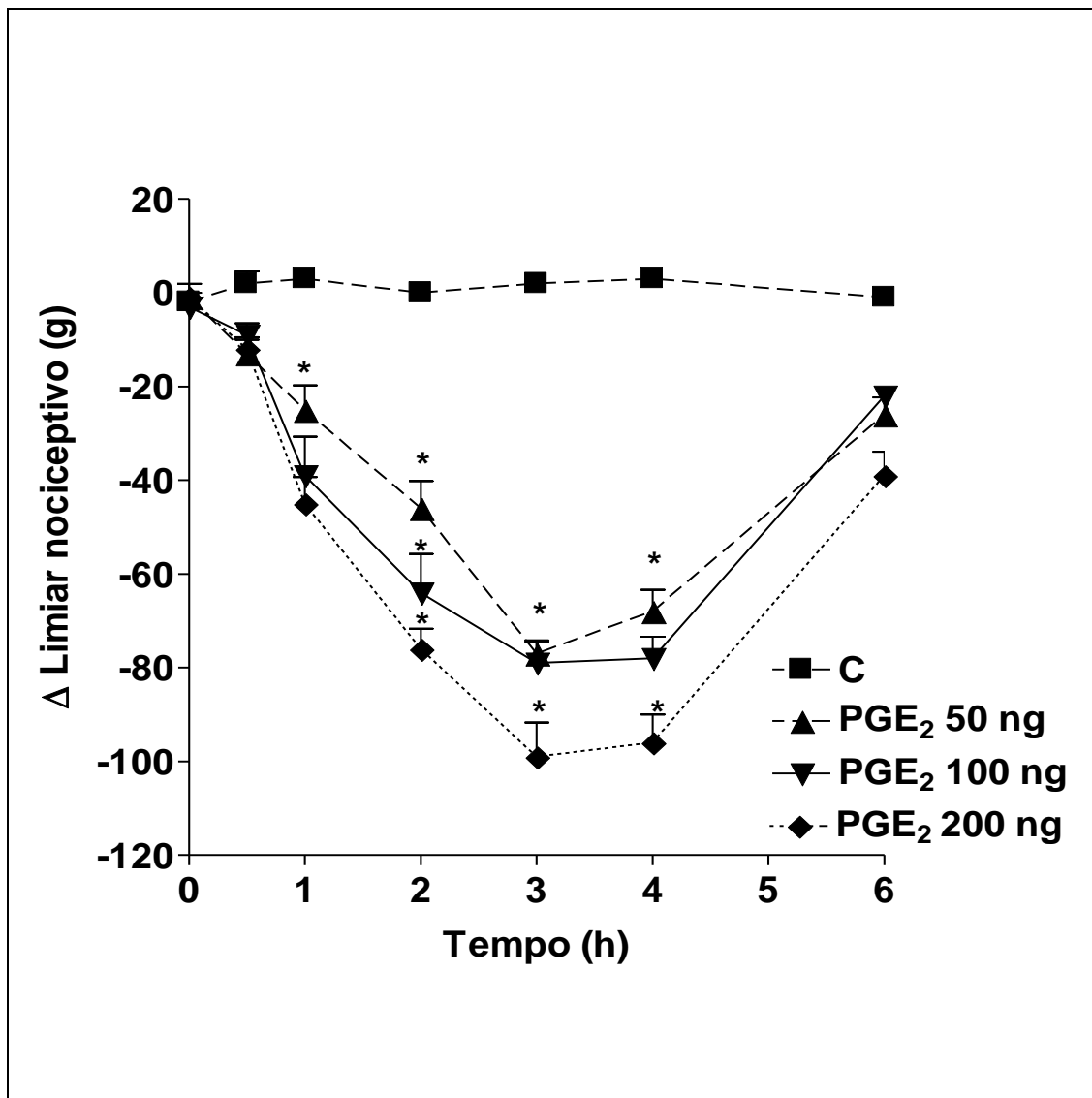


Gráfico 10: Hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de PGE₂ em ratos.

Para a medida de hiperalgesia foi utilizado o método de retirada da pata do rato submetida a compressão crescente. A PGE₂ (50, 100, 200 ng) foi injetada na pata traseira e a intensidade de resposta de hiperalgesia das patas posteriores dos animais foi medida na zero hora, ½, 1, 2, 3, 4 e 6 horas após a injeção do estímulo. Os valores apresentados são as médias ± e.p.m. de 5-6 animais por grupo.

* Valores estatisticamente significativos, P<0,05.

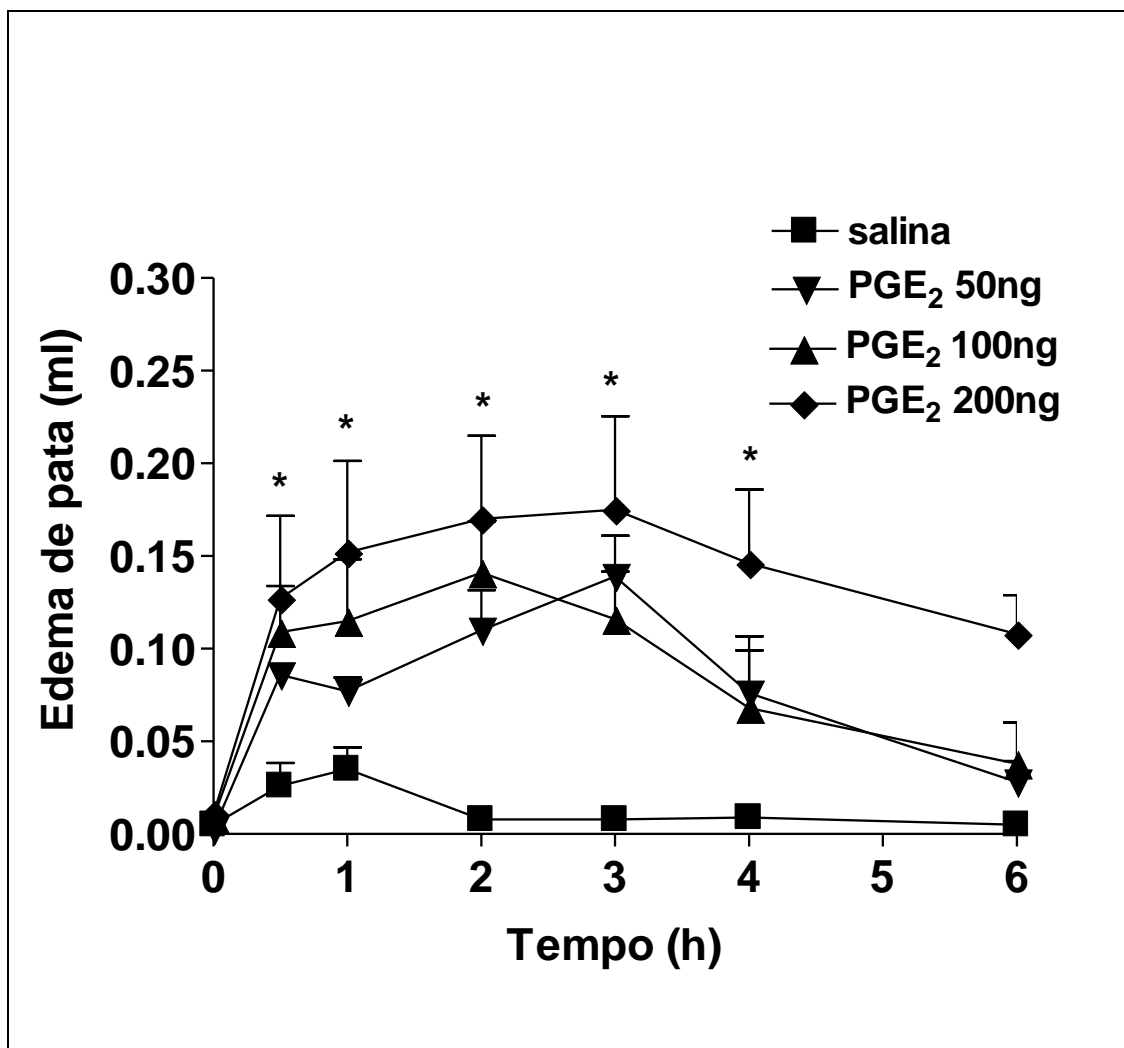


Gráfico 11: Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de PGE₂ em ratos. O aumento do volume (em ml) das patas posteriores dos animais induzido pela injeção intraplantar de PGE₂ (50, 100, 200 ng) foi aferido pela imersão das patas em pletismômetro (Ugo Basile, modelo 1750) nos tempos 0, ½, 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após a injeção. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de 5-6 animais por grupo.

* Valores estatisticamente significativos, $P < 0,05$.

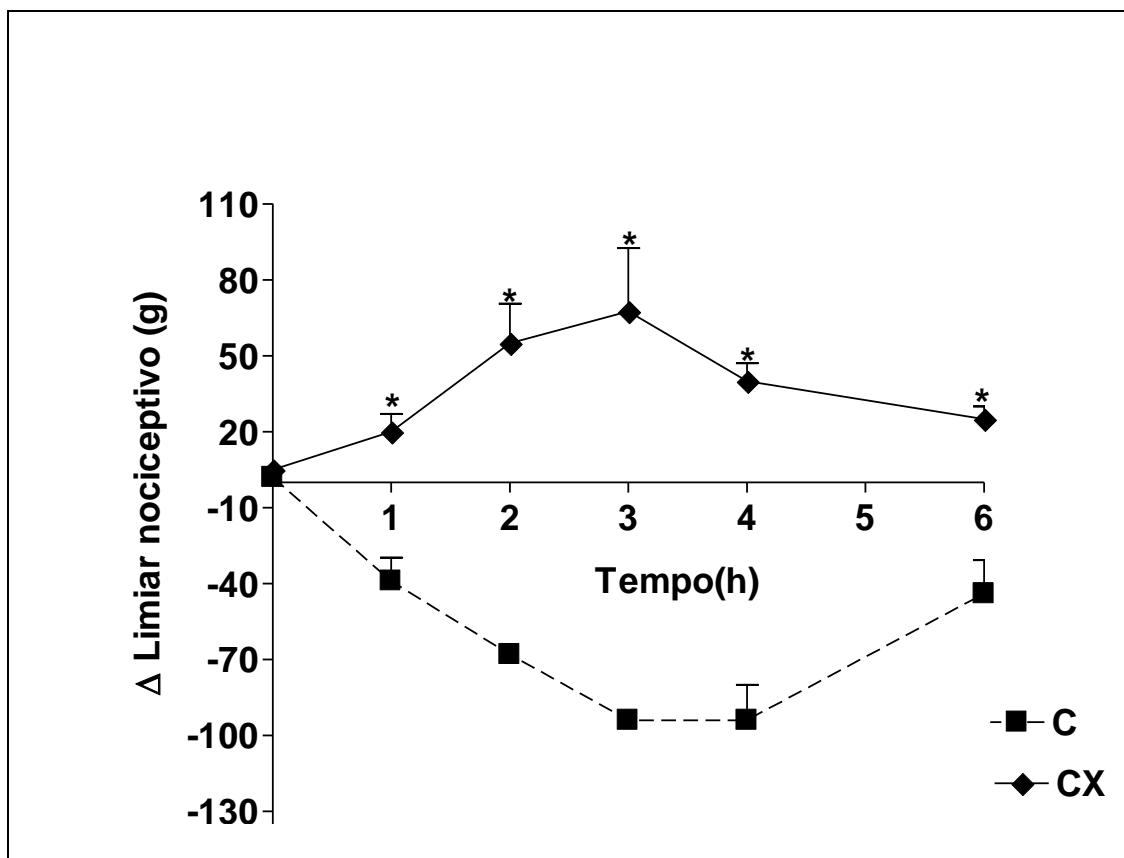


Gráfico 12: Efeito do celecoxibe na hiperalgesia induzida por PGE₂ em ratos. Para a medida de hiperalgesia foi utilizado o método de retirada da pata do rato submetida à compressão crescente após a injeção do estímulo. O inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe (CX), foi administrado por via subcutânea (12mg/kg) e o grupo controle (C) recebeu salina. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de 5-6 animais por grupo.

* Valores estatisticamente significativos, $P < 0,05$.

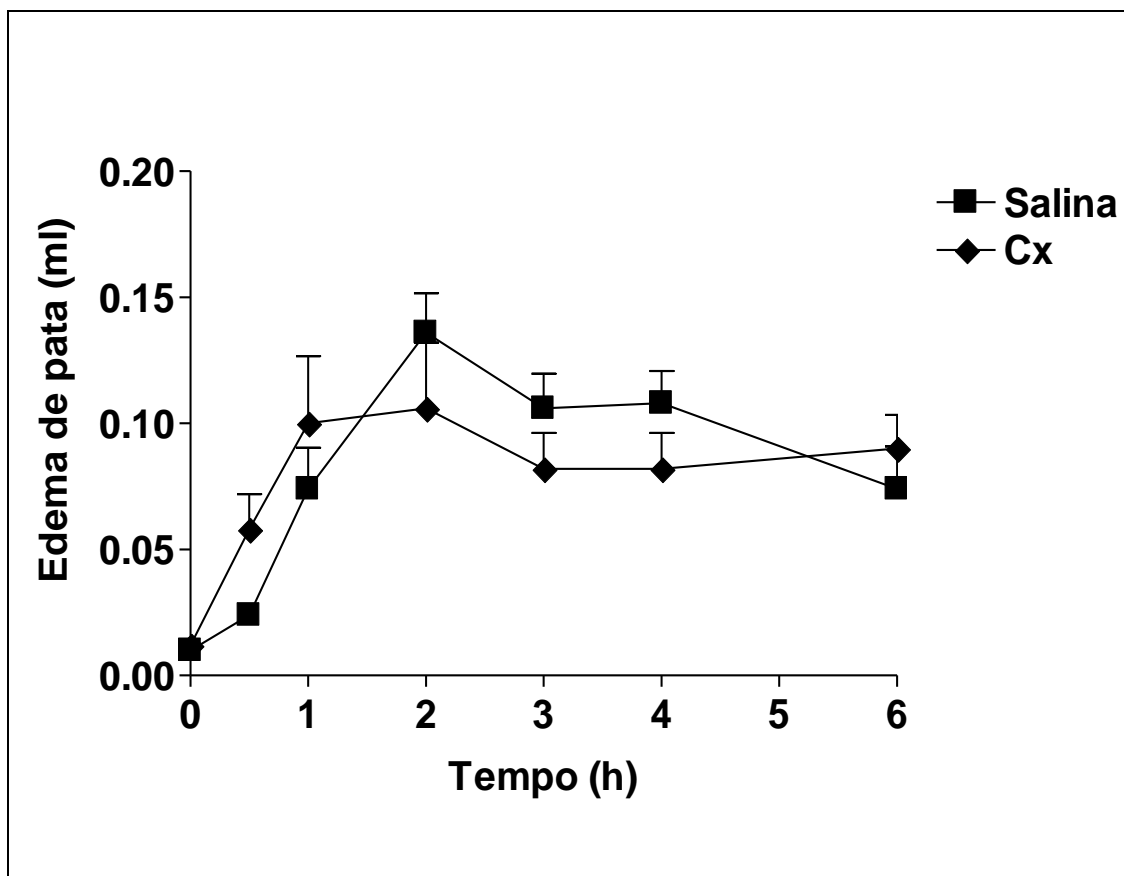


Gráfico 13: Efeito do celecoxibe no edema de pata induzido por PGE₂ em ratos.

O celecoxibe (12 mg/Kg, sc), inibidor seletivo de COX-2, foi administrado 30 minutos da injeção de PGE₂ (200ng/pata). O aumento do volume (em ml) das patas posteriores dos ratos foi medido na zero hora e 1, 2, 3, 4, 6 e 24 horas após a injeção do estímulo.

4.7 Efeito de L-NAME sobre a hipoalgesia induzida por celecoxibe.

Com o objetivo de avaliar a participação do óxido nítrico (NO) no efeito hipoalгésico do IC0X-2, celecoxibe, foi administrado L-NAME (inibidor de NO sintase) por via oral, 1 hora antes da injeção intraplantar de carragenina em animais tratados ou não com celecoxibe. L-NAME (30 mg/Kg), isoladamente, aboliu a hiperalgesia induzida por carragenina (gráfico 14) e reduziu o edema de pata (gráfico 15). O pré-tratamento com L-NAME reverteu parcialmente (cerca de 50%) a hipoalgesia induzida por celecoxibe injetado por via subcutânea (12 mg/Kg). Neste mesmo protocolo, o efeito apresentado por esta dose de celecoxibe foi alterado pelo pré-tratamento com L-NAME (gráfico 15).

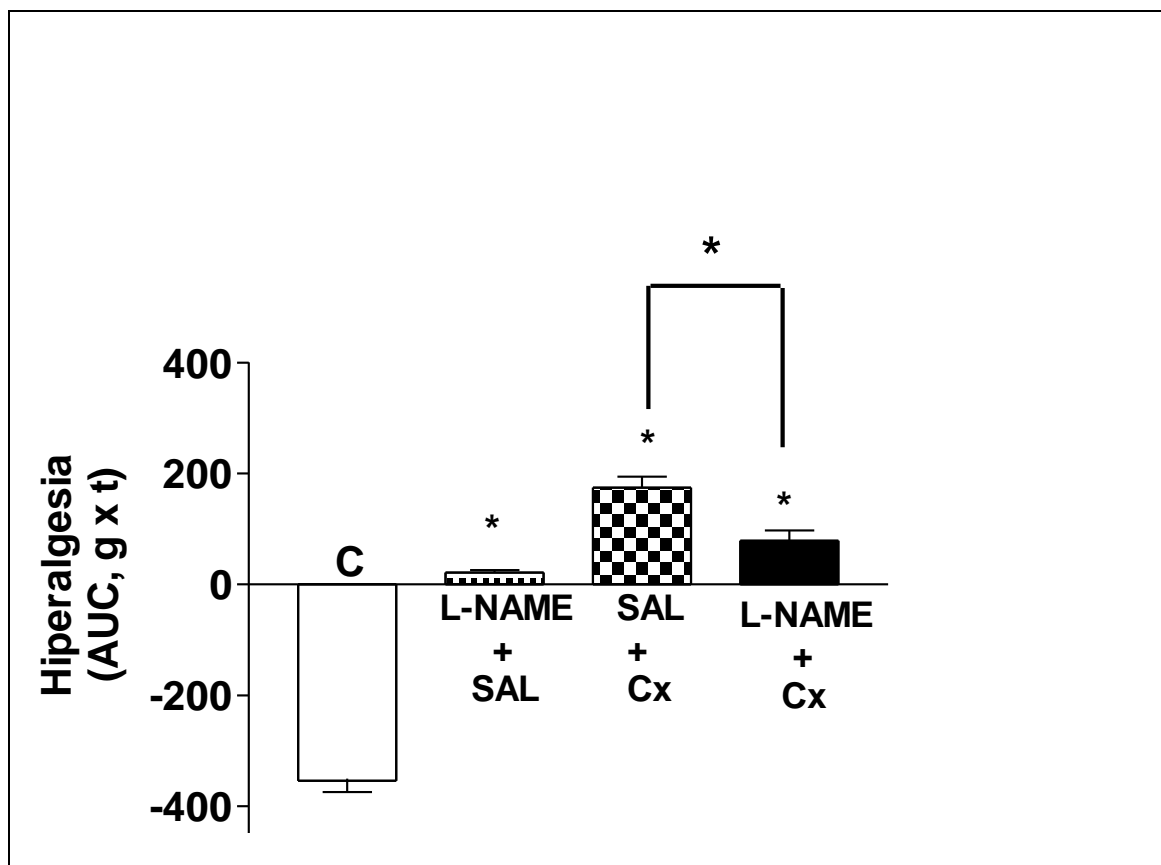


Gráfico 14: Efeito da administração oral de L-NAME sobre a hiperalgesia induzida por celecoxib. Os resultados foram apresentados em AUC em unidades de (grama versus tempo). Valores negativos representam hiperalgesia e valores positivos hipoalgesia. O inibidor de NO sintase, L-NAME, foi administrado *per os* (30 mg/Kg) uma hora antes da injeção de carragenina. O inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe (CX), foi administrado por via subcutânea (12 mg/Kg) meia hora antes da injeção de carragenina e o grupo controle (C) recebeu carragenina (250 µg/pata). Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) da AUC de cada grupo tratado 5-6 animais por grupo.

* Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais controle (C), e # indica diferença significativa entre os grupos apontados, $P < 0,05$.

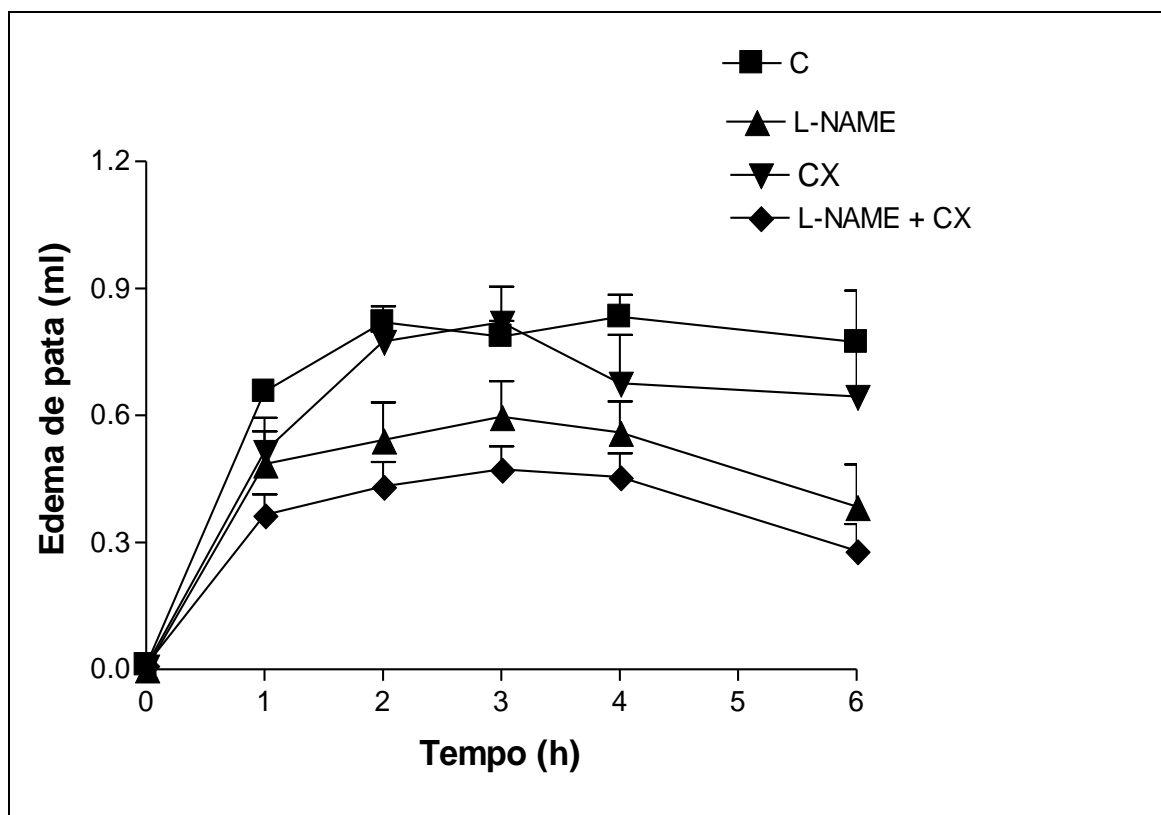


Gráfico 15: Efeito da administração oral de L-NAME sobre o edema de pata induzido por carragenina. O aumento do volume (em ml) das patas posteriores dos animais induzido pela injeção intraplantar de carragenina foi aferido pela imersão das patas em pletismômetro (Ugo Basile (modelo 1750) nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 6 horas após a injeção.. O inibidor de NO sintase, L-NAME, foi administrado por via *per os* (30 mg/Kg) uma hora antes da injeção de carragenina. O inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe (CX), foi administrado por via subcutânea (12mg/Kg) meia hora antes da injeção de carragenina.

Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado (5-6 animais por grupo).

4.8 Efeito de L-NMMA sobre a hipoalgesia induzida por celecoxibe.

Com o objetivo de confirmar a participação do óxido nítrico (NO) no efeito hipoalésico dos ICox-2, foi administrado outro inibidor de NO sintase L-NMMA por via subcutânea, 30 minutos antes da injeção intraplantar de carragenina em animais tratados ou não com celecoxibe. L-NMMA (10 mg/Kg, sc), isoladamente, reduziu a hiperalgesia induzida por carragenina (gráfico 16) e não alterou o edema de pata (gráfico 17). O pré-tratamento com L-NMMA reverteu a hipoalgesia induzida por celecoxib injetado por via subcutânea (12 mg/Kg). Neste mesmo protocolo, o efeito apresentado por esta dose de celecoxibe foi alterado pelo pré-tratamento com L-NMMA, ou seja, houve o aparecimento de efeito antiedematogênico, da mesma maneira que ocorreu entre a associação de L-NAME e celecoxibe, observado anteriormente (gráfico 17).

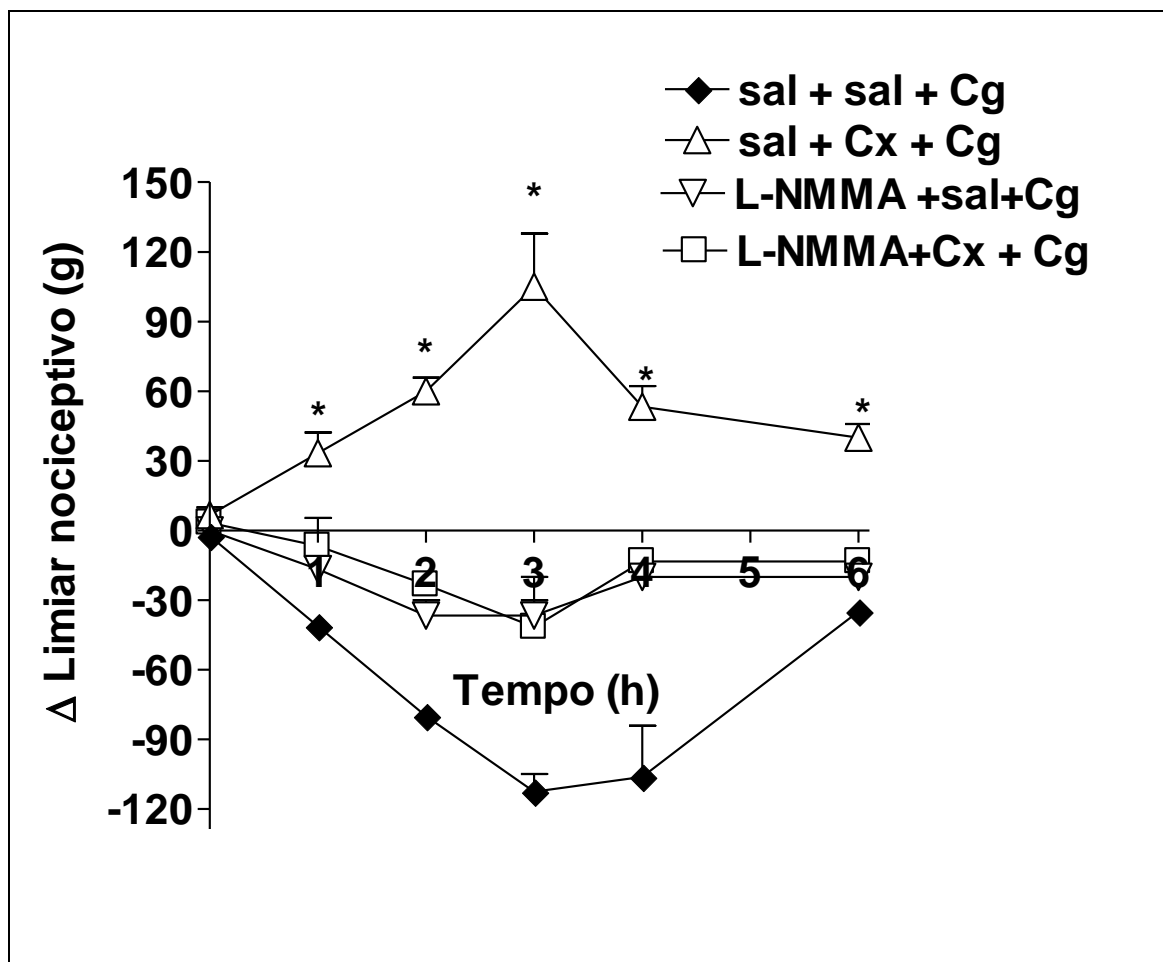


Gráfico 16: Efeito da administração oral de L-NMMA sobre a hipotalgesia induzida por celecoxibe. O inibidor de NO sintase, L-NMMA, foi administrado (10 mg/Kg, sc) uma hora antes da injeção de carragenina. O inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe (CX), foi administrado por via subcutânea (12 mg/Kg) meia hora antes da injeção de carragenina (250 µg/pata) e o grupo controle (C) recebeu salina. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado, 5-6 animais por grupo.

* Valores estatisticamente significativos, $P < 0,05$.

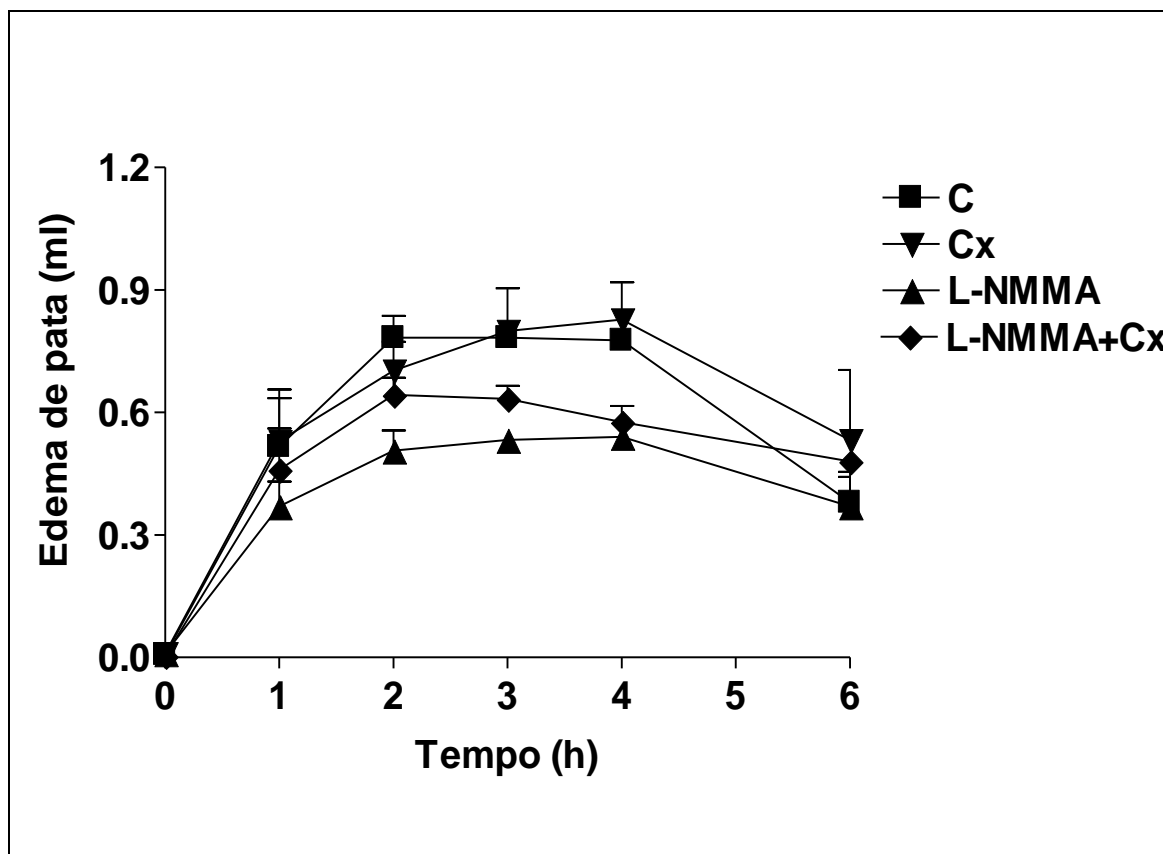


Gráfico 17: Efeito da administração oral de L-NMMA sobre o edema de pata induzido por carragenina. O aumento do volume (em ml) das patas posteriores dos animais induzido pela injeção intraplantar de carragenina foi aferido pela imersão das patas em pletismômetro (Ugo Basile (modelo 1750) nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 6 horas após a injeção.. O inibidor de NO sintase, L-NMMA, foi administrado (10 mg/Kg, sc) uma hora antes da injeção de carragenina. O inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe (CX), foi administrado por via subcutânea (12mg/Kg) meia hora antes da injeção de carragenina e o grupo controle (C) recebeu salina. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado (5-6 animais por grupo).

4.8 Efeito de naltrexona sobre a hipoalgesia induzida por inibidores seletivos e não seletivos de COX-2.

A naltrexona, antagonista de receptor opioidérgico, na dose de 3mg/Kg, não afetou a hiperalgesia induzida por carragenina. Entretanto, aboliu a hipoalgesia induzida pelos inibidores seletivos para COX-2, celecoxibe (12 mg/Kg, sc), SC 236 (12 mg/Kg, sc) e rofecoxib (0,7 mg/Kg, sc) (gráficos 18, 19 e 20). Vale ressaltar que esta dose de naltrexona reverteu o efeito antinociceptivo da morfina (2mg/Kg, sc).

Como mostra o gráfico 21, a naltrexona não alterou o efeito antinociceptivo do inibidor não seletivo de COX-2, a indometacina (4 mg/Kg, sc).

Em conjunto, esses dados sugerem o envolvimento de opióides endógenos na resposta hipoalgéica induzida por inibidores seletivos de COX-2 em ratos.

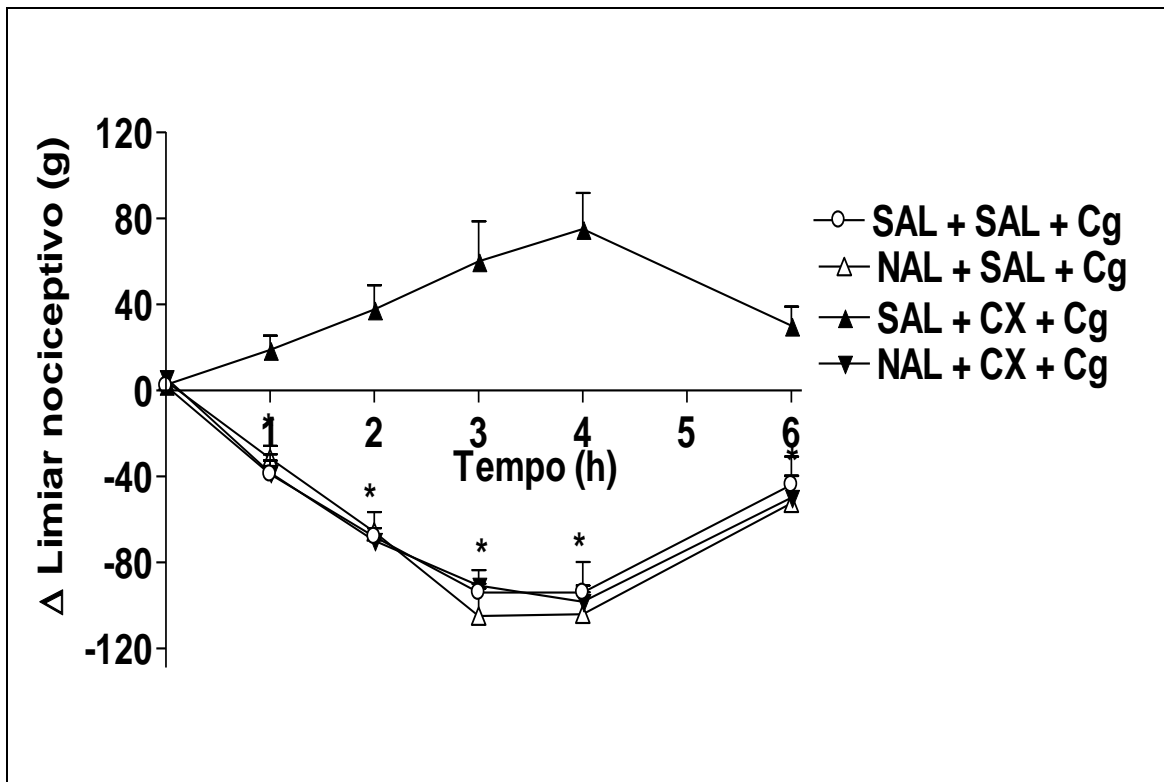


Gráfico 18: Efeito de naltrexona sobre a hipoalgesia induzida por celecoxibe. Os animais foram pré-tratados com o antagonista de receptor opióide, naltrexona (3mg/Kg, sc) ou salina uma hora antes de carragenina. Celecoxibe ou salina foi administrado (12mg/Kg, sc) meia hora antes de carragenina. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado 5-6 animais por grupo.

Valores estatisticamente significativos, $P < 0,05$.

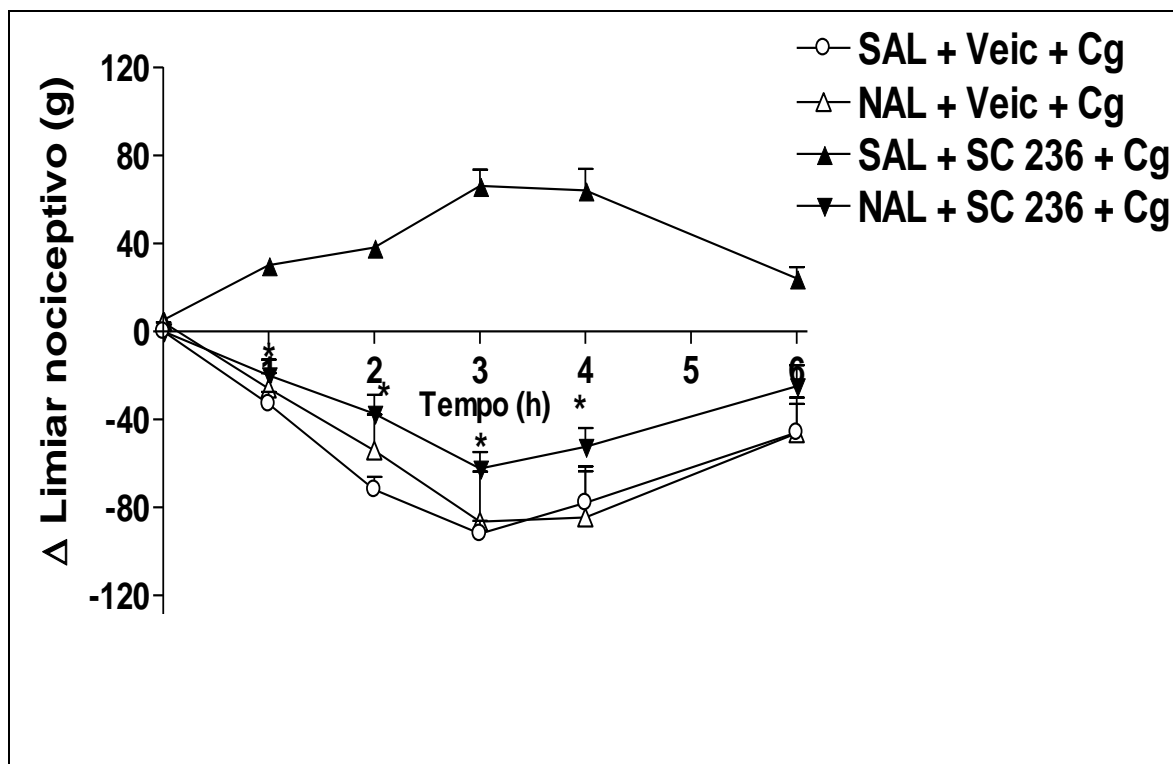


Gráfico 19: Efeito de naltrexona sobre a hipoalgesia induzida por SC 236. Os animais foram pré-tratados com o antagonista de receptor opióide, naltrexona (3mg/Kg, sc) ou salina uma hora antes de carragenina. SC 236 ou veículo foi administrado (12mg/Kg, sc) meia hora antes de carragenina. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado 5-6 animais por grupo.

Valores estatisticamente significativos, $P < 0,05$.

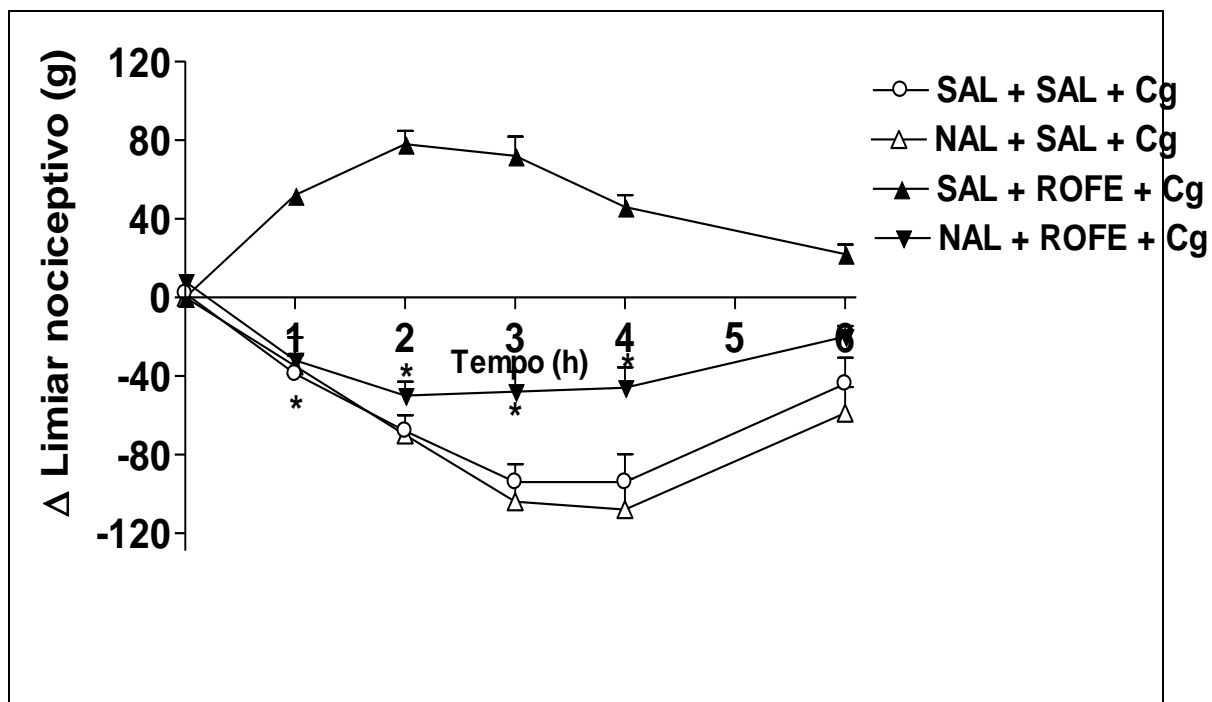


Gráfico 20: Efeito de Naltrexona sobre a hipalgesia induzida por rofecoxibe. Os animais foram pré-tratados com o antagonista de receptor opióide, naltrexona (3mg/Kg, sc) ou salina uma hora antes de carragenina. Rofecoxibe ou salina foi administrado (0,7 mg/Kg, sc) meia hora antes de carragenina. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado 5-6 animais por grupo.

Valores estatisticamente significativos, $P < 0,05$.

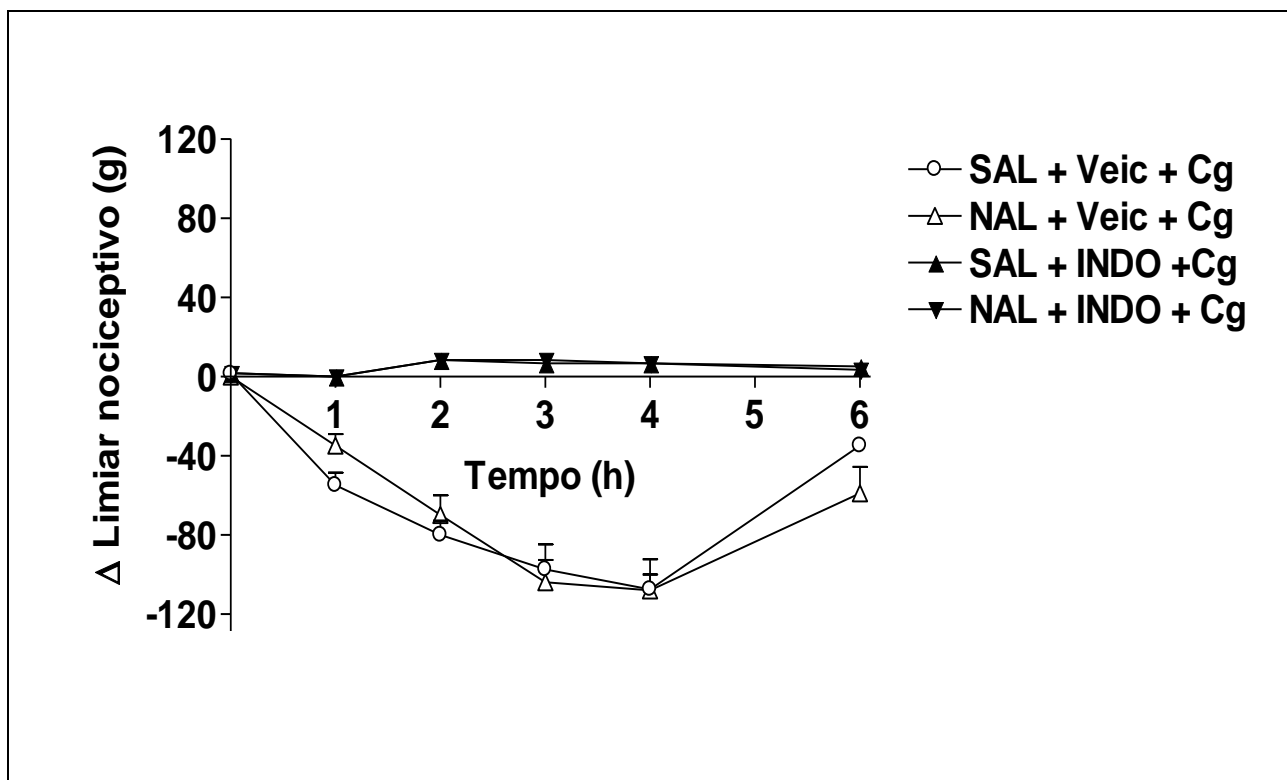


Gráfico 21: Efeito de Naltrexona sobre o efeito antinociceptivo induzido por indometacina. Os animais foram pré-tratados com o antagonista de receptor opióide, naltrexona (3mg/Kg, sc) ou salina uma hora antes de carragenina. Indometacina ou veículo foi administrado (4 mg/Kg, sc) meia hora antes de carragenina. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado 5-6 animais por grupo.

4.9 Efeito dos inibidores de ciclooxigenases em ratos tolerantes à morfina.

Com o objetivo de observar o envolvimento de opióides endógenos no modelo estudado, inibidores de COX foram administrados em ratos tolerantes à morfina. Os animais receberam diariamente (2 vezes por dia) administração de morfina que levou a redução dos efeitos antinociceptivos de morfina no modelo de hiperalgisia induzida por PGE₂. (gráfico 22).

Foi usada PGE₂ (200 ng/pata) para induzir hiperalgisia e o limiar nociceptivo foi medido nos dias 1, 3, 5 e 6, no momento em que ocorre o pico da hiperalgisia, ou seja, na 3^a hora de experimento.

Como mostra o gráfico 22, no primeiro dia, a morfina foi capaz de reverter a hiperalgisia induzida por PGE₂ e causar hipoalgisia. No terceiro dia, a hipoalgisia foi suprimida e no quinto dia o efeito antinociceptivo da morfina desapareceu, indicando o desenvolvimento de tolerância nesses animais. No sexto dia os inibidores de COX (SC236, indometacina ou SC560) foram utilizados no grupo de animais tratados com salina ou morfina por cinco dias.

No grupo de ratos tolerantes à morfina (sexto dia), a administração aguda de SC236 não alterou a hiperalgisia induzida por PGE₂. Entretanto, o grupo tratado com salina por cinco dias este inibidor induziu hipoalgisia (gráfico 22). Em contraste, o efeito antinociceptivo do inibidor seletivo de COX-1, SC560, e do inibidor não seletivo indometacina, não foi alterado nos animais tolerantes à morfina (gráfico 23).

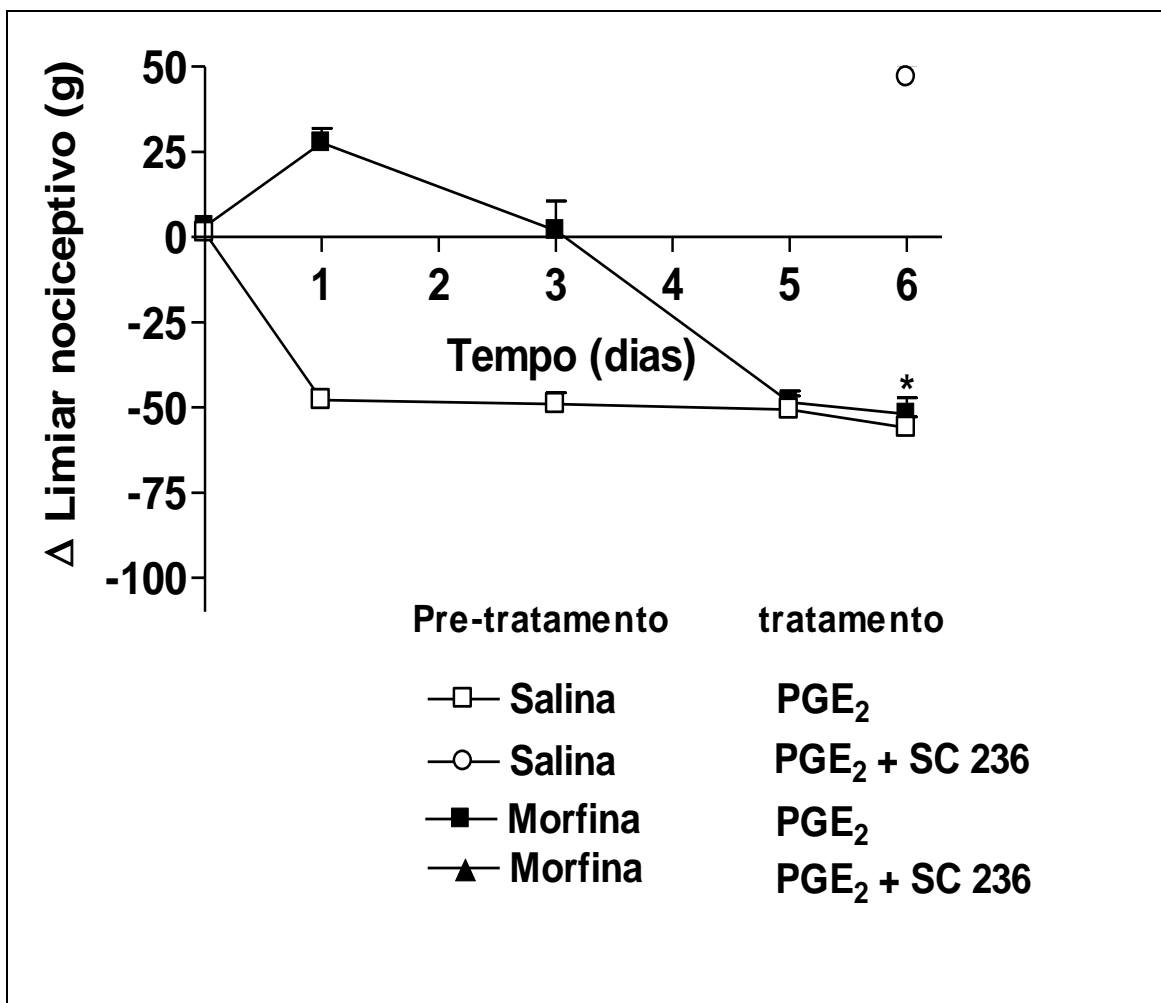


Gráfico 22: Avaliação da resposta hipoalgésica em ratos tolerante a morfina e tratados com SC 236. Os animais receberam diariamente injeções subcutânea de morfina ou salina (5 dias). Nos dias 1, 3, 5 e 6, PGE₂ (200 ng) foi injetada na pata e o limiar nociceptivo medido na 3^a hora após a injeção. No sexto dia, os animais foram pré-tratados com SC 236 (12 mg/kg; s.c.) 30 minutos antes da injeção de PGE₂. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado 5-6 animais por grupo.

*Valores estatisticamente significativos, $P < 0,05$

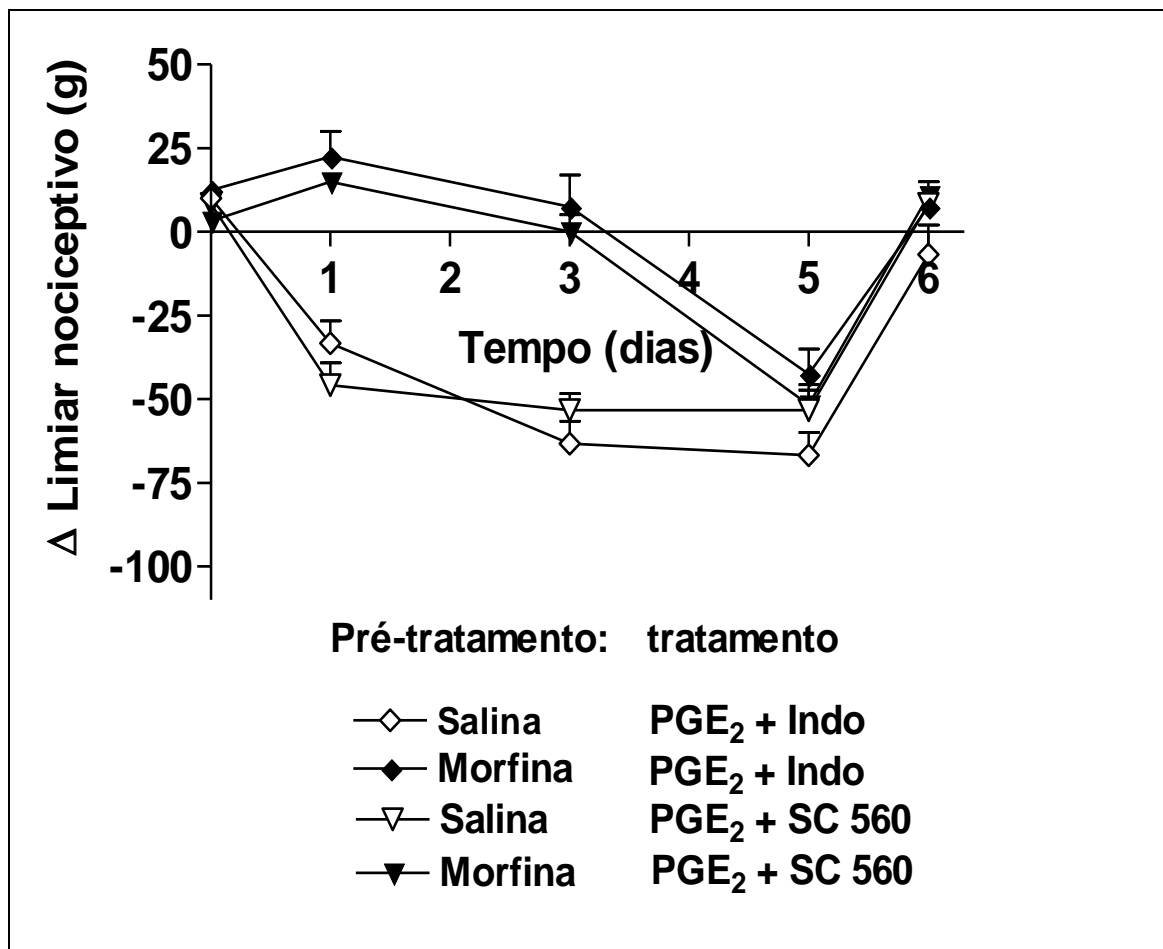


Gráfico 23: Desenvolvimento de tolerância à morfina e a resposta hiperalgésica em ratos tratados com SC 560 ou indometacina. Os animais receberam diariamente injeções subcutânea de morfina ou salina (5 dias). Nos dias 1, 3, 5 e 6, PGE₂ (200 ng) foi injetada na pata e o limiar nociceptivo medido na 3^a hora após a injeção. No sexto dia, os animais foram pré-tratados com SC 560 (5 mg/kg; s.c.) ou indometacina (4mg/Kg; s.c.) 30 minutos antes da injeção de PGE₂. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado 5-6 animais por grupo.

4.10 Efeito do paclitaxel (taxol) na hipoalgesia induzida por celecoxib.

Como a neurotransmissão em geral, e a neurotransmissão da dor em particular, envolve a participação do citoesqueleto celular, procuramos verificar na seqüência de experimentos a seguir, se os mecanismos da hipoalgesia induzida pelos inibidores seletivos de COX-2 envolveria a participação do citoesqueleto. Para isso, os animais foram pré-tratados com diferentes doses de paclitaxel (taxol) por via intraplantar. Como se pode observar, o paclitaxel reduziu de forma dose-dependente a hipoalgesia e o efeito antinociceptivo induzido por celecoxib administrado por via subcutânea na dose de 12mg/Kg (gráfico 24). A dose de 20 µg administrada localmente foi capaz de reverter completamente o efeito antinociceptivo do celecoxibe, a níveis equivalentes de nocicepção apresentada por animais não tratados com celecoxibe. O taxol não alterou o edema de pata induzido por carragenina (gráfico 25). Vale ressaltar que o taxol também não alterou a hiperalgesia induzida por carragenina, nas doses utilizadas nesses experimentos.

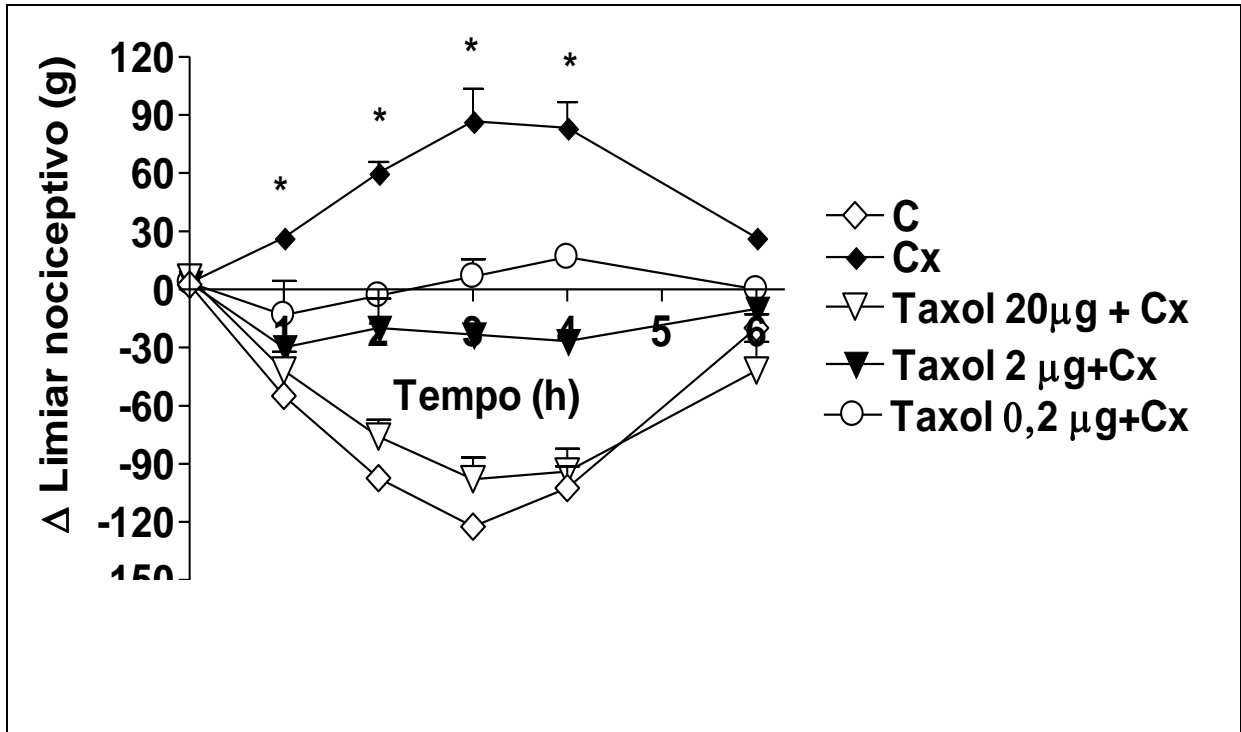


Gráfico 24: Reversão dose-dependente pelo paclitaxel (taxol) da hipotalgesia induzida por celecoxib. O desestabilizador de microtúbulos, paclitaxel (taxol, 20, 2 e 0,2 μg/pata) foi administrado por via intraplantar uma hora antes da injeção de carragenina. O grupo tratado recebeu o inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe (CX) por via subcutânea (12 mg/Kg) meia hora antes da injeção de carragenina (250 μg/pata) enquanto que o grupo controle (C) recebeu salina. Os valores apresentados são as médias (± e.p.m.) de cada grupo tratado, 5-6 animais por grupo.

* Valores estatisticamente significativos, $P < 0,05$.

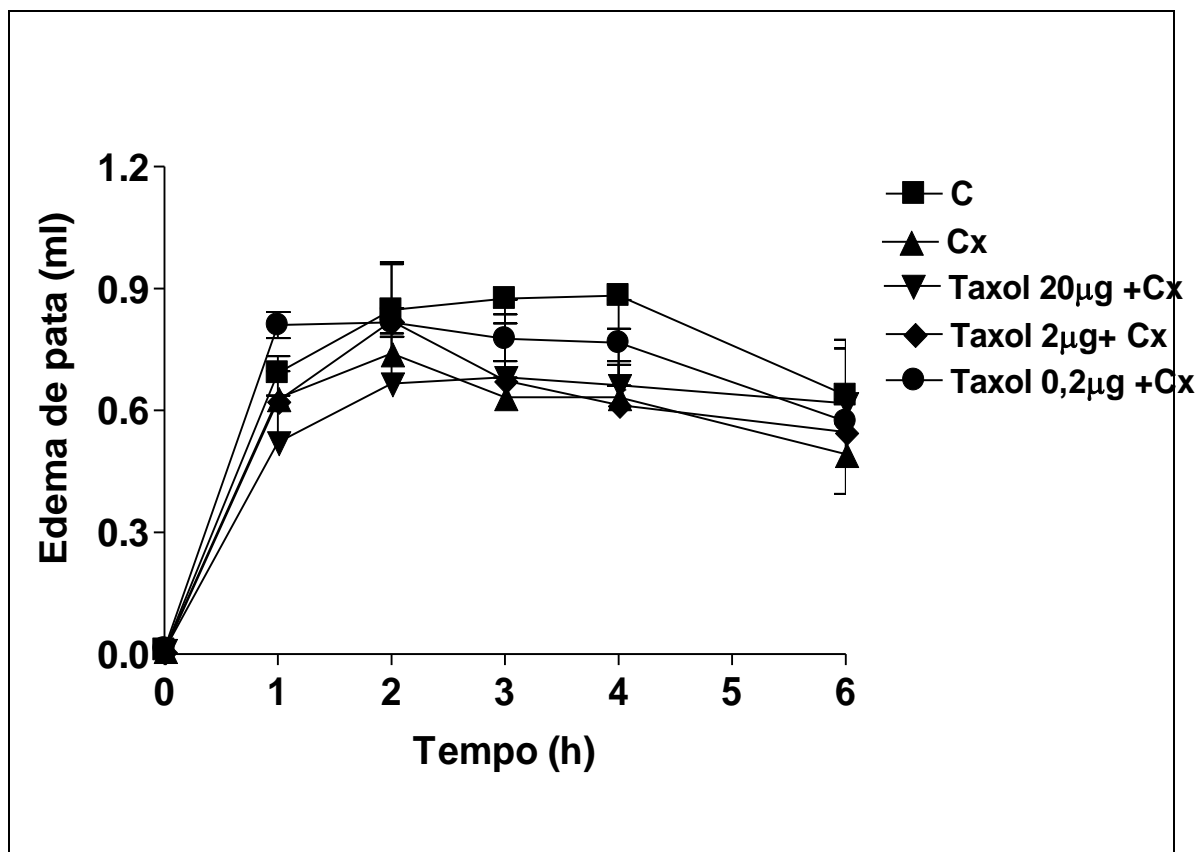


Gráfico 25: Efeito da administração intraplantar de paclitaxel (taxol) sobre o edema de pata induzido por carragenina. O aumento do volume (em ml) das patas posteriores dos animais foi aferido pela imersão das patas em pletismômetro (Ugo Basile (modelo 1750) nos tempos zero, 1, 2, 3, 4 e 6 horas após a injeção intraplantar de carragenina. O desestabilizador de microtúbulos foi administrado (taxol, 20, 2 e 0,2 µg/pata) uma hora antes da injeção de carragenina. O inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe (CX), foi administrado por via subcutânea (12mg/Kg) meia hora antes da injeção de carragenina e o grupo controle (C) recebeu salina. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado (5-6 animais por grupo)

4.11 Efeito da colchicina na hipoalgesia induzida por celecoxibe.

O pré-tratamento com outro desestabilizador de microtúbulos, a colchicina, por via intraplantar também reverteu, de forma dose-dependente, a hipoalgesia e o efeito antinociceptivo induzido pela administração subcutânea de celecoxibe (12mg/Kg). As doses de colchicina administradas não alteraram a hiperalgesia induzida por carragenina, conforme apresentado no gráfico 26.

O pré-tratamento com diferentes doses de colchicina não alteraram o edema de pata induzido por carragenina (gráfico 27).

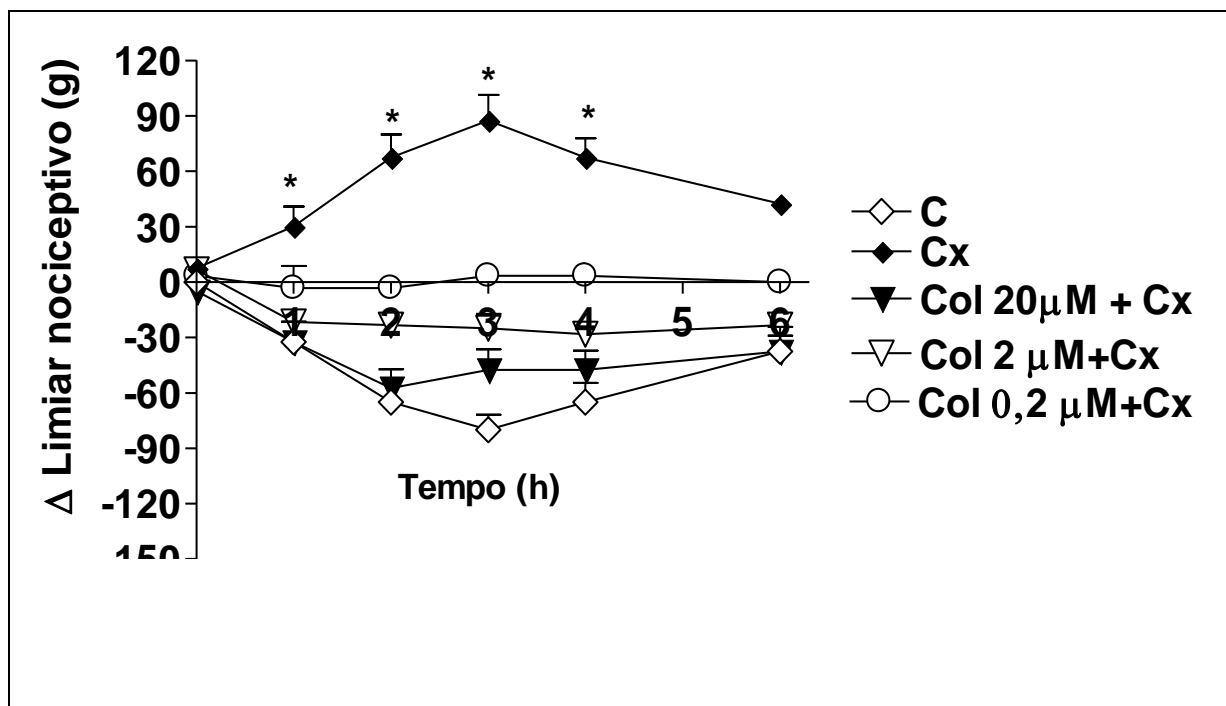


Gráfico 26: Efeito da colchicina na hipoalgesia induzida por celecoxibe. O desestabilizador de microtúbulos, colchicina (Col, 20, 2 e 0,2 μ M/pata) foi administrado por via intraplantar uma hora antes da injeção de carragenina. O inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe (CX), foi administrado por via subcutânea (12 mg/Kg) meia hora antes da injeção de carragenina (250 μ g/pata) e o grupo controle (C) recebeu salina. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado, 5-6 animais por grupo.

* Valores estatisticamente significativos, $P < 0,05$.

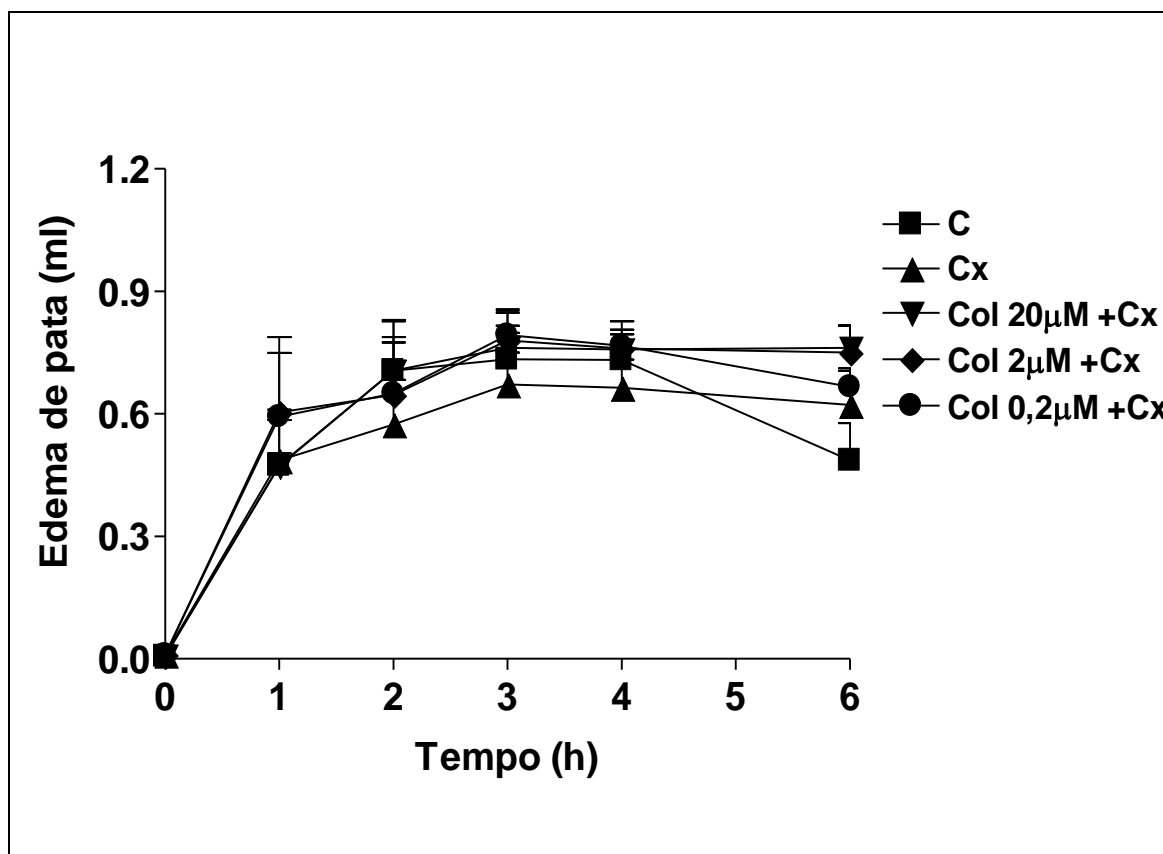


Gráfico 27: Efeito da administração intraplantar de colchicina sobre o edema de pata induzido por carragenina. O aumento do volume (em ml) das patas posteriores dos animais foi aferido pela imersão das patas em pletismômetro (Ugo Basile (modelo 1750) nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 6 horas após injeção intraplantar de carragenina. O desestabilizador de microtúbulos colchicina (20, 2,0 e 0,2 µM/pata) foi administrado uma hora antes da injeção de carragenina. O inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe (CX), foi administrado por via subcutânea (12mg/Kg) meia hora antes da injeção de carragenina e o grupo controle (C) recebeu salina. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado (5-6 animais por grupo).

4.12 Efeito do nocodazol na hipoalgesia induzida por celecoxibe.

Com o objetivo de observar se outro agente desestabilizador de microtúbulos alteraria a hipoalgesia induzida por ICOX-2, os animais foram pré-tratados com diferentes doses de nocodazol por via intraplantar. Como se pode observar, o nocodazol reduziu de forma dose-dependente a hipoalgesia e o efeito antinociceptivo induzido por celecoxibe administrado por via subcutânea na dose de 12mg/Kg (gráfico 28). A dose de 10 µg foi capaz de reverter completamente o efeito antinociceptivo do celecoxibe. O nocodazol não alterou o edema de pata induzido por carragenina (gráfico 29). Vale ressaltar que o nocodazol não altera a hiperalgesia induzida por carragenina.

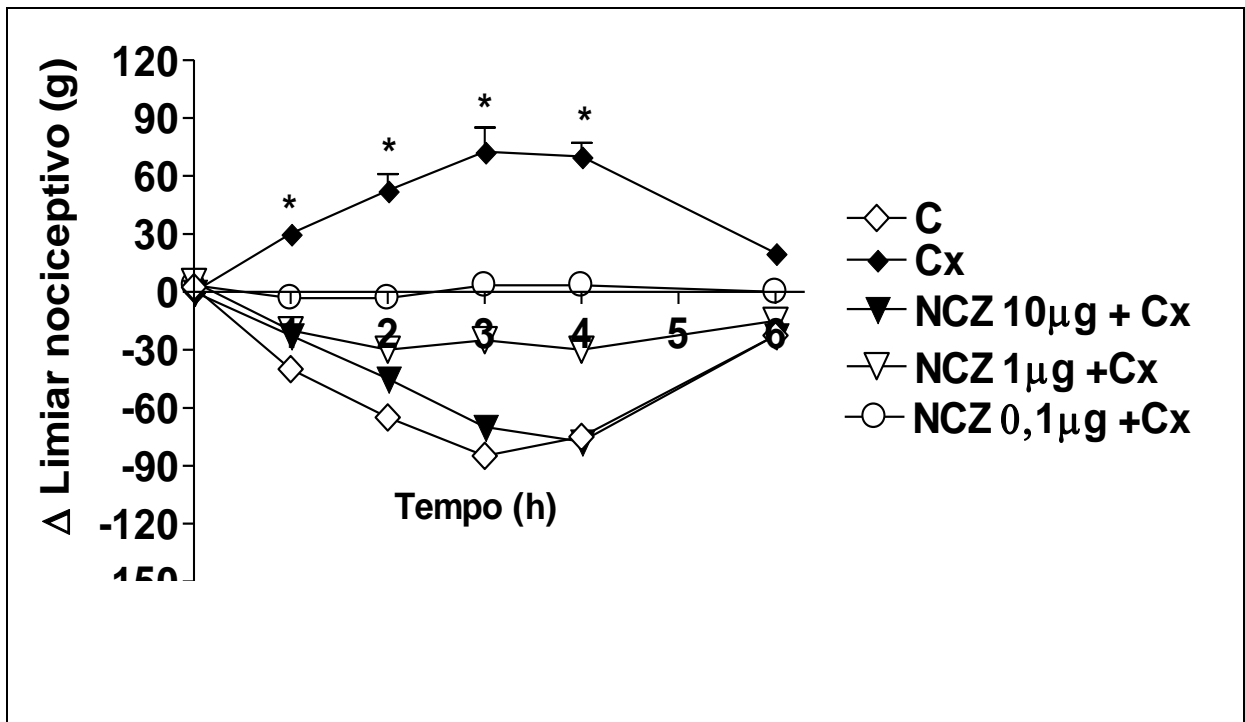


Gráfico 28: Efeito do nocodazol na hipoalgesia induzida por celecoxibe. O nocodazol (NCZ, 10, 1 e 0,1 µg/pata) foi administrado por via intraplantar uma hora antes da injeção de carragenina. O inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe (CX), foi administrado por via subcutânea (12 mg/Kg) meia hora antes da injeção de carragenina (250 µg/pata) e o grupo controle (C) recebeu salina. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado, 5-6 animais por grupo.

* Valores estatisticamente significativos, $P < 0,05$.

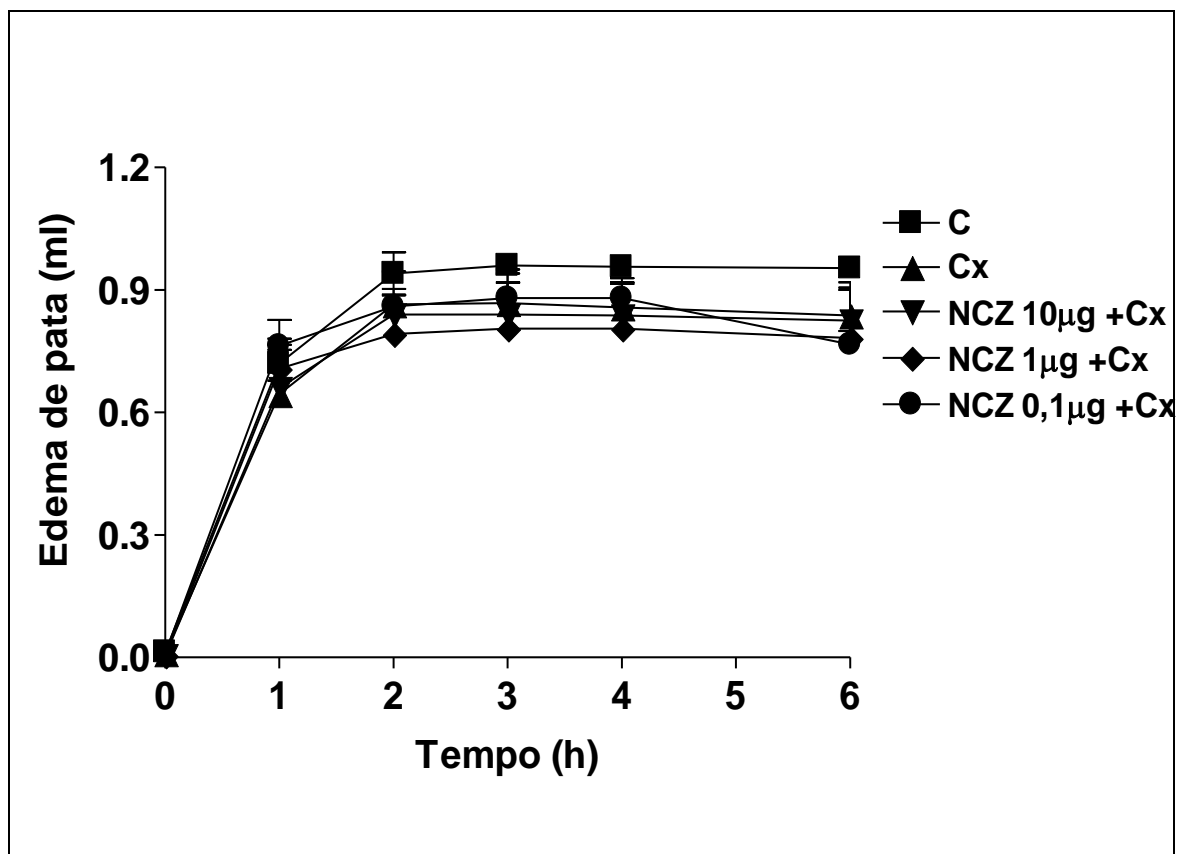


Gráfico 29: Efeito da administração intraplantar de nocodazol sobre o edema de pata induzido por carragenina. O aumento do volume (em ml) das patas posteriores dos animais foi aferido pela imersão das patas em pletismômetro (Ugo Basile (modelo 1750) nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 6 horas após injeção intraplantar de carragenina. O nocodazol (10, 1,0 e 0,1 µg/pata) foi administrado uma hora antes da injeção de carragenina. O inibidor seletivo de COX-2, celecoxibe (CX), foi administrado por via subcutânea (12mg/Kg) meia hora antes da injeção de carragenina e o grupo controle (C) recebeu salina. Os valores apresentados são as médias (\pm e.p.m.) de cada grupo tratado (5-6 animais por grupo).

4.13 Imunocitoquímica dos constituintes do citoesqueleto dos neurônios sensitivos cultivados com ICOX ou colchicina.

As lâminas obtidas na cultura de neurônios sensitivos, cultivadas com ICOX ou veículo, foram submetidos à coloração imunocitoquímica para α -tubulina. Estas lâminas foram observadas em microscópio confocal e em cada lâmina, três imagens foram gravadas para análise da fluorescência.

A figura 6 A mostra uma cultura de neurônios, cujo corpo celular e prolongamentos corados de verde, expressando a proteína estrutural α -tubulina e o núcleo corado com iodeto de propídio (vermelho). Estas culturas foram cultivadas com veículo (A) ou salina (B). Pode-se observar que o citoplasma e os prolongamentos estão imunomarcados, não demonstrando nenhuma descontinuidade na estrutura.

Quando os neurônios foram cultivados com SC 236, observa-se um declínio na coloração e pontos de descontinuidade na estrutura (figura 7 A e B). De modo semelhante ocorreu quando os neurônios foram tratados com rofecoxibe (figura 8 A e B). Entretanto o inibidor seletivo de COX-1 houve redução na fluorescência e não alterou a continuidade dos prolongamentos (figura 9 A e B).

A figura 10 (A e B) mostra neurônios cultivados na presença de piroxicam, um inibidor não seletivo de COX. Pode-se observar que há uma coloração com intensidade e continuidade semelhante às lâminas controles.

Quando os neurônios foram cultivados com um desestabilizador de microtúbulos, a colchicina a coloração foi de menor intensidade bem como ocorreu descontinuidade dos prolongamentos (figura 11 A e B). Vale ressaltar que todas as lâminas foram submetidas à mesma rotina de coloração e mesma resolução no microscópio.

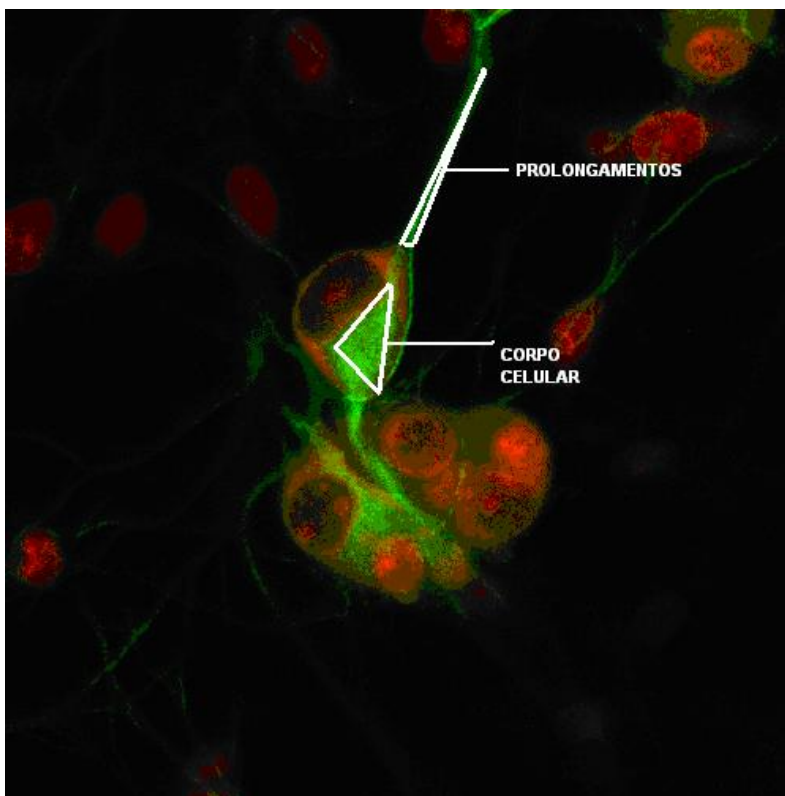
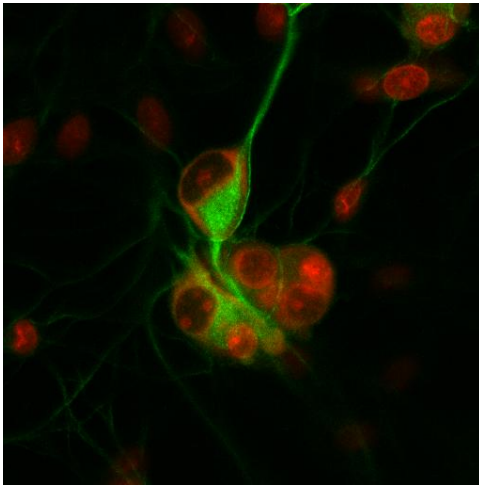


Figura 6: Cultura de neurônios sensitivos que foi tratada com veículo ou salina. A figura mostra cultura de neurônios cujo corpo celular e prolongamentos corados de verde, o núcleo corado de vermelho e as áreas selecionadas para quantificação da fluorescência. As lâminas foram submetidas à coloração imunocitoquímica com marcação para α -tubulina. Para cada lâmina foram coletadas três imagens sob microscopia confocal.

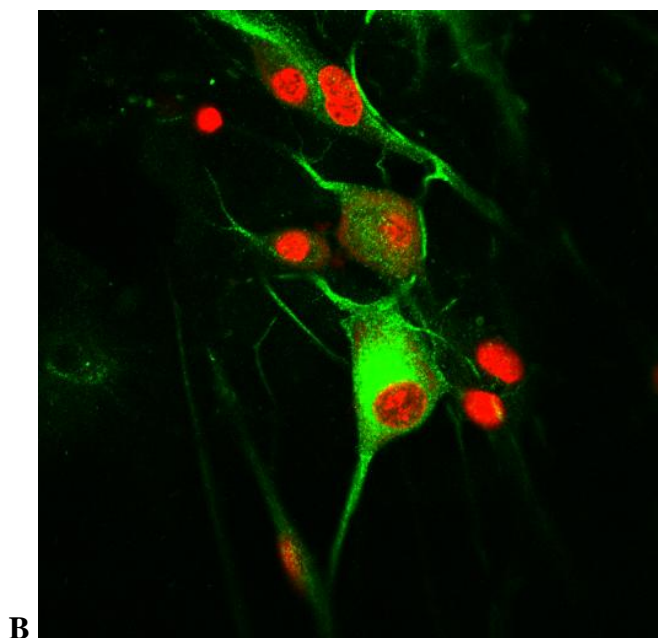
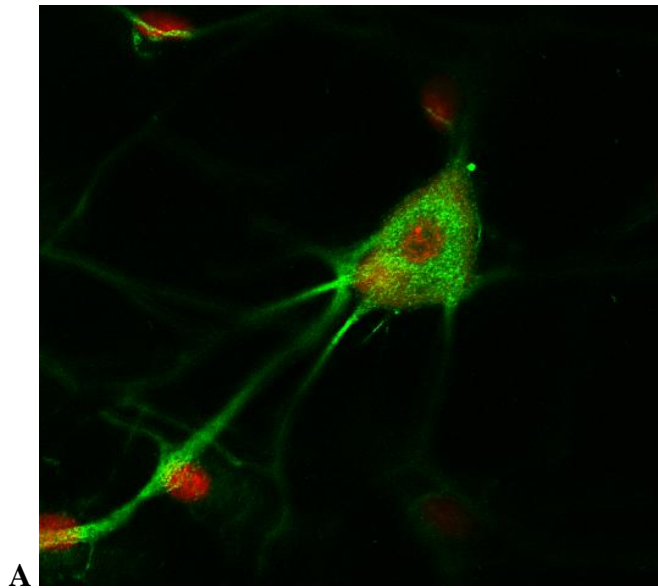
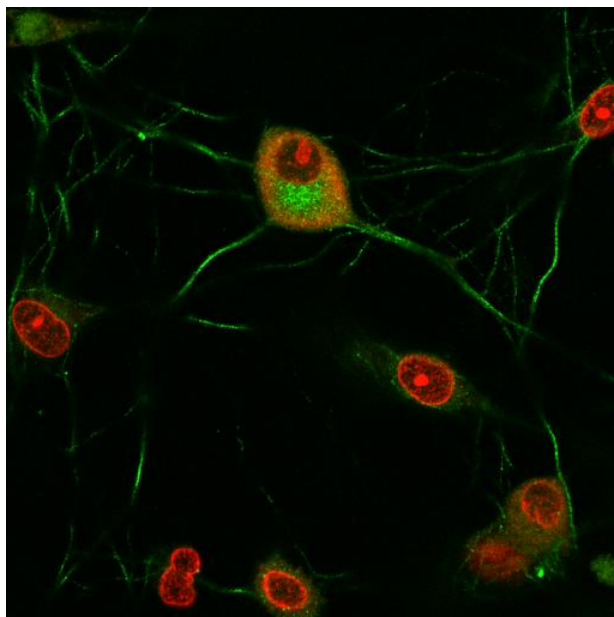
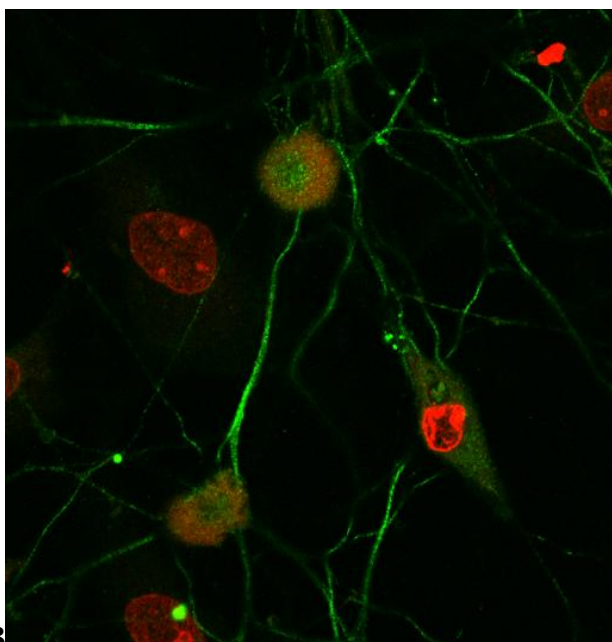


Figura 7: Cultura de neurônios sensitivos que foi tratada com veículo ou salina.

Estas culturas foram cultivadas com veículo (A) ou salina (B). Uma hora antes do período de incubação, veículo (A) ou salina (B) foi adicionada (10 μ L). As lâminas foram submetidas à coloração imunocitoquímica com marcação para α -tubulina. Para cada lâmina foram coletadas três imagens sob microscopia confocal.



A



B

Figura 8: Cultura de neurônios sensitivos que foram tratados com SC 236 (A e B).

Uma hora antes do período de incubação, o inibidor de COX-2 SC 236 (12 mg/ml, 10 μ L) foi adicionado. As lâminas foram submetidas à coloração imunocitoquímica com marcação para α -tubulina. Para cada lâmina foram coletadas três imagens sob microscopia confocal.

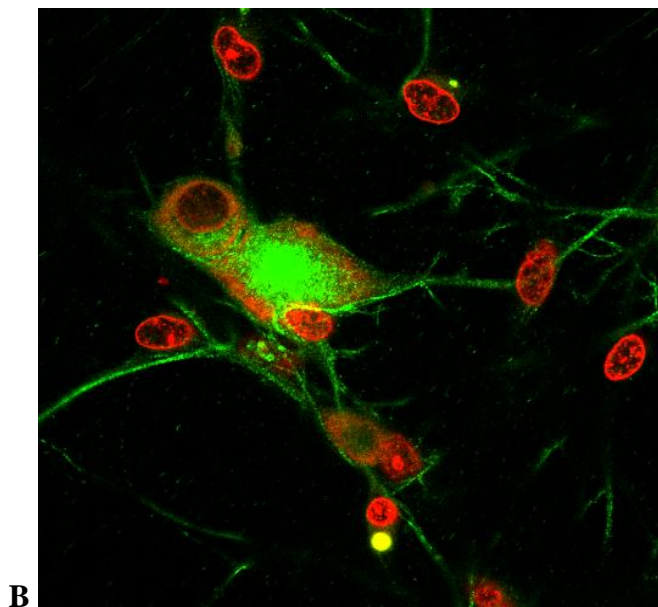
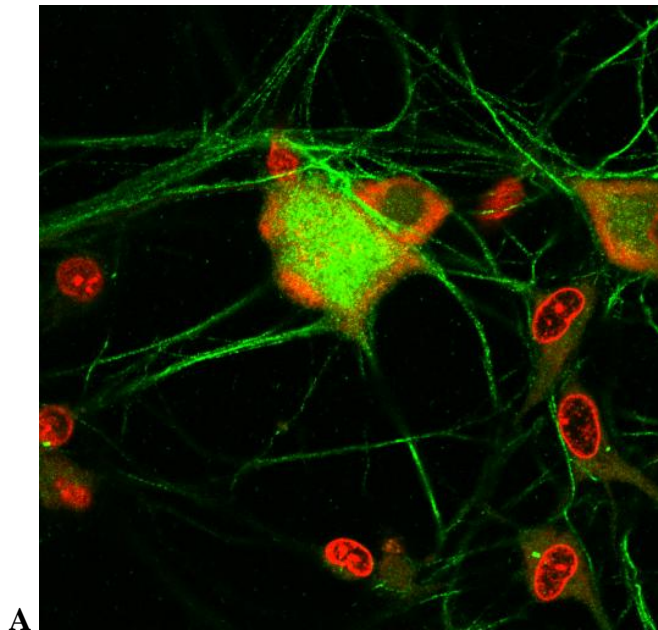


Figura 9: Cultura de neurônios sensitivos que foram tratados com rofecoxibe (A e B). Uma hora antes do período de incubação, o inibidor de COX-2 rofecoxibe (0,7 mg/ml, 10 μ L) foi adicionado. As lâminas foram submetidas à coloração imunocitoquímica com marcação para α -tubulina. Para cada lâmina foram coletadas três imagens sob microscopia confocal.

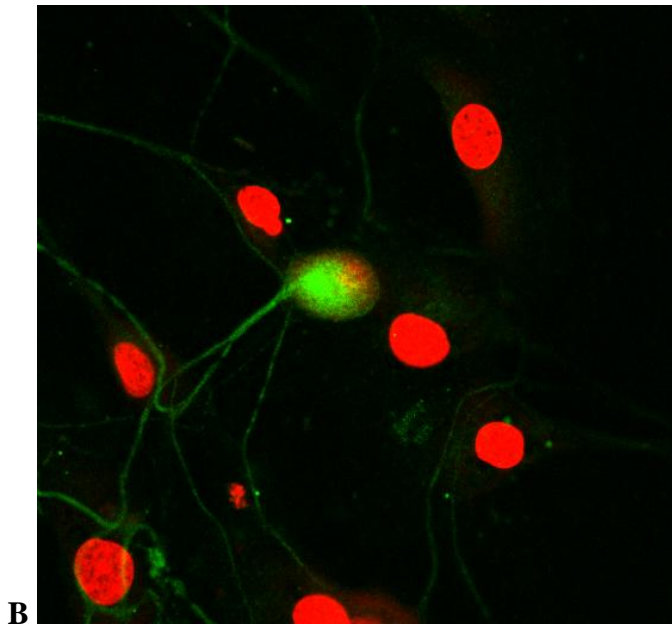
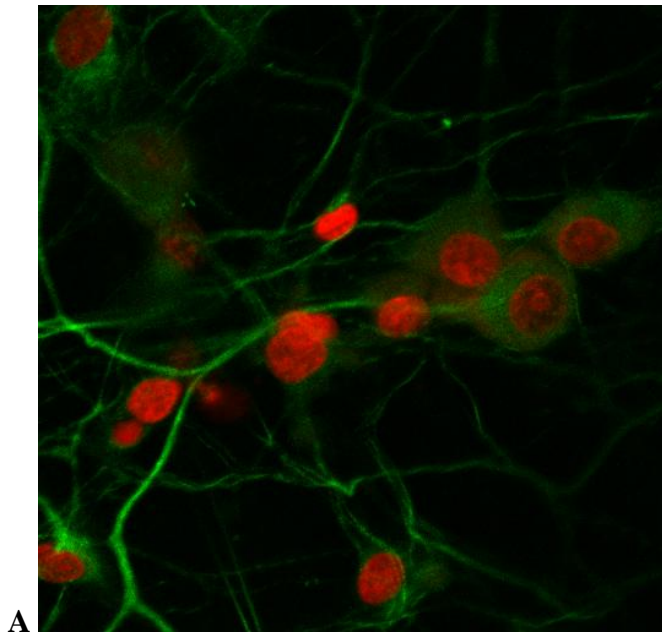


Figura 10: Cultura de neurônios sensitivos que foram tratados com SC 560 (A e B).

Uma hora antes do período de incubação, o inibidor de COX-1 SC 560 (1,0 mg/ml, 10 μ L) foi adicionado. As lâminas foram submetidas à coloração imunocitoquímica com marcação para α -tubulina. Para cada lâmina foram coletadas três imagens sob microscopia confocal.

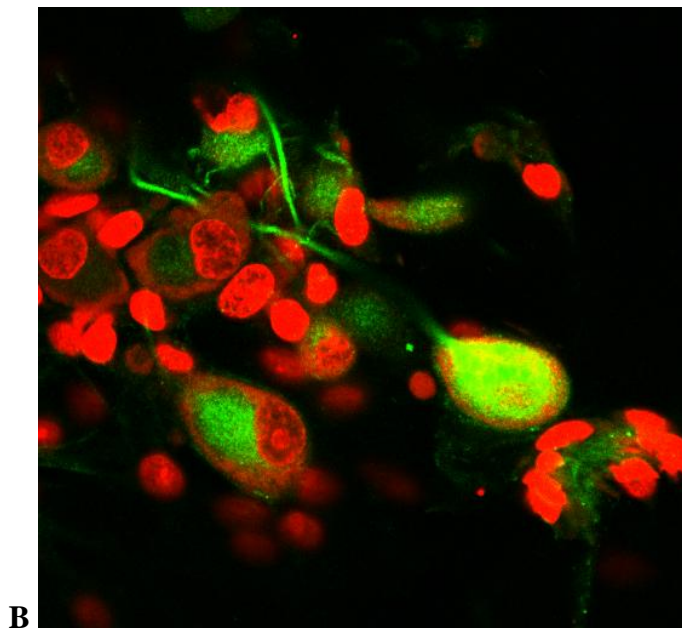
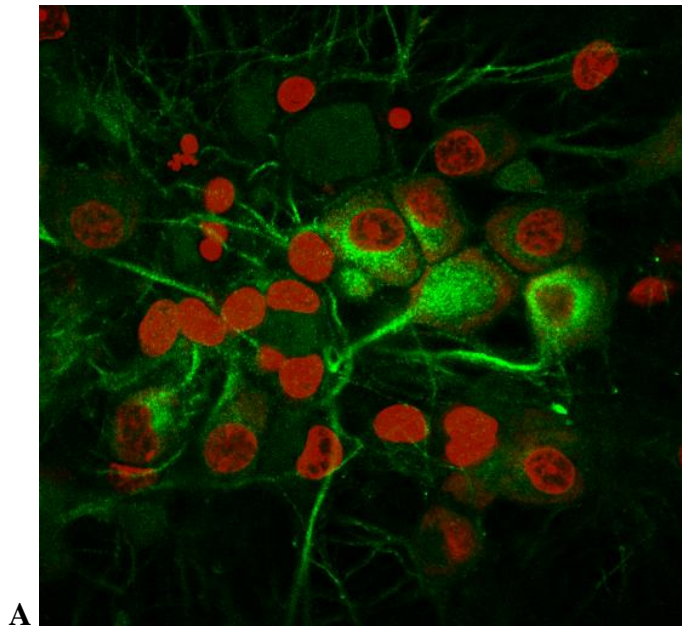


Figura 11: Cultura de neurônios sensitivos que foram tratados com piroxicam (A e B). Uma hora antes do período de incubação, o inibidor de COX piroxicam (3 mg/ml, 10 μ L) foi adicionado. As lâminas foram submetidas à coloração imunocitoquímica com marcação para α -tubulina. Para cada lâmina foram coletadas três imagens sob microscopia confocal.

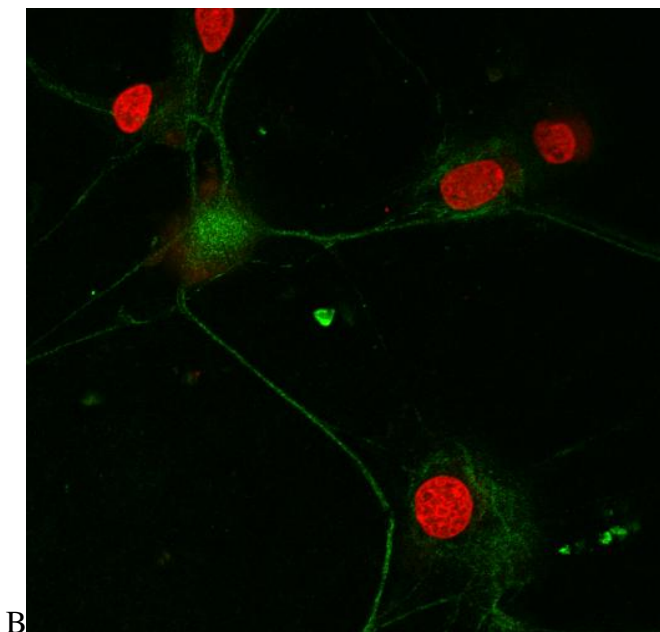
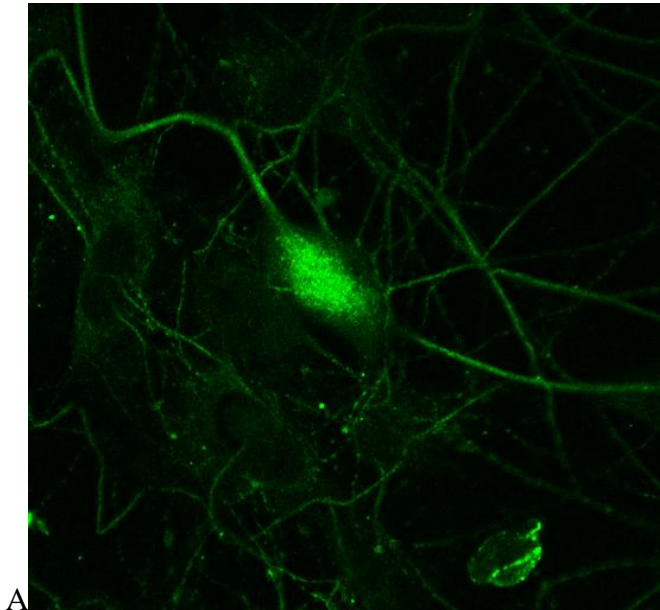


Figura 12: Cultura de neurônios sensitivos que foram tratados com colchicina (A e B). Uma hora antes do período de incubação, o desestabilizador de microtúbulos colchicina (20 μ M/ml, 10 μ L) foi adicionado. As lâminas foram submetidas à coloração imunocitoquímica com marcação para α -tubulina. Para cada lâmina foram coletadas três imagens sob microscopia confocal.

4.14 Quantificação da fluorescência dos neurônios sensitivos cultivados com ICOX ou colchicina.

Foi feita quantificação da fluorescência dos prolongamentos e corpo celular dos neurônios que foram cultivados. Como podemos observar no gráfico 30 (A e B) que o corpo celular e os prolongamentos dos animais controles apresentam área de fluorescência elevadas (média±epm). Porém quando os neurônios foram cultivados com SC 236, um ICOX-2, esta área de fluorescência do corpo celular e dos prolongamentos reduziu cerca de 70%, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (Gráfico 30 A). Houve redução na área de fluorescência nos axônios em todos os tratamentos, porém não foi estatisticamente significativa (Gráfico 30 B).

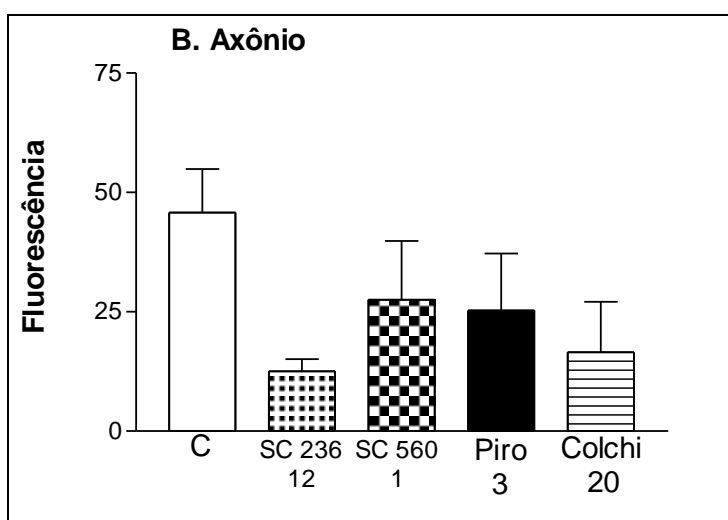
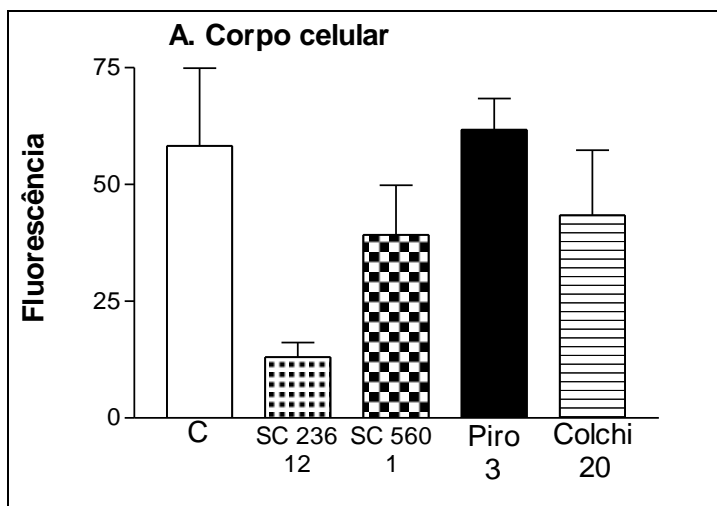


Gráfico 30: Quantificação da fluorescência no corpo celular (A) e em axônio (B) dos neurônios sensíveis cultivados com ICOX ou colchicina. Uma hora antes do período de incubação, o ICOX-2 SC 236 (12 mg/ml), o ICOX-1 SC 560 (1 mg/ml), piroxicam (3mg/ml) e o desestabilizador de microtúbulos colchicina (20 μ M/ml, 10 μ L) foram adicionados às culturas. As lâminas foram submetidas à coloração imunocitoquímica com marcação para α -tubulina e a quantificação da fluorescência nos axônios e corpo celular derivou da determinação da área da região delimitada, utilizando programa apropriado. Foram coletadas fluorescências de 22 lâminas, cada uma em triplicata.

5.0 DISCUSSÃO

5.1 Considerações gerais

O objetivo principal deste trabalho foi compreender os mecanismos envolvidos na resposta hipoalгésica induzida por inibidores seletivos de COX-2 (ICOX-2). O modelo hiperalгesia e edema de pata induzido por carragenina é bastante conhecido e estabelecido por envolver PGs e é um padrão para o estudo de drogas que apresentam efeito antiinflamatório, como os antiinflamatórios não esteróides (SWINGLE *et al.*, 1975; RIENDEAU *et al.*, 1997).

Desde que foi introduzida por Winter e colaboradores (1961), a injeção de carragenina na pata de ratos tem sido amplamente utilizada como modelo para estudo dos mecanismos envolvidos na ação de drogas antiinflamatórias não esteróides. A carragenina é um polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Chondrus crispus* e a fração lambda é a mais ativa em induzir resposta inflamatória aguda e crônica (DI ROSA, 1972). A administração intraplantar de carragenina causa edema, manifestado pelo aumento no volume da pata, e exacerba a sensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos, sendo chamada então de hiperalгesia (NANTEL *et al.*, 1999)

Essa hiperalгesia deve-se principalmente à liberação de prostaglandinas, já que a inflamação periférica aumenta os níveis de prostanóides e esta contribui diretamente para a dor inflamatória.

A hipoalгesia, aumento do limiar nociceptivo considerado acima dos níveis basais, induzida por AINES, teoricamente seria impossível se fosse dependente apenas da inibição da síntese de PGs, por isso o interesse em elucidar os principais mecanismos envolvidos nesta resposta.

Os primeiros experimentos do presente trabalho, tiveram como objetivo observar se a resposta hipoalгésica estaria relacionada com o animal utilizado. Foi demonstrado que esta resposta não esteve somente restrita aos ratos Holtzman, como foi originalmente descrito (FRANCISCHI *et al.*, 2002), mas foi reproduzida em duas outras linhagens de ratos comumente utilizadas em estudos de inflamação e dor como Wistar e Sprague-Dawley. As doses hipoalгésicas dos ICOX-2 utilizadas neste estudo foram escolhidas de acordo com trabalho de FRANCISCHI e colaboradores (2002), no qual curvas dose-resposta foram realizadas. A resposta hipoalгésica não está relacionada com a dose, pois, a administração local (intraplantar) ou sistêmica (subcutânea) dos ICOX-2 foi capaz de induzir essa mesma resposta. Além disso, a mesma resposta foi obtida quando a via de administração dos ICOX-2 foi a oral (dados não publicados). Para comprovar o efeito local do celecoxibe, quando este foi administrado por via intraplantar, carragenina foi injetada nas duas patas. Por meio deste experimento foi observado que o efeito realmente é local e não sistêmico. O celecoxibe também induziu hipoalgesia no modelo de hiperalgesia secundária induzido por formalina em ratos Wistar (VEIGA *et al.*, 2004).

Em relação à atividade anti-edematogênica, pode-se observar que dependendo da via de administração utilizada ocorre alteração da resposta, pois, os ICOX-2 por via subcutânea, bem como por via oral não reduziram estatisticamente o edema de pata (dados do laboratório). Entretanto, a resposta anti-edematogênica ficou evidente quando os animais receberam o tratamento intraplantar com os ICOX-2.

Para compreender os mecanismos envolvidos na resposta hipoalгésica induzida pelos ICOX-2, primeiro foi analisado o efeito de um inibidor seletivo para COX-1, SC 560 (MARTINEZ *et al.*, 2002; PENNING *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1998; SIQUEIRA Jr. *et al.*, 2003; PINHEIRO & CALIXTO, 2002) no mesmo modelo de hiperalgesia e

edema. Este inibidor somente reduziu a hiperalgisia induzida por carragenina, porém não induziu hipoalgisia e não afetou o edema de pata. O mesmo ocorreu com inibidores não seletivos, a indometacina e o piroxicam (FRANCISCHI *et al.*, 2002) Em conjunto, esses resultados sugeriram que a hipoalgisia não estaria relacionada apenas com a inibição da síntese PG.

Considerando que: 1) a inibição da síntese de PGs é o mecanismo principal de analgésicos e antiinflamatórios das drogas como a aspirina (VANE *et al.*, 1971); 2) as PGs são liberadas durante a inflamação induzida por carragenina em pata de ratos (VINEGAR, 1976) e 3) as PGs são mediadores presentes na hiperalgisia em ratos (FERREIRA & NAKAMURA, 1979) e em humanos (FERREIRA, 1972), poder-se-ia concluir que a inibição da síntese de PGs induzida por ICOX-2 seria responsável pelo desenvolvimento da hipoalgisia. Entretanto esta hipoalgisia foi demonstrada também quando o estímulo hiperalgésico utilizado foi a própria PGE₂, demonstrando que este fenômeno não estaria relacionado com o decréscimo da síntese de PGs. Assim, tornou-se necessário a pesquisa de outros mecanismos envolvidos nesta resposta.

5.2 Participação de NO

O NO é um mediador que está relacionado tanto com o sistema PG/COX (SALVEMINI *et al.*, 1995) como com a nocicepção (RIEDEL & NEECK, 2001). O NO é produzido a partir da L-arginina pela isoforma constitutiva da enzima NO sintase, e requer a ativação de um sítio sensível à calmodulina pelo cálcio intracelular; ou também pela isoforma induzida que é ativada por citocinas e endotoxinas. O NO formado ativa a guanililciclase que provoca aumento nos níveis de GMPc (MONCADA *et al.*, 1991), um segundo mensageiro chave para inúmeros processos fisiológicos.

O envolvimento do NO na modulação da nocicepção em diferentes modelos está bem estabelecido e a sua relevância em modelos de inflamação é bastante estudada. Entretanto, a contribuição desse mediador é bastante controverso, pois, NO pode exercer efeitos pró-nociceptivo, bem como antinociceptivo, dependendo do modelo experimental utilizado. A injeção local de doadores de NO, em pata de ratos, no modelo de hiperalgesia induzida por PGE₂, induziu antinocicepção quando injetada por via subcutânea, enquanto que a injeção intradérmica potencializou a hiperalgesia (VIVANCOS *et al.*, 2001) Entretanto, os inibidores de NOS induzem efeito antinociceptivo em modelo de artrite (ROCHA *et al.*, 2002; TEDESCO *et al.*, 2002). Vários estudos têm demonstrado a participação da via L-arginina/NO/GMPc na analgesia induzida por certas drogas como agonistas colinérgicos (DUARTE *et al.*, 1990a,b; DUARTE & FERREIRA, 1992), opióides (FERREIRA *et al.*, 1991; AMARANTE & DUARTE, 2002) e antiinflamatórios não esteróides (DUARTE *et al.*, 1992a; TONUSSI & FERREIRA, 1994) No modelo utilizado neste trabalho, L-NMMA, um inibidor de NOS, reverteu a hipoalgesia induzida pelo celecoxibe, indicando o envolvimento de NO nesta resposta. O L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS também reduziu a hipoalgesia induzida por celecoxibe. Este inibidor demonstrou tanto efeito antinociceptivo quanto efeito anti-hipoalgésico embora parte do efeito sistêmico do L-NAME tenha sido antinociceptivo.

5.3 Participação de opióides endógenos

Outro possível mecanismo estudado do efeito hipoalgésico induzido pelos ICOX-2 seletivos envolveu a participação de opióides endógenos. Os analgésicos

opióides, originalmente considerados por apresentarem ação central, são conhecidos por também apresentarem um papel na periferia, ou seja, no sítio onde ocorreu o estímulo nociceptivo (FERREIRA & NAKAMURA, 1979). A ação periférica dos opióides já está bem estabelecida (SMITH & BUCHAN, 1984; STEIN *et al.*, 2003) e são efetivos na hiperalgesia induzida por PGE₂ (FERREIRA & NAKAMURA, 1979; SACHS *et al.*, 2004).

O pré-tratamento com naltrexona, um antagonista de receptor opióide, no modelo utilizado neste estudo, reverteu a hipoalgesia induzida por ICOX-2, como o celecoxibe, rofecoxibe e SC 236. Vale ressaltar que a naltrexona não interferiu no desenvolvimento da hiperalgesia induzida por carragenina.

Rofecoxibe também exerceu efeito antinociceptivo no modelo de artrite pela interação via NO- GMPC e canais de potássio ativados por ATP (DÉCIGA-CAMPOS & LOPEZ-MUNOZ, 2004), resultados que foram compatíveis aos encontrados neste estudo. Os nossos resultados são os primeiros a demonstrar que o efeito antinociceptivo dos inibidores de COX-2 não é devido somente a inibição da síntese de PGs e que a naltrexona pode abolir esta resposta e indica um mecanismo que envolve a liberação de opióides. Como as ações periféricas da morfina que são conhecidas por envolver o NO endógeno, possivelmente os mecanismos podem estar associados (FERREIRA *et al.*, 1991).

Para confirmar a participação de opióides na resposta hipoalgésica, ratos tolerantes à morfina foram usados. Estes animais receberam injeções diárias de morfina que levou a redução dos efeitos antinociceptivos da morfina no modelo de hiperalgesia induzida por PGE₂. Os resultados mostraram uma completa perda do efeito antinociceptivo dos ICOX-2, confirmando que seus efeitos estariam relacionados com a

participação dos opióides endógenos. Corroborando tais achados, o efeito antinociceptivo do inibidor de COX-1, SC 560 e do inibidor não seletivo, indometacina, não foi afetado pela naltrexona ou pela tolerância à morfina, demonstrando que existem mecanismos diferenciados para este efeito para os diferentes inibidores de COX.

Provavelmente a capacidade dos ICOX-2 inibirem a síntese de PGs não está diretamente relacionada com seus efeitos hipalgésicos. Com estes resultados, demonstra-se que poderiam existir duas vias paralelas de antinocicepção, uma dependente de PG e outra que parece envolver opióides endógenos e outros mediadores, com funções distintas.

Vários estudos na literatura demonstraram a interação entre a enzima ciclooxigenase e opióides, associados com os inibidores de COX não seletivos, por exemplo, animais tratados com ibuprofeno (TROULLOS, *et al.*, 1997) ou cetorolaco (MITCHEL *et al.*, 1996) apresentaram aumento nos níveis sanguíneos de opióides endógenos. Além disso, o efeito antinociceptivo do cetorolaco foi revertido por naloxona (MITCHEL *et al.*, 1996).

HERERRO & HEADLEY (1996) demonstraram que a fluxina, um outro antiinflamatório não esteróide, reduz os reflexos espinhais e esta redução foi antagonizada pela naloxona administrada sistemicamente e estes mesmos autores relataram aumento da resposta nociceptiva induzida por este antagonista opióide. No presente estudo, o antagonista opióide naloxona não alterou a hiperalgesia de animais controles.

Como já foi discutido anteriormente, o efeito do celecoxibe administrado por via intraplantar não atinge a pata contralateral. A possibilidade de uma liberação local de opióides endógenos é possível, pois estudos já demonstraram a ação periférica de

opióides (FERREIRA & NAKAMURA, 1979; SMITH & BUCHAN, 1984; STEIN *et al.*, 2003).

Desse modo, este estudo é o primeiro a demonstrar que os efeitos antinociceptivos e hipoalgésicos induzido por inibidores seletivos de COX-2 envolvem a participação de opióides endógenos (FRANÇA *et al.*, 2006).

5.4 Participação do citoesqueleto celular

Os elementos citoesqueleto celular são responsáveis em organizar os mecanismos de transdução para a produção de hiperalgesia induzida por mediadores inflamatórios que agem diretamente nos nociceptores por meio da proteína G. Em ratos, os filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários são necessários para a hiperalgesia induzida por epinefrina (DINA *et al.*, 2003). Sugere-se que elementos do citoesqueleto são necessários para o funcionamento da PKA, que é um segundo mensageiro. Como foi demonstrado que o citoesqueleto é importante na hiperalgesia periférica e que pode ser um alvo para o tratamento da dor inflamatória, utilizou-se fármacos que desestabilizam os microtúbulos na hipoalgesia induzida por celecoxibe, para verificar se esses componentes estaria de alguma maneira envolvidos em tal mecanismo.

De acordo com os resultados, os desestabilizadores dos microtúbulos paclitaxel (taxol), colchicina e nocodazol reverteram a hipoalgesia induzida por celecoxibe de forma dose-dependente. Vale ressaltar que estes agentes não alteraram a hiperalgesia induzida por carragenina. SUBBARAMAIAH e colaboradores (2000) demonstram que

a fragmentação dos microtúbulos aumenta a transcrição de COX-2 e aumento da síntese de PGE₂.

Paclitaxel (Taxol) é um agente antineoplásico usado clinicamente para tratar uma variedade de tipos de câncer (VAISHAMPAYAN *et al.*, 1999). A alteração na estrutura e função do microtúbulo, por drogas como o taxol, resulta na ativação e/ou inativação de várias proteínas quinases, PKC (JUN *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1998; ZONG *et al.*, 2000) e PKA (CHO-CHUNG, 1990) que são via importantes para a nocicepção. DINA e colaboradores (2001) demonstraram a participação destas proteínas quinases na neuropatia induzida pelo taxol.

Estudos recentes têm elucidado a relevância da atividade da COX-2 para o desenvolvimento de certos tipos de tumores e a terapia contra o câncer envolvendo os inibidores de COX-2 têm sido amplamente estudada (BAHKLE, 2001). Foi recentemente demonstrado que a atividade da COX-2 no tratamento e prevenção desses tumores pode estar relacionada à dinâmica do citoesqueleto. Foi observada uma fragmentação do citoesqueleto nas células tratadas com o ICOX-2, que poderia dificultar o processo de invasão e metástase (JIA *et al.*, 2004). Os resultados aqui apresentados sugerem que modificações na polimerização de microtúbulos estão envolvidas no efeito hipalgésico do celecoxibe. Em estudo realizado, em paralelo, em nosso laboratório demonstrou que os inibidores dos filamentos actina, um importante componente do citoesqueleto, reverteu a hipotalgesia induzida pelo mesmo inibidor, enquanto que o inibidor de filamentos intermediários acrilamida não foi capaz de produzir o mesmo efeito.

Para tentar confirmar se a hipotalgesia induzida pelos ICOX-2 pode estar relacionado com o citoesqueleto, foi utilizada a técnica de imunocitoquímica e a microscopia confocal para visualizar a α -tubulina, que é um dos componentes que

compõe os microtúbulos, em cultura de neurônios sensitivos. Nas células tratadas com os inibidores seletivos de COX-2 observaram-se pontos de interrupção nos prolongamentos e redução da fluorescência, mostrando que estes inibidores provavelmente atuam na estrutura do microtúbulo. Nos experimentos feitos “*in vivo*”, a inibição de microtúbulos foi capaz de reverter a hipoalgesia, fato que não foi confirmado claramente pela marcação de α -tubulina (“*in vitro*”).

Em resumo, a hipoalgesia induzida por inibidores seletivos de COX-2 está envolvida com a participação de opióides endógenos com uma contribuição de NO. Além disso, mostrou-se que mecanismo na resposta hipoalгésica não está somente relacionado com a inibição da síntese de PGs, abre um novo caminho para a pesquisa de novos medicamentos analгésicos. Estudos demonstrando a participação da COX-2 na dinâmica do citoesqueleto são raros na literatura, e a interação entre coxibes e agentes perturbadores do citoesqueleto parece oferecer um campo promissor para pesquisa e futuras terapêuticas antiinflamatórias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANONSEN, L. M.; LEI, S.; WILCOX, G. L. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. *Pain*. 41:309-321, 1990.

AHMAD SR, KORTEPETER C, BRINKER A et al - Renal failure associated with the use of celecoxib and rofecoxib. *Drug Saf*, 2002;25:537-544.

AKERMAN, B.; ROSELL, S.; FOLKERS, K. Intrathecal (D-Pro², D-Trp^{7,9})-SP elicits and

antagonizes noxious responses induced by substance P. *Acta hypoalgesia and motor blockade in the rat* *Physiol. Scand.* 114:631-633, 1982.

ALEY, K. O.; McCARTER, G.; LEVINE, J. D. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J. Neurosci.*, v. 18, p.7008-7014, 1998.

ALVES, D. P.; TATSUO, M. A. F.; LEITE, R.; DUARTE, I. D. G. Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K⁺ channels activation. *Life Sci.*, v.74, p.2577-2591, 2004.

AMARANTE, L. H.; DUARTE, I. D. G. The k-opioid agonist (±)-bremazocine elicits

peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, v.454, p.19-23, 2002.

BARNES CJ, LEE M - Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the adenomatous polyposis coli min mouse model with aspirin. *Gastroenterology*, 1998;114:873-877.

BARON JA, COLE BF, SANDLER RS ET.AL - A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med*, 2003;348: 891-899.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M. The perception of pain. In: Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessel, T. M. (Eds) *Principles of Neural Science*. 4.ed. Mc Graw Hill, 2000. Cap.24, p.472-491.

BASBAUM, A. I.; WOOLF, C. J. Pain. *Curr Biol.*, v.9, p. R429-R431, 1999.

BREDER C, SAPER CB - Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res*, 1996;713:64-69

CHAN C-C, BOYCE S, BRIDEAU C, CHARLESON S, CROMLISH W, ETHIER D, EVANS J, FORD-HUTCHINSON AW, FORREST MJ, GAUTHIER JY, GORDON R, GRESSER M, GUAY D, KARGMAN S, KENNEDY B, LEBLANC Y, LEGER S, MANCINI J, O'NEILL GP, OUELLET M, PATRICK D, PERCIVAL MD, PERRIER H, PRASIT P, RODGER I, TAGARI P, THERIEN M, VICKERS P, VISCO D, WANG Z, WEBB J, WONG E, XU L-J, YOUNG RN, ZAMBONI R, RIENDEAU D. Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-Methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and Biochemical profiles. *J. Pharm. Exper. Therap.* 1999;290:551-560.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROSS, T. L. K.; NATHAN, K. E.; 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. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 99(21): 13926-13931, 2002.

CHO-CHUNG, Y.S.,. Role of cyclic AMP receptor proteins in growth, differentiation, and suppression of malignancy: new approaches to therapy. *Cancer Res.* 50, 7093-7100, 1990.

COHN SM, SCHLOEMANN S, TESSNER T ET AL - Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. *J Clin Invest*, 1997;99: 1367-1379.

CORCHERO, J.; AVILA, M. A. ; FUENTES J. A.; MANZANARES, J. Delta-9-tetrahydrocannabinol increases prodynorphin and proenkephalin gene expression in the spinal cord of the rat. *Life Sci* 61(4): PL39-43, 1997.

CROFFORD LJ - COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol*;24:15-19, 1997.

CRUNKHORN, P.; WILLIS, A. L. Cutaneous reactions to intradermal prostaglandins. *Br. J. Pharmacol.* v.41, p.49-56, 1971.

CRYER B, DUBOIS A - The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase. A review. *Prostaglandins*, 1998;56:341-361.

CUNHA, F. Q. ; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H., The pivotal role of tumor necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology*; 107: 660-664, 1992.

DAHL, J. B.; BRENNUN, J.; ARENDT-NIELSEN, L.; JENSEN, T. S. ; KEHLET, H. The effect of pre versus post-injury infiltration with lidocaine on thermal and mechanical hyperalgesia after heat injury to the skin. *Pain*, 53:43-51,1993.

DEVCHAND PR, KELLER H, PETERS JH ET AL - The PPAR α - leukotriene B₄ pathway to inflammatory control. Nature, 1996;384:39-43.

DEWITT DL, SMITH WL - Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. Proc Natl Acad Sci, 1988;85: 1412-1416.

DAVIS AJ, PERKINS MN The involvement of bradykinin B₁ and B₂ receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. Br J Pharmacol 1994 113(1):63-8.

DÉCIGA-CAMPOS M, LÓPEZ-MUÑOZ FJ. Participation of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K⁺ channel cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. Eur. J. Pharmacol 2004;484:193-199.

DINA O. A., CHEN, X. REICHLING D., LEVINE J. D. Role of protein kinase C and protein kinase A in model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in rat. Neuroscience Vol. 108, No. 3, pp. 507-515, 2001

DINCHUK JE, LIU RQ, TRZASKOS JM.. COX-3: in the wrong frame in mind. Immunol Lett. 2003 Mar 3;86(1):121

DRAY A., Inflammatory. mediators of pain. *Br J Anaesth.* 1995 Aug;75(2):125-31.

DUARTE, I. D. G.; DOS SANTOS, I. R.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H.

Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, v.217, p.225-227, 1992b.

DUARTE, I. D. G.; FERREIRA, S. H. The molecular mechanism of central analgesia

induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, v.221, p.171-174, 1992a.

DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, v.186, p.289-293, 1990a.

DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Acetylcholine induces

peripheral analgesia by the release of nitric oxide. In: MONCADA, S.; HIGGS, E. A. (Ed) *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*. London, Elsevier Science Publishers, 1990b. p.165-170.

DUBOIS RN, ABRAMSON SB, CROFFORD L ET AL - Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*, 1998;12:1063-1073.

ENGLAND, S.; BEVAN, S.; DOCHERTY, R. J. PGE₂ modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J. Physiol.*, v.495, p.429-440, 1996.

ERNST EJ, EGGE JA - Celecoxib-induced erythema multiforme with glyburide cross-reactivity. *Pharmacotherapy*, 2002;22: 637-640.

FERREIRA SH, VANE JR - Mode of Action of Anti-Inflammatory Agents which are Prostaglandin Synthetase Inhibitory, em: Vane JR, Ferreira SH - *Anti-Inflammatory Drugs*. New York, Springer-Verlag, 1979;348-398.

FERREIRA SH, LORENZETTI BB, BRISTOW AF, POOLE S Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*. 1988 Aug 25;334(6184):698-700

FERREIRA SH, DUARTE ID, LORENZETTI BB. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.* 1991;201(1):121-2.

FERREIRA, SH, NAKAMURA M. I- Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca⁺⁺ dependent process. *Prostaglandins* 1979a;18:179-190.

FIEBICH BL, HULL M, LIEB K ET AL - Prostaglandin E₂ induces interleukin-6 synthesis in human astrocytoma cells. *J Neurochem*;68:704-709, 1997.

FISCHER JW, GROSS DM - Effects of Prostaglandins on Erythropoiesis, em: Silver M, Smith BJ, Kocsis JJ - Prostaglandins in Haematology. New York, Spectrum Publications Inc, 1977; 159-185.

FITZGERALD GA, PATRONO C - The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med*;345:433-442, 2001.

FITZGERALD, GA, Prostaglandins: modulators of inflammation and cardiovascular risk. *J. Clin Rheumatol.* 2004 Jun;10(3 Suppl):S12-7

FRANCISCHI, J.N. ; CHAVES, C.T. ; LIMA, A.S. ; BAKHLE, Y.S. A new anti-nociceptive pathway mediated by cyclooxygenase-2 in rat paw inflammation induced by carrageenan. *Br. J. Pharm.* 135 :159p, 2002.

GIMBEL, J.S., BRUGGER, A. ZHAO, W., VERBURG, K. M. & GEIS, S. Efficacy and tolerability of celecoxib versus hydrocortisone/acetaminophen in the treatment of pain after ambulatory orthopedic surgery in adults. *Clinical Therapeutics* 23(2), 228-241. 2001.

GOLD, M. S.; REICHLING, D. B.; SHUSTER, M. J.; LEVINE, J. D. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na^+ current in nociceptors. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, v.93, p.1108-1112, 1996.

GROB M, SCHEIDEGGER P, WUTHRICH B - Allergic skin reaction to celecoxib. *Dermatology*; 201:383, 2000.

HARDY, J.D. ; WOLFF, H.G. ; GOODELL, H. Pain sensations and reactions, (Williams and Wilkins, Eds). Reprinted by Hafner Publishing, New York, 1967.

HAWKEU CJ - COX-2 Inhibitors. *Nature*,;353:307-314, 1999

HE TC, CHAN TA, KINZLER KW - PPAR δ is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*, 1999;99:335-345.

HERSCHMAN HR. PROSTAGLANDIN SYNTHASE 2. *Biochim Biophys Acta*.

Jan 5;1299(1):125-40, 1996

HINZ B, BRUNE K - Cyclooxygenase-2 10 years later. *J. Pharmacol. Exp Ther.*;300:367-375, 2002.

HLA T, BISHOP-BAILEY D, LIU CH ET AL - Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int J Bioch Cell Biol.*;31:551-557, 1999

HULL M, LIEB K, FIEBICH BL - Anti-inflammatory drugs: a hope for Alzheimer's disease? *Expert Opin Investig Drugs* ;9: 671-683, 2000.

JOUZEAU Y, TERLAIN B, ABID A - Cyclo-oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs.*;53: 563-582, 1997.

JULIUS D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanism of nociception. *Nature*, v.413, p.203-210, 2001.

JUN, C.D., CHOI, B.M., KIM, H.M., CHUNG, H.T., Involvement of protein kinase C during taxol-induced activation of murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 154, 6541-6547, 1995.

KUJUBU DA, FLETCHER BS, VARNUM BC - TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*;266:12866-12872, 1991.

KULKARNI SK, JAIN NK, SINGH A - Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*;22:291-298, 2000.

KAUFMANN WE, WORLEY PF, PEGG J - COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci*;93:2317-2321, 1996.

KNOWLES S, SHAPIRO L, SHEAR NH - Should celecoxib be contraindicated in patients who are allergic to sulfonamides? Revisiting the meaning of 'sulfa' allergy. *Drug Saf*, 2001;24:239-247.

KURITZKY, L. & WEAVER, A. Perspectives in Pain management: the role of Coxibs. *Advances in Rheumatology: Coxibs and Beyond. J. Pain Sympt. Management*, 25 (2S), S6-S20. 2003.

KURUMBAIL RG, STEVENS AM, GIERSE JK - Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 1996;384:644-648.

LaMOTTE, R. H., SHAIN, C. N., SIMONE, D. A., TSAI, E. F P. Neurogenic hyperalgesia: psychophysical studies of underlying mechanisms. *J. Neurophysiol.*, v.66, p.190-211, 1991.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, v.57, p.1-164, 1999.

MITCHELL JA, AKARASEREENONT P, THIEMERMANN C, FLOWER RJ, VANE JR Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 15;90(24):11693-7

MONCADA S, FERREIRA SH, VANE JR - Pain and Inflammatory Mediators, em: Vane JR, Ferreira SH - *Hand Books of Experimental Inflammation*. New York, Springer-Verlag, 1978;588-616.

MONCADA S, VANE JR - Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev*, 1978;30:293-331

MORISSET S, PATRY C, LORA, M ET AL - Regulation of cyclooxygenase-2 expression in bovine chondrocytes in culture by interleukin 1 α , tumor necrosis factor- α , glucocorticoids, and 17 β -estradiol. *J Rheumatol*, 1998;25:1146-1153.

MORROW JD, ROBERTS LJ - Lipid-Derived Autacoids. Eicosanoids and Platelet-Activating Factor, em: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG - *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York, McGraw-Hill, 2001;669-685

MUKHERJEE D, NISSEN SE, TOPOL EJ - Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA*, 2001;286: 954-959.

MURRAY CW, COWAN A, LARSON AA. Neurokinin and NMDA antagonists (but not a kainic acid antagonist) are antinociceptive in the mouse formalin model Pain. 1991 Feb;44(2):179-85..

OUELLET M, PERCIVAL MD Mechanism of acetaminophen inhibition of cyclooxygenase isoforms. *Arch Biochem Biophys*. 2001 Mar 15;387(2):273-80

PANARA MR, RENDA G, SCIULLI MG et al - Dose-dependent inhibition of platelet cyclooxygenase-1 and monocyte cyclooxygenase-2 by meloxicam in healthy subjects. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999;290: 276-280.

PENNING TB, TALLEY JJ, BERTENSHAW SR, CARTER JS, COLLINS PW, DOCTER S, GRANETO MJ, LEE LF, MALECHA JW, MIYASHIRO JM, ROGERS RS, ROGIER DJ, YU SS, ANDERSON GD, BURTON EG, COGBURN JN, GREGORY SA, KOBOLDT CM, PERKINS WE, SEIBERT K, VEENHUIZEN AW, ZHANG YY, ISAKSON PC. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-Diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib). *J. Med. Chem.* 1997;40:1347-1365.

PIPER P, VANE J - The release of prostaglandins from lung and other tissues. *Ann N Y Acad Sci*, 1971;180:383-385.

POOLE S, CUNHA FQ, SELKIRK S, LORENZETTI BB, FERREIRA SH. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *Br J Pharmacol.* 1995 Jun;115(4):684-8

RAJA, S. N.; MEYER, R. A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J. N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: WALL, D.;

RANDALL LD, SELITTO JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 1957;113: 233-249.

RAZ A, WYCHE A, NEEDLEMAN P - Temporal and pharmacological division of fibroblast cyclooxygenase expression into transcriptional and translational phases.

Proc Natl Acad Sci, 1989;86:1657-1661.

REN K. & DUBNER R., NMDA receptor antagonists attenuate mechanical hyperalgesia in rats with unilateral inflammation of the hindpaw.

Neurosci Lett. 1993 Nov 26;163(1):22-6

RIEDEL W, NEECK G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol.* 2001;60(6):404-15.

RIENDEAU D, PERCIVAL MD, BOYCE S, BRIDEAU C, CHARLESON S, CROMLISH W, ETHIER D, EVANS J, FALGUEYRET JP, FORD-HUTCHINSON AW, GORDON R, GREIG G, GRESSER M, GUAY J, KARGMAN S, LEGER S, MANCINI JA, O'NEILL G, OUELLET M, RODGER IW, THERIEN M, WANG Z, WEBB JK, WONG E, CHAN CC. Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted

furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* 1997;121(1):105-17.

ROCHA JCS, PEIXOTO ME, JANCAR S, CUNHA FQ, RIBEIRO RA, ROCHA FA. Dualeffect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. Br. J. Pharmacol. 2002;136(4):588-96.

ROCHA JL, FERNANDEZ-ALONSO J - Acute tubulointerstitial nephritis associated with the selective COX-2 enzyme inhibitor, rofecoxib. Lancet, 2001;357:1946-1947.

SACHS D, CUNHA FQ, FERREIRA SH. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004; 101(10):3680-85.

SALVEMINI D, SETTLE SL, MASFERRER JL, SEIBERT K, CURRIE MG, NEEDLEMAN P. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. Br. J. Pharmacol. 1995;114(6):1171-8.

SAMUELSSON B, GRANSTROM E, GREEN K - Prostaglandins. Ann Rev Biochem, 1975;44:669-694.

SCHNEIDER F, MEZIANI F, CHARTIER C - Fatal allergic vasculitis associated with celecoxib. Lancet, 2002;359:852-853.

SHER & MITCHELL, Intrathecal N-methyl-D-aspartate induces hyperexcitability in rat dorsal horn convergent neurones. *Neurosci Lett.* 1990 Nov 13;119(2):199-202.

SEIBERT K, ZHANG Y, LEAHY K, HAUSER S, MASFERRER J, ISAKSON P
Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. *Adv Exp Med Biol.* 1997;400A:167-70

SIMMONS DL, BOTTING RM, HLA T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 2004;56(3):387-437.

SMITH CJ, ZHANG Y, KOBOLDT CM, MUHAMMAD J, ZWEIFEL BS, SHAFFER A, TALLEY JJ, MASFERRER JL, SEIBERT K, ISAKSON PC. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:13313-18.

SMITH TW, BUCHAN P. Peripheral opioid receptors located on the rat saphenous nerve. *Neuropeptides.* 1984;5(1-3):217-20.

SOARES AC, LEITE R, TATSUO MA, DUARTE ID. Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Eur. J. Pharmacol.* 2000;400(1):67-71.

STEIN C, SCHAFER M, MACHELSKA H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat. Med.* 2003;9(8):1003-8.

SWINGLE KF, SCHERRER RA, GRANT TJ. Antiinflammatory activity of alpha-methyl-3-phenyl-7-benzofuranacetic acid (R-803). *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1975;214(2):240-9.

TAIWO, Y. O.; GOETZL, E. J.; LEVINE, J. D. Hyperalgesia onset latency suggests a hierarchy of action. *Brain Res.*, v.423, p.333-337, 1987.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Prostaglandin effects after elimination of indirect hyperalgesic mechanism in the skin of the rat. *Brain Res.*, v.492, p.397-399, 1989.

TEDESCO LS, FUSELER J, GRISHAM M, WOLF R, ROERIG SC. Therapeutic administration of nitric oxide synthase inhibitors reverses hyperalgesia but not inflammation in a rat model of polyarthritis. *Pain.* 2002;95(3):215-23.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur. J. Pharmacol.*, v.251, p.173-179, 1994.

TYERS, M. B.; HAYWOOD, H. Effect of prostaglandin on peripheral nociceptors in acute inflammation. *Agents Actions Suppl.*, v.6, p.65-78, 1979.

VANE J. R. ; BAKLE Y.S. ; BOTTING, R. M.; Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu. Rev . Pharmacol. Toxicol.* 38:97-120, 1998.

VANE JR, BOTTING RM. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res.* 1995 Jan;44(1):1-10

VANE JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin like *drugs*. *Nature New Biology* 1971;231:232-235.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. Prostaglandin and cyclooxygenase in the spinal cord. *Prog. Neurobiol.*, v.64, p.327-363, 2001.

VEIGA A P C, DUARTE I D G, ÁVILA M N, MOTTA P G, TATSUO M A K F, FRANCISCHI J N. Prevention by celecoxib of secondary hyperalgesia induced by formalin in rats. *Life Sciences* 2004;75:2807-17.

VAISHAMPAYAN, U., PARCHMENT, R.E., JASTI, B.R., HUSSAIN, M., 1999. Taxanes: an overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Urology* 54, 22^29.

VIVANCOS GG, PARADA CA, FERREIRA SH. Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues. *Br. J. Pharmacol.* 2003;138:1351-7.

XIE W, CHIPMAN JG, ROBERTSON DL - Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci*, 1991;88: 2692-2696.

YAMAGATA K, ANDREASSON KI, KAUFMANN WE - Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, 1993;11:371-386

WALLACE JL, REUTER B, CICALA C, MCKNIGHT W, GRISHAM MB, CIRINO G Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. *Gastroenterology*. 1994 Jul;107(1):173-9

WANG, S., GUO, C.Y., CASTILLO, A., DENT, P., GRANT, S., Effect of bryostatin 1 on taxol-induced apoptosis and cytotoxicity in human leukemia cells (U937). *Biochem. Pharmacol.* 56, 635-644, 1998.

WARNER TD, VOJNOVIC I, GIULIANO F, JIMENEZ R, BISHOP-BAILEY D, MITCHELL JA. Cyclooxygenases 1, 2, and 3 and the production of prostaglandin I₂: investigating the activities of acetaminophen and cyclooxygenase-2-selective

inhibitors in rat tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Aug;310(2):642-7. Epub 2004 May 17.

WHELTON A - Renal aspects of treatment with conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs versus cyclooxygenase-2 specific inhibitors. *Am J Med,* 2001;110:(Suppl)33S-42S.

WU GD - A nuclear receptor to prevent colon cancer. *N Engl J Med,*342:651-653.

Zong, Z.P., Fujikawa-Yamamoto, K., Li, A.L., Yamaguchi, N., Chang, Y.G., Murakami, M., Ishikawa, Y., 2000. Involvement of protein kinase C in taxol-induced polyploidization in a cultured sarcoma cell line. *Eur. J. Pharmacol.* 394, 181-187, 2000.

ZENOR, B. N.; WEESNEER, G. D.; MALVEN, P. V.; Endocrine and other responses to acute administration of cannabinoid compounds to non-stressed male calves. *Life Sci.* 65(2) : 125-133, 1999.

ZIMMER, A.; ZIMMER, A. M.; HOHMANN, A. G.; HERKENHAM, M.; BONNER, T. I. Increased mortality, hypoactivity and hypoalgesia in cannabinoid CBI receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 96(10):5780-5785, 1999.

ZOLLNER C, SHAQURA MA, BOPAIAH CP, MOUSA S, STEIN C, SCHAFER M.

Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol. Pharmacol.* 2003;64(2):202-10.

