

C756830
R. 1549022
01/11/02
R47,55



Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia

Participação de mediadores inflamatórios na fase aguda da artrite induzida por zymosan em ratos – Efeito dual do óxido nítrico sobre a dor inflamatória articular e migração celular na artrite induzida por zymosan

JOSÉ CARLOS DA SILVA ROCHA

7155
616.0113
25739
1100
111

Fortaleza – Ceará – Brasil

2002

Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia

Participação de mediadores inflamatórios na fase aguda da artrite induzida por zymosan em ratos – Efeito dual do óxido nítrico sobre a dor inflamatória articular e migração celular na artrite induzida por zymosan

JOSÉ CARLOS DA SILVA ROCHA

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Fortaleza – Ceará – Brasil

Julho - 2002

FICHA CATALOGRÁFICA

R573p Rocha, José Carlos da Silva
Participação de mediadores inflamatórios na fase aguda da artrite induzida por zymosan em ratos – Efeito dual do óxido nítrico sobre a dor inflamatória articular e migração celular na artrite induzida por zymosan / José Carlos da Silva Rocha. – Fortaleza, 2002.
186 fs.: il.
Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha
Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.
1. Artrite experimental 2. Inflamação 3. Zymosan
4. Dor articular 5. Migração celular 6. Mediadores da inflamação 7. Óxido nítrico I. Rocha, Francisco Airton Castro da (Orient.) II. Título
CDD 616.0473

Participação de mediadores inflamatórios na fase aguda da artrite induzida por zymosan em ratos – Efeito dual do óxido nítrico sobre a dor inflamatória articular e migração celular na artrite induzida por zymosan

JOSÉ CARLOS DA SILVA ROCHA

Tese aprovada com Louvor em 26 de Julho de 2002

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha (Orientador)

Prof. Dr. Carlos Maurício Castro Costa

Prof.^a Dr.^a Gerly Annes de Castro Brito

Prof. Dr. Jamil Assreuy

Prof.^a Dr.^a Sônia Jancar

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA)

À Simone Hounsell, esposa, amiga, confidente, companheira, o riso fácil e contagiante que sempre buscou mostrar que, mesmo nos momentos mais difíceis, há sempre um lado positivo.

*Ao João da Mata, Maria de Jesus, Deuvanir, Jaqueline e Jonathan
Ivanhoé, a grande família, que nunca negou o seu apoio às minhas
empreitadas.*

A Eduardo e Regina Hounsell, sogros, pela amizade e apoio.

AGRADECIMENTOS

A Jeová, deus dos meus pais, a quem elevo a minha própria alma e em quem confiarei e que não me deixará ser envergonhado, me ensinará as Suas próprias veredas e far-me-á andar na Sua verdade. (Salmos 25: 1-5).

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que contribuíram, nestes anos de pós-graduação, para a minha formação acadêmica, científica e intelectual, em particular:

Armênio Aguiar dos Santos e Vietla Satyanarayana Rao, experiência e paciência para ajudar.

Gerly Anne de Castro Brito, simpatia e auxílio nas nossas dificuldades.

Devo destacar dois professores em especial:

Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, para quem não tenho palavras suficientes para expressar os meus mais profundos agradecimentos pois recebeu-me e colocou-me à disposição todo o seu laboratório. Além disso, fez parte efetiva desta empreitada e orientou-me em vários momentos difíceis.

Francisco Ailton Castro da Rocha, orientador, divergimos e avançamos. O sucesso desta empreitada só foi possível graças a sua firme orientação. A preocupação, inteligência e perspicácia o qualificam como um dos melhores orientadores que qualquer aluno de pós-graduação, preocupado com a qualidade do seu trabalho, ansiaria ter à disposição.

Aos amigos no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) Adriana Magalhães Andrade, Cristina Kelma Loiola Ponte Batista, Mariana Lima Vale, Mirlane Guimarães de Melo Cardoso, Sílvia Bona do Nascimento, Veruska Bezerra de Menezes Alencar, pelo companheirismo e mútua ajuda e, de forma muito especial e carinhosa, para os diletos amigos Márcio Uetti Fernandes Oliveira, Pedro Adriano Leandro Teixeira, Renata Ferreira de Carvalho Leitão e Vilma de Lima.

Aos muitos amigos da pós-graduação entre os quais Adriana Rolim Campos, Adriana da Rocha Tomé, Ana Maria Sampaio Assreuy, Luilma Albuquerque Gurgel, Maria Lurdemiler Sabóia Mota, Regilane Matos da Silva, Rômulo Augusto Feio Farias, e Sandra Maria Nunes Ferreira, pelo companheirismo durante todos estes anos.

Aos alunos de iniciação científica Aline Pinho Carvalho, Larissa Teles Souza e Márcio Xenofonte Siebra, pela indispensável ajuda.

A funcionários e agregados do Departamento e do Curso de Pós-Graduação Antonio Haroldo Pinheiro Ferreira, Aura Rhanes Farias Nogueira Yida, Christian Paulino Gama, Joana Barbosa de Moura, Maria Artemísia Portela Cardoso, Maria Silvandira França Pinheiro (Vandinha), Marta Célia Araújo de Freitas, Rejane Teixeira Carvalho, Sílvia Maria Azevedo de Lima e Sílvio Alves Costa, pessoas que deram contribuições fundamentais.

Aos meus pares na Universidade Federal do Pará na pessoa dos professores Pergentino José da Cunha Sousa, Chefe do Departamento de Farmácia, José Ribamar Mesquita Teixeira, da Farmacodinâmica, e Cristovan Diniz, ex-reitor, os quais apoiaram, defenderam e garantiram a minha permanência na pós-graduação.

Aos cobaias, coelhos, macacos, ratos, sapos e todo e qualquer animal de experimentação biológica, os quais tem as suas inocentes vidas imoladas em nome da saúde da humanidade.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos, os meus sinceros agradecimentos e a promessa de fazer jus à confiança que em mim depositaram.

***“O universo não é idéia minha. A
minha idéia do Universo é que é idéia
minha.”***

F. Pessoa

***“Nada é tão estúpido quanto
vencer. O verdadeiro triunfo está em
convencer.”***

Victor Hugo

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de Fotografia.....	xiii
Listas de Siglas e Abreviaturas.....	xiv
Resumo.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Artrite reumatóide.....	2
i. Modelos experimentais para estudo da artrite.....	3
1.2. Inflamação.....	5
i. Dor.....	6
a. Dor inflamatória.....	8
I. Dor inflamatória articular.....	9
ii. Migração celular.....	10
1.3. Mediadores da resposta inflamatória.....	11
i. Derivados do ácido araquidônico.....	11
a. Prostaglandinas.....	12
b. Leucotrienos.....	13
ii. Autacóides.....	15
a. Serotonina.....	15
b. Histamina.....	16
iii. Fosfodiesterases.....	18
iv. Sistema adrenérgico.....	20
v. Óxido nítrico.....	22
a. Ações do óxido nítrico.....	23
b. Óxido nítrico e dor.....	24
c. Óxido nítrico e artrite.....	26
vi. Neutrófilos.....	27

2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivos gerais.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1. Animais.....	33
3.2. Drogas.....	33
3.3. Descrição do modelo experimental e métodos.....	34
i. Indução da artrite.....	34
a. Registro da incapacitação articular.....	34
b. Influxo celular.....	36
c. Determinação da produção de óxido nítrico.....	38
d. Determinação da produção leucotrieno B ₄ no lavado sinovial da artrite induzida por zymosan em ratos.....	39
3.4. Modulação farmacológica.....	39
i. Intervenção profilática.....	40
a. Inibidores da síntese de prostaglandina E ₂	40
I. Celecoxib.....	40
II. Rofecoxib.....	40
b. Inibidor da síntese de leucotrieno B ₄	40
I. MK-886.....	40
c. Antagonista serotoninérgico.....	40
I. Metisergida.....	40
d. Antagonistas histaminérgicos.....	40
I. Mepiramina.....	40
II. Cimetidina.....	41
e. Depletor de mastócitos.....	41
I. Composto 48/80.....	41
f. Inibidor de fosfodiesterase IV.....	41
I. Rolipram.....	41

g. Bloqueadores adrenérgicos.....	41
I. Guanetidina.....	41
II. Propranolol.....	41
h. Inibidores da síntese de óxido nítrico.....	42
I. L-NAME.....	42
II. Aminoguanidina.....	42
III. 1400W.....	42
i. Anticorpo antineutrófilos.....	42
ii. Intervenção terapêutica.....	42
a. Inibidores da síntese de prostaglandina E ₂	42
I. Celecoxib.....	42
II. Rofecoxib.....	42
b. Inibidor da síntese de leucotrieno B ₄	42
I. MK-886.....	42
c. Antagonista serotoninérgico.....	43
I. Metisergida.....	43
d. Antagonistas histaminérgicos.....	43
I. Mepiramina.....	43
II. Cimetidina.....	43
e. Bloqueador adrenérgico.....	43
f. Inibidores da síntese de óxido nítrico.....	43
I. L-NAME.....	43
II. Aminoguanidina.....	43
III. 1400W.....	43
g. Doador de óxido nítrico.....	44
I. SIN-1.....	44
3.5. Estatística.....	44

4. RESULTADOS.....	45
4.1. Incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	46
4.2. Influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	46
4.3. Efeito da administração de inibidores da síntese de prostaglandina E ₂	46
i. Incapacitação articular.....	46
a. Intervenção profilática.....	46
I. Celecoxib.....	46
II. Rofecoxib.....	47
b. Intervenção terapêutica.....	47
I. Celecoxib.....	47
II. Rofecoxib.....	47
ii. Influxo celular.....	47
a. Intervenção profilática.....	47
I. Celecoxib.....	47
II. Rofecoxib.....	48
b. Intervenção terapêutica.....	48
I. Celecoxib.....	48
II. Rofecoxib.....	48
4.4. Efeito da administração de inibidor da síntese de leucotrieno B ₄	48
i. Incapacitação articular.....	48
a. Intervenção profilática.....	48
I. MK-886.....	48
b. Intervenção terapêutica.....	49
I. MK-886.....	49
ii. Influxo celular.....	49
a. Intervenção profilática.....	49
I. MK-886.....	49
b. Intervenção terapêutica.....	49
I. MK-885.....	49

iii. Efeito da administração de MK-886 sobre o conteúdo sinovial de leucotrieno B ₄ na artrite induzida por zymosan em ratos.....	49
4.5. Efeito da administração de antagonista da serotonina.....	57
i. Incapacitação articular.....	57
a. Intervenção profilática.....	57
I. Metisergida.....	57
b. Intervenção terapêutica.....	57
I. Metisergida.....	57
ii. Influxo celular.....	57
a. Intervenção profilática.....	57
I. Metisergida.....	57
b. Intervenção terapêutica.....	58
I. Metisergida.....	58
4.6. Efeito da administração de antagonistas da histamina.....	58
i. Incapacitação articular.....	58
a. Intervenção profilática.....	58
I. Mepiramina.....	58
II. Cimetidina.....	58
ii. Influxo celular.....	58
a. Intervenção profilática.....	58
I. Mepiramina.....	58
II. Cimetidina.....	59
4.7. Efeito da administração de depletor de mastócitos.....	59
i. Incapacitação articular.....	59
a. Intervenção profilática.....	59
I. Composto 48/80.....	59
ii. Influxo celular.....	59
a. Intervenção profilática.....	59
I. Composto 48/80.....	59
4.8. Efeito da administração de inibidor de fosfodiesterase IV.....	66
i. Incapacitação articular.....	66
a. Intervenção profilática.....	66

I. Rolipram.....	66
ii. Influxo celular.....	66
a. Intervenção profilática.....	66
I. Rolipram.....	66
4.9. Efeito da administração de bloqueadores adrenérgicos.....	69
i. Incapacitação articular.....	69
a. Intervenção profilática.....	69
I. Guanetidina.....	69
II. Propranolol.....	69
b. Intervenção terapêutica.....	69
I. Propranolol.....	69
ii. Influxo celular.....	70
a. Intervenção profilática.....	70
I. Guanetidina.....	70
II. Propranolol.....	70
b. Intervenção terapêutica.....	70
I. Propranolol.....	70
4.10. Efeito da administração de inibidores da síntese de óxido nítrico.....	75
i. Incapacitação articular.....	75
a. Intervenção profilática.....	75
I. 1400W.....	75
II. L-NAME.....	75
III. Aminoguanidina.....	75
b. Intervenção terapêutica.....	78
I. 1400W.....	78
II. L-NAME.....	78
III. Aminoguanidina.....	78
ii. Influxo celular.....	78
a. Intervenção profilática.....	78
I. 1400W.....	78
II. L-NAME.....	79
III. Aminoguanidina.....	79

b. Intervenção terapêutica.....	79
I. 1400W.....	79
II. L-NAME.....	80
III. Aminoguanidina.....	80
iii. Efeito do tratamento com inibidores da óxido nítrico sintase sobre a produção de óxido nítrico articular na artrite induzida por zymosan em ratos.....	80
a. Curso temporal dos níveis de óxido nítrico no exsudato articular na artrite induzida por zymosan em ratos.....	80
b. Administração sistêmica profilática ou terapêutica de inibidores da óxido nítrico sintase sobre a liberação de óxido nítrico na artrite induzida por zymosan em ratos.....	88
4.11. Efeito da administração de doador de óxido nítrico.....	88
i. Incapacitação articular.....	88
a. Intervenção terapêutica.....	88
I. SIN-1.....	88
ii. Influxo celular.....	88
a. Intervenção terapêutica.....	88
I. SIN-1.....	88
4.12. Efeito de anticorpo antineutrófilos.....	89
i. Incapacitação articular.....	89
a. Intervenção profilática.....	89
I. Anticorpo antineutrófilos	89
b. Influxo celular.....	89
a. Intervenção profilática.....	89
I. Anticorpo antineutrófilos.....	89
5. DISCUSSÃO.....	95
5.1. Participação de prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	96
5.2. Participação de leucotrienos.....	97
5.3. Participação de autacóides (serotonina e histamina)	99
5.4. Participação de fosfodiesterase IV.....	99
5.5. Participação do sistema simpático.....	100

5.6. Participação de óxido nítrico.....	101
5.7. Participação de neutrófilos.....	106
6. Conclusões.....	109
Abstract.....	111
Referências bibliográficas.....	112
Anexo.....	150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação do influxo celular na artrite induzida por zymosan em ratos – Curso temporal.....	51
Tabela 2. Efeito da administração de MK-886 sobre o conteúdo de leucotrieno B ₄ no exsudato sinovial da artrite induzida por zymosan em ratos.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito dose e tempo dependente sobre a incapacitação articular (IA) em ratos submetidos à artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	50
Figura 2. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) oral de celecoxib (CEL) ou rofecoxib (ROF) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	52
Figura 3. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) oral de celecoxib (CEL) ou rofecoxib (ROF) sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	53
Figura 4. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) oral de MK-886 sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	54
Figura 5. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) oral de MK-886 sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	55
Figura 6. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) sistêmica de metisergida sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	60
Figura 7. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) sistêmica de metisergida sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	61
Figura 8. Efeito da administração profilática sistêmica de mepiramina (MEP) ou cimetidina (CIM) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy)	62
Figura 9. Efeito da administração profilática sistêmica de mepiramina (MEP) ou cimetidina (CIM) sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy)	63
Figura 10. Efeito da administração profilática sistêmica do composto 48/80 (C48/80) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	64

Figura 11. Efeito da administração profilática sistêmica do composto 48/80 (C48/80) sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	65
Figura 12. Efeito da administração profilática sistêmica de rolipram sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	67
Figura 13. Efeito da administração profilática sistêmica de rolipram sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	68
Figura 14. Efeito da administração profilática sistêmica de guanetidina sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	71
Figura 15. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) sistêmica de propranolol sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	72
Figura 16. Efeito da administração profilática sistêmica de guanetidina sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	73
Figura 17. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) sistêmica de propranolol sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	74
Figura 18. Efeito dose-dependente da administração profilática sistêmica de 1400W sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	76
Figura 19. Efeito da administração profilática local de L-NAME, aminoguanidina ou 1400W sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	77
Figura 20. Efeito da administração terapêutica local de L-NAME, aminoguanidina ou 1400W sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	81
Figura 21. Efeito da administração terapêutica sistêmica de L-NAME, aminoguanidina (AG) ou 1400W sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	82

Figura 22. Efeito dose-dependente da administração profilática sistêmica de 1400W sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	83
Figura 23. Efeito da administração profilática local de L-NAME, aminoguanidina ou 1400W sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	84
Figura 24. Efeito da administração terapêutica local de L-NAME, aminoguanidina ou 1400W sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	85
Figura 25. Efeito da administração terapêutica sistêmica de L-NAME, aminoguanidina (AG) ou 1400W sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	86
Figura 26A. Curso temporal dos níveis de nitrito/nitrato no exsudato articular na de ratos na artrite induzida por zymosan	87
Figura 26B. Efeito da administração sistêmica profilática ou terapêutica de inibidores da óxido nítrico sintase sobre os níveis de nitrito/nitrato no exsudato articular na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	90
Figura 27. Efeito da administração terapêutica local de SIN-1 sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	91
Figura 28. Efeito da administração terapêutica local de SIN-1 sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	92
Figura 29. Efeito da administração profilática sistêmica do anticorpo antineutrófilos (Ac-An) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	93
Figura 30. Efeito da administração profilática sistêmica do anticorpo antineutrófilos (Ac-An) sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy).....	94

LISTA DE FOTOGRAFIA

Fotografia 1. Animais deambulando no sistema de registro da incapacitação articular

37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 1400W: N-(3-(aminometil)benzil)acetamidina
- 5-HT: serotonina
- 5-HTx: receptores serotoninérgicos
- Ac-An: anticorpo antineutrófilos
- ANOVA: análise de variância
- AZy: artrite induzida por zymosan
- BP 2-94: (R)-(-)-2-[[N-1-(1H-imidazol-4yl)-2-propil]imino]fenilmetil] fenol
- cAMP: adenosina monofosfato cíclico
- cGMP: guanilato monofosfato cíclico
- cm: centímetros
- COX: ciclooxigenase
- DAINE's: drogas antiinflamatórias não-esteroidais
- di-HETE: ácido di-hidroxi eicosatetraenóico
- DMSO: dimetilsulfóxido
- e.p.m.: erro padrão da média
- e.v.: endovenosa
- ELISA: ensaio imunoenzimático
- fMLP: n-formil-metionil-leucil fenilalanina
- g: grama/gravidade
- GABA: ácido γ -aminobutírico
- GTN: gliceril trinitrato
- h: hora (s)
- H₁, H₂, H₃: receptores histaminérgicos
- i.art.: intra-articular
- i.p.: intraperitoneal
- IA: incapacitação articular
- IC: influxo celular
- IFN- γ : interferon gama

ILx: interleucinas

iNOS: óxido nítrico sintase induzida

IPDE IV: inibidor de fosfodiesterase do tipo IV

kg: quilograma

L-NAME: L-N^G-nitroarginina metil éster

L-NIO: N-ímonoetil-L-ornitina

L-NMMA: L-N^G-monometilarginina

LPS: lipolissacarídeo de parede de bactéria

LTB₄: leucotrieno B₄

mg: miligrama

min: minuto (s)

MK-886: ácido 3-[1-(*p*-clorobenzil)-5-(isopropil)-3-*t*-butiltioindol-2-yl]-2,2 dimetilpropanóico

ml: mililitros

mm³: milímetros cúbicos

mRNA: RNA mensageiro

MY 5445: 1-(3-chorofenilfenilamino)-4-fenilftalazina

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NANC: sistema não-adrenérgico não-colinérgico

NGF-β: fator de crescimento neural β

nm: nanomol

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

NO₂⁻: nitrito

NO₃⁻: nitrato

NOS: óxido nítrico sintase

NPS: nitroprussiato de sódio

NT: não-tratado

°C: graus Celsius

ODQ: (1H-[1,2,4]-oxadiaolo[4,3-a]quinoxalin-1-one]

OVA: ovoalbumina

p: probabilidade

PAF: fator ativador plaquetário
PDE IV: fosfodiesterase tipo 4
pg: picograma
PGI₂: prostaciclina
PGs: prostaglandinas
PLA₂: fosfolipase A₂
PMN: leucócitos polimorfonucleares
q.s.p.: quantidade suficiente para
r.p.m.: rotações por minuto
s.c.: subcutânea
seg: segundo (s)
SIN-1: S-morfolinosidnonimina
SNAP: S-nitroso-N-acetil-penicilamina
TNF: fator de necrose tumoral
TSP: tempo de suspensão da pata
v.o.: via oral
Zy: zymosan
μg: micrograma
μl: microlitros
μmol: micromol

Participação de mediadores inflamatórios na fase aguda da artrite induzida por zymosan em ratos – Efeito dual do óxido nítrico sobre a dor inflamatória articular e migração celular na artrite induzida por zymosan. José Carlos da Silva Rocha. Orientador: Prof. Dr. Francisco Ayrton Castro da Rocha. Tese de Doutorado.

A artrite induzida por zymosan (AZy) é caracterizada por dor inflamatória articular, avaliada através da incapacitação articular (IA) e influxo celular (IC) e parece ser um evento multimediado. Assim, resolvemos avaliar o envolvimento de mediadores na IA e IC da AZy. Ratos Wistar receberam injeção intra-articular (i.art.) de Zy (1 mg) no joelho direito e o pico de IA foi obtido na 3^a ou 4^a h de artrite. Na 6^a h os animais foram sacrificados e o exsudato articular coletado para contagem do número total de células. O grupo controle recebeu salina i.art. e o grupo não-tratado (NT) recebeu Zy i.art. Foram feitos tratamentos profiláticos (antes da indução da AZy) ou terapêuticos (2 h após a indução da AZy). O tratamento profilático i.art. com L-NAME (LN - inibidor de NOS) e aminoguanidina (AG - inibidor de iNOS) ou 1400W (inibidor de iNOS), i.art. ou s.c., reduziu a IA e o IC em relação ao grupo NT enquanto a administração terapêutica reduziu apenas o IC em relação ao grupo NT. A administração terapêutica de SIN-1 (doador de NO) reduziu a IA e o IC. A administração prévia v.o. de celecoxib (CEL) ou rofecoxib (inibidores de COX-2) reduziu a IA enquanto apenas CEL reduziu o IC, tanto profilática quanto terapêuticamente. MK-886 (inibidor de lipoxigenase) v.o. dado antes da AZy reduziu a IA e o tratamento terapêutico reverteu apenas o IC. Metisergida (antagonista de serotonina) administrada i.p. antes ou após a AZy, reduziu a IA enquanto apenas o tratamento prévio reduziu o IC. Antagonistas histaminérgicos (cimetidina e mepiramina) i.p. não reverteram a IA ou o IC. A administração prévia i.p. do composto 48/80 (depletor de mastócitos) reduziu a IA e o IC. A administração prévia i.p. de rolipram (inibidor de fosfodiesterase IV) reduziu a IA e o IC. A administração prévia i.p. de anticorpo antineutrófilo reduziu a IA e o IC. Guanetidina (depletor de catecolaminas) via i.p. e propranolol (β -bloqueador), via s.c., administrados previamente, reduziram a IA enquanto o propranolol administrado 2 h após Zy reduziu a IA e IC. A administração profilática ou terapêutica de LN, AG ou 1400W reduziu a liberação de nitrito nos exsudatos articulares enquanto MK-886 reduziu a liberação de LTB₄ no exsudato articular. A administração inibidores de NOS reduz a dor inflamatória e o influxo celular apenas quando feita previamente à indução da artrite. A administração de um doador de NO induz efeito antinociceptivo na AZy. A analgesia e a inibição da migração celular foram obtidas com o bloqueio da geração de PGE₂, o bloqueio da geração de LTB₄, bloqueio de receptores serotoninérgicos, mas não histaminérgicos, o bloqueio simpático e a inibição de fosfodiesterase IV. A migração de polimorfonucleares para a articulação induz dor inflamatória articular.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Artrite reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica caracterizada por proliferação da membrana sinovial, destruição da cartilagem articular e invasão inflamatória do osso subcondral. Atinge uma grande parcela da população mundial tendo prevalência de 1% e, em função disso, tem grande importância epidemiológica, além de ser uma patologia altamente incapacitante. Infelizmente, a falta de conhecimentos sobre a etiopatogenia da doença dificulta o encontro de uma terapêutica que possa alterar significativamente o curso da doença (Harris, 1990).

A membrana sinovial é um tecido que reveste a superfície interna das articulações e é composta dos tipos celulares denominados sinoviócitos do tipo A, similares a macrófagos, e os sinoviócitos do tipo B, similares aos fibroblastos. A AR caracteriza-se por sinovite intensa e aumento do influxo celular observado tanto na membrana quanto no líquido sinovial. Na fase aguda da resposta inflamatória há um claro predomínio dos neutrófilos enquanto na fase crônica há o predomínio de células linfomononucleares. A produção de citocinas a partir de células residentes parece induzir um aumento do tecido linfóide tendo em vista que, conforme mencionamos anteriormente, os sinoviócitos do tipo A, similares a macrófagos, após estímulo adequado, passam a liberar citocinas e outros mediadores da resposta inflamatória. Adicionalmente, também foi observado aumento do número e hiperplasia dos sinoviócitos, além da migração de monócitos da periferia para a sinóvia inflamada (Harris, 1990) aumentando o número de células imunocompetentes na fase crônica da sinovite reumatóide. Portanto, acrescentando-se as células endoteliais dos vasos da membrana sinovial, que é ricamente irrigada, e os condrócitos da cartilagem articular, há um conjunto de células imunocompetentes capazes de potencializar uma resposta inflamatória a partir de um estímulo inicial (Seki *et al.*, 1988; Cannon *et al.*, 1996).

i. Modelos experimentais para estudo da artrite

Considerações éticas e práticas permitem o estudo de patologias que afetem os seres humanos apenas em modelos experimentais desenvolvidos em animais de laboratório. Não há um modelo de artrite reumatóide em animais, mas os utilizados atualmente apresentam similaridades com a condição humana e permitem a obtenção de parâmetros importantes tais como o aumento da permeabilidade vascular, aumento da migração celular e dor, na fase aguda e, na fase crônica, observa-se hiperplasia sinovial e proliferação linfomonocitária (Harris, 1990).

Não há um modelo animal específico para o estudo da artrite reumatóide mas os atualmente empregados apresentam similaridades importantes com a condição humana e permitem a obtenção de dados importantes como aumento de permeabilidade, dor e edema, considerando os aspectos agudos da resposta inflamatória e hiperplasia sinovial e proliferação linfomonocitária, considerando os aspectos crônicos da resposta inflamatória crônica. A seguir, abordamos modelos empregados para estudo da artrite reumatóide em animais.

Na artrite induzida por antígeno utilizam-se coelhos nos quais, após sensibilização com ovoalbumina (OVA), administra-se o antígeno numa das articulações do joelho do animal. A articulação contra-lateral serve como controle do experimento. A monoartrite é similar a AR na sua fase crônica e há, também, progressiva erosão óssea e da cartilagem e os achados histopatológicos são indistinguíveis daqueles da juntas reumáticas. Diferentes de outros modelos animais de artrite, este responde à terapia de maneira similar a AR humana. A administração de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINE's) ou esteroidais, como indometacina e prednisolona, respectivamente, reduzem o edema articular (Blackham & Radziwonik, 1977; Pettipher *et al.* 1989) tendo sido demonstrada a liberação de prostaglandinas e leucotrienos (Henderson & Higgs, 1987) e fator ativador plaquetário (PAF) (Zarco *et al.*, 1992).

A reação passiva reversa de Arthus em articulação do joelho de coelhos, induz aumento da permeabilidade vascular e migração celular, principalmente neutrófilos polimorfonucleares, e destruição da cartilagem, sendo considerado um modelo adequado para o estudo dos mecanismos envolvidos nas lesões articulares

que dependem da formação de imunocomplexos (Foster *et al.*, 1988; de Brum-Fernandes *et al.*, 1988). A indução da artrite por imunocomplexos na articulação do joelhos de ratos, através da reação passiva reversa de Arthus, mostrou o envolvimento de mediadores lipídicos, como leucotrieno B₄, tromboxanos e PAF, mediando a infiltração celular (Rocha *et al.*, 1997). O PAF parece, também, modular a liberação de TNF- α observada no modelo (Rocha *et al.*, 1997).

A administração de colágeno induz uma artrite em ratos (Trentham *et al.*, 1977) e camundongos (Courtenay *et al.*, 1980). Histologicamente, há uma sinovite inflamatória com erosão da cartilagem e do osso (Trentham *et al.*, 1977). É um modelo conveniente pois os pacientes com AR exibem tanto imunidade humoral (Andriopoulos *et al.*, 1976) quanto celular (Trentham *et al.*, 1978) ao colágeno. Entretanto, uma provável limitação é a sensibilidade do modelo a drogas similares a aspirina (Billingham *et al.*, 1983). A indometacina inibe o edema da pata e a anquilose óssea (Sloboda *et al.*, 1981) sugerindo um papel de prostaglandinas no edema e nas alterações observadas no tecido conectivo, o que não parece ocorrer na AR.

A poliartrite por adjuvante é utilizada na avaliação de drogas antiinflamatórias em ratos e induzida após a administração de uma mistura de *Mycobacterium tuberculosis* em adjuvante completo de Freund. Tem duração de cerca de 2 – 3 semanas mas há dados mostrando que pode durar até 60 dias após a administração do agente inflamatório (Glen *et al.*, 1965). O modelo parece restrito a ratos Lewis e o mecanismo através do qual a patologia desenvolve-se apenas nesta espécie ainda não é claro mas parece envolver uma secreção deficiente do hormônio liberador de corticotropina no hipotálamo em resposta à inflamação (Tanaka *et al.*, 1996; Dimitrijevic *et al.*, 2001). A lesão observada é caracterizada por edema e remodelagem óssea. Qualquer degradação da cartilagem que possa ocorrer parece ser secundária à reabsorção óssea e não há evidência de dano direto à cartilagem como evento inicial. Antiinflamatórios não-esteroidais, como indometacina, aliviam a sintomatologia sugerindo a participação de eicosanóides neste modelo experimental (Audibert & Chedid, 1976; Toivonen *et al.*, 1982; Griffiths, 1992; Cannon *et al.*, 1999).

O zymosan (Zy) é um polissacarídeo obtido de fungos que induz uma resposta inflamatória quando administrado pelas vias intradérmica (Ridger *et al.*, 1997), intra-peritoneal (Rao *et al.*, 1994) ou intra-articular (Gegout *et al.*, 1995; Pettipher & Salter, 1996).

A administração de zymosan ativa a via alternativa do complemento (Konno & Tsurufuji, 1983). A ativação do complemento induz a geração de uma série de peptídeos quimiotáticos (C5a e C5a des Arg) (Fernandez *et al.*, 1978; Webster *et al.*, 1980) e anafilatoxinas (C3a, C4a e C5a) (Dias da Silva & Lepow, 1967; Cochrane *et al.*, 1968; Hugli & Müller-Eberhard, 1978; Hugli *et al.*, 1981) que são capazes de induzir a degranulação de mastócitos e liberar aminas vasoativas como serotonina e histamina (Johnson *et al.*, 1975). Adicionalmente, também foi demonstrado que o zymosan é um potente liberador de metabólitos do ácido araquidônico (Griffiths *et al.*, 1991).

A fase aguda da artrite induzida por zymosan é caracterizada por aumento na permeabilidade vascular e migração celular (Rocha *et al.*, 1999) e parece envolver a indução de numerosos mediadores inflamatórios como PAF (Martins *et al.*, 1989) e as citocinas IL-1 (Perretti *et al.*, 1992; Erdo *et al.*, 1994), IL-6, IL-8 e TNF- α (Au *et al.*, 1994; van de Foo *et al.*, 1995; Pettipher & Salter, 1996).

Histologicamente, a artrite induzida por zymosan é caracterizada por infiltrado de células mononucleares, hipertrofia da sinóvia e formação do *pannus* (Keystone *et al.*, 1977; Gegout *et al.*, 1994).

1.2. Inflamação

A inflamação é uma resposta dos tecidos vascularizados a estímulos lesivos de origem exógena ou endógena. É uma reação estereotípada que obedece sempre ao mesmo padrão, independente do estímulo que a originou embora possa haver pequenas variações dependentes das características do tecido ou órgão afetado e da coexistência de outras patologias (Cotran *et al.*, 1994).

A resposta inflamatória é uma reação geralmente localizada, transitória e autolimitada e dividida em fases distintas. O passo inicial, denominado fase aguda, tem duração relativamente curta e se caracteriza por exsudação de líquidos e

proteínas plasmáticas, que induz edema e a migração de leucócitos, particularmente neutrófilos. A reação, dependendo da persistência do estímulo, pode entrar numa segunda fase denominada fase crônica, que tem uma duração maior e associa-se, em termos histológicos, a presença de linfócitos e de macrófagos e com a proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese) e do tecido conjuntivo. Após a fase aguda ou crônica normalmente ocorre a resolução do processo devido à eliminação dos agentes agressores (Cotran *et al.*, 1994).

Os fenômenos vasculares e celulares são observados na fase aguda e levam ao surgimento dos sinais cardinais da resposta inflamatória que são o calor, o rubor, o tumor (edema), a dor e a perda da função. Várias células participam deste evento. As células circulantes incluem neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. As células do tecido conjuntivo incluem os mastócitos, os fibroblastos do tecido conjuntivo e os macrófagos e linfócitos residentes (Cotran *et al.*, 1994).

Os mediadores da inflamação são substâncias formadas e liberadas, concomitante ou seqüencialmente, no local da lesão. A origem destes mediadores pode ser plasmática (fatores do complemento e bradicinina) ou celular (histamina, serotonina, prostaglandinas, fator ativador plaquetário (PAF), leucotrienos, citocinas, etc...). Os mediadores estão envolvidos na gênese e/ou manutenção dos eventos característicos da reação inflamatória e ligam-se a receptores específicos nas células-alvos podendo, inclusive, estimular a liberação de outros mediadores (Cotran *et al.*, 1994).

i. Dor

A dor é, essencialmente, um mecanismo de proteção do organismo e ocorre sempre que qualquer tecido é lesado. Ela induz, no indivíduo, uma reação defensiva a fim de afastar ou eliminar o agente nocivo embora a dor crônica não tenha esta função e gere acentuado estresse. A dor aguda pode ser explicada em termos de estimulação excessiva que dá origem a uma sensação intensa e desagradável, enquanto a maioria dos estados com dor crônica está associada com alterações graves das vias de condução fisiológica normal que originam a hiperalgesia (uma maior intensidade da dor associada a estímulo nocivo leve), alodinia (dor evocada

por estimulação não-nociva) ou espasmos espontâneos de dor sem qualquer estímulo desencadeante (Woolf, 1991; Carr & Goudas, 1999; Loeser & Melzack, 1999; Woolf & Mannion, 1999).

Os nociceptores são terminações nervosas que respondem à estimulação dolorosa e estão amplamente distribuídos no organismo. Na realidade, são transdutores ligados a fibras do tipo A δ e C e, diferente de outros receptores, não são fibras especializadas para receber estímulos específicos podendo ser ativados por qualquer estímulo relativamente nocivo aos tecidos tais como estímulos mecânicos (tração), térmicos (estimulados por calor ou frio excessivo) ou químicos. Uma das características mais importantes dos nociceptores é a plasticidade, definida em termos de variação na sensibilidade à estimulação. Desta forma, os nociceptores que possuem limiar de excitabilidade variado respondem de forma distinta a estímulos de intensidade diferente. Os nociceptores quimiossensíveis, por exemplo, são terminações que possuem limiar de excitabilidade relativamente elevado e só são ativados por estímulos com intensidade suficiente para produzir determinado grau de lesão tecidual (Besson & Chaouch, 1987).

Os mecanismos centrais envolvidos na resposta álgica tem sido intensamente estudados e mostram que, de modo similar ao observado na mediação periférica da dor, também há o envolvimento de vários mediadores como substância P, glutamato, ácido γ -aminobutírico (GABA), óxido nítrico, metabólitos do ácido araquidônico, e aminas biogênicas (serotonina e histamina), apontando para várias possibilidades de interferência terapêutica (Besson, 1999).

Os aminoácidos excitatórios, particularmente o glutamato, são liberados por fibras aferentes primárias e tem importante papel nos mecanismos centrais de transmissão da resposta álgica. Vários receptores e subtipos estão envolvidos mas o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) são os que tem mais atraído a atenção pois foi demonstrado que eles são importantes nos eventos sinápticos que levam a sensibilização central e hiperalgesia (Urban *et al.*, 1994; Dickenson, 1995; Urban & Gebhart, 1999). A liberação de peptídeos, como substância P, remove o bloqueio ao receptor NMDA e, assim, permite a sua ativação pelo glutamato em vários estados de dor persistente (Besson, 1999). Este processo resulta em hipersensibilidade neuronal e amplificação da entrada de estímulos periféricos. Além disso, a ativação

dos receptores de NMDA leva à entrada de cálcio em neurônios que, então, passam a produzir outros mediadores através do aumento da atividade enzimática. Exemplos desta atividade aumentada em função da ativação dos receptores NMDA são o aumento da expressão de NOS e, por conseguinte, aumento da síntese de óxido nítrico, que age como mediador exacerbando a transmissão algica (Meller & Gebhart, 1993) e a ativação de fosfolipases, que induzem aumento da produção de prostanóides, num efeito que pode ser a base para a ação central dos antiinflamatórios não-esteroidais (Malmberg & Yaksh, 1992a; 1992b).

a. Dor inflamatória

Na resposta inflamatória, células não-neuronais produzem uma variedade de mediadores que podem agir ativando diretamente os nociceptores, como bradicinina e histamina, enquanto outros mediadores induzem hiperalgesia, como serotonina, histamina, dopamina e prostaglandinas. A sensibilidade química dos nociceptores explicaria a atividade contínua durante a inflamação que poderia causar, ou facilitar, a dor, mesmo em condições de repouso. Na maioria das vezes a estimulação é química e, mesmo nos casos em que os estímulos mecânicos ou térmicos causem dor, a persistência da dor, mesmo após a remoção do estímulo, resulta de alterações evocadas pela estimulação química dos aferentes da dor (Rang *et al.*, 1991; Woolf, 1991).

É importante salientar a descrição, recente, de um nociceptor denominado “silencioso”, que não é ativo normalmente mas que pode ser ativado em situações específicas, como na resposta inflamatória. Estes nociceptores foram encontrados em tecidos cutâneos e viscerais e já foram descritos em várias espécies animais (Koltzenburg & McMahon, 1986; Grigg *et al.*, 1986; Schaible & Schmidt, 1985; Meyer & Campbell, 1988; Habler *et al.* 1988; Janig & Koltzenburg, 1990; Cohen *et al.*, 1990; McMahon & Koltzenburg, 1990).

Os analgésicos periféricos, de acordo com Ferreira (1994) e levando em conta as considerações aqui tecidas sobre os mecanismos da dor inflamatória, podem ser classificados em diferentes classes de drogas. Assim, temos os inibidores da ativação direta dos nociceptores os quais previnem a dor mediante a inibição da

ativação dos nociceptores sensibilizados através de antagonismo ou evitando a estimulação excitatória. Drogas que pertencem a esta classe são os anti-histamínicos, os bloqueadores α -adrenérgicos e os anestésicos locais. Um outro grupo de analgésico periférico é composto por drogas que previnem a hiperalgesia, como os DAINE's, os simpatolíticos e bloqueadores β -adrenérgicos (como a guanetidina e o propranolol, respectivamente), além dos antagonistas da interleucina 1 (IL-1) e da bradicinina. Por fim, ainda segundo Ferreira (1994), o bloqueio direto da hiperalgesia através da estimulação do sistema L-arginina:óxido nítrico (NO):guanilato monofosfato cíclico (cGMP), ou através da redução da sensibilidade nociceptiva (opióides periféricos, dipirona, diclofenaco) ou através da regulação direta da sensibilidade dos nociceptores liberando opióides endógenos de ação periférica (clonidina).

I. Dor inflamatória articular

As articulações são freqüentemente afetadas por inflamações e alterações degenerativas com conseqüente prejuízo da função da estrutura, hiperalgesia e dor na região afetada. O desenvolvimento de inflamação articular é comumente associada com alterações teciduais e síntese e liberação local de mediadores inflamatórios que contribuem para estas alterações. A aplicação de alguns mediadores inflamatórios, como prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaciclina (PGI_2), bradicinina ou serotonina (5-HT), induz sensibilização a estímulos mecânicos de fibras aferentes nas inervações articulares sugerindo que estes mediadores exercem papel importante na hiperalgesia e dor associada com inflamação (Schaible & Grubb, 1993). Por outro lado, a membrana sinovial das articulações móveis é um tecido que recobre a superfície interna e estruturas intra-articulares (exceto a cartilagem) das articulações móveis sendo pobre em nociceptores (Rocha *et al.*, 1999). Estes autores demonstraram, no teste da incapacitação articular induzida em ratos por zymosan, que a administração direta do agente inflamatório na cavidade articular não altera significativamente o limiar de excitabilidade do animal à estimulação. Entretanto, uma resposta nociceptiva franca foi observada quando da administração do zymosan no tecido periarticular. Estes dados demonstraram que a

hiperalgesia observada provavelmente é resultante da estimulação de nociceptores localizados em estruturas periféricas à articulação como cápsula fibrosa, ligamentos e periósteo.

ii. Migração celular

Várias das células envolvidas na resposta inflamatória, como células endoteliais, mastócitos e células residentes, são normalmente encontradas nos tecidos, enquanto outras, como as células polimorfonucleares (PMNs: neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e as células mononucleares (monócitos e linfócitos) chegam ao foco inflamatório utilizando a via sangüínea como meio de acesso ou migrando através dos tecidos (Rang *et al.*, 1995).

Dados experimentais permitiram demonstrar os processos básicos envolvidos na migração de neutrófilos para o foco inflamatório bem como o envolvimento de mediadores quimiotáticos e a expressão de moléculas de adesão como selectinas e integrinas (Brito & Ribeiro, 1999). O passo inicial é a lentificação do fluxo sangüíneo ocasionada pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular em torno do sítio inflamatório. A seguir, ocorre a marginação do neutrófilo ao longo da superfície da célula endotelial seguida da interação entre a célula e o endotélio vascular e, nas condições geradas pela lentificação do fluxo sangüíneo, temos o rolamento (*rolling*) do leucócito sobre o endotélio (McEver, 1992) num processo mediado por selectinas. O passo seguinte é a adesão do leucócito ao endotélio via ligação firme entre integrinas expressas pelos leucócitos e as moléculas de adesão intercelular da classe das imunoglobulinas (IgCAMs) expressas no endotélio (McEver, 1992). As IgCAMs e integrinas também são essenciais para a migração transendotelial dos leucócitos para o tecido inflamado, processo denominado diapedese. As IgCAMs mais claramente associadas com a adesão e diapedese são as ICAM-1 e ICAM-2 (moléculas de adesão intercelular) e a VCAM-1 (moléculas de adesão célula-endotélio vascular) (Pober, 1990; Springer, 1990). O ligante para a VCAM-1 é uma integrina presente na superfície de monócitos, linfócitos e eosinófilos. O neutrófilo não apresenta esta integrina na sua superfície e não se liga à VCAM-1 (Bevilacqua *et al.*, 1994). Finalmente, ocorre a migração dos leucócitos da luz vascular para o

espaço extravascular (Smith *et al.*, 1988; Bevilacqua *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1991; Mackay & Imhof, 1993; Aplin *et al.*, 1998; Henricks & Nijkamp, 1998).

A quimiotaxia é o processo de migração do leucócito para o foco inflamatório e os agentes que atuam neste processo, denominados agentes quimiotáticos, podem ser de origem endógena ou exógena. Os agentes exógenos mais comuns são os produtos bacterianos que contém um aminoácido terminal N-formil-metionina enquanto os mediadores endógenos incluem os componentes do sistema do complemento, em especial o C5a, os produtos da lipooxigenase, principalmente o leucotrieno B₄ (LTB₄), citocinas como IL-1, IL-6, TNF- α e as quimiocinas da família da IL-8. Na inflamação induzida por estímulos exógenos, como carragenina, zymosan ou lipopolissacarídeo (LPS) ou por mediadores quimiotáticos, como IL-1 e TNF- α , que induzem migração por mecanismos indiretos, os macrófagos residentes parecem ser as células mais importantes atuando no controle do recrutamento celular (Souza & Ferreira, 1985; Faccioli *et al.*, 1990) enquanto na inflamação induzida por outros estímulos, células residentes nos tecidos, como macrófagos, mastócitos e linfócitos, participam no controle da migração de neutrófilos via liberação de fatores quimiotáticos como leucotrienos (Rankin *et al.*, 1990), componentes do sistema do complemento (Czermak *et al.*, 1999) e citocinas inflamatórias (Staruch & Wood, 1985; Rankin *et al.*, 1990).

1.3. Mediadores da resposta inflamatória

i. Derivados do ácido araquidônico

A estimulação das membranas celulares induz a liberação, via ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) do ácido araquidônico, um ácido graxo insaturado que contém 20 carbonos e quatro duplas ligações. A seguir ocorre a sua biotransformação a prostaglandinas (PGs), via ação de ciclooxigenases (COX), e leucotrienos via ação das lipooxigenases, entre outras substâncias (Shimizu & Wolfe, 1990).

a. Prostaglandinas

A COX-1 é constitutivamente expressa e envolvida em funções normais como manutenção da homeostase, da função renal e a integridade da mucosa gástrica (Vane & Botting, 1995; Jouzeau *et al.*, 1997), enquanto a COX-2, é expressa na resposta inflamatória após indução por citocinas e fatores de crescimento, além de outros mediadores inflamatórios (Jouzeau *et al.*, 1997; Vane *et al.*, 1998). Apenas a indução da COX-2 é inibida pelos glicocorticóides (Hoff *et al.*, 1993; deWitt & Maede, 1993; Ristimaki *et al.*, 1996). Do ponto de vista da resposta inflamatória, é importante destacar a PGE₂ (Kindgen-Milles, 1995). A discussão sobre a ativação de receptores específicos para as PGs foge ao escopo deste trabalho. Entretanto, excelente revisão pode ser encontrada em Coleman *et al.*, (1994), sobre os receptores de uma forma geral, e Bley *et al.*, (1998), sobre o papel dos receptores prostanóides na dor inflamatória.

Os estudos acerca da participação das prostaglandinas (PGs) em eventos fisiopatológicos permitiram demonstrar que as drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINE's) aspirina-símile reduzem a sintomatologia da inflamação por inibirem a síntese de prostaglandinas (Vane, 1971; Moncada *et al.*, 1975; Ferreira *et al.* 1978). Dados adicionais confirmaram a elevação dos níveis de PGs, durante a inflamação aumentando ou prolongando os sinais produzidos por outros mediadores inflamatórios (Williams & Morley, 1973; Williams, 1979; Doherty *et al.*, 1985; 1987; Gegout *et al.*, 1995).

Entretanto, os DAINE's bloqueiam ambas as enzimas e induzem o aparecimento de graves efeitos colaterais como sangramento gastrointestinal (Warner *et al.*, 1999), alterações renais (Whelton, 1999) e nos mecanismos de hemostase (Patrono, 1994). Estas alterações, que parecem ser decorrentes da inibição da COX-1, levaram à busca de inibidores mais seletivos e resultou no surgimento de drogas mais seletivas para COX-2. Estudos com estes inibidores específicos demonstraram que a indução de COX-2 com LPS aumentou o número de contorção em camundongos (Matsumoto *et al.*, 1998) enquanto a inibição da expressão da enzima reverte a hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina em ratos (Zhang *et al.*, 1997) e reduziu a resposta inflamatória na artrite induzida por

adjuvante em ratos (Anderson *et al.*, 1996). Estes dados reforçam a importância da COX-2 na resposta inflamatória e, na atualidade, os mais importantes inibidores de COX-2 utilizados na prática médica são rofecoxib (Chan *et al.*, 1999) e celecoxib (Paulson *et al.*, 2000).

O envolvimento da COX na dor inflamatória foi avaliado em vários modelos e demonstrou-se que as PGs não ativam diretamente os nociceptores, mas os sensibiliza para estímulos mecânicos, ou para outros mediadores químicos como bradicinina (Ferreira, 1972). Adicionalmente a sua habilidade para inibir a síntese periférica de PGs, diversos autores reportam uma ação central das DAINE's (Vanegas & Schaible, 2001) permitindo a associação entre hiperalgesia central e a liberação de prostaglandinas (Dirig & Yaksh, 1998). Assim, foi relatado que a administração epidural de DAINE's reduziu a hiperalgesia induzida por NO em ratos, apontando para um provável efeito central e a inter-relação entre o NO e prostaglandinas (Masue *et al.*, 1999). É interessante que o efeito analgésico central dos antiinflamatórios não-esteroidais já havia sido apontado anteriormente com a demonstração do efeito analgésico central de dipirona, um DAINE (Neugebauer *et al.*, 1994; Akman *et al.*, 1996). Efeitos analgésicos foram reportados utilizando o teste da formalina (Malmberg & Yaksh, 1992a; 1992b; 1993; 1994), o teste de hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de carragenina (Hay & Belleruche, 1997), o teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (Björkman, 1995; Matsumoto *et al.*, 1998) ou com a administração de agonistas como N-metil-D-aspartato (NMDA) (Malmberg & Yaksh, 1992a).

Finalmente, dados obtidos em modelos experimentais de inflamação articular demonstrou exacerbação da resposta inflamatória associado com elevação dos níveis de PGEs e melhora do quadro clínico após tratamento com DAINE's (Schepelmann *et al.*, 1992; Gegout *et al.* 1995; Spangler, 1996; Anderson *et al.*, 1996; Ochi & Goto, 2001)

b. Leucotrienos

Os leucotrienos são uma família de substâncias farmacologicamente ativas e muito potentes derivadas do ácido araquidônico por ação de 5-lipooxigenases

(Samuelsson, 1983; Piper, 1984) em células como leucócitos PMN, monócitos e macrófagos (Henderson, 1994). Os estudos dos leucotrienos na inflamação baseiam-se na inibição de várias enzimas da cascata do ácido araquidônico ou na inibição da 5-lipooxigenase, que apresenta a vantagem de reduzir os níveis de todos os leucotrienos (Harris *et al.*, 1995). Uma outra abordagem é o antagonismo específico de receptores de leucotrienos e os dados obtidos permitem a demonstração da participação de leucotrienos em patologias humanas com componente inflamatório como rinite alérgica (Diamant & Fokkens, 2001), artrite (Weinblatt *et al.*, 1992), asma (Bisgaard & Groth, 1987) e psoríase (Black *et al.*, 1990).

O antagonismo dos receptores de leucotrieno B₄ (LTB₄) apresenta-se muito promissor tendo em vista que, encontrados em neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, queratinócitos e células endoteliais (Harris *et al.*, 1995), estão envolvidos nos mecanismos de ativação e quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos. Estes receptores provavelmente estão envolvidos nos potentes efeitos ativadores do LTB₄ sobre neutrófilos (Ford-Hutchinson *et al.*, 1980; Belch *et al.*, 1989) resultando na mobilização de cálcio (Naccache *et al.*, 1984), agregação (Ford-Hutchinson *et al.*, 1980), adesão às células endoteliais (Gimbrone *et al.*, 1984) e migração celular (Goetzl & Pickett, 1980). Deste modo, a elevação dos níveis de LTB₄, associada à inflamação, foi demonstrada em modelos animais de permeabilidade vascular induzida em coelhos, cobaios e ratos (Bray *et al.*, 1981), na hiperalgesia térmica induzida pelo fator de crescimento neural β (NGF-β) em camundongos (Amann *et al.*, 1996), na artrite induzida por colágeno em camundongos (Griffiths *et al.*, 1995; 1997; Tsuji *et al.*, 1999; Kuwabara *et al.*, 2000) e por imunocomplexos em ratos (Rocha *et al.*, 1996), na peritonite induzida em por zymosan em camundongos (Griffiths *et al.*, 1997) e na dor radicular em ratos por hérnia induzida no núcleo pulposo (Kawakami *et al.*, 2001). Similarmente, também em seres humanos foi demonstrado que LTB₄ participa na gênese da gota (Rae *et al.*, 1982), asma (Friedman *et al.*, 1993) e artrite (Klickstein *et al.*, 1980; Belch *et al.*, 1989; Weinblatt *et al.*, 1992; Kankaanranta *et al.*, 1996; Prete & Gurakar-Osborne, 1997; Gursel *et al.*, 1997), além de induzir hiperalgesia (Bisgaard & Kristensen, 1985). Estes dados demonstram a relevância dos leucotrienos, particularmente o LTB₄, em doenças humanas com componente inflamatório e reforçam a necessidade do estudo de drogas que bloqueiem a síntese

(Weinblatt *et al.*, 1992; Depre *et al.*, 1993) ou a ação em receptores (Showell *et al.*, 1998).

ii. Autacóides

a. Serotonina

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é sintetizada a partir do triptofano numa reação mediada pela triptofano sintetase. Encontrada em células enterocromafins intestinais, plaquetas humanas, mastócitos de ratos, mas não de humanos, e sistema nervoso central, a amina possui multiplicidade de ações biológicas em função da variedade de receptores farmacológicos (Hoyer *et al.*, 1994; McCall & Clement, 1994).

A 5-HT tem sido reconhecida como um mediador endógeno da resposta inflamatória em tecidos periféricos. O edema induzido por formalina aumentou quando houve co-administração de 5-HT (Doak & Sawynok, 1997) enquanto a permeabilidade vascular foi reduzida pela administração de antagonistas de receptores de 5-HT (Fujii *et al.*, 1994; Pierce *et al.*, 1995; Germonpre *et al.*, 1997). Também foi observado que, na injúria cerebral induzida em ratos, a administração de um inibidor da síntese de 5-HT, *p*-clorofenilalanina, inibiu a elevação da permeabilidade vascular e o edema cerebral (Sharma *et al.*, 2000). A participação da 5-HT na dor também foi avaliada e demonstrou-se que a amina, além de possuir, *per se*, atividade algica, também parece potenciar a resposta algica produzida por outros mediadores inflamatórios (Abbott *et al.*, 1996). Por outro lado, há trabalhos apontando para um provável efeito analgésico. Esta dicotomia pode ser explicada pela grande variedade de receptores da 5-HT. No modelo de hiperalgisia térmica periférica foi relatado que o subtipo de receptor 5-HT_{2A}, mas não o 5-HT₃ está envolvido na resposta observada (Tokunaga *et al.*, 1998) embora estudos com processamento da dor a nível central mostrem resultados contraditórios (Glaum *et al.*, 1990; Ochi & Goto, 2000). Quando houve indução de hiperalgisia por carragenina, os dados demonstraram que os subtipos de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} parecem ter um efeito facilitatório no processamento do mecanismo nociceptivo na

espinha dorsal de ratos (Zhang *et al.*, 2001a). Estes dados reforçam aumento da expressão do mRNA (Zhang *et al.*, 2001b) e da participação de 5-HT_{1A} na resposta nociceptiva (Parada *et al.*, 2001) embora não estejam de acordo com os dados anteriores sobre 5-HT_{1B} (Alhaider & Wilcox, 1993). Por fim, é importante destacar que, em estudos com humanos, foi relatado que a administração de 5-HT aumentou os efeitos da bradicinina na geração de dor e hiperalgesia muscular (Babenko *et al.*, 1999; 2000).

Nos modelos de artrite foi demonstrado que a ativação de plaquetas, as quais liberariam 5-HT, contribuiu para a resposta inflamatória observada na artrite (Endresen, 1989). Adicionalmente, também foi demonstrado que alterações no conteúdo central de 5-HT podem alterar o início e a gravidade da artrite induzida por adjuvante em ratos (Harbuz *et al.*, 1996; 1998). Em monoartrite induzida na articulação temporomandibular e no joelho de coelhos foi observado que, embora não houvesse diferença histológica entre os grupos, houve um aumento significativo no conteúdo de 5-HT (Tominaga *et al.*, 1999).

b. Histamina

A histamina, mediador armazenado em mastócitos juntamente com 5-HT, é uma amina formada a partir da histidina por ação da histidina descarboxilase e encontrada em vários tecidos. Tem ampla distribuição tecidual, mas está concentrada principalmente nos pulmões, pele e no trato gastrointestinal. Suas ações fisiológicas resultam de ação em três receptores farmacológicos denominados H₁, H₂ e H₃. O estudo desses receptores abriu caminho para o desenvolvimento de drogas antialérgicas (antagonistas H₁) e antiulcerosos (H₂). Os receptores H₃ parecem localizar-se principalmente em tecidos neuronais e participam dos mecanismos de autoliberação de histamina e na regulação da liberação pré-sináptica de outros transmissores (Hill *et al.*, 1997; Rouleau *et al.*, 1997; Leurs *et al.*, 1998).

A histamina tem participação importante em fenômenos inflamatórios. Na rinite alérgica (Georgitis *et al.*, 1992; Pazdrak *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1996) e na asma (Casterline *et al.*, 1977; Kobayashi *et al.*, 1998a; 1998b) a administração de

bloqueadores dos receptores H₁ reduz a sintomatologia inflamatória. Também houve redução de edema induzido pela injeção intraplantar de zymosan em ratos (Blazso & Gabor, 1997) e por trauma hipertérmico cerebral em ratos (Patnaik *et al.*, 2000). Na artrite reumatóide induzida em ratos parece haver um aumento significativo no número de mastócitos, células ricas em histamina, que está de acordo com dados mostrando exacerbação da patologia em modelos experimentais associado à elevação do conteúdo sinovial da amina (Buckley *et al.*, 1997; Woolley & Tetlow, 2000). Estes dados corroboram outros achados os quais demonstraram que antagonistas dos receptores da histamina induzem melhora no quadro patológico (Permin *et al.*, 1981; Tanaka *et al.*, 1997). É importante destacar que parece haver, durante a artrite, aumento da expressão do mRNA dos receptores H₁ (Zenmyo *et al.*, 1995; 1996).

O papel da histamina na dor também foi investigado e os resultados são promissores embora pareça haver uma certa confusão na literatura a respeito deste tópico pois foi demonstrado que os antagonistas dos receptores H₁ são antinociceptivos (Rumore & Schlichting, 1985; Malmberg-Aiello *et al.*, 1998) enquanto antagonistas H₂ tem efeitos antinociceptivos (Abacioglu *et al.*, 1993) mas também podem inibir a antinocicepção pela morfina (Gogas *et al.*, 1989). Em modelos de dor experimental utilizando estímulo mecânico (pressão sobre pata e *tail flick* em ratos), térmico (teste da placa aquecida) ou químico (contorção abdominal) ambos em camundongos, os autores concluíram que o sistema histaminérgico modula a resposta nociceptiva via estimulação de receptores H₂ (Lamberti *et al.*, 1996; Hough *et al.*, 1999). Por outro lado, também há fortes evidências apontando para a participação de receptores H₂ na via nociceptiva histaminérgica. Malmberg-Aiello *et al.*, (1998) utilizaram um agonista seletivo para H₁ e demonstraram atividade hipernociceptiva que foi bloqueada por pirlamina, antagonista H₁, nos testes de placa aquecida, contorção abdominal e de pressão da pata, concluindo que estes receptores aumentam a sensibilidade tecidual aos estímulos lesivos. Estes dados foram recentemente confirmados. Antagonistas seletivos H₁ inibiram as fases neurogênica e inflamatória no teste da formalina (Parada *et al.*, 2001) e em vários modelos experimentais utilizando animais *knockout* para o gene dos receptores H₁ (Mobarakeh *et al.*, 2000).

O papel de receptores H_3 na resposta só recentemente foi avaliado e demonstrou-se que, em roedores, o BP 29-4, uma pró-droga da metil-histamina, inibe o extravasamento de plasma induzido por capsaicina e edema de pata induzida por zymosan (Rouleau, *et al.*, 1997). Estes efeitos foram atribuídos a expressão de receptores H_3 inibitórios nas fibras sensoriais do tipo C que, em conjunto com a liberação de histamina dos depósitos de mastócitos, agem como um sistema de retro-alimentação negativo para a liberação de neuropeptídeos (Rouleau, *et al.*, 1997). Um mecanismo de retro-alimentação similar parece existir em ratos, cobaios, no pulmão de coelho e na dura-máter de ratos (Ichinose *et al.*, 1990; Delaunois *et al.*, 1995; Dimitriadou *et al.*, 1997) sugerindo um efeito benéfico dos agonistas de H_3 (Matsubara *et al.*, 1992; Dimitriadou *et al.*, 1997).

iii. Fosfodiesterases

As fosfodiesterases são uma complexa família de isoenzimas que atuam degradando cAMP e cGMP e a fosfodiesterase do tipo IV (PDE IV) parece ser a mais importante nas células inflamatórias. A elevação intracelular dos níveis de cAMP está associada com a supressão das funções de células inflamatórias. A migração celular para o foco inflamatório é uma resposta essencial na defesa do organismo contra agentes/estímulos lesivos sendo que a resposta imune inicial pode levar a danos permanentes se não for adequadamente controlada. Doenças como asma e artrite são exemplos desta resposta descontrolada que se faz acompanhar de intensa infiltração tecidual com células inflamatórias. Neste contexto, uma alternativa terapêutica que vem sendo dada maior atenção está relacionada aos níveis de cAMP, cuja elevação está associada a inibição da quimiotaxia e degranulação de eosinófilos (Barnette *et al.*, 1995; Alves *et al.*, 1996; Tenor *et al.*, 1996), inibição da liberação de TNF- α de macrófagos (Moraes *et al.*, 1998), ativação de macrófagos (Beshay *et al.*, 2001) e inibição da liberação de enzimas lisossomais, PAF, leucotrienos, NO e espécies oxigênio-reativas de neutrófilos, eosinófilos ou macrófagos (Moore *et al.*, 1995). Assim, várias drogas estão sendo avaliadas por seu potencial efeito inibidor seletivo sobre a PDE IV em diferentes modelos experimentais (Teixeira *et al.*, 1997). No edema de pata de ratos induzida por

carragenina, a administração de rolipram, um inibidor seletivo de PDE IV, reduziu os níveis locais de TNF- α e a resposta inflamatória associada (Sekut *et al.*, 1995). Resultado similar foi mostrado na bolsa de ar induzida por zymosan em ratos onde o rolipram foi comparado com dexametasona e reduziu significativamente os níveis de TNF- α prevenindo totalmente a migração celular (Klemm *et al.*, 1995). Em modelos de artrite os dados também são muito promissores pois foi relatada a redução de parâmetros inflamatórios na artrite induzida por colágeno (Nyman *et al.*, 1997), na artrite induzida por adjuvante (Francischi *et al.*, 2000) e na artrite induzida por *streptococcus* (Laemont *et al.*, 1999), todos modelos avaliados em ratos. Ainda, em nosso laboratório foi demonstrado que a administração de agentes que elevam os níveis intracelulares de cAMP reduzem o número de contorções abdominais induzida por ácido acético e zymosan em camundongos (Brito *et al.*, 2001). Estudos com leucócitos humanos mostrou que os inibidores seletivos de PDE IV inibiram a biossíntese de LTB₄ induzida por fMLP (Denis & Riendeau, 1999) enquanto em células mononucleares de pacientes com esclerose múltipla houve redução dos níveis de TNF- α e IFN- γ (Semmler *et al.*, 1993; Navikas *et al.*, 1998).

O mecanismo responsável pelo efeito antiinflamatório do rolipram parece também estar relacionado, além da inibição de PDE IV, à inibição de LTB₄ (Denis & Riendeau, 1999), IFN- γ , TNF- α e das interleucinas IL-1 e IL-5. O efeito sobre a PDE IV é confirmado pelo fato de o isoproterenol, um agonista β -adrenérgico não-seletivo que aumenta os níveis de cAMP e afeta as funções dos leucócitos que são mediadas pelos agonistas destes receptores, inibir o edema de pata e ser tão ativo quanto rolipram (Wiegmann *et al.*, 1995) na artrite. Para alguns autores, o mecanismo mais importante é a inibição de TNF- α devido ao fato deste mediador exercer papel importante atraindo leucócitos (Kiely *et al.*, 1995; Pettipher *et al.*, 1996), ativando células endoteliais (Gao & Issekutz, 1994; Sekut *et al.*, 1995; Schimmer *et al.*, 1997) e contribuindo para o edema (Sekut *et al.*, 1995). Outros autores relataram que o rolipram inibe o acúmulo de mieloperoxidase (um indicador do recrutamento de PMN) e edema na inflamação auricular induzida por ácido acético (Griswold *et al.*, 1993). Estes dados mostram que a inibição da

fosfodiesterase é uma estratégia importante na busca de novas drogas com atividade antiinflamatória.

iv. Sistema adrenérgico

O papel exercido pelo sistema simpático não é claro em função da multiplicidade de receptores que podem ser ativados por agonistas farmacológicos. Talvez este fato ajude a explicar os dados contraditórios encontrados na literatura a respeito da participação do sistema simpático na mediação de fenômenos inflamatórios. Nakamura & Lico (1986) relatam, por exemplo, que a simpatectomia era usada desde a II Grande Guerra Mundial para tratamento de alguns tipos de dor, mas outros autores reportaram dados apontando para uma direção oposta mostrando redução da resposta inflamatória por catecolaminas em modelos de permeabilidade vascular em camundongos e no edema de pata em ratos (Green, 1972; O'Duffy & Chahl, 1979). Atualmente, os dados relatados por vários autores permitem considerar que, de fato, o sistema simpático parece ativo em ambas as situações.

A administração intratecal de norepinefrina, agonista adrenérgico, em ratos induziu um aumento significativo do limiar nociceptivo, avaliado no teste da placa aquecida e no teste do *tail flick*, de forma dose-dependente (Reddy *et al.*, 1980). Efeito similar foi observado com a administração de clonidina, agonista α -adrenérgico seletivo, no teste do *tail flick* (Ossipov *et al.*, 1988) ou tramadol, inibidor da recaptação de noradrenalina, em modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos (Kayser *et al.*, 1992). Estes dados foram confirmados utilizando dois agonistas específicos para os receptores α -adrenérgicos, a dexmedetomidina, que produziu antinocicepção quando administrada por via intratecal ou via sistêmica nos modelos de inflamação periférica induzida por carragenina, no teste da placa aquecida, no teste do *tail flick* e no teste de pressão da pata de ratos (Fisher *et al.*, 1991; Idänpään-Heikkilä *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1997; 2000), e o ST-91, que produziu efeitos similares (Howe *et al.*, 1983; Monasky *et al.*, 1990; Takano & Yaksh, 1992; Graham *et al.*, 1997; 2000). É importante destacar que o efeito analgésico destes agonistas depende do animal empregado. Estes dados apontam para um efeito

analgésico resultante da ativação do sistema simpático por agonistas α -adrenérgicos que altera a transmissão simpática através da medula espinal induzindo alterações no fluxo simpático em resposta à estimulação nociva.

Por outro lado, também são extensos os relatos demonstrando efeito hiperalgésico via mediação simpática. Em modelo de dor induzida por estimulação elétrica em ratos foi demonstrando que a administração de propranolol bloqueou a resposta vocalizada pelo animal (Nakamura & Lico, 1986). Na hiperalgesia induzida por carragenina em pata de ratos foi relatado que a administração de guanetidina, depletor de reservas catecolaminérgicas, e outros bloqueadores do sistema simpático, inibiram a resposta nociceptiva (Nakamura & Ferreira, 1987) e, por fim, estudando a resposta inflamatória na contorção abdominal induzida em camungos por ácido acético, foi demonstrado que a administração de simpatomiméticos, como tiramina e cocaína, exacerbam as contorções abdominais as quais foram bloqueadas por propranolol (Duarte *et al.*, 1988), antagonista da receptores β -adrenérgicos. Similarmente, em modelo de incapacitação articular induzida em ratos por carragenina, foi demonstrado que a simpatectomia química obtida com guanetidina reduziu a resposta inflamatória (Tonussi & Ferreira, 1992). Dados adicionais mostram que vários mediadores induzem sintomas inflamatórios com a participação do sistema simpático. Assim, na resposta inflamatória induzida por prostanóides (Gonzales *et al.*, 1989; Raja *et al.*, 1995; Janig *et al.*, 1996), interleucina 8 (IL-8) (Cunha *et al.*, 1991), 5-hidroxitriptamina (Pierce *et al.*, 1995) e bradicinina (Khasar *et al.*, 1995), há evidências da mediação simpática.

O mecanismo através do qual ocorre esta mediação simpática não é totalmente claro, mas há algumas teorias. Segundo Janig *et al.*, (1996) na lesão parcial ou completa de terminações nervosas ocorreria a plasticidade neuronal que resultaria em novas conexões químicas com neurônios aferentes que seriam responsáveis pela sensibilização/ativação dos neurônios aferentes primários através das terminações simpáticas. Outro provável mecanismo seria a sensibilização direta de terminações nociceptivas em condições inflamatórias, corroborando relatos anteriores (Levine *et al.*, 1985a; 1986b). É importante apontar as evidências destacando a ativação dos receptores β -adrenérgicos em eventos pró-inflamatórios (Levine *et al.*, 1988; Coderre *et al.*, 1990)

Fica claro, ao final desta exposição, que há uma dicotomia a respeito dos efeitos do sistema simpático na inflamação e os dados mostram que a magnitude do efeito observado parece depender do subtipo de receptor envolvido, do modelo experimental utilizado e a via de administração empregada.

v. Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é formado a partir do oxigênio molecular e da L-arginina através de uma reação catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (Moncada *et al.*, 1991). Diversos tipos celulares são capazes de sintetizar NO, entre os quais as células endoteliais (Wright *et al.*, 1989), macrófagos (di Rosa *et al.*, 1990), sinoviócitos (McInnes *et al.*, 1996) e condrócitos (Stadler *et al.*, 1991). A via de biossíntese gera, além de NO, também citrulina e é estereoespecífica tendo em vista que a administração da D-arginina, estereoisômero da L-arginina, não funciona como substrato para a produção de NO. Até o momento foram determinados três subtipos de NOS: as denominadas constitutivas (cNOS) são cálcio-calmodulina dependentes e produzem picomoles de NO por curtos períodos de ativação. Este subtipo de enzima é encontrado no endotélio vascular e denominada eNOS (ou NOS I). Outro subtipo de cNOS é encontrado nas terminações nervosas cerebrais e denominada neuronal, nNOS (NOS III). Por outro lado, há um outro subtipo de NOS que só é expressa depois de adequada estimulação. Este subtipo, denominado induzida, iNOS (NOS II), é cálcio-calmodulina independente e produz nanomoles de NO por períodos prolongados de ativação. Do ponto de vista da resposta inflamatória, é a mais importante e expressa após exposição a estímulos como IL-1, fator de necrose tumoral (TNF) e lipopolisacarrídeo da parede de bactérias (LPS).

O estudo do NO em processos fisiopatológicos é relativamente difícil em função de ser uma pequena molécula altamente instável. Entretanto, há formas alternativas para o seu estudo, entre as quais a avaliação da conversão da L-arginina à L-citrulina e a quantificação dos seus metabólitos finais, nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (Ignarro *et al.*, 1990). Outra forma empregada é a demonstração da ativação do gene do mRNA que leva à expressão da iNOS (Mohaupt *et al.*, 1994). Atualmente, a forma mais empregada é o bloqueio farmacológico da produção de

NO através de análogos estruturais da L-arginina, os quais funcionam como falsos substratos enzimáticos e ocupam os sítios de ligação da L-arginina na NOS. Os inibidores mais utilizados são o L-N^G-nitroarginina metil ester (L-NAME), o L-N^G-monometilarginina (L-NMMA) e o N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) (Rees *et al.*, 1990), a aminoguanidina (Stefanovic-Racic *et al.*, 1995; Ridger *et al.*, 1997) e o 1400W (Garvey *et al.*, 1997). Por outro lado, pode-se simular a ação de NO através da administração de doadores que, uma vez biotransformados, liberam NO. O nitroprussiato de sódio (NPS) (Fidecka *et al.*, 1997), o trinitrato de glicerila (GTN) (Shaffer *et al.*, 1992), o S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP) (Gibson *et al.*, 1992; Shaffer *et al.*, 1992; Holm *et al.*, 1998) e S-morfolisidnonimina (SIN-1) (Holm *et al.*, 1998) são as substâncias mais utilizadas com esta finalidade. Por fim, como contra-prova, pode-se usar o estereoisômero inativo da L-arginina, a D-arginina, ou o estereoisômero inativo do principal bloqueador da síntese, o D-NAME (Aguirre-Banuelos & Granados-Soto, 2000).

a. Ações do óxido nítrico

O NO é uma das moléculas mais estudadas na atualidade e o seu envolvimento em vários eventos fisiopatológicos é amplamente documentado. Assim, foi relatada a sua participação nos mecanismos de controle da pressão arterial (Furchgott, 1983; Ignarro *et al.*, 1987) e na inibição da aderência e agregação de plaquetas, leucócitos, neutrófilos e monócitos (Kubes *et al.*, 1991; Belenky *et al.* 1993a; 1993b; Kubes *et al.*, 1993; Thomassen & Kavuru, 2001). Adicionalmente, parece participar da neurotransmissão e plasticidade neuronal (Southam & Garthwaite, 1993; Holscher, 1997). No sistema nervoso periférico, foi demonstrado a sua participação no sistema não-colinérgico-não-adrenérgico (Rand, 1992; Rajfer *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1992; Ziessen *et al.*, 2002) além do envolvimento nos mecanismos de ereção peniana (Rajfer *et al.*, 1992; Burnett, 1995). Por fim, há relatos apontando para o papel imunomediador exercido pelo NO e a demonstração de seus efeitos citotóxicos e citostáticos com atuação na defesa inespecífica do organismo contra células tumorais e patógenos como bactérias, fungos e parasitas (Oswald *et al.*, 1994; Fang, 1997; Colasanti *et al.*, 2002).

Parte dos efeitos mediados pelo NO ocorrem via aumento dos níveis intracelulares de guanosina monofosfato cíclico (cGMP) e a bloqueio desta via através de ferramentas farmacológicas específicas, como azul de metileno (Inoue *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 2000) e ODQ (Cunha *et al.*, 1999), é uma evidência da participação do sistema L-arginina:NO:cGMP embora tenha sido demonstrado que, em osteoclastos, o efeito do NO independente de cGMP (MacIntyre *et al.*, 1991).

b. Óxido nítrico e dor

O papel do NO na nocicepção não está claro. A antinocicepção colinérgica foi mostrada em diferentes modelos de resposta álgica (Ferreira & Nakamura, 1979; Nakamura, 1984; Duarte *et al.*, 1990a). Este efeito foi confirmado com o bloqueio da analgesia periférica da acetilcolina através da administração, no modelo de hiperalgesia induzida por carragenina ou prostaglandina (Randall & Selitto, 1957), de L-NMMA, inibidor da síntese de NO, ou azul de metileno, antagonista de cGMP, e foi potenciado com MY 5445, inibidor de fosfodiesterase. Este conjunto de dados levou os autores a sugerirem que a analgesia periférica por acetilcolina envolve a ativação da via L-arginina:NO:cGMP (Duarte *et al.*, 1990b). Nesta mesma linha, foi demonstrado que morfina induz efeito antinociceptivo em modelo de hiperalgesia de pata de ratos sensibilizada por PGE₂ (Ferreira *et al.*, 1991a; 1991b) e no teste da formalina em pata de ratos (Granados-Soto *et al.*, 1997), via ativação de cGMP. Por fim, L-NMMA e azul de metileno inibiram o efeito de dipirona e mirceno, dois analgésicos periféricos de ação direta, reforçando a participação do sistema L-arginina:NO:cGMP nos mecanismos periféricos e centrais de controle da resposta álgica (Duarte *et al.*, 1992).

Entretanto, também foi demonstrado efeito hiperalgésico do NO. Moore *et al.*, (1991) mostrou nos testes de formalina em pata de ratos, placa quente (*hot plat test*) e modelo de contorção abdominal em camundongos (*writhing test*) que, independente da via de administração, L-NAME induz antinocicepção de forma dose-dependente. Também foi demonstrado que L-NAME bloqueou o efeito hiperalgésico de capsaicina em ratos (Sakurada *et al.*, 1996) e reverteu a hiperalgesia induzida por bradicinina em pata de ratos (Nakamura *et al.*, 1996). A

administração de L-NMMA também reverteu a hiperalgesia por bradicinina em pata de ratos (Nakamura *et al.*, 1996). Por fim, a participação da via L-arginina:NO:cGMP no efeito antinociceptivo de L-NAME também foi demonstrado em modelo de contorção abdominal e no teste de hiperalgesia induzida por carragenina e PGE₂ em pata de ratos (Duarte & Ferreira, 2000). É importante destacar que a carragenina induziu a liberação periférica de NO mediada através de nNOS, na fase inicial, e por iNOS e nNOS, na fase final da resposta inflamatória (Omote *et al.*, 2001). Por fim, a administração terapêutica de L-NAME reduziu a hiperalgesia térmica em ratos (Tedesco *et al.*, 2002). A participação do NO nos mecanismos centrais de modulação da resposta nociceptiva também foi avaliada e demonstrou-se que, em modelo de dor neuropática induzida pela compressão de terminações nervosas espinhais, a administração de L-NAME suprime a alodinia mecânica e térmica bem como reduziu o estresse induzido pelo frio. A administração de D-NAME, estereoisômero inativo de L-NAME, ou solução salina, não alteraram o comportamento nociceptivo (Yoon *et al.*, 1998). De modo similar, foi demonstrada a expressão local de NOS na dor neuropática induzida por constrição em terminações nervosas (Levy & Zochodne, 1998; Levy *et al.*, 1999).

Em nossa dissertação de mestrado também avaliamos o efeito do NO em um modelo de dor inflamatória articular e observamos que a dor induzida por zymosan foi inibida pela prévia administração de L-NAME ou aminoguanidina. Por outro lado, também pudemos observar que a administração de NPS, doador de NO, após a administração de zymosan, foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva (Rocha, 1999). Os dados obtidos neste trabalho reforçam a noção geral de que a via L-arginina:NO:cGMP parece ter um efeito dual podendo exercer efeitos tanto pró-inflamatórios quanto antiinflamatórios. Entretanto, os achados reiteram a participação do NO nos eventos descritos e reforçam a necessidade de estudos adicionais sobre a participação do NO na dor inflamatória articular e migração celular da artrite induzida por zymosan em ratos.

c. Óxido nítrico e artrite

Várias células presentes na articulação, como condrócitos (Sakurai *et al.*, 1995; Amin *et al.*, 1995), sinoviócitos (Sakurai *et al.*, 1995, McInnes *et al.*, 1996; Stefanovic-Racic *et al.*, 1994), macrófagos (Yui *et al.*, 1991) e neutrófilos (McCall *et al.*, 1989), uma vez estimuladas, induzem a produção de NO. A produção aumentada de NO em articulações inflamadas também é sugerido pelos níveis elevados de NO^{-3} encontrados no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (Farrell *et al.*, 1992; Grabowski *et al.*, 1996; McInnes *et al.*, 1996; Miyasaka e Hirata, 1997). Adicionalmente, a demonstração de S-nitrosoproteínas, produtos estáveis que retém a atividade farmacológica de NO, no líquido sinovial e no soro de pacientes artríticos, reforçam a tese da participação do NO em artrites (Hilliquin *et al.*, 1997). Em modelos animais de artrite por *streptococcus* foi observado aumento da produção de NO e da expressão da NOS na sinóvia dos animais (McCartney-Francis *et al.*, 1993). A administração oral de L-NAME suprimiu, de forma dose-dependente, a artrite induzida por adjuvante de Freund em ratos com o provável envolvimento da via L-arginina:NO na proliferação de linfócitos T e na ativação de macrófagos (Ialenti *et al.*, 1993). Outro achado importante foi a demonstração de que a administração de L-NMMA, inibidor de NOS, reduziu a inflamação sinovial e o dano tecidual no modelo de artrite induzida por LPS (McCartney-Francis *et al.*, 1993). No modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos, foi demonstrado que aminoguanidina e N-iminoetil-L-lisina, dois inibidores específicos da síntese de NO, suprimiram o aumento dos níveis de nitrito plasmático e a inflamação articular associada com a artrite induzida por adjuvante, de maneira dose-dependente (Connor *et al.*, 1995). Por outro lado, há alguma controvérsia pois foi demonstrado que aminoguanidina reduziu apenas a excreção urinária de nitrito e nitrato, sem afetar o curso da artrite induzida por adjuvante em ratos (Stefanovic-Racic *et al.*, 1995).

Os dados apontados demonstram que, de fato, o NO tem papel relevante em artropatias inflamatórias, mas o seu real papel ainda não é claro demandando investigações adicionais.

vi. Neutrófilos

Os neutrófilos são células fundamentais para a fase inicial do processo inflamatório e atuam liberando mediadores farmacológicos que agem, principalmente, como fatores quimiotáticos para monócitos e outras células inflamatórias. Eles têm potencial para amplificar a resposta inflamatória celular e causar lesão. Também estão implicados no desenvolvimento da dor inflamatória. Há evidências indiretas que demonstram que os neutrófilos contribuem para os mecanismos periféricos da dor neuropática tendo em vista que o fator de crescimento neural (NGF) contribui para a hiperalgesia neuropática e esta hiperalgesia parece ser, pelo menos em parte, induzida por neutrófilos, embora não haja dados quantitativos diretos a este respeito (Bennett *et al.*, 1998; Ro *et al.*, 1999; Schuligoi, 1998; Theodosiou *et al.*, 1999).

A depleção dos neutrófilos circulantes através da utilização de anticorpo antineutrófilos foi seguida de um padrão tempo-dependente e concomitante ao alívio da hiperalgesia em um grupo tratado com anticorpos, fato consistente com a ativação da resposta inflamatória por causa da injúria nervosa, haja vista que a inflamação aguda pode acelerar a liberação de neutrófilos imaturos do *pool* de reserva da medula óssea (Perkins & Tracey, 2000). O tratamento com anticorpos antineutrófilos também foi capaz de reduzir o número de outros leucócitos circulantes (Perkins & Tracey, 2000) sugerindo que o tratamento não depletou apenas os leucócitos, mas preveniu também o seu aumento como parte normal da resposta inflamatória após injúria nervosa. Segundo os autores, este é um fato inesperado levando-se em conta que os neutrófilos liberam uma variedade de mediadores inflamatórios e fatores quimiotáticos a partir de monócitos e outras células inflamatórias.

Na fase inicial da dor neuropática periférica, os neutrófilos também exercem papel importante tendo sido demonstrado que a sua depleção, ao mesmo tempo em que ocorre a injúria neuronal, atenua a indução da hiperalgesia térmica durante a depleção. Entretanto, em animais onde não é feita a depleção de neutrófilos, a resposta inflamatória pode estabelecer-se e, mesmo após 8 dias, a depleção de neutrófilos não terá mais efeito sobre a hiperalgesia (Perkins & Tracey, 2000).

Segundo os autores, isto ocorre porque, nesta fase, os macrófagos e seus mediadores são provavelmente mais importantes que os neutrófilos na manutenção da hiperalgesia. Parece que os neutrófilos contribuem para a fase inicial da dor neuropática periférica através da liberação de mediadores algésicos os quais sensibilizariam os nociceptores assim como estimulariam a liberação de fatores quimiotáticos que recrutariam outras células do sistema imune, entre as quais, os próprios macrófagos.

Algumas dúvidas surgem à cerca do local de atuação dos neutrófilos e alguns dados sugerem que a hiperalgesia neuropática ocorre em torno da terminação nervosa, ao invés de dentro da terminação embora não se tenha notado acúmulo da célula em torno da terminação.

Os neutrófilos endoneurais podem agir no sítio da injúria nervosa para induzir hiperalgesia diretamente, através da liberação de mediadores que sensibilizam ou ativam nociceptores aferentes, e também podem agir indiretamente, induzindo a liberação de mediadores algogênicos de outros tipos celulares. Há vários candidatos para agirem diretamente como mediadores algésicos. Um deles é um produto dos neutrófilos, 8*R*,15*S*-diHETE, leucotrieno que sensibiliza aferentes nociceptivos primários (White *et al.*, 1990) e induz hiperalgesia quando injetado intradermicamente na pata de ratos (Levine *et al.*, 1986a). A participação de prostaglandinas (Maloney *et al.*, 1998; Fasano *et al.*, 1998), superóxido (Khalil *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Tal, 1996), PAF (Fazal *et al.*, 2001; Kuijpers *et al.*, 2001) e óxido nítrico (Lin *et al.*, 2001; Franco-Penteado *et al.*, 2001) não pode ser descartada.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Em função de não conhecermos adequadamente os mecanismos envolvidos na dor inflamatória, há muitos tratamentos embora ainda estejamos longe do tratamento ideal. Os estudos das variações entre os diferentes modelos experimentais são importantes, pois podem contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas e ajudar no melhor entendimento da fisiopatologia da doença. Neste trabalho o nosso objetivo foi continuar a caracterização do modelo da artrite induzida por zymosan, iniciada no mestrado com o estudo da participação do óxido nítrico no modelo. Os dados obtidos com o óxido nítrico no mestrado sugeriram uma aparente controvérsia, ora com um papel analgésico. ora com um papel hiperalgésico. Em função disso objetivamos, na fase inicial, aprofundar e definir mais claramente qual o papel do óxido nítrico administrado em situações profiláticas (antes da indução da artrite por zymosan) e terapêuticas (2 h após a indução da AZy) empregando diferentes estratégias de administrações. A seguir, objetivamos continuar a caracterização do modelo avaliando a participação de outros mediadores da resposta inflamatória administrados tanto de forma profilática quanto terapêutica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Avaliar a participação do óxido nítrico na incapacitação articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos

- ii. Avaliar a participação de prostaglandinas na incapacitação articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos

- iii. Avaliar a participação de leucotrienos na incapacitação articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos

- iv. Avaliar a participação de serotonina na incapacitação articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos

- v. Avaliar a participação de histamina na incapacitação articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos

- vi. Avaliar a participação de fosfodiesterase IV na incapacitação articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos

- vii. Avaliar a participação de neutrófilos na incapacitação articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos

- viii. Avaliar a participação do sistema adrenérgico na incapacitação articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, pesando entre 170 - 210 gramas, provenientes do Biotério Central e do Biotério Setorial da Faculdade de Medicina, ambos da Universidade Federal do Ceará. Os animais forma mantidos em caixas de plástico com livre acesso à água e comida, obedecendo a ciclos claro/escuro. Todos os animais forma treinados 24 h antes da experimentação no modelo de incapacitação articular.

3.2. Drogas

- i. 1400W: Cayman Chem. Co., USA
- ii. Aminoguanidina: Sigma Chem. Co., USA
- iii. Anticorpo antineutrófilos: Sigma Chem. Co., USA
- iv. Celecoxib (Celebra[®]): Pfizer, Brasil
- v. Cimetidina: Sigma Chem. Co., USA
- vi. Composto 48/80: Sigma Chem. Co., USA
- vii. Guanetidina: Sigma Chem Co., USA
- viii. Heparina: Cristália, Brasil
- ix. Hidrato de cloral: Reagen, Brasil
- x. L-NAME: Sigma Chem. Co., USA

- xi. MK-886: Biomol Res. Lab. Inc., UCA
- xii. Mepiramina: Sigma Chem. Co., USA
- xiii. Metisergida: Sigma Chem. Co., USA
- xiv. Propranolol: Sigma Chem. Co., USA
- xv. Rofecoxib (Vioxx[®]): Merck Sharp & Dohme, Brasil
- xvi. Rolipram: Sigma Chem. Co., USA
- xvii. SIN-1: Tocris Chem., USA
- xviii. Zymosan: Sigma Chem Co., USA

3.3. Descrição do modelo experimental e métodos

i. Indução da artrite

A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg diluído em 50 μ l de solução salina 0.9% na articulação do joelho direito (Rocha *et al.*, 1999). O grupo controle recebeu apenas solução salina 0.9% intra-articular (i.art.).

a. Registro da incapacitação articular

O modelo de artrite induzida por zymosan (AZy) permite o estudo da dor inflamatória articular e foi desenvolvida a partir da idéia original de Bustamante (1982) que induziu incapacitação articular em ratas através de cristais de urato e utilizou como parâmetro de avaliação o número de toques que a pata lesada exercia

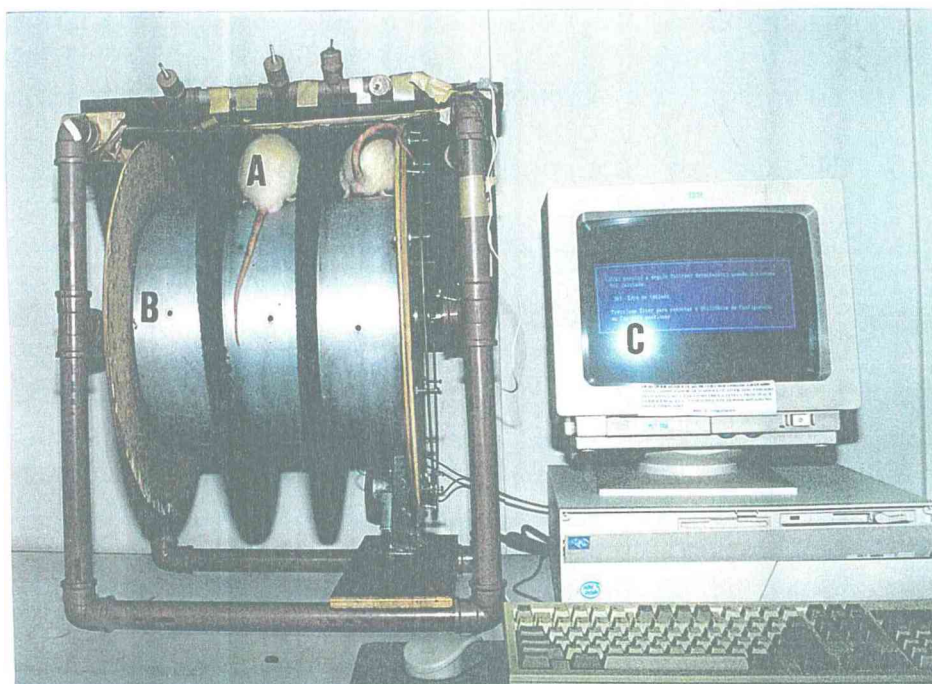
sobre uma superfície metálica. Tonussi & Ferreira (1992) aperfeiçoaram a idéia e utilizaram carragenina como agente inflamatório desenvolvendo um método simples, sensível e seguro baseado em sistema computadorizado de aquisição de dados. O modelo foi adaptado para as nossas condições de laboratório e passamos a estudar também o influxo celular (Magalhães *et al.*, 1997) e a induzir a lesão utilizando como agente inflamatório o zymosan (Vianna *et al.*, 1998), além de permitir o estudo da permeabilidade vascular (Rocha *et al.*, 1999). A AZy é um modelo de fácil reprodução e de baixo custo, pois é induzida em ratos, permite a experimentação de vários animais simultaneamente e limita a subjetividade do observador. Além disso, demonstrou que é possível a obtenção do lavado articular para análise da migração de células para o foco inflamatório e a dosagem de mediadores. Permite ainda a determinação do momento inicial do processo inflamatório e o estudo da dor aguda. Os estudos do nosso grupo têm demonstrado que a lesão sinovial na artrite crônica, com a participação do sistema imunológico evidenciado pela proliferação linfomonocitária e presença de células gigantes na sinovite, em sua fase crônica (Rocha *et al.*, 1999).

Inicialmente, ratos Wistar machos receberam uma injeção i.art. na articulação do joelho posterior direito de 1 mg de zymosan diluído em 50 μ l de solução salina 0.9% e foram postos a deambular em um cilindro metálico giratório de alumínio (Fotografia 1), com 30 cm de diâmetro e 50 cm de largura, com capacidade para três animais por vez e girando a uma velocidade média de 3 rpm. As patas traseiras do animal foram calçadas com sapatilhas metálicas especialmente desenhadas. A sapatilha correspondente à pata que recebeu Zy foi conectada a uma

porta de entrada de dados de um microcomputador, no qual está instalado um programa de aquisição de dados. Ao tocar a superfície do cilindro, o animal fecha um circuito que é registrado pelo computador. O tempo total de registro é de um minuto e, ao final, o programa nos fornece o tempo, durante aquele minuto, que o animal permaneceu com a pata suspensa. Essa medida é denominada tempo de suspensão da pata (TSP) e é tida como diretamente proporcional à dor inflamatória articular. O TSP é medido antes da injeção do estímulo (valor basal) e a cada hora até a 6^a h. O aumento do TSP indica incapacidade do animal em deambular normalmente podendo ser tomado como medida indireta de hiperalgesia.

b. Influxo celular

Na 6^a h após a administração do zymosan, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% e sacrificados por decapitação e exsanguinação. A seguir, as articulações lesionadas foram lavadas com volumes de 0.2 ml (2 x) de solução salina heparinizada. Dos lavados articulares obtidos, retiramos uma alíquota que, após corada em solução de Turk, foi utilizada para contagem do número total de células em câmara de Neubauer. O restante do lavado foi centrifugado (500 g/10 min) e o sobrenadante obtido estocado a -20° C para posterior análise.



Fotografia 1. Animais deambulando no sistema de registro da incapacitação articular. Os animais (A), após colocação de sapatilhas metálicas, são postos a deambularem em um cilindro metálico (B) que gira a 3 rpm. O cilindro está conectado a um microcomputador (C), que possui um programa específico para registro do Tempo de Suspensão da Pata, em segundos, para cada animal.

c. Determinação da produção de óxido nítrico

A produção de NO foi obtida através da determinação do conteúdo total de nitrito e nitrato ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) no lavado sinovial obtido na 6^a h de artrite através da reação de Griess. A concentração total de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ nas amostras foi convertida a NO_2^- incubando-se 0.01 ml de nitrato redutase de *Aspergillus* sp e 0.01 ml de NADPH por 30 minutos a 37°C. A concentração de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ da amostra foi determinada espectofotometricamente através da reação de Griess da seguinte forma. Utilizamos placa de 96 poços e fizemos as determinações em triplicata. Colocamos 50 μl da amostra experimental em cada poço. Uma série de diluições da curva padrão de referência do NO_2^- (80 μmol , 40 μmol , 20 μmol , 10 μmol , 5 μmol , 2.5 μmol , 1.25 μmol e 0.625 μmol) foi preparada e 50 μl do padrão foi colocado numa segunda placa de 96 poços, em triplicata. A seguir, foi colocado 50 μl de solução de sulfanilamida em cada poço de ambas as placas e as incubamos, por 10 min, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após este período de incubação, adicionamos 50 μl de uma solução de dicloreto de N-1-naftiletlenodiamina e incubamos novamente nas mesmas condições anteriores. A coloração púrpura/magenta apareceu imediatamente e foi medida em leitor de placas com filtro entre 520 – 550 nm e os valores obtidos para as amostras experimentais foram comparados com os obtidos para a curva padrão. A coloração é estável por até 30 min.

d. Determinação da produção de leucotrieno B₄ no lavado sinovial da artrite induzida por zymosan em ratos

A determinação de leucotrieno B₄ (LTB₄) foi feita no lavado articular obtido dos animais tratados com o MK-886, inibidor de lipooxigenase. Os sobrenadantes dos lavados, após centrifugação (500 g/10 min), foram estocados a -20° C. As concentrações de LTB₄ presentes no lavado articular foram determinados através de ensaio imunoenzimático (ELISA) conforme método descrito anteriormente (Pradelles *et al.*, 1985), utilizando *kit* comercialmente disponível.

Inicialmente, foi adicionado às amostras 4 volumes de metanol absoluto, para precipitação de proteínas que pudessem interferir com a especificidade do teste. Após centrifugação e sob refrigeração (4° C), o sobrenadante foi submetido à secagem refrigerada a vácuo para evaporação do metanol adicionado às amostras que, secas, são utilizadas no teste. Os resultados são expressos em pg/ml de amostra.

3.4. Modulação farmacológica

Com a finalidade de estudarmos o perfil profilático ou terapêutico das intervenções realizadas, grupos foram previamente tratados 1 h antes da injeção de zymosan (intervenção profilática) ou 2 h após a injeção de zymosan (intervenção terapêutica).

i. Intervenção profilática

a. Inibidores da síntese de prostaglandina E₂

I. Celecoxib: inibidor seletivo de COX-2, foi administrado nas doses de 3, 10 e 30 mg kg⁻¹ v.o.

II. Rofecoxib: inibidor seletivo de COX-2, foi administrado nas doses de 1 e 3 mg kg⁻¹ v.o.

b. Inibidor de síntese de leucotrienos B₄

I. MK-886: inibidor de lipooxigenase, foi administrado nas doses de 0.3 e 3 mg kg⁻¹ v.o.

c. Antagonista serotoninérgico

I. Metisergida: antagonista dos receptores da serotonina, foi administrado na dose de 0.5 mg kg⁻¹ i.p.

d. Antagonistas histaminérgicos

I. Mepiramina: antagonista dos receptores H₁ da histamina, foi administrado na dose de 6 mg kg⁻¹ i.p.

II. Cimetidina: antagonista dos receptores H_2 da histamina, foi administrado na dose de 50 mg kg^{-1} i.p.

e. Depletor de mastócitos

I. Composto 48/80: depletor de mastócitos, foi administrado no seguinte esquema: 0.6 mg kg^{-1} i.p. a cada 12 h durante 3 d; no 4^o d foi administrado 1.2 mg kg^{-1} i.p. a cada 12 h.

f. Inibidor de fosfodiesterase IV

I. Rolipram: inibidor de fosfodiesterase tipo IV, foi administrado nas doses de 3 e 9 mg kg^{-1} i.p.

g. Bloqueadores adrenérgicos

I. Guanetidina: depletor de reservas catecolaminérgicas, foi administrado na dose de 30 mg kg^{-1} i.p. durante 3 dias.

II. Propranolol: antagonista dos receptores β -adrenérgicos, foi administrado na dose de $100 \mu\text{mol kg}^{-1}$ s.c.

h. Inibidores da síntese de óxido nítrico

I. L-NAME: inibidor inespecífico de NOS, foi administrado nas doses de 0.1, 0.3 e 1 $\mu\text{mol i.art.}$

II. Aminoguanidina: inibidor específico de iNOS, foi administrada nas doses de 0.1, 0.3 e 1 $\mu\text{mol i.art.}$

III. 1400W: inibidor seletivo de iNOS, foi administrado nas doses de 0.5 e 1 mg kg^{-1} s.c. ou 0.01 $\mu\text{moles i.art.}$

i. Anticorpo antineutrófilos: foi administrado na dose de 32.5 ml kg^{-1} i.p.

ii. Intervenção terapêutica

a. Inibidores da síntese de prostaglandina E_2

I. Celecoxib: administrado na dose de 30 mg kg^{-1} v.o.

II. Rofecoxib: administrado na dose de 1 mg kg^{-1} v.o.

b. Inibidor de síntese de leucotrieno B_4

I. MK-886: administrado na dose de 3 mg kg^{-1} v.o.

c. Antagonista serotoninérgico

I. **Metisergida:** administrado na dose de 0.5 mg kg^{-1} i.p.

d. Antagonistas histaminérgicos

I. **Mepiramina:** administrado na dose na dose de 6 mg kg^{-1} i.p.

II. **Cimetidina:** administrado na dose de 50 mg kg^{-1} i.p.

e. Bloqueador adrenérgico

I. **Propranolol:** administrado na dose de $100 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$ s.c.

f. Inibidores da síntese de óxido nítrico

I. **L-NAME:** administrado nas doses de $0.3 \text{ } \mu\text{mol i.art.}$ ou 100 mg kg^{-1} i.p.

II. **Aminoguanidina:** administrado nas doses de $0.1 \text{ } \mu\text{mol i.art.}$ ou 100 mg kg^{-1} i.p.

III. **1400W:** administrado na doses de 1 mg kg^{-1} s.c. ou $0.01 \text{ } \mu\text{moles i.art.}$

g. Doador de óxido nítrico

I. **SIN-1**: doador não-enzimático de NO, foi administrado na dose de 10 ou 100 μg

i.art.

3.5. Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. Diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas utilizando ANOVA univariada seguido da aplicação do teste de Tukey. Valores com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy)

A injeção i.art. de 1 mg de zymosan induziu IA que foi dose e tempo dependente (Figura 1). O pico de IA foi observado entre a 3^a e 4^a h após indução da AZy. O tempo obtido para o grupo não-tratado (NT), que recebeu apenas solução salina 0.9% previamente à injeção i.art. de 1 mg de zymosan, foi de 37.2 ± 2.3 seg enquanto o grupo controle (C), que representa os animais sem artrite, foi de 10.7 ± 0.8 seg.

4.2. Influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy)

A administração de zymosan induz um aumento da migração de células para o foco inflamatório, que atinge o seu valor máximo por volta da 6^a h (Tabela 1). Os tipos celulares mais comuns são os neutrófilos ($\geq 80\%$), sendo $3.3 \pm 0.3 \times 10^3/\text{mm}^3$ células quando comparamos com o grupo controle, que é de $0.5 \pm 0.2 \times 10^3/\text{mm}^3$ células onde predominam as células mononucleares.

4.3. Efeito da administração de inibidores da síntese de prostaglandina E₂

i. Incapacitação articular

a. Intervenção profilática

I. Celecoxib

A administração profilática (PROF) v.o. de celecoxib, nas doses de 10 ou 30 mg kg⁻¹ (Figura 2), reduziu a IA, de forma significativa ($p < 0.05$) e dose dependente, para 15.8 ± 2.4 seg e 15.2 ± 1.6 seg sendo 34.4%, 57.5% e 59.2% menor em relação ao grupo NT para as respectivas doses.

II. Rofecoxib

A administração profilática (PROF) v.o. de rofecoxib, nas doses de 1 e 3 mg kg⁻¹ (Figura 2), reduziu a IA, de forma significativa ($p < 0.05$) e dose dependente, para 20.3±2.4 seg e 20±1.8 seg sendo 45.5% e 46% menor em relação ao grupo NT para as respectivas doses.

b. Intervenção terapêutica

I. Celecoxib

A administração v.o. de celecoxib 2 h após (TER) a indução da AZy, na dose de 30 mg kg⁻¹ v.o. (Figura 2), reduziu a IA, de forma significativa ($p < 0.05$), para 16.8±1.5 seg sendo 54.8% menor em relação ao grupo NT.

II. Rofecoxib

A administração v.o. de rofecoxib 2 h após (TER) a indução da AZy, na dose de 1 mg kg⁻¹ v.o. (Figura 2) reduziu a IA, de forma significativa ($p < 0.05$), para 19±2 seg sendo 48.9% menor em relação ao grupo NT.

ii. Influxo celular

a. Intervenção profilática

I. Celecoxib

A administração profilática (PROF) v.o. de celecoxib, nas doses de 3, 10 e 30 mg kg⁻¹ (Figura 3), não reduziu o IC ($p > 0.05$) quando comparado ao grupo NT.

II. Rofecoxib

A administração profilática (PROF) v.o. de rofecoxib, nas doses de 1 e 3 mg kg⁻¹ (Figura 3), não reduziu ($p>0.05$) o IC em relação ao grupo NT.

b. Intervenção terapêutica

I. Celecoxib

A administração de celecoxib 2 após (TER) a indução da AZy, na dose de 30 mg kg⁻¹ v.o. (Figura 3) reduziu o IC, de forma significativa ($p<0.05$), para $0.8\pm 0.1 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 75.8% menor em relação ao grupo NT.

II. Rofecoxib

A administração de rofecoxib 2 h após (TER) a indução da AZy, na dose de 1 mg kg⁻¹ v.o. (Figura 3) não reduziu ($p>0.05$) o IC em relação ao grupo NT.

4.4. Efeito da administração de inibidor da síntese de leucotrieno B₄

i. Incapacitação articular

a. Intervenção profilática

I. MK-886

A administração profilática (PROF) v.o. de MK-886, na dose de 3 mg kg⁻¹ (Figura 4), reduziu a IA, de forma significativa ($p<0.05$) e dose-dependente, para 19 ± 4.5 seg sendo 49% menor em relação ao grupo NT.

b. Intervenção terapêutica

I. MK-886

A administração v.o. de MK-886 2 h após (TER) a indução da AZy, na dose de 3 mg kg⁻¹ (Figura 4), não reduziu a IA ($p>0.05$) quando comparado ao grupo NT.

ii. Influxo celular

a. Intervenção profilática

I. MK-886

A administração profilática (PROF) v.o. de MK-886, na dose de 0.3 ou 3 mg kg⁻¹ (Figura 5), reduziu o IC, de forma significativa ($p<0.05$) e dose-dependente, para $1.9\pm 0.2 \times 10^3/\text{mm}^3$ células e $1.4\pm 0.2 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 42.4% e 57.6% menor em relação ao grupo NT, para as respectivas doses.

b. Intervenção terapêutica

I. MK-886

A administração de MK-886 2 h (TER) após a indução da AZy, na dose de 3 mg kg⁻¹ v.o. (Figura 5) reduziu o IC, de forma significativa ($p<0.05$), para $0.9\pm 0.4 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 72.7% menor em relação ao grupo NT.

iii. Efeito da administração de MK-886 sobre o conteúdo sinovial de leucotrieno B₄ na artrite induzida por zymosan em ratos

A administração de MK-886, na dose de 3 mg kg⁻¹ reduziu o conteúdo de leucotrieno B₄ no exsudato articular da artrite induzida por zymosan em ratos (Tabela 2).

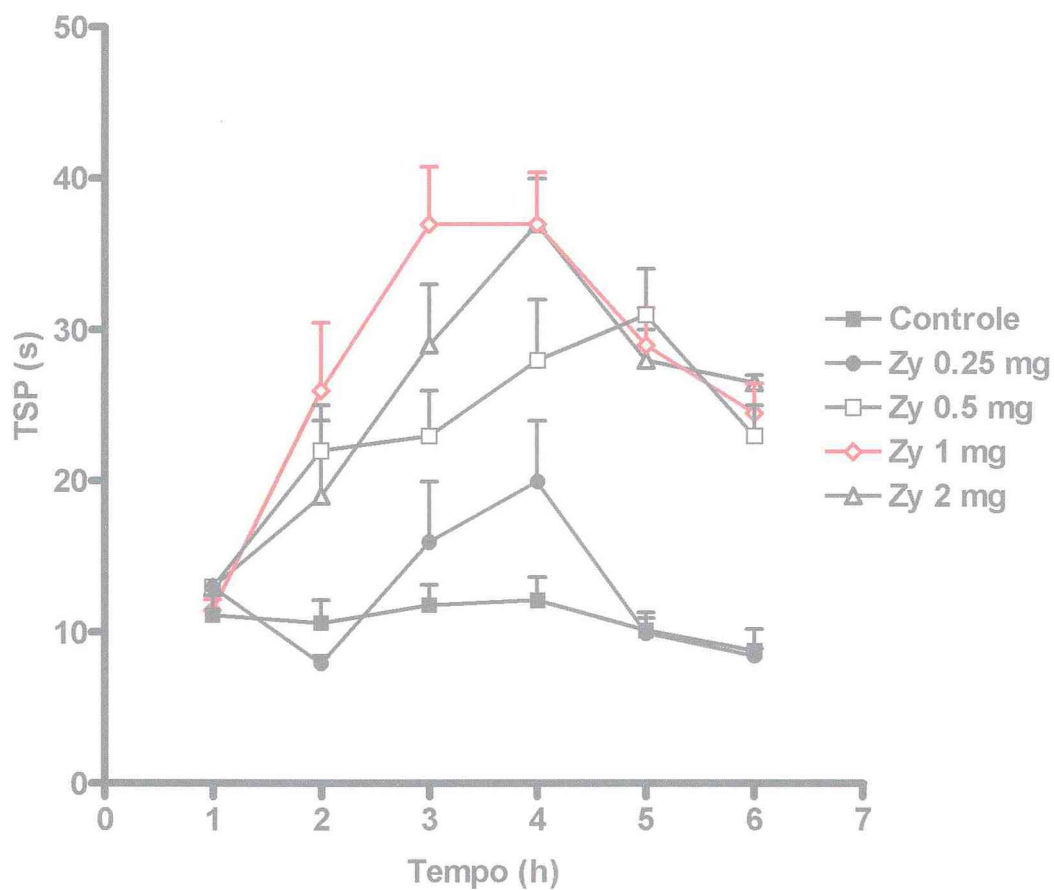


Figura 1. Efeito dose e tempo dependente sobre a incapacitação articular (IA) em ratos submetidos à artrite experimental induzida por zymosan em ratos. A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan nas doses de 0.25, 0.5, 1 ou 2 mg no joelho direito e a IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos, representado no gráfico. O grupo controle representa os animais sem artrite. Os dados representam a média \pm epm (n=6).

Tabela 1. Avaliação do influxo celular na artrite induzida por zymosan em ratos**Curso temporal**

	Leucócitos x 10 ³ /mm ³		
	2 ^a hora	4 ^a hora	6 ^a hora
Controle	0.12±0.7	0.11±0.8	0.13±0.5
Não-tratado	1.6±1.2	1.7±1.8*	9.2±4.6*

A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg na articulação do joelho direito dos animais (Não-tratado). O grupo controle recebeu solução salina 0.9% i.art. A contagem do número total de células no exsudato sinovial foi feita, após coloração em corante de Turk, em câmara de Neubauer, na 2^a, 4^a e 6^a h após a administração do estímulo. Os dados representam a média±DP (n=6). **p*<0.01 em relação ao grupo controle (ANOVA).

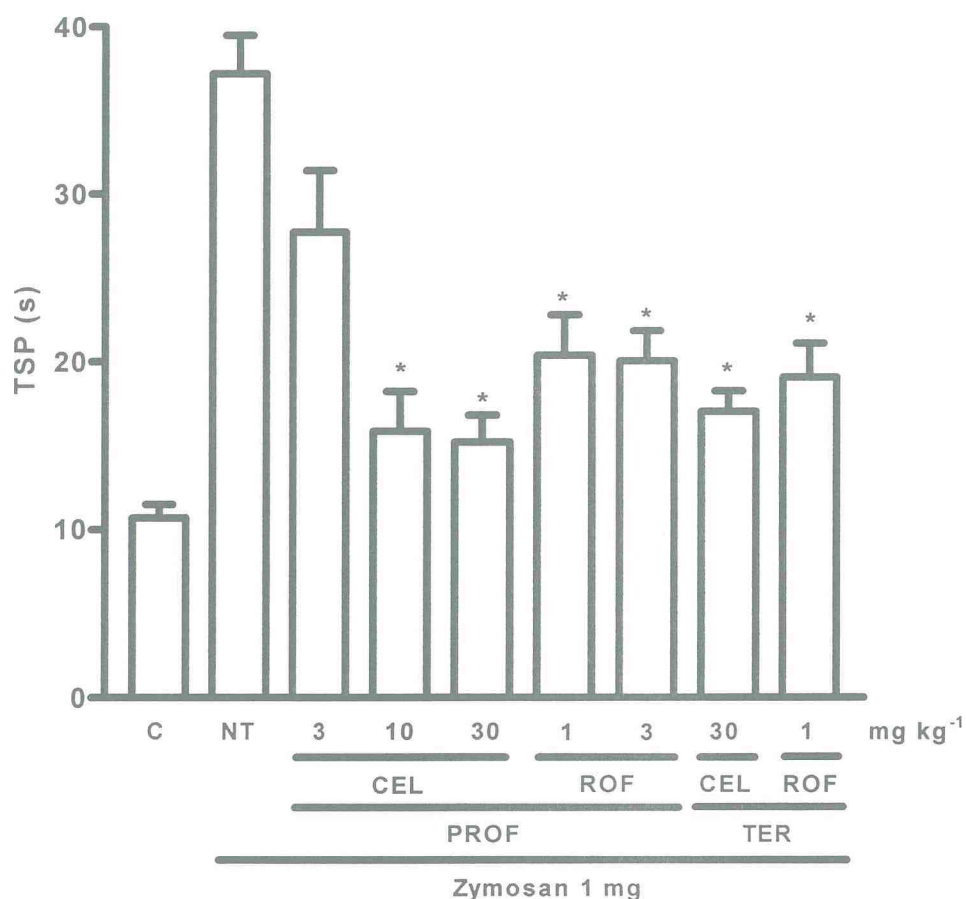


Figura 2. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) oral de celecoxib (CEL) ou rofecoxib (ROF) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. CEL foi administrado nas doses de 3, 10 ou 30 mg kg⁻¹ e rofecoxib foi administrado nas doses de 1 ou 3 mg kg⁻¹, antes da indução da AZy (PROF). CEL 30 mg kg⁻¹ ou ROF 1 mg kg⁻¹ foram administrados 2 h após a indução da AZy (TER). A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3^a e 4^a h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). **p*<0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

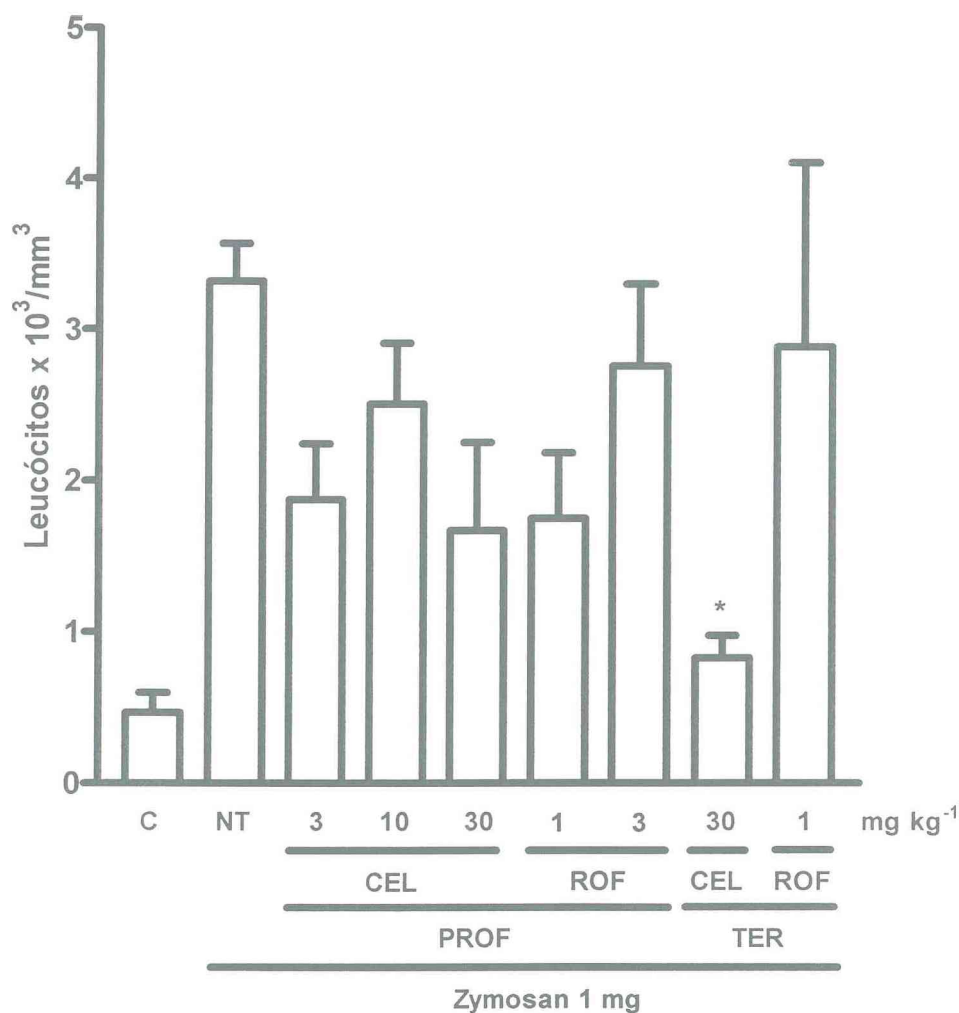


Figura 3. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) oral de celecoxib (CEL) ou rofecoxib (ROF) sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. CEL foi administrado nas doses de 3, 10 ou 30 mg kg⁻¹ e rofecoxib foi administrado nas doses de 1 ou 3 mg kg⁻¹, antes da indução da AZy (PROF). CEL 30 mg kg⁻¹ ou ROF 1 mg kg⁻¹ foram administrados 2 h após a indução da AZy (TER) O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6).

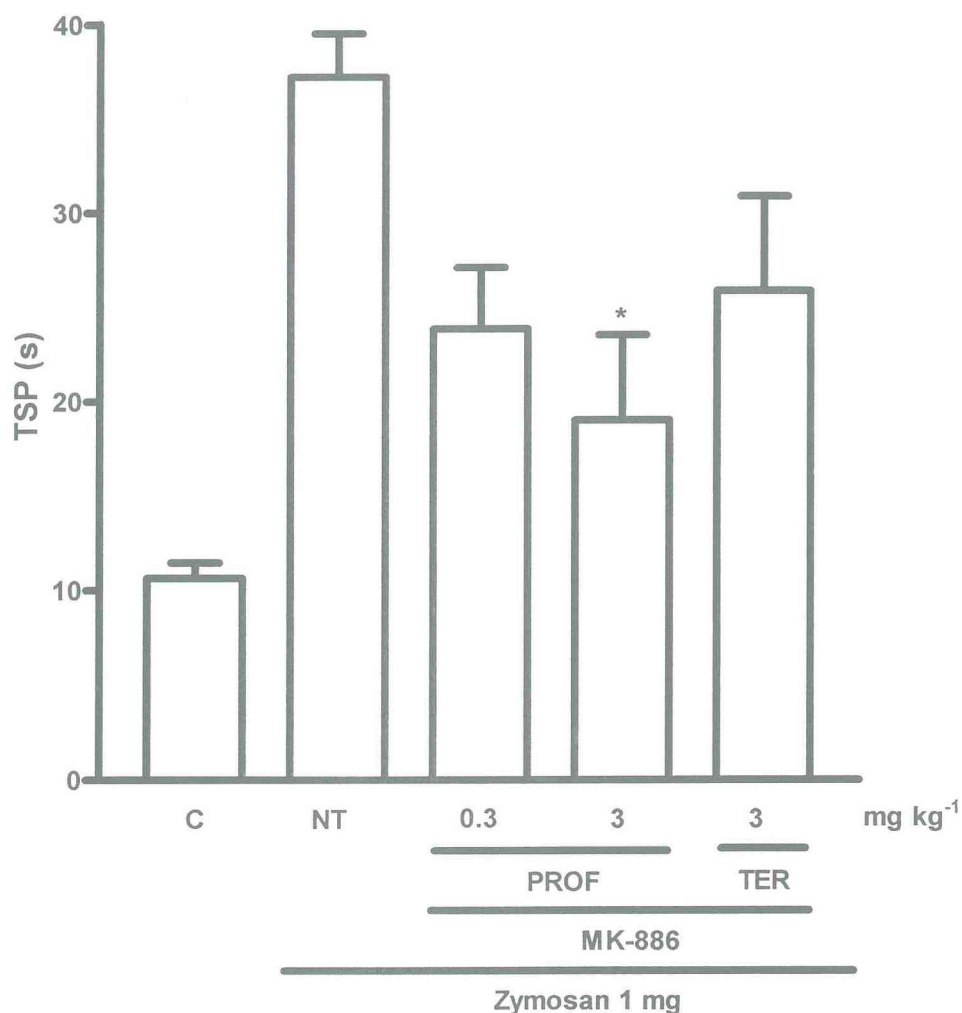


Figura 4. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) oral de MK-886 sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. MK-886 foi administrado nas doses de 0.3 ou 3 mg kg⁻¹ v.o. antes da indução da AZy (PROF) ou na dose de 3 mg kg⁻¹ v.o., 2 h após a indução da AZy (TER). A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3^a e 4^a h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). **p*<0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

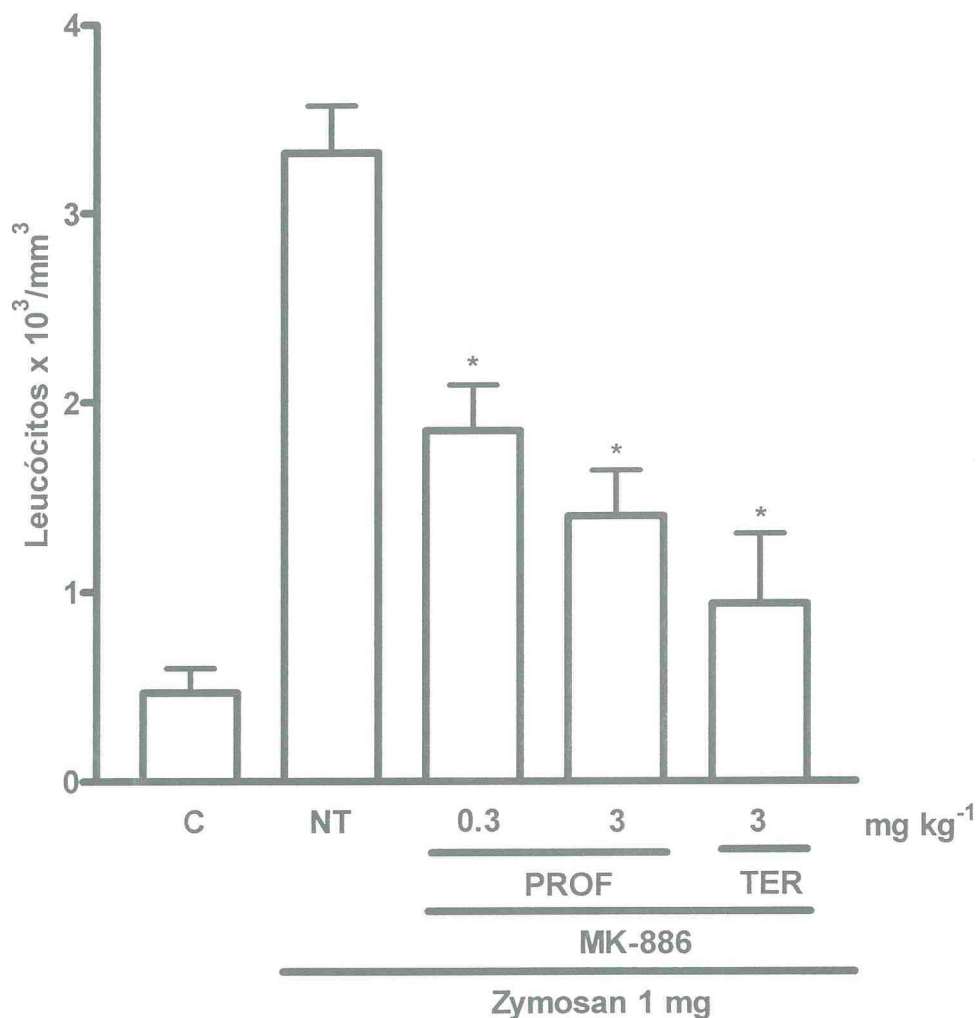


Figura 5. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) oral de MK-886 sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. MK-886 foi administrado nas doses de 0.3 ou 3 mg kg⁻¹ v.o. antes da indução da AZy (PROF) ou na dose de 3 mg kg⁻¹ v.o., 2 h após a indução da AZy (TER). O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média ± epm (n=6). **p*<0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

Tabela 2. Efeito da administração de MK-886 sobre o conteúdo de leucotrieno B₄ no exsudato sinovial na artrite induzida por zymosan em ratos

	Média (pg/ml)	EPM
Controle	- 2	-
Não-tratado	200	±14.7
MK-886 3 mg kg ⁻¹	158*	±7.75

A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg na articulação do joelho direito dos animais. O grupo controle representa animais sem artrite. O lavado articular foi coletado na 6^a h para determinação do conteúdo de leucotrieno B₄, realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando *kits* obtidos comercialmente. Os dados representam a média±EPM (n=6). * $p < 0.01$ em relação ao grupo não-tratado (ANOVA).

4.5. Efeito da administração de antagonista da serotonina

i. Incapacitação articular

a. Intervenção profilática

I. Metisergida

A administração profilática (PROF) i.p. de metisergida, na dose de 0.5 mg kg^{-1} (Figura 6), reduziu a IA, de forma significativa ($p < 0.05$), para 23.4 ± 3.2 seg sendo 37.1% menor em relação ao grupo NT.

b. Intervenção terapêutica

I. Metisergida

A administração de metisergida 2 h após (TER) a indução da AZy, na dose de 0.5 mg kg^{-1} i.p. (Figura 6) reduziu a IA, de forma significativa ($p < 0.05$), para 22 ± 2.8 seg sendo 40.9% menor em relação ao grupo NT.

ii. Influxo celular

a. Intervenção profilática

I. Metisergida

A administração profilática (PROF) i.p. de metisergida, na dose de 0.5 mg kg^{-1} (Figura 7), reduziu o IC, de forma significativa ($p < 0.05$), para $1.6 \pm 0.5 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 51.6% menor em relação ao grupo NT.

b. Intervenção terapêutica

I. Metisergida

A administração de metisergida 2 h após (TER) a indução da AZy, na dose de 0.5 mg kg⁻¹ i.p. (Figura 7), não reduziu ($p>0.05$) o IC em relação ao grupo NT.

4.6. Efeito da administração de antagonistas da histamina

i. Incapacitação articular

a. Intervenção profilática

I. Mepiramina

A administração profilática i.p. de mepiramina, na dose de 6 mg kg⁻¹ (Figura 8), não reduziu a IA ($p>0.05$) em relação ao grupo NT.

II. Cimetidina

A administração profilática i.p. de cimetidina, na dose de 50 mg kg⁻¹ (Figura 8), não reduziu a IA ($p<0.05$) em relação ao grupo NT.

ii. Influxo celular

a. Intervenção profilática

I. Mepiramina

A administração profilática i.p. de mepiramina, na dose de 6 mg kg⁻¹ (Figura 9), não reduziu ($p>0.05$) o IC em relação ao grupo NT.

II. Cimetidina

A administração profilática i.p. de cimetidina, na dose de 50 mg kg^{-1} (Figura 9), não reduziu ($p>0.05$) o IC em relação ao grupo NT.

4.7. Efeito da administração de depletor de mastócitos

i. Incapacitação articular

a. Intervenção profilática

I. Composto 48/80

A administração profilática i.p. do composto 48/80, na dose de 0.6 mg kg^{-1} a cada 12 h durante 3 d seguida de mais 1.2 mg kg^{-1} a cada 12 h no 4^o d (Figura 10), reduziu a IA, de forma significativa ($p<0.05$), para 20.9 ± 1.2 seg sendo 43.8% menor em relação ao grupo NT.

ii. Influxo celular

a. Intervenção profilática

I. Composto 48/80

A administração profilática i.p. do composto 48/80, na dose de 0.6 mg kg^{-1} a cada 12 h durante 3 d seguida de mais 1.2 mg kg^{-1} a cada 12 h no 4^o d (Figura 11), não reduziu ($p>0.05$) o IC em relação ao grupo NT.

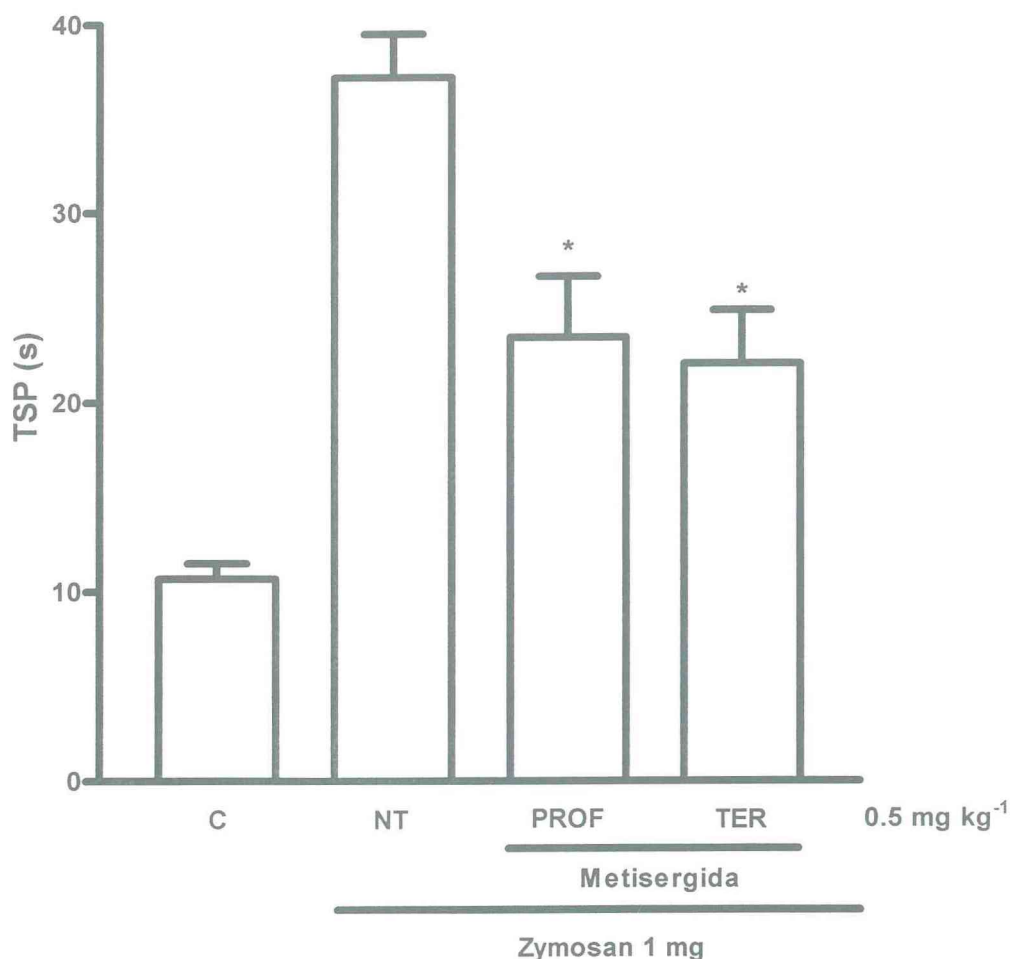


Figura 6. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) sistêmica de metisergida sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. Metisergida foi administrada na dose de 0.5 mg kg^{-1} i.p. antes (PROF) ou 2 h após a indução da AZy (TER). A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3^a e 4^a h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0.05$ em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

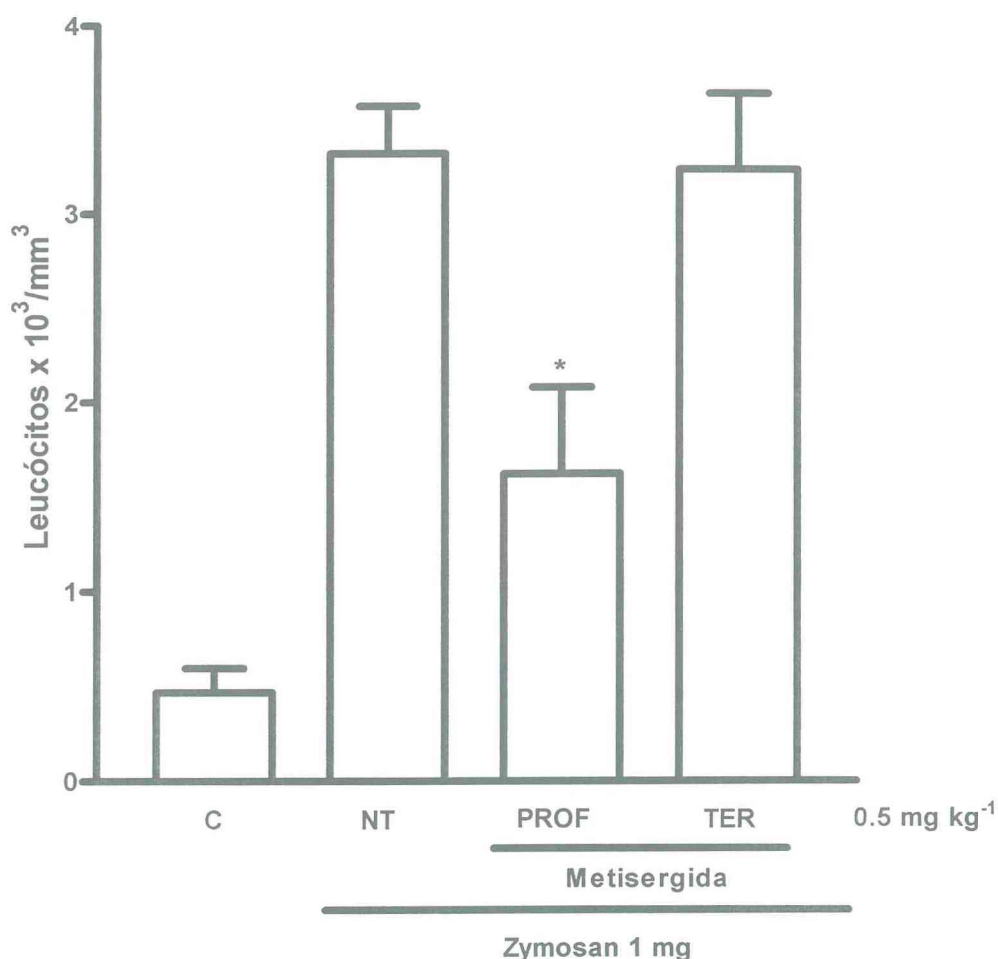


Figura 7. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) sistêmica de metisergida sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. Metisergida foi administrada na dose de 0.5 mg kg⁻¹ i.p. antes (PROF) ou 2 h após a indução da AZy (TER). O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). **p*<0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

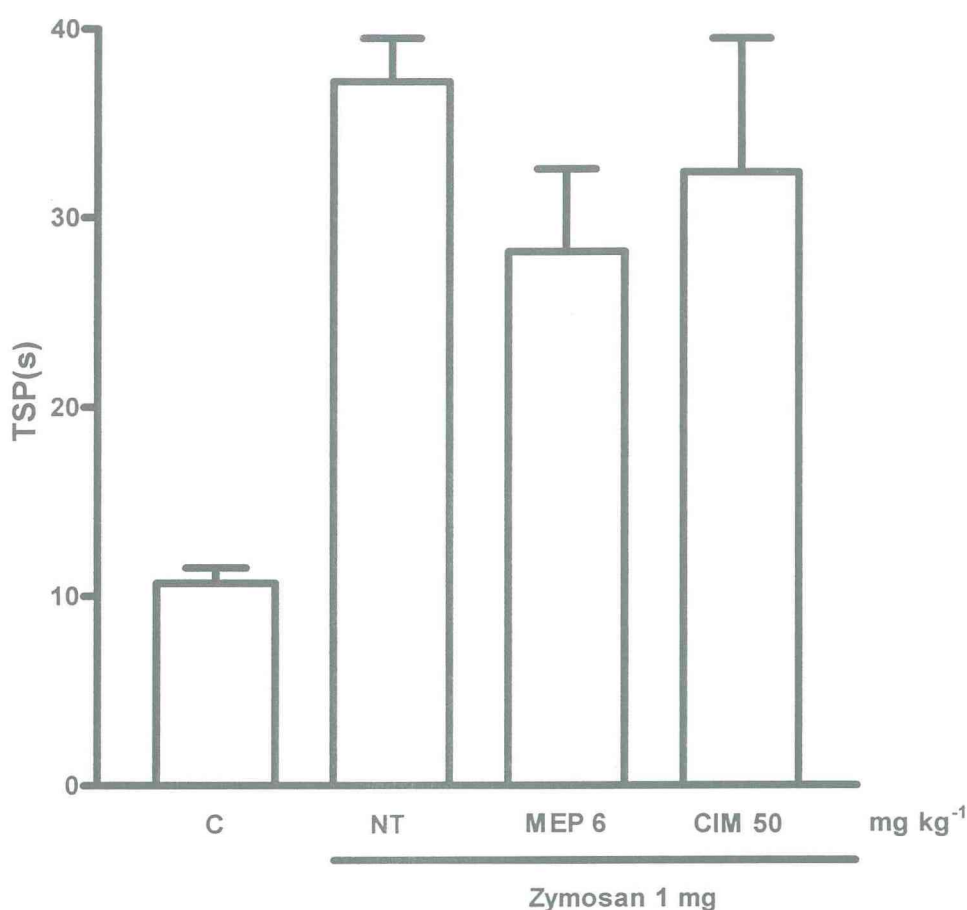


Figura 8. Efeito da administração profilática sistêmica de mepiramina (MEP) ou cimetidina (CIM) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. MEP foi administrada na dose de 6 mg kg⁻¹ i.p. e a CIM foi administrada na dose de 50 mg kg⁻¹ i.p., ambos antes da indução da AZy. A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3^a e 4^a h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). NT = grupo de animais sem tratamento.

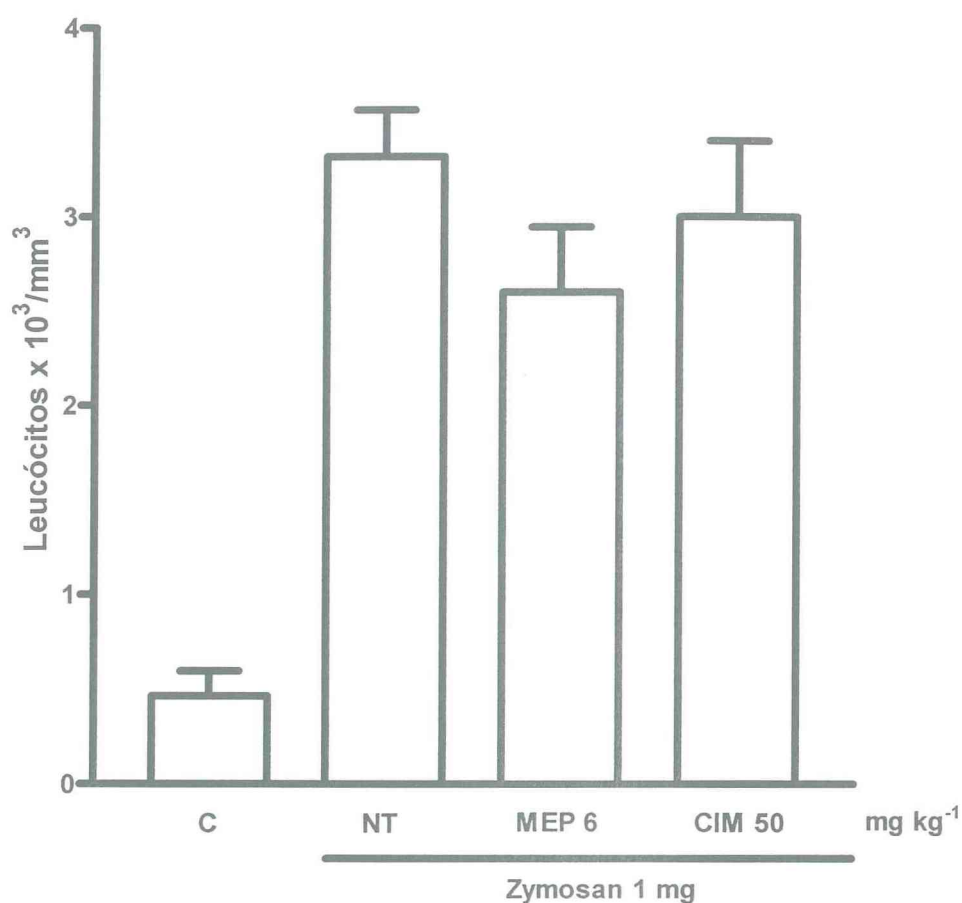


Figura 9. Efeito da administração profilática sistêmica de mepiramina (MEP) ou cimetidina (CIM) sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. MEP foi administrada na dose de 6 mg kg⁻¹ i.p. e a CIM foi administrada na dose de 50 mg kg⁻¹ i.p., ambas antes da indução da AZy. O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média ± epm (n=6). NT= grupo de animais sem tratamento

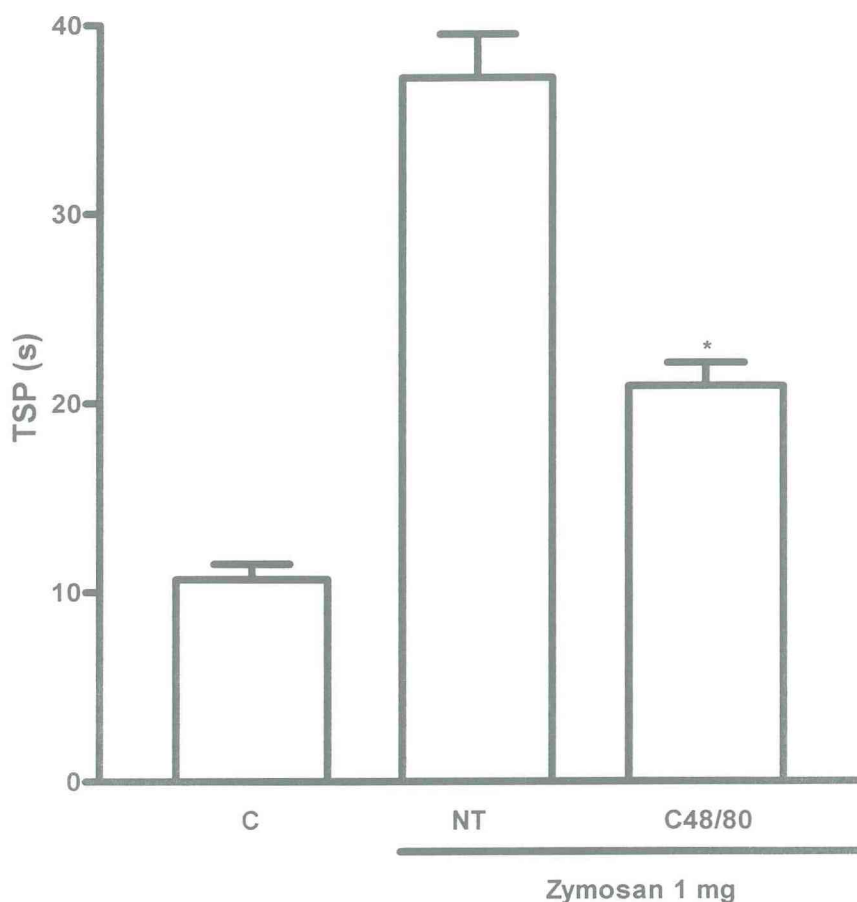


Figura 10. Efeito da administração profilática sistêmica do composto 48/80 (C48/80) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. C48/80 foi administrado antes da indução da AZy, na dose de 0.6 mg kg^{-1} i.p. a cada 12 h durante 3 d complementado com dose adicional de 1.2 mg kg^{-1} i.p. a cada 12 h no 4^o d. A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3^a e 4^a h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média \pm epm (n=6).

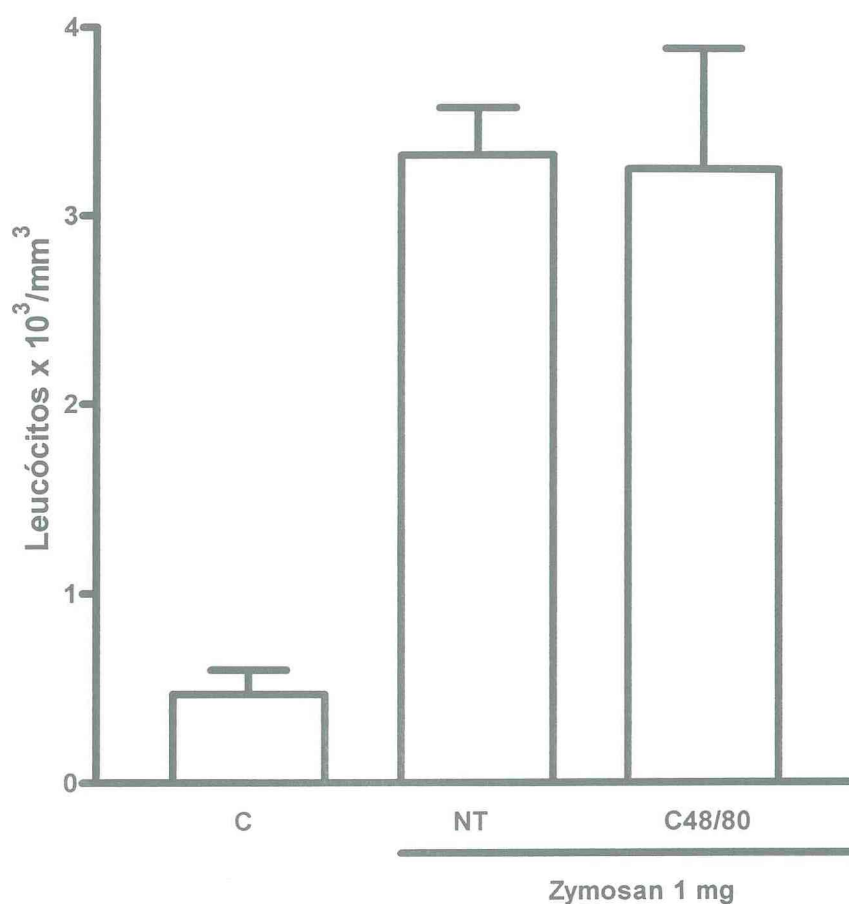


Figura 11. Efeito da administração profilática sistêmica do composto 48/80 (C48/80) sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. C48/80 foi administrado antes da indução da AZy, na dose de 0.6 mg kg^{-1} i.p. a cada 12 h durante 3 d complementado com dose adicional de 1.2 mg kg^{-1} i.p. a cada 12 h no 4^o d. O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média \pm epm (n=6). NT = grupo de animais sem tratamento.

4.8. Efeito da administração de inibidor de fosfodiesterase IV

i. Incapacitação articular

a. Intervenção profilática

I. Rolipram

A administração profilática i.p. de rolipram, na dose de 3 e 9 mg kg⁻¹ (Figura 12), reduziu a IA, de forma significativa ($p < 0.05$), para 20±5.2 seg e 20.4±4.5 seg sendo 44.9% e 45.2% menor em relação ao grupo NT para as doses respectivas.

ii. Influxo celular

a. Intervenção profilática

I. Rolipram

A administração profilática i.p. de rolipram, na dose de 9 mg kg⁻¹ (Figura 13), reduziu o IC, de forma significativa ($p < 0.05$) e dose-dependente, para 1±0.6 x 10³/mm³ células sendo 69.7% menor em relação ao grupo NT.

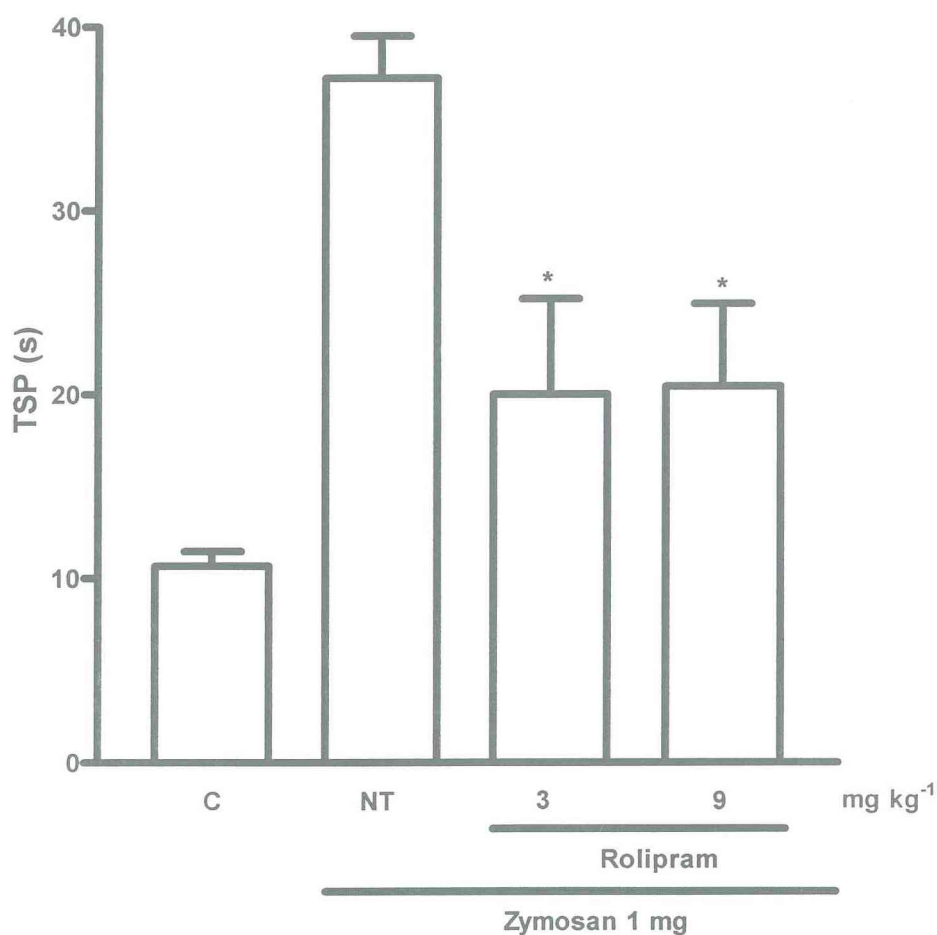


Figura 12. Efeito da administração profilática sistêmica de rolipram sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. Rolipram foi administrado antes da indução da AZy, na dose de 3 ou 9 mg kg⁻¹ i.p. A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3^a e 4^a h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). **p*<0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

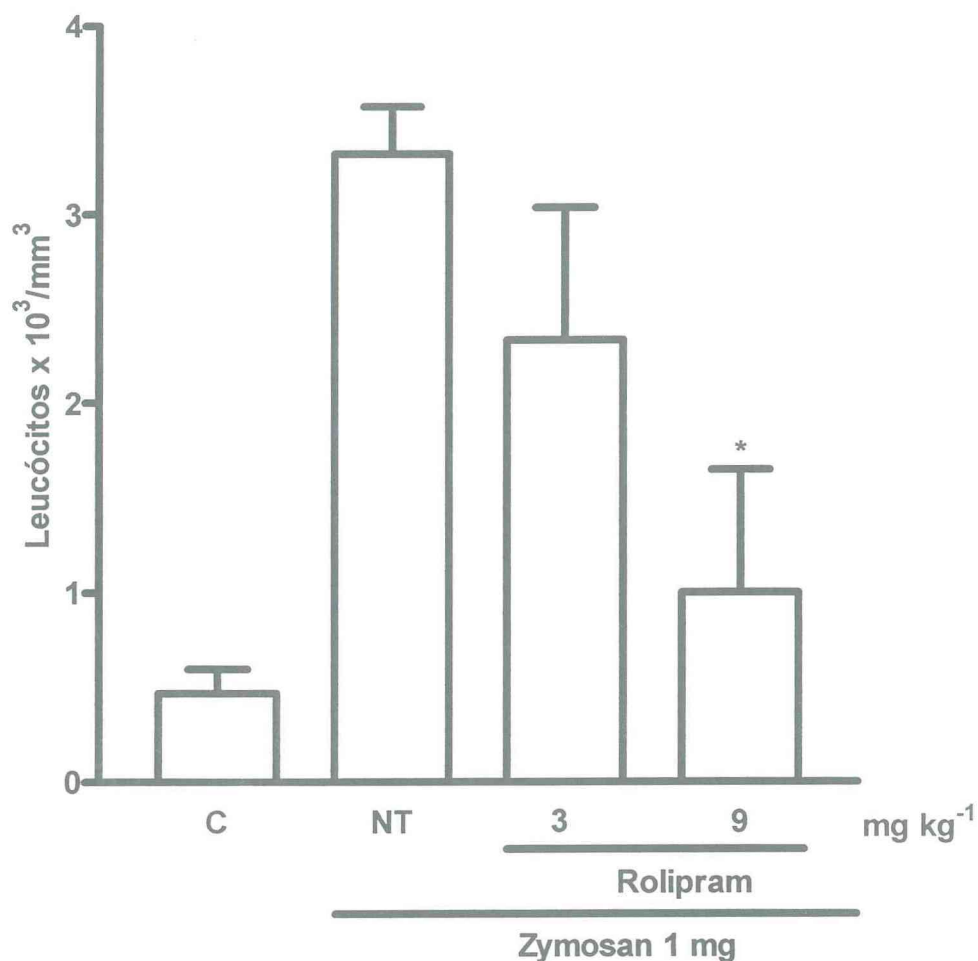


Figura 13. Efeito da administração profilática sistêmica de rolapram sobre o influxo celular na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. Rolapram foi administrado antes da indução da AZy, na dose de 3 ou 9 mg kg⁻¹ i.p. O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). **p*<0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

4.9. Efeito da administração de bloqueadores adrenérgicos

i. Incapacitação articular

a. Intervenção profilática

I. Guanetidina

A administração profilática i.p. de guanetidina, na dose de 30 mg kg^{-1} durante 3 d (Figura 14), reduziu a IA, de forma significativa ($p < 0.05$), para 20.3 ± 2.7 seg sendo 45.4% menor em relação ao grupo NT.

II. Propranolol

A administração profilática (PROF) s.c. de propranolol, na dose de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 15), reduziu a IA, de forma significativa ($p < 0.05$), para 25.8 ± 4.6 seg sendo 30.6% menor ao relação ao grupo NT.

b. Intervenção terapêutica

I. Propranolol

A administração de propranolol 2 h após (TER) a indução da AZy, na dose de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ s.c. (Figura 15) reduziu a IA, de forma significativa ($p < 0.05$), para 18.4 ± 1.5 seg sendo 50.6% menor em relação ao grupo NT.

ii. Influxo celular

a. Intervenção profilática

I. Guanetidina

A administração profilática i.p. de guanetidina, na dose de 30 mg kg^{-1} durante 3 d (Figura 16), reduziu o IC, de forma significativa ($p < 0.05$), para $1.8 \pm 0.1 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 45.4% menor em relação ao grupo NT.

II. Propranolol

A administração profilática (PROF) s.c. de propranolol, na dose de $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 17), reduziu o IC, de forma significativa ($p < 0.05$), para $2.1 \pm 0.2 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 36.4% menor em relação ao grupo NT.

b. Intervenção terapêutica

I. Propranolol

A administração de propranolol 2 h após (TER) a indução da AZy, na dose de $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ s.c. (Figura 17), reduziu o IC, de forma significativa ($p < 0.05$), para $1 \pm 0.3 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 69.7% em relação ao grupo NT.

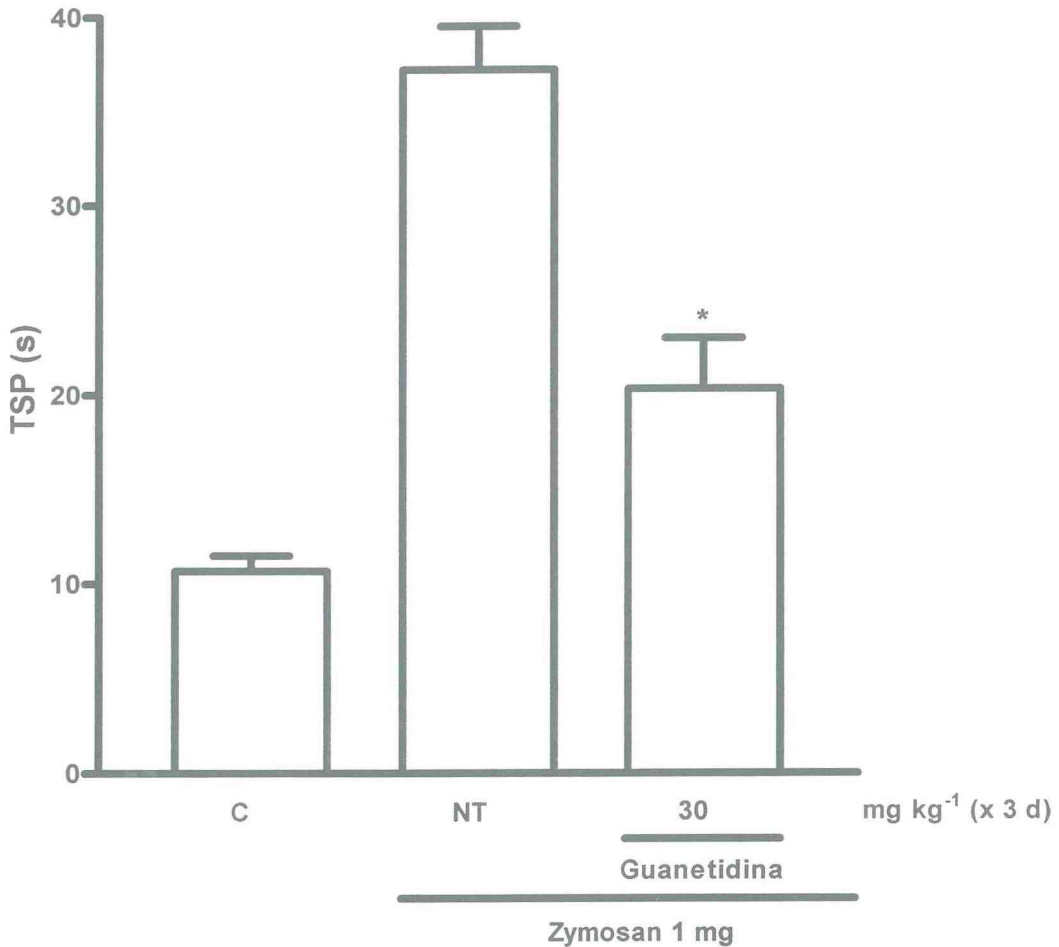


Figura 14. Efeito da administração profilática sistêmica de guanetidina sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. Guanetidina foi administrada antes da indução da AZy, na dose de 30 mg kg⁻¹ durante 3 d i.p. A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3^a e 4^a h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). **p*<0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

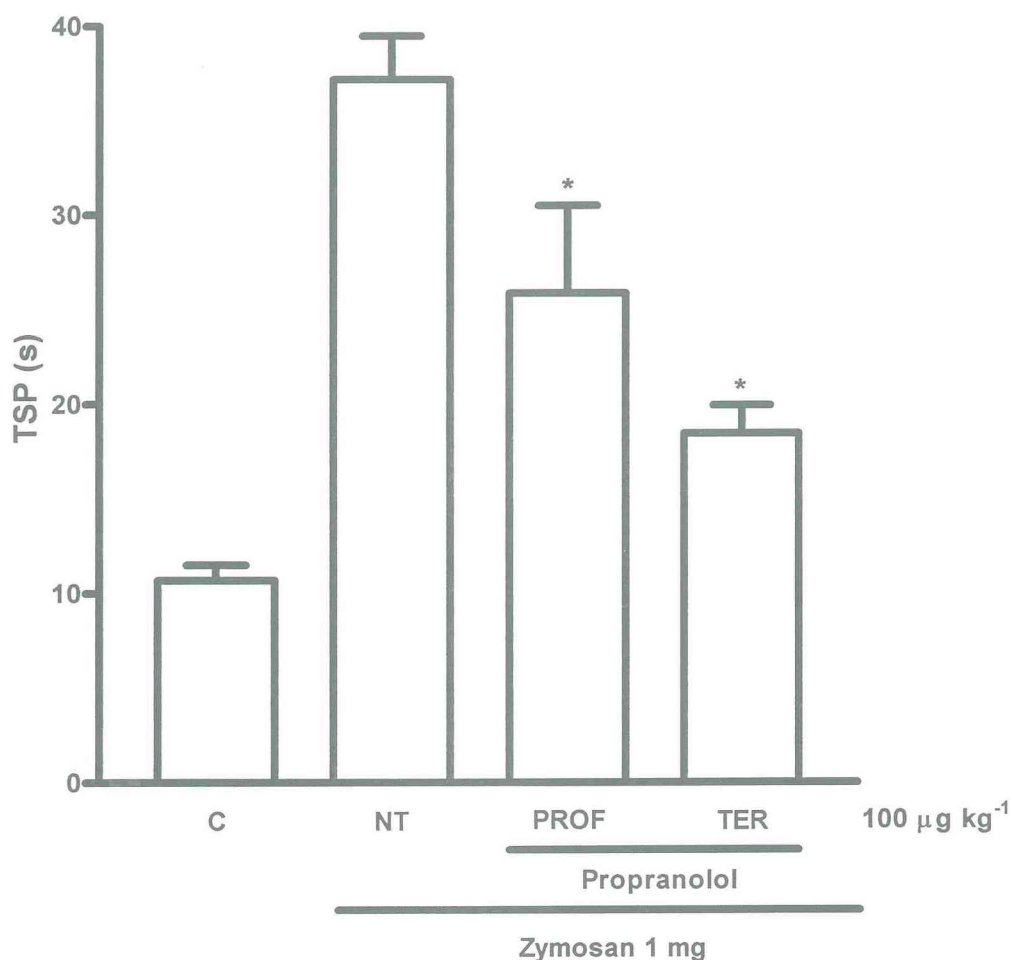


Figura 15. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) sistêmica de propranolol sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. Propranolol foi administrado na dose de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ s.c. antes (PROF) ou 2 h após a indução da AZy (TER). A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3^a e 4^a h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0.05$ em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

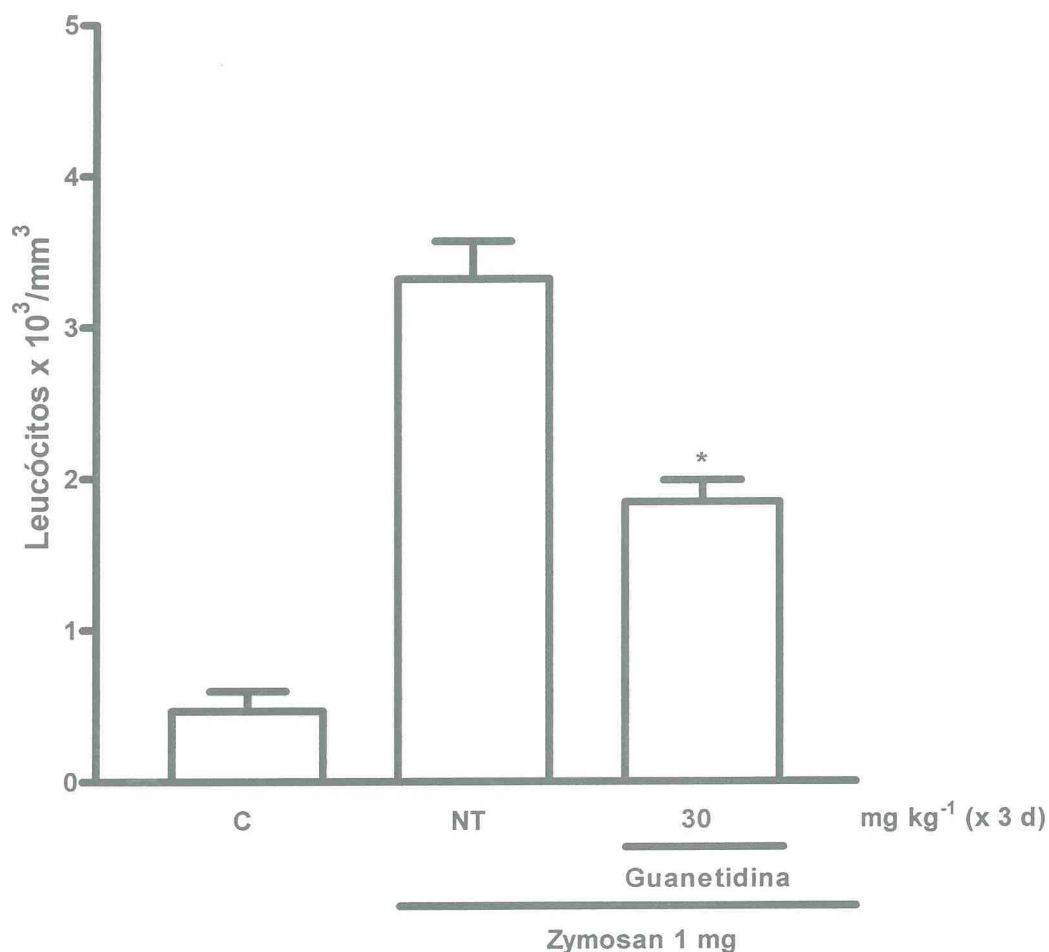


Figura 16. Efeito da administração profilática sistêmica de guanetidina sobre o influxo celular na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. Guanetidina foi administrada antes da indução da AZy, na dose de 30 mg kg⁻¹ durante 3 d i.p. O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). **p*<0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

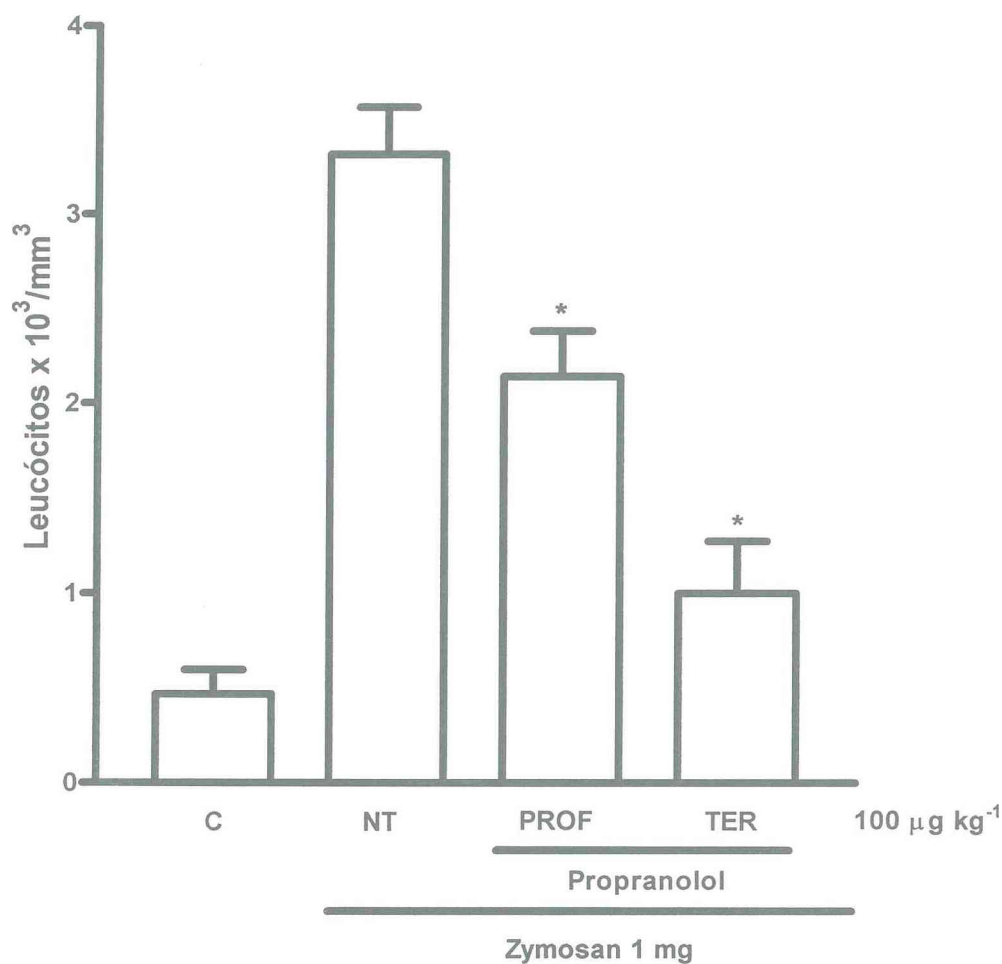


Figura 17. Efeito da administração profilática (PROF) ou terapêutica (TER) sistêmica de propranolol sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. Propranolol foi administrado na dose de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ s.c. antes (PROF) ou 2 h após (TER) a indução da AZy. O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * $p < 0.05$ em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

4.10. Efeito da administração de inibidores da síntese de óxido nítrico

i. Incapacitação articular

a. Intervenção profilática

I. 1400W

A administração profilática s.c. de 1400W, nas doses de 0.5 e 1 mg kg⁻¹ (Figura 18), reduziu a IA, de forma significativa e dose-dependente ($p < 0.05$), para 21.4±3.7 seg e 14.6±1.1 seg sendo 42.5% e 60.8% menor em relação ao grupo NT para as respectivas doses. Similarmente, a administração profilática i.art., na dose de 0.01 μmol (Figura 19), reduziu a IA, de forma significativa ($p < 0.05$), para 16±1 seg sendo 56.7% menor em relação ao grupo NT.

II. L-NAME

A administração profilática i.art. de L-NAME, nas doses de 0.3 e 1 μmol (Figura 19), reduziu a IA, de forma significativa e dose dependente ($p < 0.05$), para 20.5±2 e 19.2±1.6 seg sendo 44.9% e 48.4% menor em relação ao grupo NT para as respectivas doses.

III. Aminoguanidina

A administração profilática i.art. de aminoguanidina, nas doses de 0.1, 0.3 e 1 μmol (Figura 19), reduziu a IA, de forma significativa e dose-dependente ($p < 0.05$), para 20.5±1.5 seg, 15.3±1 seg e 20.5±1.8 seg sendo 44.9%, 58.9% e 44.9% menor em relação ao grupo NT para as respectivas doses.

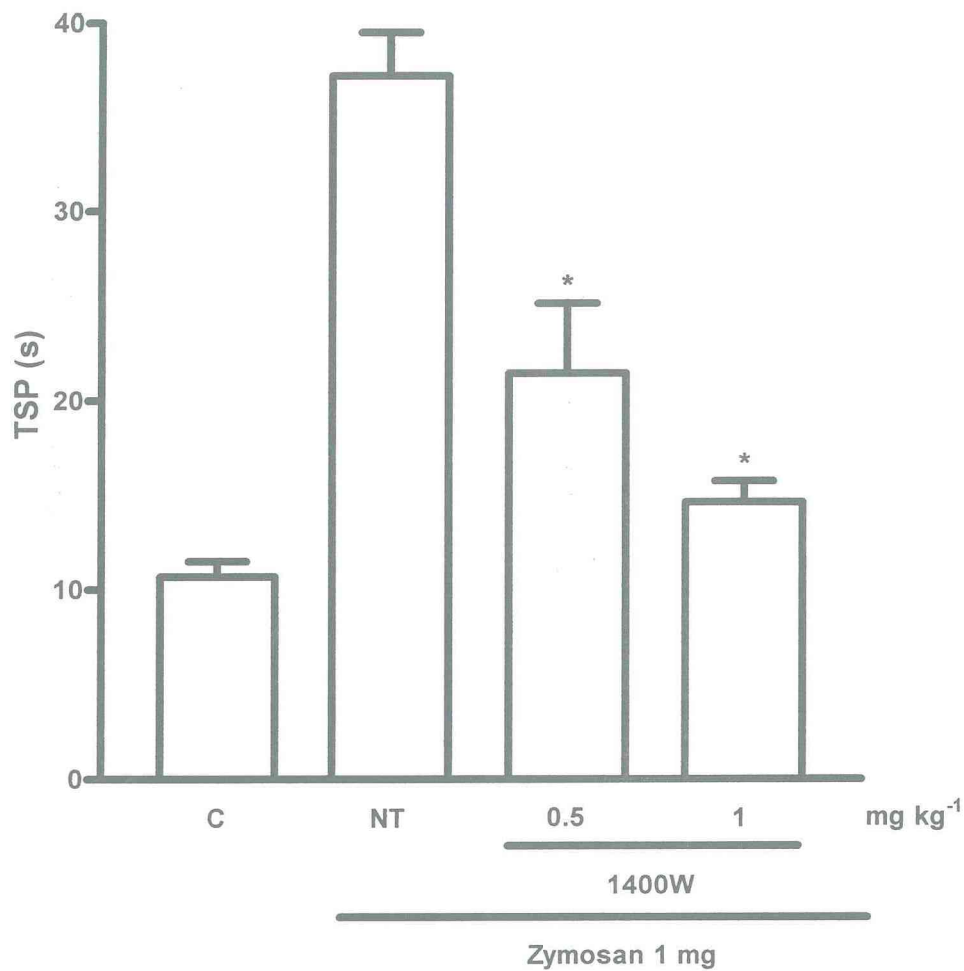


Figura 18. Efeito dose-dependente da administração profilática sistêmica de 1400W sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. 1400W foi administrado na dose de 0.5 e 1 mg kg⁻¹ antes da indução da AZy. A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3^a e 4^a h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). **p*<0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

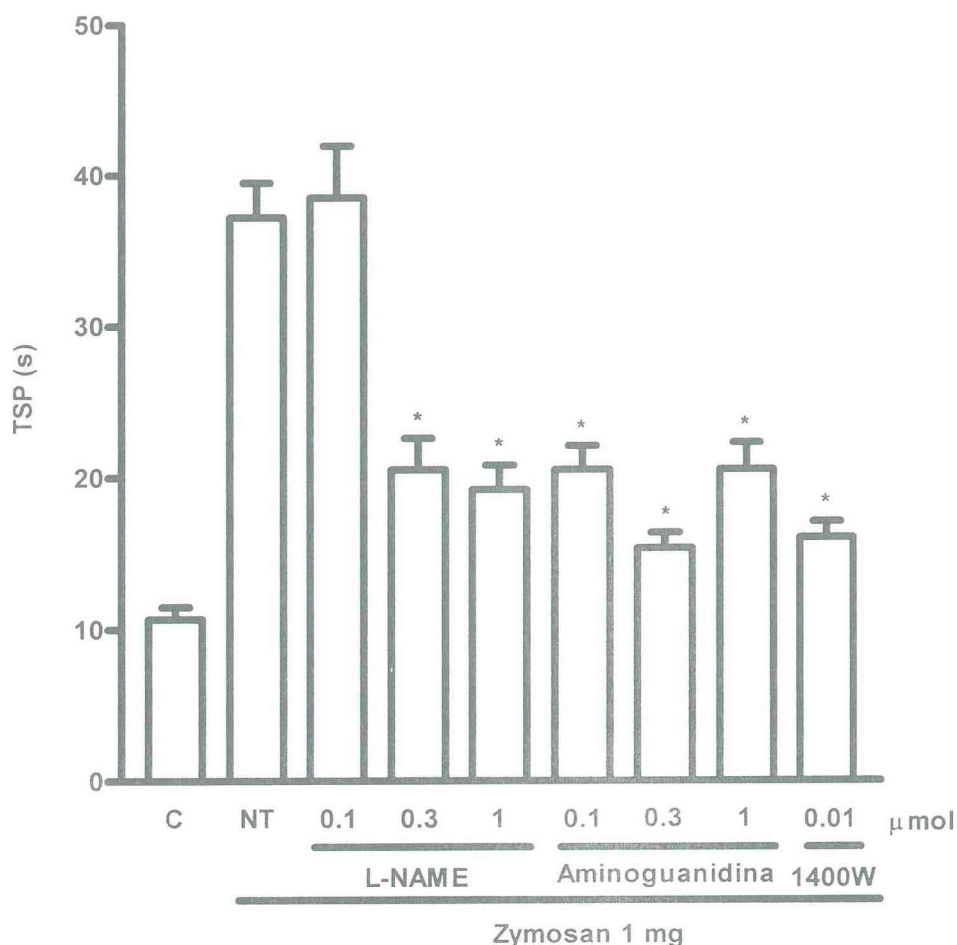


Figura 19. Efeito da administração profilática local de L-NAME, aminoguanidina ou 1400W sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. L-NAME ou AG foi administrado nas doses de 0.1, 0.3 ou 1 μmol i.art. enquanto 1400W foi administrado na dose de 0.01 μmol i.art., antes da indução da AZy. A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3^a e 4^a h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média ± epm (n=6). * $p < 0.05$ em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

b. Intervenção terapêutica

I. 1400W

A administração de 1400W 2 h após a indução da AZy, nas doses de 0.01 μmol i.art. (Figura 20) ou 1 mg kg^{-1} i.p. (Figura 21), não reduziu ($p < 0.05$) a IA quando comparado ao grupo NT.

II. L-NAME

A administração de L-NAME 2 h após a indução da AZy, nas doses de 0.3 μmol i.art. (Figura 20) ou 100 mg kg^{-1} i.p. (Figura 21), não reduziu ($p < 0.05$) a IA quando comparado ao grupo NT.

III. Aminoguanidina

A administração de aminoguanidina 2 h após a indução da AZy, nas doses de 0.1 μmol i.art. (Figura 20) ou 100 mg kg^{-1} i.p. (Figura 21), não reduziu ($p < 0.05$) a IA quando comparado ao grupo NT.

ii. Influxo celular

a. Intervenção profilática

I. 1400W

A administração profilática s.c. de 1400W, nas doses de 0.5 ou 1 mg kg^{-1} (Figura 22) reduziu o IC, de forma significativa ($p < 0.05$) e dose-dependente, para $1.3 \pm 0.4 \times 10^3/\text{mm}^3$ células e $0.8 \pm 0.2 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 60.6% e 75.8% menor em relação ao grupo NT, para as respectivas doses. Similarmente, a administração profilática i.art., na dose de 0.01 μmol (Figura 23), também reduziu o IC, de forma

significativa ($p<0.05$), para $1.5\pm 0.4 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 54.5% menor em relação ao grupo NT.

II. L-NAME

A administração profilática i.art. de L-NAME, nas doses de 0.3 ou 1 μmol (Figura 23), reduziu o IC, de forma significativa ($p<0.05$), para $1.1\pm 0.2 \times 10^3/\text{mm}^3$ células e $1.6\pm 0.3 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 66.7% e 51.6% menor em relação ao grupo NT, para as respectivas doses.

III. Aminoguanidina

A administração profilática i.art. de aminoguanidina, nas doses de 0.1, 0.3 ou 1 μmol (Figura 23), reduziu o IC, de forma significativa ($p<0.05$), para $1.4\pm 0.3 \times 10^3/\text{mm}^3$ células, $1.2\pm 0.3 \times 10^3/\text{mm}^3$ células e $1.4\pm 0.3 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 57.6%, 63.6% e 57.6% menor em relação ao grupo NT, para as respectivas doses.

b. Intervenção terapêutica

I. 1400W

A administração de 1400W 2 h após a indução da AZy, na dose de 0.01 μmol i.art. (Figura 24) ou 1 mg kg^{-1} s.c. (Figura 25) reduziu o IC, de forma significativa ($p<0.05$), para $0.4\pm 0.2 \times 10^3/\text{mm}^3$ células e $0.7\pm 0.1 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 87.9% e 78.8% menor em relação ao grupo NT para as respectivas doses.

II. L-NAME

A administração de L-NAME 2 h após a indução da AZy, na dose de $0.3 \mu\text{mol}$ i.art. (Figura 24) reduziu o IC, de forma significativa ($p < 0.05$), para $1.1 \pm 0.4 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 66.7% menor em relação ao grupo NT. A dose de 100 mg kg^{-1} i.p. (Figura 25) não reduziu ($p > 0.05$) o IC em relação ao grupo NT.

III. Aminoguanidina

A administração de aminoguanidina 2 h após a indução da AZy, na dose de $0.1 \mu\text{mol}$ i.art. (Figura 24) reduziu o IC, de forma significativa ($p < 0.05$), para $1.3 \pm 0.6 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 60.6% menor em relação ao grupo NT. A dose de 100 mg kg^{-1} i.p. (Figura 25) não reduziu ($p > 0.05$) o IC em relação ao grupo NT.

iii. Efeito do tratamento com inibidores da óxido nítrico sintase sobre a produção de óxido nítrico articular na artrite induzida por zymosan em ratos

a. Curso temporal dos níveis de nitrito/nitrato no exsudato articular na artrite induzida por zymosan em ratos

O curso temporal da liberação de nitrito no exsudato sinovial na AZy é mostrado na figura 26A. A liberação inicia-se na primeira hora após a injeção de zymosan e atinge valores máximos por volta da 6^a h após a administração do estímulo inflamatório. Nos animais em que foi administrada apenas solução salina 0.9%, a concentração de nitrito (medido como $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) foi baixa e assim permaneceu durante todo o período avaliado.

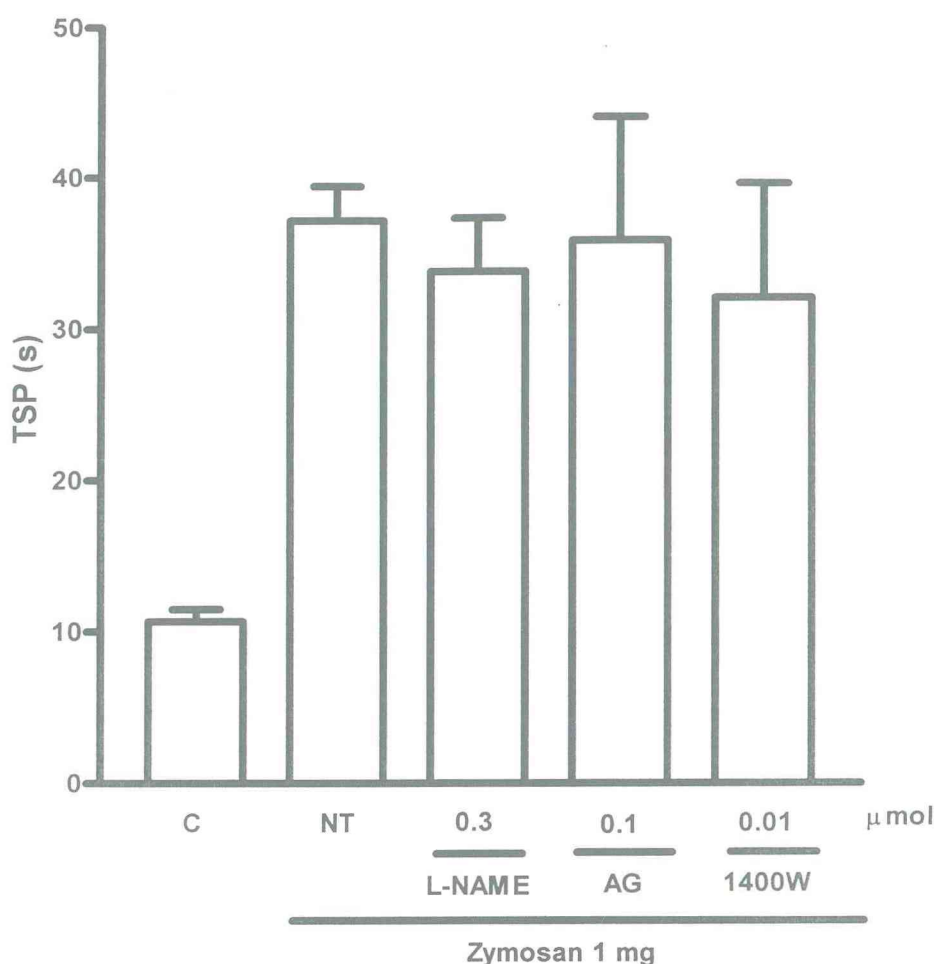


Figura 20. Efeito da administração terapêutica local de L-NAME, aminoguanidina (AG) ou 1400W sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. L-NAME, AG ou 1400W foram administrados nas doses de 0.3, 0.1 μmol ou 0.01 μmol , respectivamente, 2 h após a indução da AZy. A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3^a e 4^a h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média \pm epm (n=6).

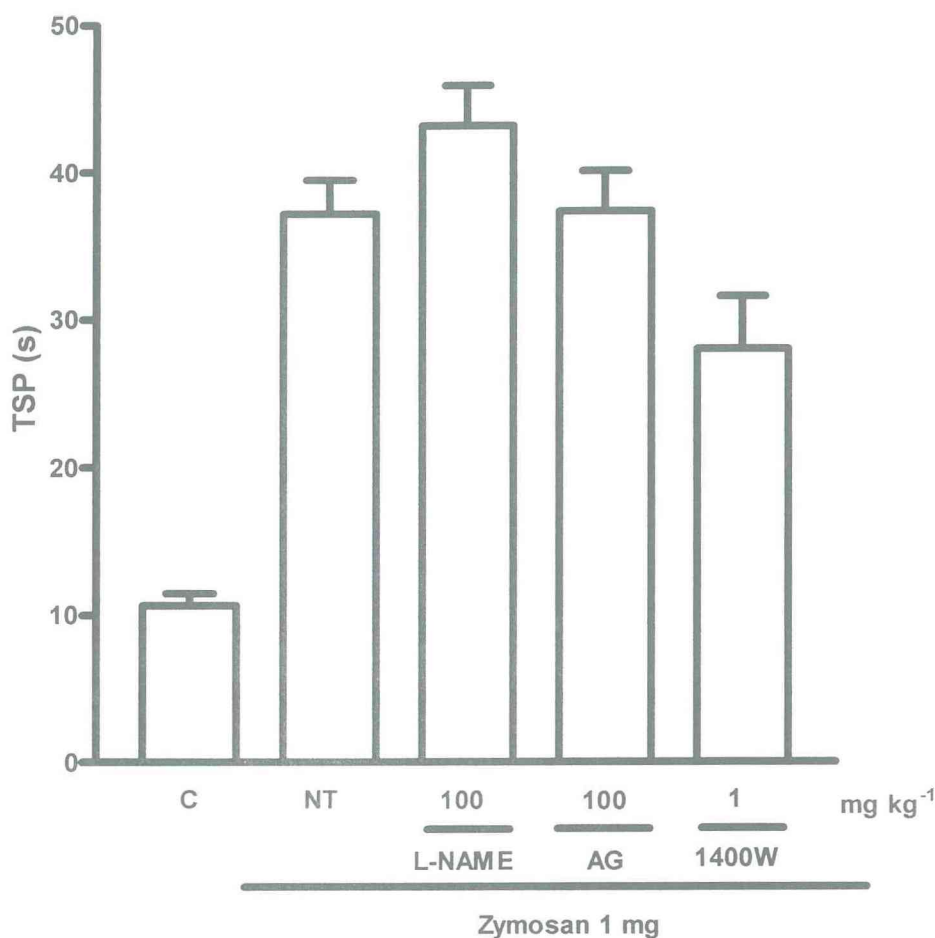


Figura 21. Efeito da administração terapêutica sistêmica de L-NAME, aminoguanidina (AG) ou 1400W sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. L-NAME ou AG, na dose de 100 mg kg⁻¹ i.p., ou 1400W, na dose de 1 mg kg⁻¹ sc., foram administrados 2 h após a indução da AZy. A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3^a e 4^a h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média ± epm (n=6).

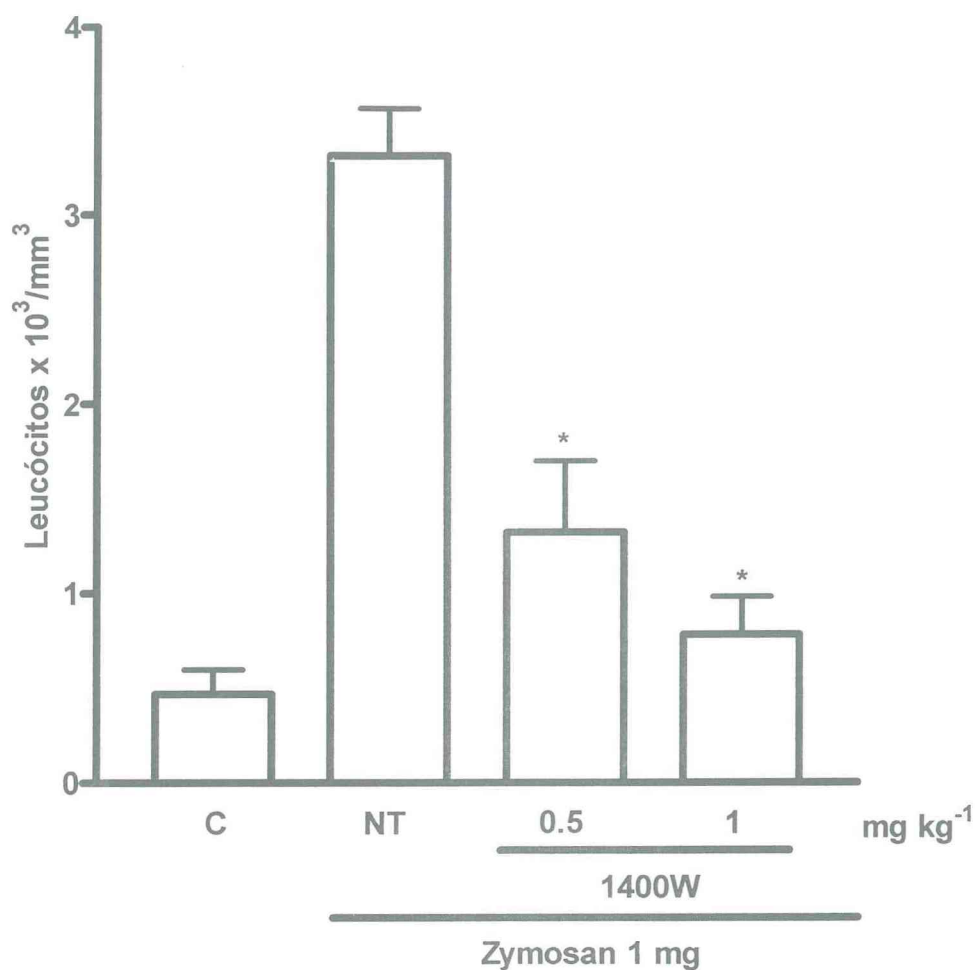


Figura 22. Efeito dose-dependente da administração profilática sistêmica de 1400W sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. 1400W foi administrado na dose de 0.5 ou 1 mg kg^{-1} antes da indução da AZy. O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média \pm epm ($n=6$). * $p < 0.05$ em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

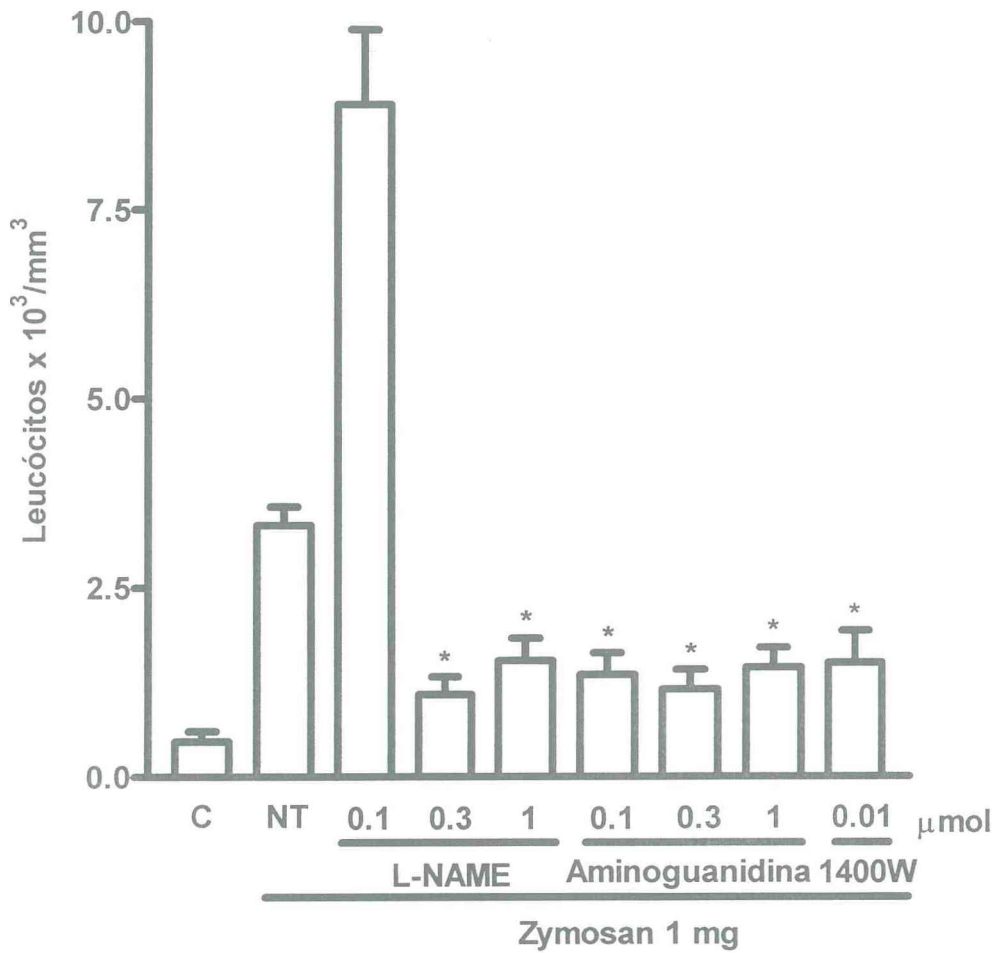


Figura 23. Efeito da administração profilática local de L-NAME, aminoguanidina ou 1400W sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. L-NAME ou aminoguanidina foram administrados nas doses de 0.1, 0.3 ou 1 μmol i.art. enquanto 1400W foi administrado na dose de 0.01 μmol i.art., antes da indução da AZy. O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). **p*<0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

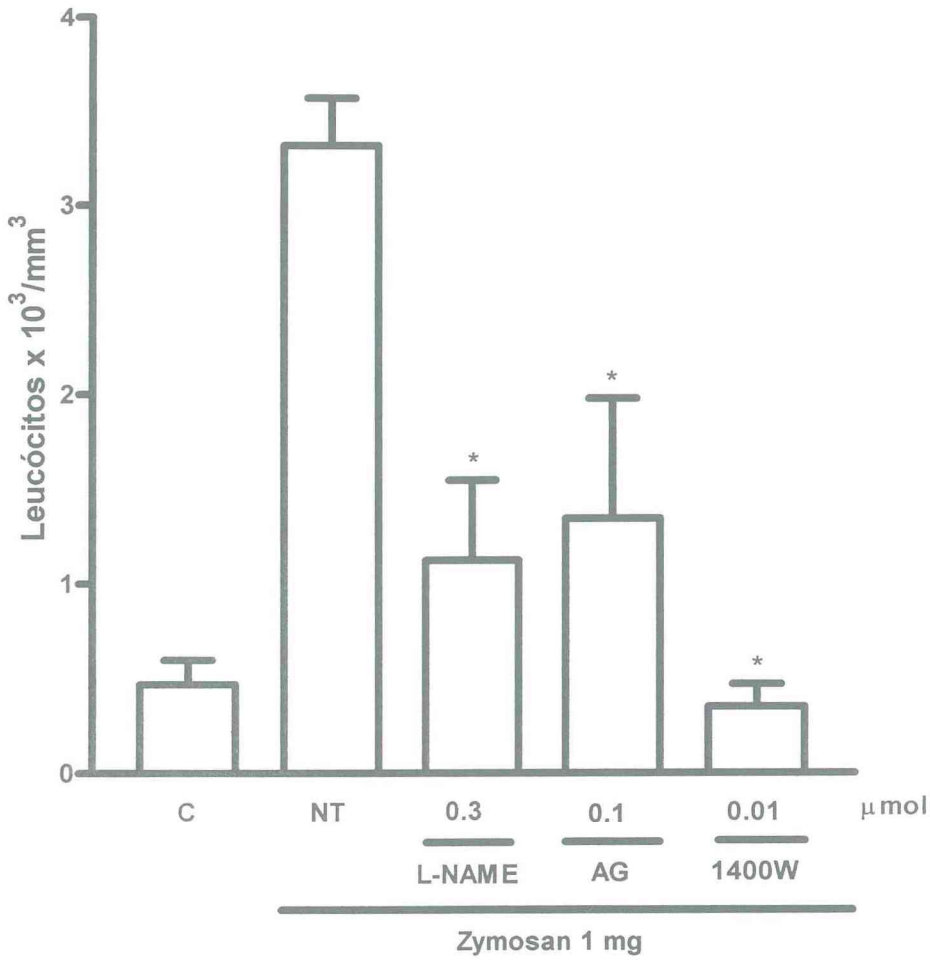


Figura 24. Efeito da administração terapêutica local de L-NAME, aminoguanidina (AG) ou 1400W sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. L-NAME ou AG ou 1400W foram administrados nas doses de 0.3, 0.1 ou 0.01 μmol i.art., respectivamente, 2 h após indução da AZy. O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média \pm epm (n=6). * p <0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

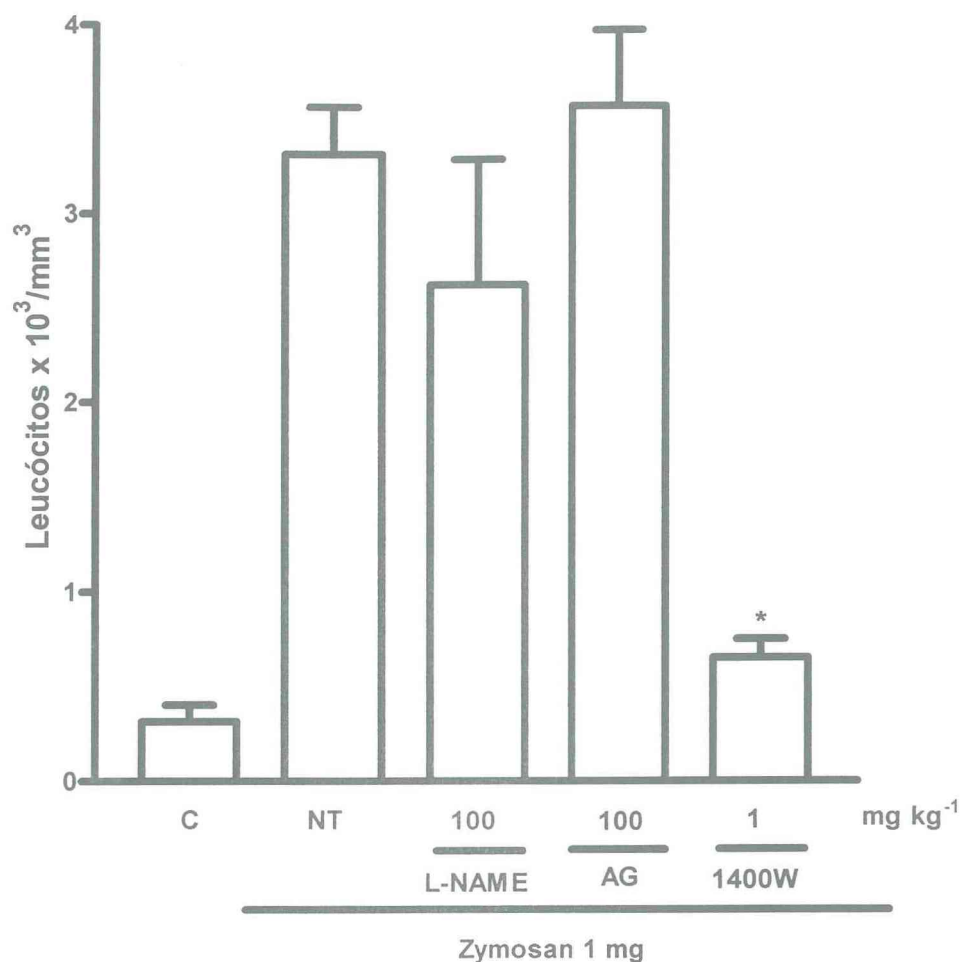


Figura 25. Efeito da administração terapêutica sistêmica de L-NAME, aminoguanidina (AG) ou 1400W sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. L-NAME ou AG, na dose de 100 mg kg⁻¹ i.p., ou 1400W, na dose de 1 mg kg⁻¹ sc., foram administrados 2 h após a indução da AZy. O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). **p*<0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

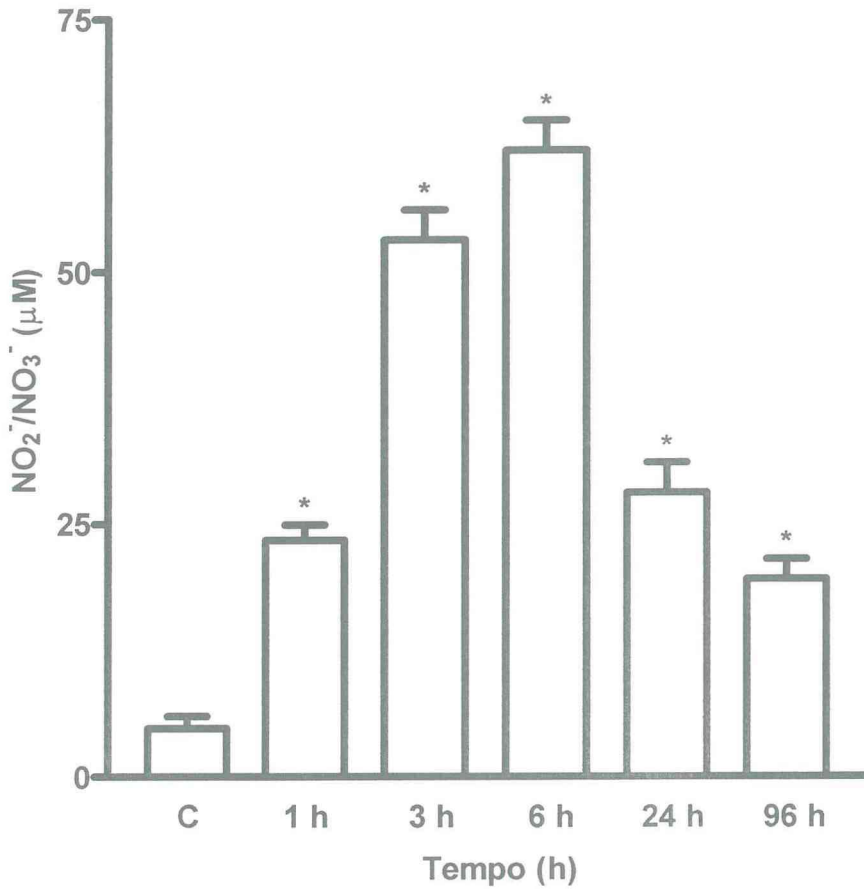


Figura 26A. Curso temporal dos níveis de nitrito/nitrato no exsudato articular de ratos na artrite induzida por zymosan. O zymosan foi injetado i.art.e a liberação de NO no exsudato (na forma de NO₂⁻/NO₃⁻) foi medido 1 h, 3 h, 6 h, 24 h e 96 h após a administração do agente inflamatório. Os animais do grupo controle (C) receberam solução salina 0.9% i.art. Os resultados são expressos como média±e.p.m. (n=6). **p*<0.05 comparado com o grupo controle.

b. Administração sistêmica profilática ou terapêutica de inibidores da óxido nítrico sintase sobre a liberação de óxido nítrico na artrite induzida por zymosan em ratos

A administração sistêmica profilática (30 min antes da administração de zymosan) ou terapêutica (2 h após a administração de zymosan) de inibidores de NOS, L-NAME, aminoguanidina ou 1400W, reduziu a liberação de nitrito nos exsudatos articulares (Figura 26B). O lavado articular foi obtido na 6^a h e a produção de NO foi determinado na forma de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ através da reação de Griess. O grupo controle (C) foi tratado apenas com solução salina 0.9%. * $p < 0.05$ em relação ao grupo não-tratado (NT).

4.11. Efeito da administração de doador de óxido nítrico

i. Incapacitação articular

a. Intervenção terapêutica

I. SIN-1

A administração de SIN-1 2 h após a indução da AZy, nas doses de 10 ou e 100 μg i.art (Figure 27), reduziu a IA, de forma significativa ($p < 0.05$), para 18.6 ± 1.2 seg e 23.4 ± 3.6 seg sendo 50% e 37% menor em relação ao grupo NT para as respectivas doses.

ii. Influxo celular

a. Intervenção terapêutica

I. SIN-1

A administração de SIN-1 2 h após a indução da AZy, nas doses de 10 ou 100 μg i.art (Figure 28) reduziu o IC, de forma significativa e dose-dependente ($p < 0.05$),

para $1.7 \pm 0.4 \times 10^3/\text{mm}^3$ células e $0.8 \pm 0.3 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 48.5% e 75.6% menor em relação ao grupo NT para as respectivas doses.

4.12. Efeito de anticorpo antineutrófilos

i. Incapacitação articular

a. Intervenção profilática

I. Anticorpo antineutrófilos

A administração profilática i.p. de anticorpo antineutrófilos, na dose de 32.5 ml kg^{-1} (Figura 29) reduziu a IA, de forma significativa ($p < 0.05$), para 22.4 ± 1 seg sendo 39.8% menor em relação ao grupo NT.

b. Influxo celular

a. Intervenção profilática

I. Anticorpo antineutrófilos

A administração profilática i.p. de anticorpo antineutrófilos, na dose de 32.5 ml kg^{-1} (Figura 30) reduziu o IC, de forma significativa ($p < 0.05$), para $0.5 \pm 0.2 \times 10^3/\text{mm}^3$ células sendo 84.8% menor em relação ao grupo NT.

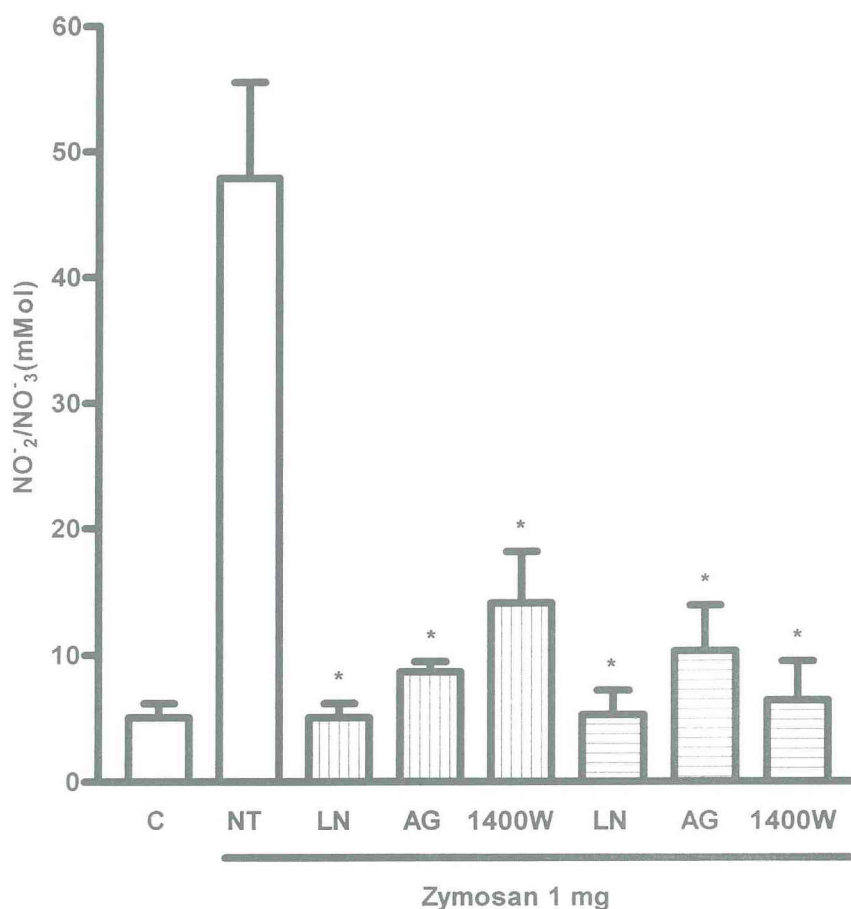


Figura 26B. Efeito da administração sistêmica profilática ou terapêutica de inibidores da óxido nítrico sintase sobre os níveis de nitrito/nitrato no exsudato articular na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg i.art. L-NAME (LN) ou aminoguanidina (AG), na dose de 100 mg kg⁻¹ i.p. ou 1400W, na dose de 1 mg kg⁻¹ s.c., foram administrados antes (profilático: barras verticais) ou 2 h após (terapêutico: barras horizontais) a indução da AZy. Os animais do grupo controle (C) receberam solução salina 0.9% i.art. Os resultados estão expressos como média±e.p.m(n=6). **p*<0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

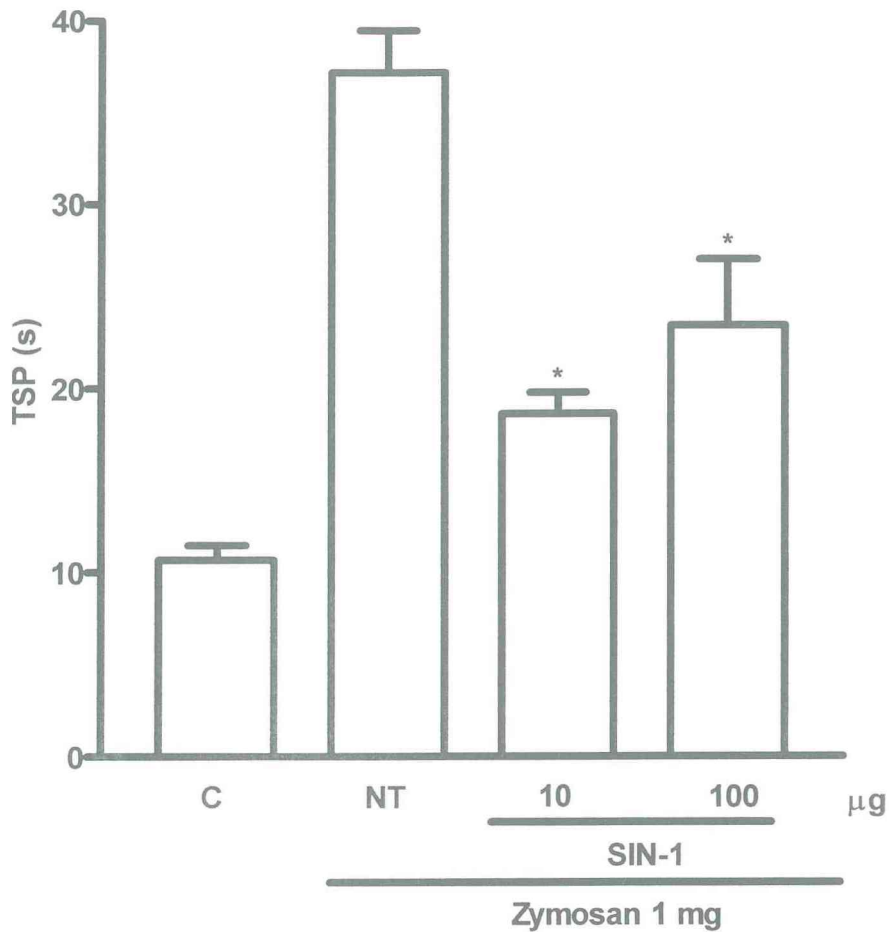


Figura 27. Efeito da administração terapêutica local de SIN-1 sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. SIN-1 foi administrado nas doses de 10 ou 100 µg i.art. 2 h após a indução da AZy. A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3a. e 4a. h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). * $p < 0.05$ em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

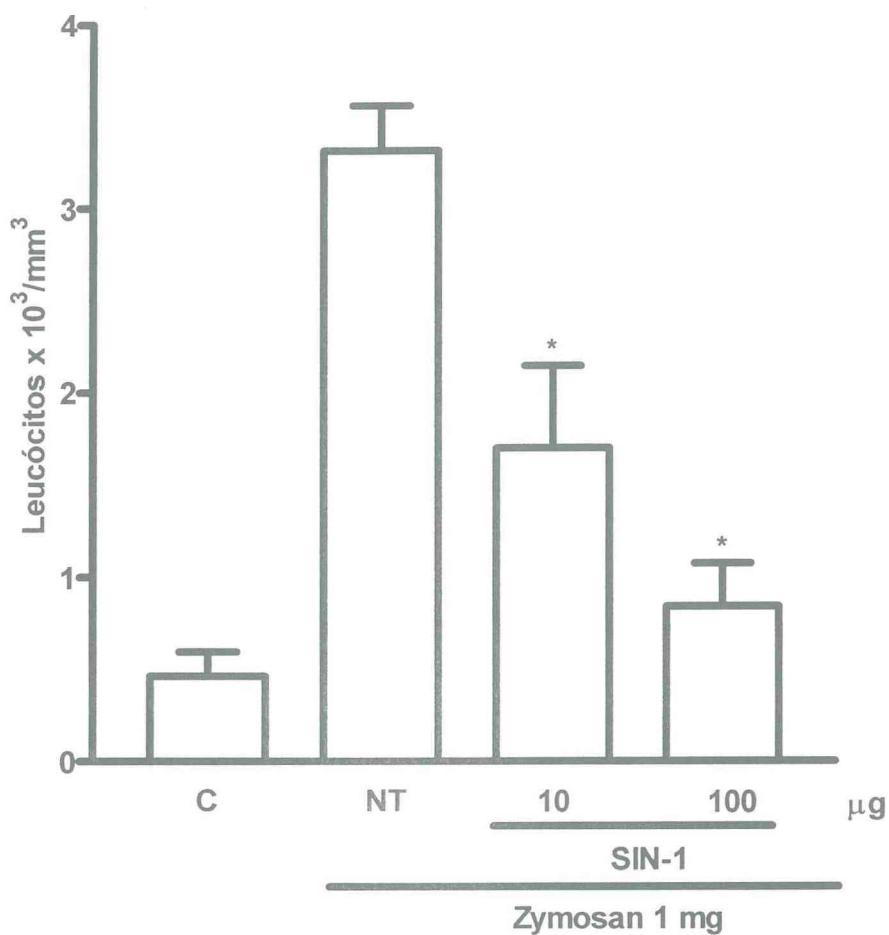


Figura 28. Efeito da administração terapêutica local de SIN-1 sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. SIN-1 foi administrado nas doses de 10 ou 100 µg i.art. 2 h após a indução da AZy. O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). * $p < 0.05$ em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

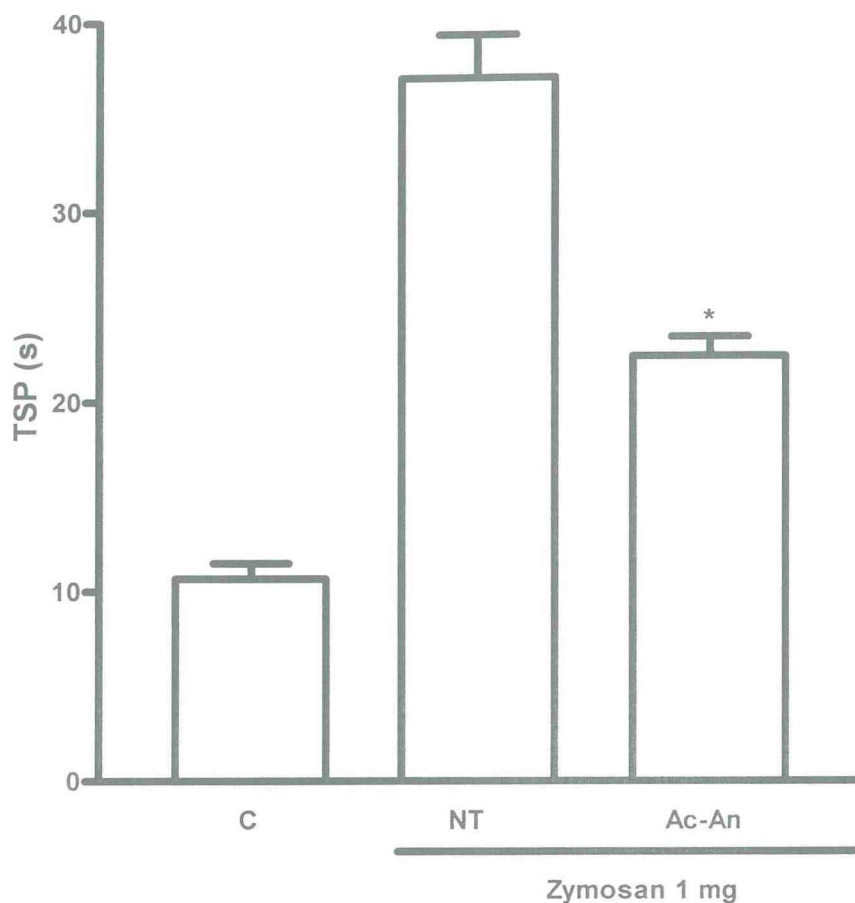


Figura 29. Efeito da administração profilática sistêmica do anticorpo anti-neutrófilos (Ac-An) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. Ac-An foi administrado antes da indução da AZy, na dose de 2 ml kg^{-1} i.p. A IA foi registrada até a 6^a h através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de incapacitação, registrado entre a 3^a e 4^a h. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média \pm epm ($n=6$). * $p<0.05$ em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

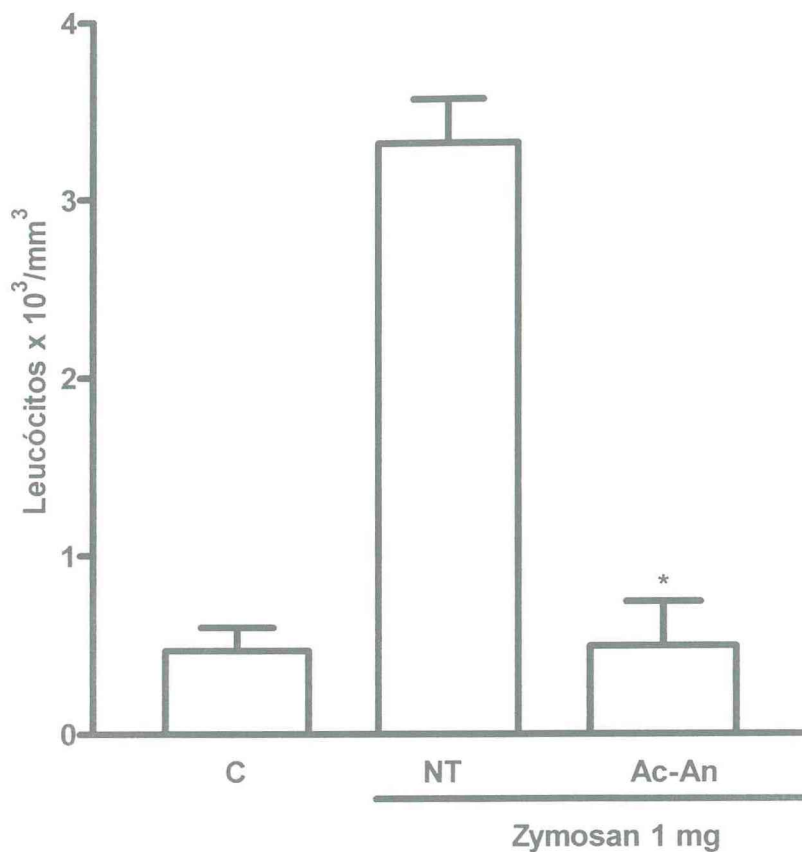


Figura 30. Efeito da administração profilática sistêmica de anticorpo anti-neutrófilos (Ac-An) sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos (AZy). A artrite foi induzida através da administração i.art. de zymosan 1 mg. Ac-An foi administrado antes da indução da AZy, na dose de 32.5 ml kg⁻¹ i.p. O lavado articular foi coletado na 6^a h para contagem do número total de células, representado no gráfico. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±epm (n=6). **p*<0.05 em relação ao grupo não-tratado (NT) (ANOVA).

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. Participação de prostaglandina E₂ (PGE₂)

A literatura mostra correlação entre a inflamação, a produção de prostaglandinas via ativação de ciclooxigenase (COX) e a redução dos parâmetros inflamatórios após a administração de inibidores seletivos de COX-2. Em nosso trabalho mostramos que, na fase aguda da AZy, a administração profilática ou terapêutica de celecoxib ou rofecoxib, inibidores seletivos de COX-2, reduziu a dor inflamatória articular enquanto a migração celular foi reduzida apenas por celecoxib.

Dados atuais mostram o envolvimento de COX-2 na inflamação. No edema induzido em pata de ratos por carragenina foi observado aumento da expressão de mRNA para COX-2 e tromboxano e redução do edema no local da injúria após a administração de um inibidor seletivo de COX-2, além de efeito analgésico. É importante destacar que não foi demonstrado efeito sobre a prostaglandina produzida no estômago e não foram observados sinais de toxicidade gastrointestinal, sugerindo que a inibição seletiva de COX-2 produziu efeito antiinflamatório importante sem incidência de efeitos colaterais relacionados com a inibição da COX-1 (Seibert *et al.*, 1994). Na artrite induzida por adjuvante, houve associação entre o desenvolvimento da artrite e aumento na produção local de PGE₂, além de ter sido demonstrado aumento da expressão de mRNA para COX-2 (Anderson *et al.*, 1996). A administração de SC-58125, um inibidor seletivo de COX-2, inibiu o edema de pata e reduziu os níveis de PGE₂ e a expressão do mRNA da enzima. Também foi observado redução do infiltrado inflamatório e alívio da inflamação sinovial. Por fim, o inibidor não afetou os níveis do mRNA para COX-1 (Anderson *et al.*, 1996). Nas contorções abdominais induzidas por ácido acético foi observada uma redução significativa do número de contorções após tratamento com inibidores seletivos de COX-2 (Matsumoto *et al.*, 1998). Na colite experimental induzida por dinitrobenzeno em ratos, foi mostrado que celecoxib reduz a gravidade da resposta inflamatória observada (Cuzzocrea *et al.*, 2001).

O efeito da administração sobre a migração celular não é muito claro, mesmo quando buscamos subsídios na literatura. Foi demonstrado, por exemplo, que a

administração de dois inibidores seletivos de COX-2, SC-58125 ou DU-697, no modelo de bolsa de ar induzida por carragenina em ratos, suprimiram os níveis de prostaglandinas mas não foram capazes de reduzir a infiltração de leucócitos (Wallace *et al.*, 1999) enquanto na artrite induzida por adjuvante foi relatado que meloxicam ou SC-58125, inibidores seletivos de COX-2, inibiram a migração celular (Anderson *et al.*, 1996; Engelhardt, 1996).

5.2. Participação de leucotrienos

O leucotrieno B₄ (LTB₄), produto do ácido araquidônico via 5-lipooxigenase, tem potente ação quimiotática e está envolvido em patologias inflamatórias em modelos animais e humanos.

Demonstramos que a administração profilática de MK-886, um inibidor da síntese de leucotrienos, reduziu a IA e o IC mas a administração após a indução da AZy reduziu apenas o IC, demonstrando o papel de LTB₄ sobre a migração celular e reforçando o potencial terapêutico de inibidores de LTB₄ sobre a resposta inflamatória. A administração terapêutica de CP-105,696, um potente e seletivo antagonista de LTB₄ (Showell *et al.*, 1998), reforça estes achados pois inibiu a migração de neutrófilos induzida por LTB₄ em pele de camundongos (Griffiths *et al.*, 1995). Outros dois antagonistas dos receptores de LTB₄, LY293111Na ou CGS25019C, administrados profilaticamente, também reduziram a migração celular no modelo de bolsa de ar em camundongos (Kuwabara *et al.*, 2000).

Em nosso trabalho, um dado interessante foi a demonstração que LTB₄ parece ter um efeito facilitatório na resposta álgica que não está relacionado ao seu efeito quimiotático e corrobora a demonstração de ativação direta de receptores da capsaicina por LTB₄ (Hwang *et al.*, 2000) para produzir dor intensa. Outros autores também demonstraram um mecanismo indireto, através do qual LTB₄ induz o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares para o sítio da inflamação e induz hiperalgesia em ratos (Levine *et al.*, 1984; 1985b) ou em humanos (Bisgaard & Kristensen, 1985). Na AZy, os resultados apontam para um efeito direto sobre a resposta nociceptiva pois já foi demonstrado que o pico da incapacitação, entre a 3^a e a 4^a h, não coincide com o pico do influxo, que ocorre na 6^a h após a indução da

AZy (Rocha *et al.*, 1999). A resposta álgica induzida por outros mediadores também parece possuir um componente LTB₄-dependente. Assim, a resposta nociceptiva vocalizada em ratos após estímulo mecânico, foi reduzida com a administração de BW-755c ou L-615,919, inibidores da via da lipooxigenase enquanto a hiperálgia térmica em ratos tratados com fator de crescimento neural (NGF) também foi prevenida pela injeção de um inibidor específico de 5-lipooxigenase (Amann *et al.*, 1996; Bennett *et al.*, 1998). Similarmente, o envolvimento de LTB₄ na hiperálgia mecânica foi demonstrado na dor radicular induzida em núcleo pulposo herniado de ratos. O envolvimento de LTB₄ na dor inflamatória em seres humanos também foi demonstrado. Quin & Bazan (1990) mostraram, através de ensaios com fluido sinovial obtidos de pacientes com disfunção temporomandibular, forte correlação entre os níveis de PGE₂, LTB₄ e PAF e índices clínicos da patologia articular. Em nossos resultados, a administração de MK-886 após a indução da AZy provavelmente não reduziu os parâmetros inflamatórios em função da liberação anterior de LTB₄ na articulação desafiada. De fato, na artrite induzida por colágeno, Rocha *et al.*, (1996) demonstraram a liberação de LTB₄ 5 minutos após a indução da artrite. Também podemos apontar a incapacidade do inibidor em bloquear a descarga neuronal em nociceptores previamente ativados. A este respeito, é importante citar os resultados relatados por Jain *et al.*, (2001), que utilizaram modelos de nocicepção central (*tail flick* e placa aquecida) e de nocicepção periférica (contorção induzida por ácido acético) para mostrar que a administração de um antagonista de receptor de leucotrieno, apesar de atenuar a resposta nociceptiva nos modelos de nocicepção periférica, não logrou o mesmo efeito nos modelos centrais, embora os autores tenham utilizado doses 4x maiores do que a utilizada na nocicepção periférica. Em outro modelo de nocicepção periférica, o teste de contorção abdominal induzida por benzoquinona em camundongos, foi relatado que a administração de um inibidor da síntese de leucotrienos não teve efeito analgésico enquanto na hiperálgia induzida por fermento a eficácia foi limitada (Muller-Peddinghaus *et al.*, 1993).

5.3. Participação de autacóides (serotonina e histamina)

Na parte introdutória deste trabalho mostramos que a histamina e serotonina são mediadores importantes da resposta inflamatória. No modelo de AZy, demonstramos que a administração prévia de metisergida, antagonista dos receptores 5-HT₁ da serotonina reduziu a IA e IC ao passo que a administração terapêutica reduziu apenas a IA. A administração de bloqueadores dos receptores H₁ e H₂ da histamina não produziu resultado similar. A administração do composto 48/80, que provoca a depleção do conteúdo de mastócitos, rico em autacóides, reduziu a IA mas não o IC. Uma provável explicação para este aparente paradoxo pode ser a estratégia de administração utilizada pois o composto 48/80 foi administrado durante 4 dias em doses elevadas, induzindo uma completa liberação de todo o conteúdo dos mastócitos que inclui, além de autacóides, outros mediadores da resposta inflamatória como leucotrienos, proteinases, citocinas (Wooley & Tetlow, 2000) e, em especial, TNF- α . À respeito desta citocina, é importante chamarmos a atenção para a sua participação na resposta nociceptiva induzida na cavidade abdominal por zymosan e ácido acético tendo sido demonstrado sua liberação a partir de macrófagos e mastócitos ativados (Ribeiro *et al.*, 2000).

5.4. Participação de fosfodiesterase IV

A elevação dos níveis de cAMP está associado à supressão da função de células imunes e inflamatórias e pode ocorrer via aumento da síntese de cAMP ou redução da sua biotransformação. O cAMP é quebrado a 3'5'-AMP e as enzimas envolvidas neste processo são as fosfodiesterases (PDEs). Há várias fosfodiesterases mas, em células envolvidas na resposta inflamatória, predomina a do tipo 4 (PDE 4). A inibição desta enzima parece ser uma alternativa terapêutica interessante no tratamento de patologias com componente inflamatório (Teixeira *et al.*, 1997), particularmente a asma, avaliada em vários animais (Turner *et al.*, 1994; 1996; Elwood *et al.*, 1995; Gozzard *et al.*, 1996). Na AZy, demonstramos que a administração de rolipram, um inibidor seletivo de PDE 4 (IPDE IV), reduziu a

incapacitação articular e o influxo celular. Uma resposta antiinflamatória após a administração de rolipram também foi observada em modelos de artrite induzida por colágeno (Nyman *et al.*, 1997), estreptococos (Laemont *et al.*, 1999) ou adjuvante (Francischi *et al.*, 2000) em ratos. Em outras patologias que apresentam componente inflamatório, também foi observado que a administração de IPDE IV reduziu os parâmetros avaliados conforme foi demonstrado no choque séptico (Cardelus *et al.*, 1996; Prabhakar *et al.*, 1994), na esclerose múltipla (Sommer *et al.*, 1995) e na isquemia por reperfusão (Barnard *et al.*, 1994), todos modelos induzidos em ratos.

O mecanismo de ação antiinflamatória dos inibidores de PDE 4 não é claro e parece ser multimediado. Na síndrome de distrofia respiratória induzida por LPS em ratos foi mostrado que o tratamento com rolipram reduziu a mortalidade bem como a concentração plasmática de TNF- α , implicando a inibição deste mediador como um provável mecanismo de ação antiinflamatória de inibidores de PDE 4 (Turner *et al.*, 1993). Este relato foi confirmado posteriormente (Greten *et al.*, 1995; Sekut *et al.*, 1995). Outros prováveis mecanismos envolvidos na resposta antiinflamatória aos inibidores de PDE 4 incluem a supressão de substâncias quimioatraentes, como interleucina 8 (Turner *et al.*, 1994) e LTB₄ (Griswood *et al.*, 1993), a inibição da ativação e migração de leucócitos, estimulação de esteróides endógenos e liberação de catecolaminas (Teixeira *et al.*, 1997).

5.5. Participação do sistema simpático

A participação do sistema simpático em modelos experimentais de inflamação foi demonstrado e apontava, inicialmente, para um efeito antiinflamatório (Green, 1972; 1974; Arntzen & Briseid, 1973; O'Duffy & Chahl, 1979). Dados recentes, entretanto, demonstram um efeito dual que parece variar de acordo com o receptor simpático avaliado. Assim, a ativação de receptores α -adrenérgicos parece induzir um efeito antinociceptivo (Reddy *et al.*, 1980; Ossipov *et al.*, 1988; Peng *et al.*, 1992; Graham *et al.*, 1997; 2000; Fairbanks *et al.*, 2002) ao passo que efeito similar pôde ser demonstrado com o bloqueio da terminação simpática ou dos receptores β -adrenérgicos. Em nosso trabalho, o bloqueio da terminação simpática através da

guanetidina, depletor das reservas catecolaminérgicas, reduziu a IA e o IC. Do mesmo modo, observamos redução da IA e IC quando administramos propranolol, um β -bloqueador, tanto antes quanto após a indução da AZy. A redução da dor inflamatória através do bloqueio simpático foi demonstrada por outros autores. No modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético, foi relatado que propranolol e guanetidina reduziram significativamente o número de contorções (Duarte *et al.*, 1988), confirmando publicações anteriores apontando para a ativação de um componente simpático na hiperalgesia inflamatória (Nakamura & Lico, 1986; Nakamura & Ferreira, 1987). No teste da incapacitação articular induzida por carragenina, similar ao modelo de AZy, foi demonstrado que, de fato, parece haver um componente simpático ativado durante a resposta inflamatória pois a injeção de propranolol ou guaneditina logrou reverter a resposta álgica induzida através da administração de carragenina (Tonussi & Ferreira, 1992).

Sobre a migração celular, a participação do sistema simpático na proliferação e migração celular foi demonstrado (Madden *et al.*, 1994) e recentemente foi relatado que neurotransmissores simpáticos são potentes quimioatraentes para monócitos e macrófagos, particularmente em tecidos linfóides (Straub *et al.*, 2000). Corroborando este dado, a avaliação de carcinoma de cólon mostra que a norepinefrina induz aumento da migração de células SW 480 com o provável envolvimento dos receptores β tendo em vista que a administração de propranolol inibiu este aumento (Masur *et al.*, 2001). De modo similar, a neutrofilia induzida por PAF foi significativamente inibida através da pré-administração de propranolol (Altenburg *et al.*, 1994). Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que em animais adrenalectomizados ou depletados de catecolaminas, a administração de PAF não induziu neutrofilia mostrando que, de fato, o sistema simpático tem papel importante nos mecanismos de migração celular.

5.6. Participação de óxido nítrico

O presente trabalho buscou aprofundar dados anteriormente demonstrados em nossa dissertação de mestrado os quais apontaram para a efetiva participação do óxido nítrico (NO) na resposta inflamatória na artrite induzida por zymosan (AZy)

em ratos (Rocha, 1999). Face ao caráter multimediado da inflamação, também avaliamos a participação de outros mediadores da resposta inflamatória na AZy.

A parte inicial do trabalho demonstrou que a injeção intra-articular de zymosan no joelho direito de ratos induziu uma resposta inflamatória que foi caracterizada por aumento da migração de leucócitos para o foco inflamatório e incapacitação articular (IA) progressiva, confirmando achados anteriores (Rocha *et al.*, 1999). A incapacitação articular é um parâmetro indireto de dor inflamatória articular e os registros demonstram que, na 2^a h após a administração de zymosan, ocorre um aumento progressivo na dor evocada que atinge o pico máximo por volta da 3^a ou 4^a h após o estímulo. Na 6^a h a incapacitação articular, embora menor que na 3^a ou 4^a, ainda é maior que os valores registrados no tempo inicial. A observação do influxo celular demonstrou um aumento progressivo a partir da 2^a h de experimentação com o pico sendo atingido na 6^a h após a administração de zymosan. Tomados em conjuntos, os dados estão de acordo com relatos anteriores os quais demonstraram padrão similar de incapacitação articular utilizando a carragenina (Magalhães *et al.*, 1997) ou zymosan (Viana *et al.*, 1998). Similarmente, nossos achados sobre a cinética do influxo celular corroboram o relato de Rocha *et al.*, (1999), no mesmo modelo e no modelo de artrite induzida por imunocomplexos (Rocha *et al.*, 1996).

A parte deste trabalho que trata do NO na AZy é uma continuação daquele realizado durante o mestrado e, em função disso, apresentaremos resumidamente os dados ali relatados.

A administração intraperitoneal dos inibidores da síntese de NO, L-NAME e aminoguanidina, antes da indução da AZy, reduziu de forma dose-dependente a incapacitação articular e o influxo celular. A co-administração de L-arginina, substrato da formação de NO, reverteu o efeito antiinflamatório de L-NAME enquanto a administração de D-NAME, estereoisômero de L-NAME, não reduziu os parâmetros avaliados apontando para um efeito antiinflamatório estereoseletivo que parece envolver a via L-arginina:NO. A administração de nitroprussiato de sódio, um doador de NO, após a indução da AZy, reduziu apenas a incapacitação articular mas não o influxo celular. Em resumo, o conjunto dos dados apontaram para um efeito dual da via L-arginina:NO sobre a sensação dolorosa e a migração celular.

A inibição de NOS tem sido associada com inibição da dor inflamatória. Relatos anteriores demonstram que a administração de L-NAME produziu efeito antinociceptivo no modelo da formalina em camundongos (Moore *et al.*, 1991). Similarmente, a administração intratecal de aminoguanidina e 2-amino-5,6-dihidro-metiltiazina, inibidores seletivos de iNOS, reduziram a hiperalgisia térmica induzida por carragenina em ratos (Osborne & Coderre, 1999). Em articulações de ratos, a administração local de L-NAME ou 7-nitro-indazole, este um inibidor seletivo da nNOS, preveniu a hiperalgésica térmica na artrite induzida pela associação carragenina-kaolina (Lawand *et al.*, 1997). Em nossos experimentos, a inibição prévia de iNOS foi antinociceptiva. Em um estudo anterior foi demonstrado que a acetilcolina induz um efeito antinociceptivo em modelo de hiperalgisia provocada pela injeção local de carragenina ou prostaglandina E₂ através da estimulação da via L-arginina:NO (Duarte *et al.*, 1990b). Uma provável explicação para esta discrepância com os nossos resultados pode ser o fato de que aqueles autores utilizaram o efeito da administração local em diferentes modelos experimentais. Em nosso modelo, verificamos que a administração local, tanto sistêmica quanto profilaticamente, promoveu efeito antinociceptivo.

Conforme afirmamos anteriormente, a incapacitação articular é observada, na AZy, entre a 3^a e 4^a hora após a administração do estímulo inflamatório. No intuito de avaliar o efeito da inibição de NOS sobre a dor já instalada, resolvemos administrar L-NAME e aminoguanidina 2 h após a administração de zymosan. Nenhuma das drogas provocou redução significativa da dor. Em estudo preliminar, vimos que um doador de NO, após indução da AZy, produziu efeito antinociceptivo. No presente estudo, esse efeito também foi observado quando administramos SIN-1, um outro doador de NO, demonstrando que, de fato, parece haver um efeito antinociceptivo direto de doadores de NO na AZy.

Dois pontos devem ser destacados. Primeiro, há um paradoxo pois tanto doadores como inibidores da síntese induziram efeitos antinociceptivos. Provavelmente, o efeito antinociceptivo de inibidores de NO ofertados profilaticamente pode ser explicado admitindo-se que ocorra a prevenção da inflamação sinovial uma vez que os sinoviócitos são estimulados pelo zymosan levando à liberação de mediadores hiperalgésicos. A administração subsequente

dos inibidores após a indução da AZy (intervenção terapêutica), por conseguinte, não conseguiria prevenir a ativação inicial dos nociceptores pelos mediadores algésicos já presentes no meio mas, por outro lado, uma vez iniciado o processo nociceptivo, os doadores de NO foram efetivos por conta do efeito antinociceptivo direto do óxido nítrico.

O efeito antinociceptivo direto do NO levanta o segundo ponto a ser discutido. Vários trabalhos têm apontado efeitos antinociceptivos ou nociceptivos para os doadores de NO dependendo do modelo, da via de administração ou da espécie estudada. No teste de pressão de pata, altas doses de SIN-1 tiveram efeito hiperalgésico (Aley *et al.*, 1998) enquanto outro estudo mostrou que SIN-1 reduziu a hiperalgesia induzida por PGE₂ (Ferreira *et al.*, 1991a). A injeção intradérmica ou intravenosa de NO evocou dor (Holthusen *et al.*, 1994; Kindgen-Milles & Arndt, 1996) enquanto a administração dérmica de nitroglicerina reduziu a dor pós-operatória em seres humanos (Lauretti *et al.*, 1999). No que diz respeito a dor articular, há um estudo demonstrando que nitroglicerina promove alívio parcial da dor em pacientes com periartrite (Berrazueta *et al.*, 1996). Embora haja limitação a administração de nitroglicerina em função dos seus efeitos colaterais, estes dados sugerem, preliminarmente, que os doadores de NO podem induzir analgesia na dor inflamatória articular em seres humanos.

O influxo celular na AZy foi diminuído quando usamos os inibidores de NO tanto por via sistêmica quanto local. De modo análogo, também observamos redução do influxo mesmo quando houve administração dos inibidores de NO 2 h após a injeção do estímulo inflamatório. Entretanto, é preciso enfatizar que a ausência do efeito antinociceptivo não pode ser relacionada a ineficácia pois a produção de NO ainda está sendo inibida, independente da estratégia de administração utilizada. Especulamos que a administração profilática de inibidores da NOS leva a *down-regulation* das células residentes sinoviais.

Trabalhos recentes mostraram que a administração local de inibidores de NOS exacerba a resposta inflamatória no modelo de pleurisia induzida por carragenina em ratos, enquanto a administração sistêmica intra-peritoneal induziu atividade antiinflamatória (Cuzzocrea *et al.*, 2000; Paul-Clark *et al.*, 2001). Embora os autores não avaliem a administração dos inibidores de NOS após a injeção de

zymosan, os resultados demonstram que os efeitos da inibição da NOS dependem da via e da estratégia de administração empregada. Outros relatos reforçam esta assertiva. Na artrite induzida por antígeno em coelhos a administração oral de L-NAME reduziu a migração celular para a cavidade articular (de Mello *et al.*, 1997). Similarmente, foi demonstrado que L-NAME, administrado na pele de cobaias e na reação de anafilaxia cutânea passiva, reduziu a migração de eosinófilos e neutrófilos (Teixeira *et al.*, 1993).

O efeito inibitório do NO sobre a migração celular parece resultar do aumento do estresse oxidativo celular promovendo a inibição de interações específicas entre neutrófilos e células endoteliais levando a redução da adesão celular (Niu *et al.*, 1994). Entretanto, os mecanismos envolvidos na inibição da migração celular após inibição de NO ainda não estão muito claros e demandam investigações adicionais. Aparentemente, NO em pequenas quantidades, modula a migração de neutrófilos inibindo a adesão destas células ao endotélio (Kubes *et al.*, 1991; Lefer *et al.*, 1999). Contudo, durante a resposta inflamatória altos níveis de NO estimulariam a migração de neutrófilos. Este dado tem sido reforçado pela demonstração de que oxidantes derivados de neutrófilos promovem adesão de polimorfonucleares a microvasos *in vivo* (Suzuki *et al.*, 1991). Adicionalmente, em camundongos *knockout* para iNOS há redução da migração de neutrófilos na peritonite por zymosan (Ajuebor *et al.*, 1998) ou na pleurisia por carragenina (Cuzzocrea *et al.*, 2000) quando comparados com a espécie selvagem. É interessante demonstrar que dose baixa de L-NAME, mas não dos inibidores de iNOS, significativamente aumentou o influxo celular demonstrando que o efeito bifásico observado com o NO parece envolver a inibição de cNOS. Assim, ao menos na articulação do joelho de ratos, baixa concentração de NO parece, efetivamente, reduzir a migração celular. Por outro lado, em situações patológicas, o aumento dos níveis de NO promove migração celular para o local da injúria.

Curiosamente, demonstramos que a injeção do doador de NO, SIN-1 também inibiu a migração celular. É paradoxal que um doador de NO reduza o influxo celular conquanto também tenhamos mostrado que os inibidores de NO reduzam-no. Quando usado *in vitro*, SIN-1 é considerado um doador de peroxinitrito visto que, simultaneamente, libera NO e gera O_2^- (Crow & Beckman, 1996). Contudo, dados

prévios mostram que SIN-1 não promove geração de peroxinitrito quando usado *in vivo* sugerindo, assim, que age como um doador puro de NO (Singh *et al.*, 1999). Confirmando este dado, foi demonstrado que a administração de DTPA Nonate, um doador puro de NO, também reduziu, de forma significativa, a migração celular quando administrado localmente, em modelo de pleurisia por carragenina em ratos (Paul-Clark *et al.*, 2001) embora o mecanismo através do qual ocorre esta inibição ainda não seja claro.

5.7. Participação de neutrófilos

A administração intraperitoneal do anticorpo antineutrófilo, antes da indução da AZy, reduziu de forma significativa tanto a incapacitação articular quanto o influxo de leucócitos. A inibição da resposta inflamatória observada na AZy é confirmada por relatos da literatura os quais demonstram o envolvimento de neutrófilos na resposta inflamatória em vários modelos e em resposta a diferentes estímulos. Adicionalmente, os estudos destacam que vários mediadores produzem os seus efeitos inflamatórios em consonância com a ativação de neutrófilos.

A hiperalgesia induzida através da ligação do nervo ciático em camundongos mostra que ocorre acúmulo de neutrófilos nas terminações nervosas lesadas. Este fato parece guardar relação com o aparecimento da resposta nociceptiva que será atenuada após depleção de neutrófilos circulantes (Perkins & Tracey, 2000). Não é claro, neste caso, quais os mediadores são quimioatraentes para neutrófilos mas há evidências apontando como candidatos prováveis o fator de crescimento neural (NGF) ou LTB₄. Estas considerações baseiam-se em várias evidências. O NGF mostrou-se, em outros modelos, quimioatraente para neutrófilos tanto *in vitro* (Gee *et al.*, 1983) quanto *in vivo* (Boyle *et al.*, 1985). Também foi demonstrado o seu envolvimento na hiperalgesia inflamatória (Lewin, 1994; McMahon, 1996) e hiperalgesia neuropática periférica (Herzberg *et al.*, 1997; Theodosiou *et al.*, 1999). Adicionalmente, parece que a hiperalgesia induzida por NGF é dependente de neutrófilos circulantes (Bennett *et al.*, 1998; Schuligoi, 1998). Por fim, a liberação de LTB₄, potente quimioatraente para neutrófilos, é estimulada por NGF (Amann *et al.*,

1996). O envolvimento do NO com a ativação de neutrófilos é amplamente documentado. Os neutrófilos ativados parecem gerar NO (Wright *et al.*, 1989) mas os níveis produzidos parecem ser menores do que os observados com células endoteliais (Yan *et al.*, 1994). No que diz respeito à quimiotaxia, o NO, via ativação de cGMP, parece agir como modulador endógeno da resposta quimiotática aos neutrófilos pois administração de inibidores da síntese de NO, como L-NAME, L-NMMA, inibiram a quimiotaxia neutrofílica induzida por fMLP (Wanikiat *et al.*, 1997; Kaplan *et al.*, 1989). Abordando este ponto, recentemente foi demonstrado que o influxo de neutrófilos, induzido pela administração de enterotoxina de bactérias em camundongos, foi inibido com a administração de L-NAME e aminoguanidina, inibidores da síntese de NO (Franco-Penteado *et al.*, 2001). A adesão do neutrófilo ao endotélio também foi avaliada e demonstrou-se que L-arginina, substrato da síntese de NO, aumentou e prolongou a agregação de neutrófilos induzida por fMLP através de um mecanismo NO-dependente (Forsslund *et al.*, 2000). Por outro lado, foi demonstrado que o LPS induz adesão do neutrófilos à células endoteliais e que este efeito é inibido pela administração de doadores de NO (Kosonen *et al.*, 2000; Gluckman *et al.*, 2000) ou TNF- α (Kosonen *et al.*, 1999). Neste sentido, parece que o NO, embora seja importante na atividade microbicida de neutrófilos, reduziu a migração neutrofílica por inibir o *rolling* e a adesão da célula ao endotélio em modelos de sepse (Benjamin *et al.*, 2002; Crosara-Alberto *et al.*, 2002).

Os leucotrienos são potentes quimiotáticos para neutrófilos, os quais possuem receptores específicos para os LTB₄. Estes receptores, uma vez ativados, iniciam uma série de eventos incluindo agregação, adesão ao endotélio vascular e produção aumentada de ânions superóxido (Gimbrone *et al.*, 1984; Palmblad *et al.*, 1984; Ford-Hutchinson, 1990). Outros dados confirmam estes achados. A lesão pulmonar induzida por LTB₄ em coelhos depende de leucócitos polimorfonucleares (Yoshimura *et al.*, 1993) e, mais recentemente, foi demonstrado que, no modelo de artrite induzida por colágeno em camundongos, a administração de um antagonista de receptores de LTB₄ reduziu de forma significativa e dose-dependente a infiltração neutrofílica para o foco inflamatório (Kuwabara *et al.*, 2000).

Os efeitos farmacológicos de outros mediadores também parecem envolver a participação de neutrófilos. No fluido sinovial de pacientes com artrite foi demonstrado que neutrófilos sinoviais sintetizam e liberam PAF (Hilliquin *et al.*, 1995) que, por seu turno, pode ativar neutrófilos mesmo em pequenas quantidades (Kuijpers *et al.*, 2001). O envolvimento de neutrófilos com a via dos derivados eicosanóides foi avaliado em animais com lesões por queimadura ou infectados por LPS e foi demonstrado que os neutrófilos induzem um aumento da expressão de COX e aumento da síntese de PGE₂, prostaglandina envolvida no processo inflamatório (He *et al.*, 2001). Estes dados foram confirmados no modelo de inflamação intestinal em ratos por dinitrobenzeno onde a administração de celecoxib, inibidor seletivo de COX-2, reduziu a gravidade da lesão (Cuzzocrea *et al.*, 2001) ou em estudos avaliando a quimiotaxia de leucócitos humanos em resposta a soro ativado por zymosan onde a administração de inibidores não-seletivos de COX reduziu a quimiotaxia e a migração celular (Hascelik *et al.*, 1994). Resultados similares também foram relatados em relação a outros mediadores como citocinas (Jordan *et al.*, 2001; Fredriksson *et al.*, 2002; Drost & MacNee, 2002), aminas biogênicas (Kheifets *et al.*, 1986; Yamaki *et al.*, 1998; Nomura *et al.*, 2001) e bradicinina (Araújo *et al.*, 2001; Bockmann & Paegelow, 2000).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Em relação à dor inflamatória articular (incapacitação articular) e influxo celular na fase aguda da artrite induzida por zymosan em ratos (AZy) e de acordo com as condições experimentais utilizadas durante a realização deste trabalho, obtivemos as seguintes conclusões:

6.1. O óxido nítrico participa na incapacitação articular e influxo celular:

i. Doadores de óxido nítrico induzem efeito antinociceptivo;

ii. A administração profilática de inibidores da síntese de óxido reduz a dor inflamatória articular e influxo celular;

iii. O bloqueio de iNOS reduz o influxo celular;

6.2. A inibição da ciclooxigenase-2 tem efeito analgésico;

6.3. O bloqueio da geração de LTB₄ promoveu analgesia e inibiu a migração celular;

6.4. O bloqueio de receptores da serotonina, mas não da histamina, promoveu analgesia e inibiu a migração celular;

6.5. Rolipram, inibidor de fosfodiesterase IV, promoveu analgesia e inibiu a migração celular;

6.6. O bloqueio do sistema simpático promoveu analgesia e inibiu a migração celular;

6.7. A migração de polimorfonucleares para a articulação induz dor inflamatória.

Participation of inflammatory mediators in the acute phase in zymosan-induced arthritis in rats – Dual effect of nitric oxide on articular inflammatory pain and cell migration in zymosan-induced arthritis – José Carlos da Silva Rocha. Professor: Francisco Airton Castro da Rocha

The zymosan-induced arthritis (ZyA) is characterized by articular inflammatory pain, evaluated through the articular incapacitation (AI), and cell influx (CI) and it seems to be multimediated. We studied the involvement of inflammatory mediators in the AI and CI in the ZyA. Wistar rats received intra-articular (i.art.) injection of 1 mg Zy into the right knee joint and AI was obtained between 3 and 4 h after Zy injection. The animals were sacrificed at 6 h of arthritis and the articular exudate was collected for the evaluation of cell influx. A control group received saline i.art. and the non-treated group (NT) received Zy i.art. The prophylactic treatment (before Zy injection) i.art. with L-NAME (LN – NOS inhibitor), aminoguanidine (AG – iNOS inhibitor) or 1400W (iNOS inhibitor), i.art. or s.c., reduced the AI and CI as compared to the NT group while the therapeutic administration (2 h after Zy injection) reduced the CI as compared to the NT group. The therapeutic administration of SIN-1 (NO donor) reduced AI and CI. The prophylactic administration of celecoxib (CEL) or rofecoxib (selective COX-2 inhibitors) reduced the AI while CEL reduced CI only when used prophylactically. MK-886 (lipooxygenase inhibitor) p.o. given before Zy reduced both AI and CI whereas when given 2h after Zy it reversed only the CI. Methysergide (serotonin antagonist) administered i.p. before or after ZyA, reduced AI whereas the CI was reduced only when it was given prophylactically. The histamine antagonists cimetidine and mepyramine i.p. didn't reverse AI or CI. Mast cell depletion using t compound 48/80 reduced both AI and CI. The prophylactic administration of rolipram (a type IV phosphodiesterase) reduced both AI and CI. Neutrophil depletion by an antineutrophil antibody reduced both AI and CI. Guanethidine (catecholamines depletor) i.p. and propranolol (adrenergic β -antagonist) s.c. administrated prophylactically reduced AI and CI while the propranolol administered after Zy reduced AI and CI. Prophylactic or therapeutic administration of LN, AG or 1400W reduced the nitrite liberation into the articular exudates. MK-886 reduced LTB₄ release into the articular exudate. NOS inhibitors reduce the hyperalgesia and CI in ZyA only when given prophylactically. The administration of an NO-donor induces analgesia in ongoing ZyA arthritis. Selective COX-2 inhibitors and a lipooxygenase inhibitor provide analgesia and inhibition of cell migration. Antagonism of the serotonin receptors, but not of histamine receptors provide analgesia in ZyA. Additionally, sympatholytics and phosphodiesterase inhibition do also provide analgesia in ZyA. Neutrophils appear to be directly involved in the acute hyperalgesia of ZyA. As a whole, these data show the complex multititude of inflammatory mediators at play in acute ZyA together with the original demonstration that an NO donor is analgesic in ZyA.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABACIOGLU, N.; BEDIZ, A.; ÇAKICI, I.; TUNÇTAN, B. & KANZIK, I. Antinociceptive effects of H₁ and H₂ antihistaminics in mice. *Gen. Pharmacol.*, 24(5): 1173-6. 1993.
- ABBOTT, F.V.; HONG, Y. & BLIER, P. Activation of 5-HT_{2A} receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. *Neuropharmacol.*, 35(1): 99-110. 1996.
- AGUIRRE-BANUELOS, P. & GRANADOS-SOTO, V. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.*, 395(1): 9-13. 2000.
- AJUEBOR, M.N.; VIRAG, L.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. & SZABO, C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. *Immunology*, 95(4): 625-30. 1998.
- AKMAN, H.; AKSU, F.; GÜLTEKIN, I.; ÖZBEK, H.; ORAL, U.; DURAN, F. & BAYSAL, F. A possible central antinociceptive effect of dipyrone in mice. *Pharmacology*, 53: 71-8. 1996.
- ALEY, K.O.; McCARTER, G. & LEVINE, J.D. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J. Neurosci.*, 18(17): 7008-14. 1998.
- ALHAIDER, A.A. & WILCOX, G.L. Differential roles of 5-hydroxytryptamine_{1A} and 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor subtypes in modulating spinal nociceptive transmission in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 265(1): 378-85. 1993.
- ALTENBURG, S.P.; BOZZA, P.T.; MARTINS, M.A.; TIBIRICA, E.V.; SILVA, P.M.; CORDEIRO, R.S. & CASTRO FARIA NETO, H.C. Adrenergic modulation of the blood neutrophilia induced by platelet activating factor in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 256(1): 45-9. 1994.
- ALVES, A.C.; PIRES, A.L.; CRUZ, H.N.; SERRA, M.F.; DIAZ, B.L.; CORDEIRO, R.S.; LAGENTE, V. & MARTINS, M.A. Selective inhibition of phosphodiesterase type IV suppresses the chemotactic responsiveness of rat eosinophils *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.*, 312(1): 89-96. 1996.
- AMANN, R.; SCHULIGOI, R.; LANZ, I. & PESKAR, B.A. Effect of a 5-lipoxygenase inhibitor on nerve growth factor-induced thermal hyperalgesia in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 306(1-3): 89-91. 1996.

- AMIN, A.R.; di CESARE, P.E.; VYAS, P.; ATTUR, M.; TZENG, E.; BILLIAR, T.R.; STUCHIN, S.A. & ABRAMSON, S.B. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulation neuronal nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.*, 182(6): 2097-102. 1995.
- ANDERSON, G.D.; HAUSER, S.D.; McGARITY, K.L.; BREMER, M.E.; ISAKSON, P.C. & GREGORY, S.A. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J. Clin. Invest.*, 97: 2672-9. 1996.
- ANDRIOPOULOS, N.A.; MESTECHY, J.; MILLER, E.J. & BENNETT, J.C. Antibodies to human native and denatured collagens in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 6(2): 209-12. 1976.
- APLIN, A.E.; HOWE, A.; ALAHARI, S.K. & JULIANO, Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecule, and selectins. *Pharmacol. Rev.*, 50(2): 197-263. 1998.
- ARAÚJO, R.C.; KETTRITZ, R.; FICHTNER, I.; PAIVA, A.C.; PESQUERO, J.B. & BADER, M. Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor-deficient mice. *Biol. Chem.*, 382(1): 91-5. 2001.
- ARNTZEN, F.C. & BRISEID, K. Inhibition of carrageenan-induced rat paw oedema by catecholamines and amine-depleting drugs. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 32: 179-92. 1973.
- AU, B.T.; WILLIAMS, T.J. & COLLINS, P.D. Zymosan-induced IL-8 release from human neutrophils involves activation via the CD11b/CD18 receptor and endogenous platelet-activating factor as an autocrine modulator. *J. Immunol.*, 152(11): 5411-9. 1994.
- AUDIBERT, F. & CHEDID, L. Adjuvant disease induced by mycobacteria, determinants of arthritogenicity. *Agents Actions*, 6(1-3): 75-85. 1976.
- BABENKO, V.; GRAVEN-NIELSEN, T.; SVENSSON, P. DREWES, A.M.; JENSEN, T.S. & ARENDT-NIELSEN, L. Experimental human muscle pain and muscular hyperalgesia induced by combinations of serotonin and bradykinin. *Pain*, 82: 1-8. 1999.
- BABENKO, V.; SVENSSON, P.; GRAVEN-NIELSEN, T.; DREWES, A.M.; JENSEN, T.S. & ARENDT-NIELSEN, L. Duration and distribution of experimental muscle hyperalgesia in humans following combined infusions of serotonin and bradykinin. *Brain Res.*, 853: 275-81. 2000.

- BARNARD, J.W.; SEIBERT, A.F.; PRASAD, V.R.; SMART, D.A.; STRADA, S.J.; TAYLOR, A.E. & THOMPSON, W.J. Reversal of pulmonary capillary ischemia-reperfusion injury by rolipram, a cAMP phosphodiesterase inhibitor. *J. Appl. Physiol.*, 77(2): 774-81. 1994.
- BARNETTE, M.S.; MANNING, C.D.; CIESLINSKI, L.B.; BURMAN, M.; CHRISTENSEN, S.B. & TORPHY, T.J. The ability of phosphodiesterase IV inhibitors to suppress superoxide production in guinea pig eosinophils is correlated with inhibition of phosphodiesterase IV catalytic activity. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 273(2): 674-9. 1995.
- BELCH, J.J.; O'DOWD, A.; ANSELL, D. & STURROCK, R.D. Leukotriene B₄ production by peripheral blood neutrophils in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.*, 18(4): 213-9. 1989.
- BELENKY, S.N.; ROBBINS, R.A. & RUBINSTEIN, I. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis *in vitro*. *J. Leukoc. Biol.*, 53(5): 498-503. 1993a.
- BELENKY, S.N.; ROBBINS, R.A.; STEPHEN, S.I.; RENNARD, S.I.; GOSSMAN, G.L.; NELSON, K.J. & RUBINSTEIN, I. Inhibitors of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis *in vitro*. *J. Lab. Clin. Med.*, 122: 388-94. 1993b.
- BENJAMIM, C.F.; SILVA, J.S.; FORTES, Z.B.; OLIVEIRA, M.A.; FERREIRA, S.H. & CUNHA, F.Q. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infec. Immun.*, 70(7): 3602-10. 2002.
- BENNETT, G.; al-RASHED, S.; HOULT, J.R. & BRAIN, S.D. Nerve growth factor induced hyperalgesia in the hind paw is dependent on circulating neutrophils. *Pain*, 77: 315-22. 1998.
- BERRAZUETA, J.R.; LOSADA, A.; POVEDA, J.; OCHOTECO, A.; Riestra, A.; SALAS, E. & AMADO, J.A. Successful treatment of shoulder pain syndrome due to supraspinatus tendinitis with transdermal nitroglycerin. A double blind study. *Pain*, 66(1): 63-7. 1996.
- BESHAY, E.; CROZE, F. & PRUD'HOMME, G.J. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram suppress macrophage activation and nitric oxide production *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Immunol.*, 98(2): 272-9. 2001.
- BESSON, J.M. The neurobiology of pain. *Lancet*, 353: 1610-5. 1999.
- BESSON, J.M. & CHAOUCH, A. A peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiological Reviews*, 67(1): 67-186. 1987.

- BEVILACQUA, M.P.; STENGELIN, S.; GIMBRONE, Jr., M.A. & SEED, B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, 243(4895): 1160-5. 1989.
- BEVILACQUA, M.P.; NELSON, R.M.; MANNORI, G. & CECCONI, O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Ann. Rev. Med.*, 45: 361-78. 1994.
- BILLINGHAM, M.E. Models of arthritis and the search for anti-arthritic drugs. *Pharmacol. Therap.*, 21(3): 389-428. 1983.
- BISGAARD, H. & GROTH, S. Bronchial effects of leukotriene D₄ inhalation in normal human lung. *Clin. Sci. (Colch.)*, 72(5): 585-92. 1987.
- BISGAARD, H. & KRISTENSEN, J.K. Leukotriene B₄ produces hyperalgesia in humans. *Prostaglandins*, 30(5): 791-7. 1985.
- BJORKMAN, R. Central antinociceptive effects of non-steroidal antiinflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. *Acta Anaesthesiol. Scand. Suppl.*, 103: 1-44. 1995.
- BLACK, A.K.; CAMP, R.D.; MALLET, A.I.; CUNNINGHAM, F.M.; HOFBAUER, M. & GREAVES, M.W. Pharmacologic and clinical effects of lonapalene (RS 43179), a 5-lipoxygenase inhibitor, in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 95(1): 50-4. 1990.
- BLACKHAM, A. & RADZIWONIK, H. The effect of drugs in established rabbit monoarthritic arthritis. *Agents Actions*, 7(4): 473-80. 1977.
- BLAZSO, G. & GABOR, M. Evaluation of the anti-oedematous effects of some h₁-receptor antagonists and methysergide in rats. *Pharmacol. Res.*, 35(1): 65-71. 1997.
- BLEY, K.R.; HUNTER, J.C.; EGKEN, R.M. & SMITH, J.A.M. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends in Pharmacol.*, 19: 141-7. 1998.
- BOCKMANN, S. & PAEGELOW, I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 68(5): 587-92. 2000.
- BOYLE, M.D.; LAWMAN, M.J.; GEE, A.P. & YOUNG, M. Nerve growth factor: a chemotactic for polymorphonuclear leukocytes *in vivo*. *J. Immunol.*, 134(1): 564-8. 1985.
- BRAY, M.A.; CUNNINGHAM, F.M.; FORD-HUTCHINSON, A.W. & SMITH, M.J.H. Leukotriene B₄: a mediator of vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.*, 72: 483-6. 1981.

- BRITO, G.A.C. & RIBEIRO, R.A. Migração de neutrófilos: mecanismos e mediadores. Revisão. *Pesq. Med. Fortaleza*, 3/4(2): 108-15. 1999.
- BRITO, G.A.C.; SARAIVAM S.N.R.; FALCÃO, J.L.A.A.; VALE, M.L.; LIMA, A.A.M.; CUNHA, F.Q. & RIBEIRO, R.A. Dual effect of cAMP on the writhing response in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 416: 223-30. 2001.
- BUCKLEY, M.G.; WALTERS, C.; WONG, W.M.; CAWLEY, M.I.; REN, S.; SCHWARTZ, L.B. & WALLS, A.F. Mast cell activation in arthritis: detection of α - and β -tryptase, histamine and eosinophil cationic protein in synovial fluid. *Clin. Sci.*, 93(4): 363-70. 1997.
- BURNETT, A.L. Role of nitric oxide in the physiology of erection. *Biol. Reprod.*, 52(3): 485-9. 1995.
- BUSTAMANTE, A.M.F. *Characterization de un modelo para la evaluation de la analgesia en ratas: medición de la limitacion funcional producida por administration intra-articular de acido urico*. México. Tese. Universidade Autônoma do México. 1982.
- CANNON, G.W.; OPENSHAW, S.J.; HIBBS, J.B.; HOIDAL, J.R.; HUECKSTEADT, T.P. & GRIFFITHS, M.M. Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. *Arth. Rheum.*, 39(10): 1677-84. 1996.
- CANNON, G.W.; OPENSHAW, S.; CLAYTON, F.; SAWITZKE, A.D. & GRIFFITHS, M.M. Adjuvant arthritis in rats: suscetibility to arthritis induced by *Mycobacterium butyricum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Transplant Proc.*, 31(3): 1590-1. 1999.
- CARDELUS, I.; GRAS, J.; JAUREGUI, J.; LLHENAS, J. & PALACIOS, J.M. Inhibition of lipopolysaccharide-induced bowel erythrocyte extravasation in rats, and of mesenteric hypoperfusion in dogs, by phosphodiesterase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.*, 299(1-3): 153-9. 1996.
- CARR, D.B. & GOUDAS, L.C. Acute pain. *Lancet*, 353: 2051-58. 1999.
- CASTERLINE, C.L. & EVANS, R. Further studies on the mechanism of human histamine-induced asthma: the effects of an aerosolized H1 receptor antagonist (diphenhydramine). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 59(6): 420-4. 1977.

- CHAN, C.C.; BOYCE, S.; BRIDEAU, C.; CHARLESON, S.; CROMLISH, W.; ETHIER, D.; EVANS, J.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; FORREST, M.J.; GAUTHIER, J.Y.; GORDON, R.; GRESSER, M.; GUAY, J.; KARGMAN, S.; KENNEDY, B.; LEBLANC, Y.; KEGER, S.; MANCINI, J.; O'NEILL, G.P. & 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. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290(2): 551-60. 1999.
- COCHRANE, C.G.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. The derivation of two distinct anaphylatoxin activities from the third and fifth components of human complement. *J. Exp. Med.*; 127(2): 371-86. 1968.
- CODERRE, T.J.; BASBAUM, A.I.; DALLMAN, M.F.; HELMS, C. & LEVINE, J.D. Epinephrine exacerbates arthritis by an action at presynaptic B₂-adrenoceptors. *Neuroscience*, 34(2): 521-3. 1990.
- COHEN, R.H. & PERL, E.R. Contributions of arachidonic acid derivatives and substance P to the sensitization of cutaneous nociceptors. *J. Neurophysiol.*, 64(2): 457-64. 1990.
- COHEN, N.; ROBINSON, D.; BEN-EZZER, J.; HEMO, Y.; HASHARONI, A.; WOLMANN, Y.; OTREMSKI, I. & NEVO, Z. Reduced NO accumulation in arthritis cartilage by exposure to methylene blue. *Acta Orthop. Scand.*, 71(6): 630-6. 2000.
- COLASANTI, M.; GRADONI, L.; MATTU, M.; PERSICHINI, T.; SALVATI, L.; VENTURINI, G. & ASCENZI, P. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO. *Int. J. Mol. Med.*, 9(2): 131-4. 2002.
- COLEMAN, R.A.; SMITH, W.L. & NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology. Classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.*, 46(2): 205-29. 1994.
- CONNOR, J.R.; MANNING, P.T.; SETTLE, S.L.; MOORE, W.M.; JEROME, G.M.; WEBBER, R.K.; TJOENG, F.S. & CURRIE, M.G. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.*, 273: 15-24. 1995.
- COTRAN, R.S.; Kumar, V. & Robbins, S.L. Pathologic Basis of Disease. 5th ed. Pens., USA, W.B. Saunders Co., pp. 1400. 1994.
- COURTENAY, J.S.; DALLMAN, M.J.; DAYAN, A.D.; MARTIN, A. & MOSEDALE, B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*, 283(5748): 666-8. 1980.

- CROSARA-ALBERTO, D.P.; DARINI, A.L.; INOUE, R.Y.; SILVA, J.S.; FERREIRA, S.H. & CUNHA, F.Q. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. *Br. J. Pharmacol.*, 136(5): 645-58. 2002.
- CROW, J.P. & BECKMAN, J.S. The importance of superoxide in nitric oxide-dependent toxicity: evidence for peroxynitrite-mediated injury. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 387: 147-61. 1996.
- CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. & FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic system. *Br. J. Pharmacol.*, 104(3): 765-7. 1991.
- CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M. & FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems – cyclic AMP and cyclic GMP – on inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, 127: 671-8. 1999.
- CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; CALABRO, G.; DUGO, L.; de SARRO, A.; van de LOO, F.A. & CAPUTI, A.P. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 162(5): 1859-66. 2000.
- CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; SERRAINO, I.; DUGO, L.; CENTORRINO, T.; CICCOLO, A.; SAUTEBIN, L. & CAPUTI, A.P. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor reduces the severity of experimental colitis induced by dinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 431(1): 91-102. 2001.
- CZERMAK, B.J.; SARMA, V.; BLESS, N.M.; SCHMAI, H.; FRIEDL, H.P. & WARD, P.A. *In vitro* and *in vivo* dependency of chemokine generation on C5a and TNF- α . *J. Immunol.*, 162(4): 2321-5. 1999.
- DAVIES, R.J.; BAGNALL, A.C.; McCABE, R.N.; CALDERON, M.A. & WANG, J.H. Antihistamines: topical vs oral administration. *Clin. Exp. Allergy*, 26(Suppl.3): 11-7. 1996.
- de BRUM-FERNANDES, A.J.; COSSERMELLI, W. & JANCAR, S. Antigen-induced arthritis in rabbits: a suitable experimental model for the study of arachidonic acid metabolites in articular inflammatory processes. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 43(3): 142-5. 1988.
- de MELLO, S.B.; NOVAES, G.S.; LAURINDO, I.M.; MUSCARÁ, M.N.; MACIEL, F.M. & COSSERMELLI, W. Nitric oxide synthase inhibitor influences prostaglandin and interleukin-1 production in experimental arthritic joints. *Inflamm. Res.*, 46(2): 72-7. 1997.
- de WITT, D.L. & MEADE, E.A. Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isoenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 306(1): 94-102. 1993.

- DELAUNOIS, A.; GUSTIN, P.; GARBARG, M. & ANSAY, M. Modulation of acetylcholine, capsaicin and substance P effects by histamine H₃ receptors in isolated perfused rabbit lungs. *Eur. J. Pharmacol.* 277(2-3): 243-50. 1995.
- DENIS, D. & RIENDEAU, D. Phosphodiesterase 4-dependent regulation of cyclic AMP levels and leukotriene B₄ biosynthesis in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 367: 343-50. 1999.
- DEPRE, M.; FRIEDMAN, B.; TANAKA, W.; van HECKEN, A.; BUNTINX, A. & DeSCHEPPER, P.J. Biochemical activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor, in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 53(5): 602-7. 1993.
- DIAS da SILVA, W. & LEPOW, I.H. Complement as a mediator of inflammation. II. Biological properties of anaphylatoxin prepared complement. *J. Exp. Med.* 125(5): 921-46. 1967.
- DICKENSON, A.H. Spinal cord pharmacology of pain. *Br. J. Anaesth.*, 75(2): 193-200. 1995.
- di ROSA, M.; RADOMSKI, M.; CARNUCCIO, R. & MONCADA, S. Glucocorticoids inhibits induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, 172(3): 1246-52. 1990.
- DIAMANT, Z. & FOKKENS, W.J. Leukotriene receptor antagonists: clinical potential in allergic rhinitis. *Rhinology*, 39(4): 187-90. 2001.
- DIMITRIADOU, V.; ROULEAU, A.; DAM TRUNG TUONG, M.; NEWLANDS, G.J.F.; MILLER, H.R.P.; LUFFAU, G.; SCHWARTZ, J.C. & GARBARG, M. Functional relationships between mast cells and C-sensitive nerve fibers evidenced by histamine H₃ receptor modulation in rat lung and spleen. *Clin. Sci.*, 87: 151-63. 1997.
- DIMITRIJEVIC, M.; LABAN, O.; DJURIC, V.J.; STANOJEVIC, S.; MILETIC, T.; KOVACEVIC-JOVANOVIC, V. & TODOROVIC, C. Behavior and severity of adjuvant arthritis in four rat strains. *Brain, Behavior and Immunity*, 15: 255-65. 2001.
- DIRIG, D.M. & YAKSH, T.L. Hyperalgesia-associated spinal synthesis and release of prostaglandins. Edited by Sinzinger *et al.*, Plenum Press. IN: *Recent Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research*. New York. USA. 205-8. 1998.
- DOAK, G.J. & SAWYNOK, J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neurosci.*, 80(3): 939-49. 1997.

- DOHERTY, N.S.; POUBELLE, P.; BORGEAT, P.; BEAVER, T.H.; WESTRICH, G.L. & SCHRADER, N.L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E₂. *Prostaglandins*, 30(5): 769-89. 1985.
- DOHERTY, N.S.; BEAVER, T.H.; CHAN, K.Y.; COUTANT, J.E. & WESTRICH, G.L. The role of prostaglandins in the nociceptive response induced by intraperitoneal injection in zymosan in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 91: 39-47. 1987.
- DROST, E.M. & MacNEE, W. Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF- α in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability adhesion receptor expression, and chemotaxis. *Eur. J. Pharmacol.*, 32(2): 393-403. 2002.
- DUARTE, I.D.G.; NAKAMURA, M. & FERREIRA, S.H. Participation of the sympathetic system in acetic-acid induced writhing im mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 21: 341-3. 1988
- DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B. & FERREIRA, S.H. Acetylcholine induces peripheral analgesia by the release of nitric oxide. *IN: Nitric oxide from L-arginine: a bio regulatory system*. S. Moncada & E.A. Higgs, eds. 165-71. 1990a.
- DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B. & FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, 186: 289-93. 1990b.
- DUARTE, I.D.G.; 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.*, 217: 225-7. 1992.
- DUARTE, I.D.G. & FERREIRA, S.H. L-NAME causes antinociceptive by stimulation of the arginine-NO-cGMP pathway. *Med. Inflamm.*, 9(1): 25-30. 2000.
- ELWOOD, W.; SUN, J.; BARNES, P.J.; GIEMBYCZ, M.A. & CHUNG, K.F. Inhibition of allergen-induced lung eosinophilia by type-III and combined type III- and IV-selective phosphodiesterase inhibitors in brown-Norway rats. *Inflamm. Res.*, 44(2): 83-6. 1995.
- ENDRESEN, G.K. Evidence for activation of platelets in the synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol., Int.*, 9: 19-24. 1989.
- ENGELHARDT, G. Pharmacology of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of COX-2. *Br. J. Pharmacol.*, 35 (Supp. 1): 4-12. 1996.

- ERDO, F.; TOROK, K. & SZEKELY, J.I. Measurement of interleukin-1 liberation in zymosan air-pouch exudate in mice. *Agents Actions*, 41(1-2): 93-5. 1994.
- FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S. & FERREIRA, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanisms. *Agents Actions*, 30 (3-4): 344-9. 1990.
- FAIRBANKS, C.A.; STONE, L.S.; KITTO, K.F.; NGUYEN, H.O.; POSTHUMUS, I.J. & WILCOX, G.L. α -2C-adrenergic receptors mediate spinal analgesia and adrenergic-opioid synergy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300(1): 282 – 90. 2002.
- FANG, F.C. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.*, 99(12): 2818-25. 1997.
- FARRELL, A.J.; BLAKE, D.R.; PALMER, R.M. & MONCADA, S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, 51(11): 1219-22. 1992.
- FASANO, M.B.; WELLS, J.D. McCALL, C.E. Human neutrophils express the prostaglandin G/H synthase 2 gene when stimulated with bacterail lipopolysaccharide. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 87(3): 304-8. 1998.
- FAZAL, N.; al-GHOUL, W.M.; CHOUDHRY, M.A. & SAYEED, M.M. PAF receptor antagonist modulates neutrophil response with thermal injury *in vivo*. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 281(4): C1310-7. 2001.
- FERNANDEZ, H.N.; HENSON, P.M.; OTANI, A. & HUGLI, T.E. Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis *in vitro* and under stimulated *in vivo* conditions. *J. Immunol.*, 120(1): 109-15. 1978.
- FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat. New Biol.*, 240(102): 200-3. 1972.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B. & CORRÊA, F.M.A. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, 53: 39-48. 1978.
- FERREIRA, S.H. & NAKAMURA, M. I – Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺-dependent process. *Prostaglandins*, 18(2): 179-90. 1979.
- FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D.G. & LORENZETTI, B.B. Molecular base of acetylcholine and morphine analgesia. *Agents Actions*, 32: 101-6. 1991a.
- FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D.G. & LORENZETTI, B.B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.*, 201(1): 121-2. 1991b.

- FERREIRA, S.H. *Analgesia com óxido nítrico y analgésicos*. IN: Berrazueta, J.M. Óxido nítrico endógeno y fármacos nitrovasodilatadores. 1^a ed. Universidade de Cantábria. Barcelona. 149-161. 1994.
- FIDECKA, S. & LALEWICZ, S. Studies on the antinociceptive effects of sodium nitroprusside and molsidomine in mice. *Pol. J. Pharmacol.*, 49(6): 395-400. 1997.
- FISHER, B.; ZORNOW, M.H.; YAKSH, T.L. & PETERSON, B.M. Antinociceptive properties of intrathecal dexmedetomidine in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 192(2): 221-5. 1991.
- FORD-HUTCHINSON, A.W.; BRAY, M.A.; DOIG, M.V.; SHIPLEY, M.E. & SMITH, M.J.H. Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*, 286: 264-5. 1980.
- FORD-HUTCHINSON, A.W. Leukotriene B₄ in inflammation. *Crit. Rev. Immunol.*, 10(1): 1-12. 1990.
- FORSLUND, T.; NILSSON, H.M. & SUNDQVIST, T. Nitric oxide regulates the aggregation of stimulated human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274(2): 482-7. 2000.
- FOSTER, S.J.; CUNLIFFE, C.J. & McCORMICK, M.E. Polymorphonuclear leukocytes induce damage to the articular cartilage in acute immunologic arthritis in rabbits. *Bioch. Pharmacol.*, 37(6): 1181-3. 1988.
- FRANCISCHI, J.N.; YOKORO, C.M.; POOLE, S.; TAFURI, W.L.; CUNHA, F.Q. & TEIXEIRA, M.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis. *Eur. J. Pharmacol.*, 399: 243-9. 2000.
- FRANCO-PENTEADO, C.F.; de SOUZA, I.; TEIXEIRA, S.A.; da SILVA, G.R.; de NUCCI, G. & ANTUNES, E. Involvement of nitric oxide on the peritoneal neutrophils influx induced by *staphylococcal* enterotoxin B in mouse. *Toxicon*, 39: 1383-6. 2001.
- FREDRIKSSON, M.; BERGSTROM, K. & ASMAN, B. IL-8 and TNF- α from peripheral neutrophils and acute-phase proteins in periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 29(2): 123-8. 2002.
- FRIEDMAN, B.S.; BEL, E.H.; BUNTINX, A.; TANAKA, W.; HAN, Y.H.; SHINGO, S.; SPECTOR, R. & STERK, P. Oral leukotriene inhibitor (MK-886) blocks allergen-induced airway response. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 147(4): 839-44. 1993.
- FUJII, E.; IRIE, K.; UCHIDA, Y.; TSUKAHARA, F. & MURAKI, T. Possible role of nitric oxide in 5-hydroxytryptamine-induced increase in vascular permeability in mouse skin. *Naunyn Schmied. Arch. Pharm.*, 350(4): 361-4. 1994.

- FURCHGOTT, R.F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ. Res.*, 53(5): 557-73. 1983.
- GAO, J.X. & ISSEKUTZ, A.C. The effect of ebselen on T-lymphocyte migration to arthritic joints and dermal inflammatory reactions in the rat. *Int. J. Immunopharmacol.*, 16(4): 279-87. 1994.
- GARVEY, E.P.; OPLINGER, J.A.; FURFINE, E.S.; KIFF, R.J.; LASZLO, F.; WHITTLE, B.J.R. & KNOWLES, R.G. 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 272(8): 4959-63. 1997.
- GEE, A.P.; BOYLE, M.D.; MUNGER, K.L.; LAWMAN, M.J. & YOUNG, M. Nerve growth factor: stimulation of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80(23): 7215-8. 1983.
- GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D.; GUINGAMP, C.; TERLAIN, B. & NETTER, P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Sci.*, 55(17): PL321-6. 1994.
- GEGOUT, P.; GILLET, P.; TERLAIN, B. & NETTER, P. Zymosan-induced arthritis in rats: effects of antiinflammatory drugs. *Life Sci.*, 56(20): PL389-94. 1995.
- GEORGITIS, J.W.; STONE, B.D. & GOTTSCHLICH, G. Inflammatory cells and mediator release during ragweed challenge: correlation between histamine content in nasal secretions and appearance of inflammatory cells. *Ann. Allergy*, 68(5): 413-8. 1992.
- GROPER, P.R.; JOOS, G.F.; MEKEIRELE, K. & PAUWELS, R.A. Role of 5-HT in neurogenic inflammation in Fisher 344 rat airways. *Eur. J. Pharmacol.*, 324(2-3): 249-55. 1997.
- GIBSON, A.; BABBEDGE, R.; BRAVE, S.R.; HART, S.L.; HOBBS, A.J.; TUCKER, J.F.; WALLACE, P. & MOORE, P.K. An investigation of some S-nitrosothiols, and of hydroxy-arginine, on the mouse anococcygeus. *Br. J. Pharmacol.*, 107(3): 715-21. 1992.
- GIMBRONE, M.A.; BROCK, A.F. & SCHAFER, A.I. Leukotriene B₄ stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to culture vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 74(4): 1552-5. 1984.
- GLAUM, S.R.; PROUDFIT, H.K. & ANDERSON, E.G. 5-HT₃ receptors modulate spinal nociceptive reflexes. *Brain Res.*, 510(1): 12-6. 1990.
- GLEN, E.M.; GRAY, J. & KOOYERS, W. Chemical changes in adjuvant-induced polyarthritis of rats. *Am. J. Vet. Res.*, 26(114): 1195-203. 1965.

- GLUCKMAN, T.L.; GROSSMAN, J.E.; FOLTS, J.D. & KRUSE-ELLIOTT, K.T. Regulation of leukocyte function by nitric oxide donors: the effect of S-nitrosothiol complexes. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, 61(1): 9-26. 2000.
- GOETZL, E.J. & PICKETT, W.C. The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxyl-eicosatetraenoic acids (HETEs). *J. Immunol.*, 125(4): 1789-91. 1980.
- GOGAS, K.R.; HOUGH, L.B.; EBERLE, N.B.; LYON, R.A.; GLICK, S.D.; WARD, S.J.; YOUNG, R.C. & PARSONS, M.E. A role for histamine and H₂-receptors in opioid antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 250(2): 476-84. 1989.
- GONZALES, R.; GOLDYNE, M.E.; TAIWO, Y.O. & LEVINE, J.D. Production of hyperalgesic prostaglandins by sympathetic postganglionic neurons. *J. Neurochem.*, 53(5): 1595-8. 1989.
- GOZZARD, N.; HERD, C.M.; BLAKE, S.M.; HOLBROOK, M.; HUGHES, B.; HIGGS, G.A. & PAGE, C.P. Effects of theophylline and rolipram on antigen-induced airway responses in neonatally immunized rabbits. *Br. J. Pharmacol.*, 117(7): 1405-12. 1996.
- GRABOWSKI, P.S.; ENGLAND, A.J.; DYKHUIZEN, R.; COPLAND, M.; BENJAMIN, N.; REID, D.M. & RALSTON, S.H. Elevated nitric oxide production in rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 39(4): 643-7. 1996.
- GRAHAM, B.A.; HAMMOND, D.L. & PROUDFIT, H.K. Differences in the antinociceptive effects of alpha-2 adrenoceptor agonists in two substrains of Sprague-Dawley rats. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 283(2): 511-9. 1997.
- GRAHAM, B.A.; HAMMOND, D.L. & PROUDFIT, H.K. Synergistic interactions between two α_2 -adrenoceptor agonists, dexmedetomidine and ST-91, in two substrains of Sprague-Dawley rats. *Pain*, 85: 135-43. 2000.
- GRANADOS-SOTO, V.; RUFINO, M.O.; LOPES, L.D.G. & FERREIRA, S.H. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception in morphine in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.*, 340: 177-80. 1997.
- GREEN, K.L. The antiinflammatory effect of catecholamines in the peritoneal cavity and hind paw of the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, 45: 322-32. 1972.
- GREEN, K.L. Role of endogenous catecholamines in the antiinflammatory activity of α -adrenoceptor blocking agents. *Br. J. Pharmacol.*, 51: 45-53. 1974.

- GRETEN, T.F.; EIGLER, A.; SINHA, B.; MOELLER, J. & ENDRES, S. The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram differentially regulates the proinflammatory mediators TNF- α and nitric oxide. *Int. J. Immunopharmacol.*, 17(7): 605-10. 1995.
- GRIFFITHS, R.J.; LI, S.W.; WOOD, B.E. & BLACKHAM, A. A comparison of the anti-inflammatory activity of a selective 5-lipoxygenase inhibitors with dexamethasone and colchicine in a model of zymosan induced inflammation in the rat knee joint and peritoneal cavity. *Agents Actions*, 32(3-4): 312-20. 1991.
- GRIFFITHS, R.J. Characterisation and pharmacological sensitivity of antigen arthritis induced by methylated bovine serum albumin in the rat. *Agents Actions*, 35(1-2): 88-95. 1992.
- GRIFFITHS, R.J.; PETTIPHER, E.R.; KOCH, K.; FARRELL, C.A.; BRESLOW, R.; CONKLYN, M.J.; SMITH, M.A.; HACKMAN, B.C.; WIMBERLY, D.J.; MILICI, A.J.; SCAMPOLI, D.N.; CHENG, J.B.; PILLAR, J.S.; PAZOLES, C.J.; DOHERTY, N.S.; MELVIN, L.S.; REITER, L.A.; BIGGARS, M.S.; FALKNER, F.C.; MITCHELL, D.Y.; LISTON, T.E. & SHOWELL, H.J. Leukotrienes B₄ plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 517-21. 1995.
- GRIFFITHS, R.J.; SMITH, M.A.; ROACH, M.L.; STOCK, J.L.; STAM, E.J.; MILICI, A.J.; SCAMPOLI, D.N.; ESKRA, J.D.; BYRUM, R.S.; KOLLER, B.H. & McNEISH, J.D. Collagen-induced arthritis is reduced in 5-lipoxygenase-activating protein-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 185(6): 1123-9. 1997.
- GRIGG, P.; SCHAIBLE, H.G. & SCMDIT, R.F. Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee. *J. Neurophysiol.*, 55(4): 635-43. 1986.
- GRISWOLD, D.E.; WEBB, E.F.; BRETON, J.; WHITE, J.R.; MARSHALL, P.J. & TORPHY, T.J. Effect of selective phosphodiesterase type IV inhibitor, rolipram, on fluid and cellular phases of inflammatory response. *Inflammation*, 17(3): 333-44. 1993.
- GURSEL, T.; FIRAT, S. & ERCAN, Z.S. Increased serum leukotriene B₄ level in the active stage of rheumatoid arthritis in children. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 56(3): 205-7. 1997.
- HABLER, H.J.; JANIG, W. & KOLTZENBURG, M. A novel type of unmyelinated chemosensitive nociceptor in the acutely inflamed urinary bladder. *Agents Actions*, 25(3-4): 219-21. 1988.
- HARBUZ, M.S.; PERVEEN-GILL, Z.; LALIES, M.D.; JESSOP, D.S.; LIGHTMAN, S.L. & CHOWDREY, H.S. The role of endogenous serotonin in adjuvant-arthritis in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 35(2): 112-6. 1996.

- HARBUZ, M.S.; MARTI, O.; LIGHTMAN, S.L. & JESSOP, D.S. Alteration of central serotonin modifies onset and severity of adjuvant-arthritis in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 37(10): 1077-83. 1998.
- HARRIS, E.D. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *New Eng. J. Med.*, 322(18): 1277-89. 1990.
- HARRIS, R.R.; CARTER, G.W.; BELL, R.L. MOORE, J.L. & BROOKS, D.W. Clinical activity of leukotriene inhibitors. *Int. J. Immunopharmacol.*, 17(2): 147-56. 1995.
- HASCELIK, G.; SENER, B. & HASCELIK, Z. Effect of some anti-inflammatory drugs on human neutrophils chemotaxis. *J. Int. Med. Res.*, 22(2): 100-6. 1994.
- HAY, C. & BELLEROCHE, J. Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclooxygenase-2 expression in spinal cord. *Neuroreport*, 8(5): 1249-51. 1997.
- HE, L.K.; LIU, L.H.; HAHN, E. & GAMELLI, R.L. The expression of cyclooxygenase and the production of prostaglandin E2 in neutrophils after burn injury and infection. *J. Burn Care Rehabil.*, 22(1): 58-64. 2001.
- HENDERSON, W.R. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann. Inter. Med.*, 121(9): 684-97. 1994.
- HENDERSON, B. & HIGGS, G.A. Synthesis of arachidonate oxidation products by synovial joint tissues during the development of chronic erosive arthritis. *Arth. Rheum.*, 30(10): 1149-56. 1987.
- HENRICKS, P.A. & NIJKAMP, F.P. Pharmacological modulation of cell adhesion molecules. *Eur. J. Pharmacol.*, 344(1): 1-13. 1998.
- HERZBERG, U.; ELIAV, E.; DORSEY, J.M. GRACEY, R.H. & KOPIN, I.J. NGF involvement in pain induced by chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Neuroreport*, 8(7): 1613-8. 1997.
- HILL, S.J.; GANELLIN, C.R.; TIMMERMAN, H.; SCHWARTZ, J.C.; SHANKLEY, N.P.; YOUNG, J.M.; SCHUNACK, W.; LEVI, R. & HAAS, H.L. International Union of Pharmacology: Classification of Histamine Receptors. *Pharmacol. Rev.*, 49(3): 253-278. 1997.
- HILLIQUIN, P.; DULIOUST, A.; GREGOIR, C.; ARNOUX, A. & MENKES, C.J. Production of PAF-Acether by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis. *Inflamm. Res.*, 44(8): 313-6. 1995.

- HILLIQUIN, P.; BORDERIE, D.; HERNVANN, A.; MENKÈS, C.J. & EKINDJIAN, O.G. Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.*, 40(8): 1512-7. 1997.
- HOFF, T.; DeWITT, D.; KAEVER, V.; RESCH, K. & GOPPELT-STRUEBE, M. Differentiation-associated expression of prostaglandin G/H synthase in monocytic cells. *FEBS Lett.*, 320(1): 38-42. 1993.
- HOLM, P.; KANKAANRANTA, H.; METSÄ-KETELÄ, T & MOILANEN, E. Radical properties of nitric oxide donors GEA 3162, SIN-1 and S-nitroso-N-acetylpenicillamine. *Eur. J. Pharmacol.*, 346: 97-102. 1998.
- HOLSCHER, C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci.*, 20(7): 298-303. 1997.
- HOLTHUSEN, H. & ARNDT, J. Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. *Neurosci. Lett.*, 165(1-2): 71-4. 1994.
- HOUGH, L.B.; NALWALK, J.W.; LEURS, R.; MENGE, W.M.P.B. & TIMMERMAN, H. Antinociceptive activity of impentamine, a histamine congener, after CNS administration. *Life Sci.*, 64(5): PL79-86. 1999.
- HOWE, J.R.; WANG, J.Y. & YAKSH, T.L. Selective antagonism of the antinociceptive effect of intrathecally applied alpha adrenergic agonists by intrathecal prazosin and intrathecal yohimbine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 224(3): 552-8. 1983.
- HOYER, D.; CLARKE, D.E.; FOZARD, J.R.; HARTIG, P.R.; MARTIN, G.R.; MYLECHARANE, E.J.; SAXENA, P.R. & HUMPHREY, P.P.A. International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.*, 46(2): 157-203. 1994.
- HUGLI, T.E. & MÜLLER-EBERHARD, H.J. Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Adv. Immunol.*, 26: 1-53. 1978.
- HUGLI, T.E.; GERARD, C.; KAWAHARA, M.; SCHEETZ, M.E.; BARTON, R.; BRIGGS, S.; KOPPEL, G. & RUSSELL, S. Isolation of three separate anaphylatoxins from complement-activated human serum. *Mol. Cell Biochem.*, 41: 59-66. 1981.
- HWANG, S.W.; CHO, H.; KWAK, J.; LEE, S.Y.; KANG, C.J.; JUNG, J.; CHO, S.; MIN, K.H.; SUH, Y.G. & OH, U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97(11): 6155-60. 2000.
- IALENTI, A.; MONCADA, S. & di ROSA, M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 701-6. 1993.

- ICHINOSE, M.; BELVISI, M.G. & BARNES, P.J. Histamine H₃-receptors inhibit neurogenic microvascular leakage in airways. *J. Appl. Physiol.*, 68: 21-5. 1990.
- IDÄNPÄÄN-HEIKILLA, J.J.; KALSO, E.A. & SEPPALA, T. Antinociceptive actions of dexmedetomidine and the kappa-opioid agonist U-50, 488H against noxious thermal, mechanical and inflammatory stimuli. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 271(3): 1306-13. 1994.
- IGNARRO, L.J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30: 535-60. 1990
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E. & CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(24): 9265-9. 1987.
- INOUE, T.; MASHIMO, T.; SHIBUTA, S. & YOSHIYA, Y. Intrathecal administration of a new nitric oxide donor, NOC-18, produces acute thermal hyperalgesia in the rat. *J. Neurol. Sci.*, 153(1): 1-7. 1997.
- JAIN, N.K.; KULKARNI, S.K. & SINGH, A. Role of cysteinyl leukotrienes in nociceptive and inflammatory conditions in experimental animals. *Eur. J. Pharmacol.*, 423(1): 85-92. 2001.
- JANIG, W. & KOLTZENBURG, M. On the function of spinal primary afferent fibres supplying colon and urinary bladder. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 30: S89-96. 1990.
- JANIG, W.; LEVINE, J.D. & MICHAELIS, M. Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog. Brain Res.*, 113: 161-84. 1996.
- JOHNSON, A.R.; HUGLI, T.E. & MÜLLER-EBERHARD, H.J. Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a. *Immunology*, 28(6): 1067. 1975.
- JORDAN, J.A.; GUO, R.F.; YUN, E.C.; SARMA, V.; WARNER, R.L.; CROUCH, L.D.; SENALDI, G.; Ulich, T.R. & WARD, P.A. Role of IL-18 in acute lung inflammation. *J. Immunol.*, 167(12): 7060-8. 2001.
- JOUZEAU, J.Y.; TERLAIN, B.; ABID, A.; NÉDÉLEC, E. & NETTER, P. Cyclooxygenase isoenzymes. *Drugs*, 53(4): 563-82. 1997.
- KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E.; TUOMIRANTA, T.; KORPELA, M.; YLIKERTTULA, U.; ISOMAKI, H. & VAPAATALO, H. Peripheral blood neutrophil leukotriene B₄ release and migration in rheumatoid arthritis. *Inflammation*, 20(5): 513-22. 1996.

- KAPLAN, S.S.; BILLIAR, T.; CURRAN, R.D.; ZDZIARSKI, U.E. SIMMONS, R.L. & BASFORD, R. Inhibition of chemotaxis N^G-monomethyl -L-arginine: a role for cyclic GMP. *Blood*, 74(6): 1885-7. 1989.
- KAWAKAMI, M.; MATSUMOTO, T. & TAMAKI, T. Roles of thromboxane A₂ and leukotriene B₄ in radicular pain induced by herniated nucleus pulposus. *J. Orthop. Res.*, 19: 472-7. 2001.
- KAYSER, V.; BESSON, J.M. & GUILBAUD, G. Evidence for a noradrenergic component in the antinociceptive effect of the analgesic agent tramadol in an animal model of clinical pain, the arthritic rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 224: 83-8. 1992.
- KEYSTONE, E.C.; SCHORLEMMER, H.U. POPE, C. & ALLISON, A.C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthr. Rheum.*, 20(7): 1396-1401. 1977.
- KHALIL, Z.; LIU, T. & HELME, R.D. Free radicals contribute to the reduction in peripheral vascular response and the maintenance of thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury. *Pain*, 79: 31-7. 1999.
- KHASAR, S.G.; MIAO, F.J. & LEVINE, J.D. Inflammation modulates the contribution of receptor-subtype to bradykinin-induced hyperalgesia in the rat. *Neuroscience*, 69(2): 685-90. 1995.
- KHEIFETS, J.; THIEME, T.; MIRKOVICH, A. & ACKERMAN, N. The effects of histamine and serotonin on polymorphonuclear leukocyte. *Eur. J. Pharmacol.*, 128(3): 179-86. 1986.
- KIELY, P.D.; GILLESPIE, K.M. & OLIVEIRA, D.B. Oxypentifylline inhibits tumor necrosis factor- α mRNA transcription and protects against arthritis in mercurio chloride-treated brown Norway rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 25(10): 2899-906. 1995.
- KINDGEN-MILLES, D. Effects of prostaglandin E₂ on the intensity of bradykinin-evoked pain from skin and veins of humans. *Eur. J. Pharmacol.*, 294: 491-6. 1995.
- KINDGEN-MILLES, D. & ARNDT, J.O. Nitric oxide as a chemical link in generation of pain from veins in humans. *Pain*, 64: 139-42. 1996.
- KLEMM, P.; HARRIS, H.J. & PERRETTI, M. Effect of rolipram in a murine model of acute inflammation: comparison with the corticoid dexamethasone. *Eur. J. Pharmacol.*, 281: 69-74. 1995.
- KLICKSTEIN, L.B.; SHAPLEIGH, C & GOETZL, E.J. Lipoxygenation of arachidonic acid as a source of polymorphonuclear leukocyte chemotactic factors in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *J. Clin. Invest.*, 66(5): 1166-70. 1980.

- KOBAYASHI, T.; TAKEHANA, Y.; SHINAGAWA, K.; TSUYUKI, S.; TOKUTAKE, Y.; SATO, M. & MOMOSE, D. Pharmacological characterization of a novel long-acting histamine H₁ receptor antagonist, KAA-276. *Biol. Pharm. Bull.*, 21(4): 350-5. 1998a.
- KOBAYASHI, T.; TAKEHANA, Y.; SHINAGAWA, K.; TSUYUKI, S.; TOKUTAKE, Y.; SATO, M. & MOMOSE, D. Effects of inhaled KAA-276, a selective histamine H₁ receptor antagonist, on antigen- and histamine-induced bronchoconstriction in animals. *Arzneimittelforschung*, 48(8): 826-31. 1998b.
- KOLTZENBURG, M. & McMAHON, S.B. Plasma extravasation in the rat urinary bladder following mechanical, electrical and chemical stimuli: evidence for a new population of chemosensitive primary sensory afferents. *Neurosci. Lett.*, 72(3): 352-6. 1986.
- KONNO, S. & TSURUFUJI, S. Induction of zymosan-air-pouch inflammation in rats and its characterization with reference to the effects of anticomplementary and antiinflammatory agents. *Br. J. Pharmacol.*, 80(2): 269-77. 1983.
- KOSONEN, O.; KANKAANRANTA, H.; MALO-RANTA, U. & MOILANEN, E. Nitric oxide-releasing compounds inhibit neutrophils adhesion to endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 382(2): 111-7. 1999.
- KOSONEN, O.; KANKAANRANTA, H.; UOTILA, J. & MOILANEN, E. Inhibition by nitric oxide-releasing compounds of E-selectin expression neutrophil adhesion to human endothelial cells. *Er. J. Pharmacol.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 394(1): 149-56. 2000.
- KUBES, P.; SUZUKI, M. & GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4651-5. 1991.
- KUBES, P.; KANWAR, S.; NIU, X.F. & GABOURY, J.P. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocytes adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB J.*, 7(13): 1293-9. 1993.
- KUIJPERS, T.W.; van den BERG, J.M.; TOOL, A.T. & ROOS, D. The impact of platelet-activating factor (PAF)-like mediators on the functional activity of neutrophils: antiinflammatory effects of human PAF-acetylhydrolase. *Clin. Exp. Immunol.*, 123(3): 412-20. 2001.
- KUWABARA, K.; YASUI, K.; JYOYAMA, H.; MARUYAMA, Y.; FLEISCH, J.H. & HORI, Y. Effects of the second-generation leukotriene B₄ receptors antagonist, LY293111Na, on leukocyte infiltration and collagen-induced arthritis in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 402: 275-85. 2000.

- LAEMONT, K.D.; SCHAEFER, C.J.; JUNEAU, P.L. & SCHRIER, D.J. Effects of the phosphodiesterase inhibitor rolipram on streptococcal cell wall-induced arthritis in rats. *Intern. J. Immunopharmacol.*, 21: 711-25. 1999.
- LAMBERTI, C.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C.; MALMBERG-AIELLO, P. Investigation into the role of histamine receptors in rodent antinociception. *Pharmacol. Biochem. Beh.*, 53(3): 567-74. 1996.
- LAURETTI, G.R.; de OLIVEIRA, R.; REIS, M.P.; MATTOS, A.L. & PEREIRA, N.L. Transdermal nitroglycerine enhances spinal sufentanil postoperative analgesia following orthopedic surgery. *Anesthesiology*, 90(3): 734-9. 1999.
- LAWAND, N.B.; WILLIS, W.D. & WESTLUND, K.N. Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Neurorep.*, 8: 895-9. 1997.
- LEFER, D.J.; JONES, S.P.; GIROD, W.G.; BAINES, A.; GRISHAM, M.B.; COCKRELL, A.S.; HUANG, P.L. & SCALIA, R. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am. J. Pharmacol.*, 276(6 pt 2): H1943-50. 1999.
- LEURS, R.; BLANDINE, P.; TEDFORD, C. & TIMMERMAN, H. Therapeutic potential of histamine H₃ receptor agonists and antagonists. *Trends Pharmacol.*, 19: 177-83. 1998.
- LEVINE, J.D.; LAU, W.; KWIAT, G. & GOETZL, E.J. Leukotriene B₄ produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. *Sciences*, 225(4663): 743-5. 1984.
- LEVINE, J.D.; MOSKOWITZ, M.A. & BASBAUM, A.I. The contribution of neurogenic inflammation in experimental arthritis. *J. Immunol.*, 135(2 Supp.): 843S-7S. 1985a.
- LEVINE, J.D.; GOODING, J.; DONATONI, P.; BORDEN, L. & GOETZL, E.J. The role of the polymorphonuclear leukocyte in hyperalgesia. *J. Neurosci.*, 5(11): 3025-9. 1985b.
- LEVINE, J.D.; LAM, D.; TAIWO, Y.O.; DONATONI, P. & GOETZL, E.J. Hyperalgesic properties of 15-lipoxygenase products of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(14): 5331-4. 1986a.
- LEVINE, J.D.; TAIWO, Y.; COLLINS, S. & TAM, J. Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminal rather than activation of primary afferent nociceptors. *Nature*, 323: 158-9. 1986b.

- LEVINE, J.D.; CODERRE, T.J.; HELMS, C. & BASBAUM, A.I. β 2-adrenergic mechanisms in experimental arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(12): 4553-6. 1988.
- LEVY, D. & ZOCHODNE, D.W. Local nitric oxide synthase activity in a model of neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci.*, 10(5): 1846-55. 1998.
- LEVY, D.; HOKE, A. & ZOCHODNE, D.W. Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. *Neurosc. Lett.*, 260(3): 207-9. 1999.
- LEWIN, G.R.; RUEFF, A. & MENDELL, L.M. Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.*, 6(12): 1903-12. 1994.
- LIN, H.C.; WANG, C.H.; YU, C.T.; HWANG, K.S. & KUO, H.P. Endogenous nitric oxide inhibits neutrophil adherence to lung epithelial cells to modulate interleukin-8 release. *Life Sci.*, 69: 1333-44. 2001.
- LIU, S.F.; CRAWLEY, D.E.; ROHDE, J.A.L.; EVANS, T.W. & BARNES, P.J. Role of nitric oxide and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate in mediating nonadrenergic, noncholinergic relaxation in guinea-pig pulmonary arteries. *Br. J. Pharmacol.*, 107: 861-6. 1992.
- LIU, T.; KNIGHT, K.R. & TRACEY, D.J. Hyperalgesia due to nerve injury – role of peroxynitrite. *Neuroscience*, 97: 125-31. 2000.
- LOESER, J.D. & MELZACK, R. Pain: an overview. *Lancet*, 353: 1607-9. 1999.
- MacKAY, C.R. & IMHOF, B.A. Cell adhesion in the immune system. *Immunol. Tod.*, 14(3): 99-102. 1993.
- MacINTYRE, I.; ZAIDI, M.; ALAM, A.S.M.T.; DATTA, H.K.; MOONGA, B.S.; LIDBURY, P.S.; HECKER, M. & VANE, J.R. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2936-40. 1991.
- MADDEN, K.S.; FELTEN, S.Y.; FELTEN, D.L.; HARDY, C.A. & LIVNAT, S. Sympathetic nervous system modulation of the immune system. II. Induction of lymphocyte proliferation and migration *in vivo* by chemical sympathectomy. *J. Neuroimmunol.*, 49(1-2): 67-75. 1994.
- MAGALHÃES, J.F.G.; VIANA, C.F.G.; ARAGÃO, Jr., A.G.M.; MORAES, V.G.; RIBEIRO, R.A. & VALE, M.R. Analgesic and antiinflammatory activities of *Ageratum conyzoides* in rats. *Phytother. Res.*, 11: 183-8. 1997.

- MALMBERG, A.B. & YAKSH, T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science*, 257(5074): 1276-9. 1992a.
- MALMBERG, A.B. & YAKSH, T.L. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal antiinflammatory agents on the formalin test in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 263(1): 136-46. 1992b.
- MALMBERG, A.B. & YAKSH, T.L. Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U50488H, and L-PIA on the formalin test and an isobolographic analysis of the NSAID interaction. *Anesthesiology*. 79(2): 211-3. 1993.
- MALMBERG, A.B. & YAKSH, T.L. Antinociception produced by spinal delivery of the S and R enantiomers of flurbiprofen in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.*, 256(2): 205-9. 1994.
- MALMBERG-AIELLO, P.; LAMBERTI, C.; IPPONI, A.; BARTOLINI, A. & SCHUNACK, W. Evidence for hypernociception induction following histamine H₁ receptor activation in rodents. *Life Sci.*, 63(6): 463-76. 1998.
- MALONEY, C.G.; KUTCHERA, W.A.; ALBERTINE, K.H.; McINTYRE, T.M.; PRESCOTT, S.M. & ZIMMERMAN, G.A. Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. 160(3): 1402-10. 1998.
- MARTINS, M.A.; SILVA, P.M.; FARIA NETO, H.C.; BOZZA, P.T.; DIAS, P.M.; LIMA, M.C.; CORDEIRO, R.S. & VARGAFTIG, B.B. Pharmacological modulation of PAF-induced rat pleurisy and its role in inflammation by zymosan. *Br. J. Pharmacol.*, 96(2): 363-71. 1989.
- MASUE, T.; DOHI, S.; ASANO, T & SHIMONAKA, H. Spinal antinociceptive effect of epidural nonsteroidal antiinflammatory drugs on nitric oxide-induced hyperalgesia in rats. *Anesthesiology*, 91: 198-206. 1999.
- MASUR, K.; NIGGEMANN, B.; ZANKER, K.S. & ENTSCHLADEN, F. Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by β -blockers. *Cancer Res.*, 61(7): 2866-9. 2001 .
- MATSUBARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. & HUANG, Z. UK-14,304, R(-)- α -methylhistamine and SMS 201-995 block plasma protein leakage within dura mater by prejunctional mechanism. *Eur. J. Pharmacol.*, 224: 145-50. 1992.
- MATSUMOTO, H.; NARABA, H.; UENO, A.; FUJIYOSHI, T.; MURAKAMI, M.; KUDO, I. & OH-ISHI, S. Induction of cyclooxygenase-2 causes an enhancement of writhing response in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 352: 47-52. 1998.

- McCALL, T.B.; BOUGHTON-SMITH, N.K.; PALMER, R.M.; WHITTLE, B.J. & MONCADA, S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem. J.*, 261(1): 293-6. 1989.
- McCALL, R.B. & CLEMENT, M.E. Role of serotonin_{1A} and serotonin₂ receptors in the central regulation of the cardiovascular system. *Pharmacol. Rev.*, 46(3): 231-43. 1994.
- McCARTNEY-FRANCIS, N.; ALLEN, J.B.; MIZEL, D.E.; ALBINA, J.E.; XIE, Q.W.; NATHAN, C.F. & WAHL, S.M. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.*, 178: 749-54. 1993.
- McEVER, R.P. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4(5): 840-9. 1992
- McINNES, I.B.; LEUNG, B.P.; FIELD, M.; WEI, X.Q.; HUANG, F.P.; STURROCK, R.D.; KINNINMONTH, A.; WEIDNER, J.; MUNFORD, R. & LIEW, F.Y. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J. Exp. Med.*, 184: 1519-24. 1996.
- McMAHON, S. & KOLTZENBURG, M. The changing role of primary afferent neurones in pain. *Pain*, 43(3): 269-72. 1990.
- McMAHON, S.B. NGF as a mediator of inflammatory pain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 351(1338): 431-40. 1996.
- MELLER, S.T. & GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain*, 55(3): 401-3. 1993.
- MEYER, R.A. & CAMPBELL, J.N. A novel electrophysiological technique for locating cutaneous nociceptive and chemospecific receptors. *Brain Res.*, 441(1-2): 81-6. 1988.
- MIYASAKA, N. & HIRATA, Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci.*, 61(21): 2073-81. 1997.
- MOBARAKEH, J.I.; SAKURADA, S.; KATSUYAMA, S.; KUTSUWA, M.; KURAMASU, A.; LIN, Z.Y.; WATANABE, T.; HASHIMOTO, Y.; WATANABE, T. & YANAI, K. Role of histamine H₁ receptor in pain perception: a study of the receptor gene knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 391: 81-9. 2000.
- MOHAUPT, M.G.; ELZIE, J.L.; AHN, K.Y.; CLAPP, W.L.; WILCOX, C.S. & KONE, B.C. Differential expression and induction of mRNA encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int.*, 46(3): 653-65. 1994.

- MONASCHY, M.S.; ZINSMEISTER, A.R.; STEVENS, C.W. & YAKSH, T.L. Interactions of intrathecal morphine and ST-91 on antinociception in the rat: dose-response analysis, antagonism and clearance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 154(2): 283-92. 1990.
- MONCADA, S.; FERREIRA, S.H. & VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin biosynthesis as the mechanism of analgesia of aspirin-like drugs in the dog knee joint. *31(2)*: 250-60. 1975.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J. & HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43(2): 109-41. 1991.
- MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P. & HART, S.L. L-N^G-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, 102: 198-202. 1991.
- MOORE, A.R. & WILLOUGHBY, D.A. The role of cAMP regulation in controlling inflammation. *Clin. Exp. Immunol.*, 101(3): 387-9. 1995.
- MORAES, V.L.G.; SINGER, M.; VARGAFTIG, B.B. & CHIGNARD, M. Effects of rolipram on cyclic AMP levels in alveolar macrophages and lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse lung. *Br. J. Pharmacol.*, 123(4): 631-6. 1998.
- MULLER-PEDDINGHAUS, R.; KOHLSDORFER, C.; THEISEN-POPP, P.; FRUCHTMANN, R.; PERZBORN, E.; BECKERMANN, B.; BUHNER, K.; AHR, H.J. & MOHRS, K.H. Bay X1005, a new inhibitor of leukotriene synthesis: *in vivo* inflammation pharmacology and pharmacokinetics. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 267(1): 51-7. 1993.
- NACCACHE, P.H.; MOLSKI, T.F.; BERGEAT, P. & SHA'AFI, R.I. Mechanism of action of leukotriene B₄: intracellular calcium redistribution in rabbit neutrophils. *J. Cell Physiol.*, 118(1): 13-8. 1984.
- NAKAMURA, M. *Estudo do efeito periférico de neurotransmissores e íons na resposta a estimulação nociva na cobaia acordada*. Ribeirão Preto. 133p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 1984.
- NAKAMURA, M. & LICO, M.C. Mechanism of peripheral pain in the conscious guinea pig: effect of propranolol. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 19: 451-3. 1986.
- NAKAMURA M. & FERREIRA S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.*, 135(2):145-53. 1987.
- NAKAMURA, A.; FUJITA, M. & SHIOMI, H. Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanisms of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, 117(3): 407-12. 1996.

- NAVIKAS, V.; MATUSEVICIUS, D.; SODERSTROM, M.; PIRSKANEN, R.; FREDRIKSON, S. & LINK, H. The phosphodiesterase i.v. inhibitor rolipram *in vitro* reduces the numbers of MBP-reactive IFN- γ and TNF- α mRNA expressing blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.*, 21(4): 236-44. 1998.
- NEUGEBAUER, V.; SCHAIBLE, H.G.; HE, X.; LUCKE, T.; GUNDLING, P. & SSCHMIDT, R.F. Electrophysiological evidence for a spinal antinociceptive action of dipyrone. *Agents Actions*, 41 (1-2): 62-70. 1994.
- NIU, X.F.; SMITH, C.W. & KUBES, P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ. Res.*, 74: 1133-40. 1994.
- NOMURA, H.; SATO, E.; KOYAMA, S.; HANIUD, M.; KUBO, K.; NAGAI, S. & IZUMI, T. Histamine stimulates alveolar macrophages to release neutrophils and monocyte chemotactic activity. *J. Lab. Clin. Med.*, 138(4): 226-35. 2001.
- NYMAN, U.; MUSSENER, A.; LARSSON, E.; LORENTZEN, J. & KLARESKOG, L. Ameliorate of collagen II-induced arthritis in rats by the type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram. *Clin. Exp. Immunol.*, 108: 415-9. 1997.
- OCHI, T. & GOTO, T. The antinociceptive effect induced by FR140423 is mediated through spinal 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 409: 167-72. 2000.
- OCHI, T. & GOTO, T. Antiinflammatory activity of a novel selective cyclooxygenase-2 inhibitor, FR140423, on type II collagen-induced arthritis in Lewis rats. *Prostag. Other Lipid Mediat.*, 66(4): 317-27. 2001.
- O'DUFFY, G. & CHAHL, L.A. Effect of catecholamines on oedema induced by inflammatory agents in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 57: 377-86. 1979.
- OMOTE, K.; HAZAMA, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAKABAYA, Y.; TORIYABE, M. & NAMIKI, A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. *Brain Res.*, 912: 171-5. 2001.
- OSBORNE, M.G. & CODERRE, T.J. Effects on intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, 126: 1840-6. 1999.
- OSSIPOV, M.H.; SUAREZ, L.J. & SPAULDING, T.C. A comparison of the antinociceptive and behavioral effects of intrathecally administered opiates, α_2 -adrenergic agonists, and local anesthetics in mice and rats. *Anesth. Analg.*, 67(7): 616-24. 1988.

- OSWALD, I.P.; ELTOUM, I.; WYNN, T.A.; SCHWARTZ, B.; CASPAR, P.; PAULIN, D.; SHER, A. & JAMES, S.L. Endothelial cells are activated by cytokines treatment to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni*, through the production of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(3): 999-1003. 1994.
- PALMBLAD, J.; GYLLENHAMMR, H.; LINDGREN, J.A. & MALMSTEN, C.L. Effects of leukotrienes and f-Met-Leu-Phe on oxidative metabolism of neutrophils and eosinophils. *J. Immunol.*, 132(6): 3041-5. 1984.
- PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neurosci.*, 102(4): 937-44. 2001.
- PATNAIK, R.; MOHANTY, S. & SHARMA, H.S. Blockade of histamine H₂ receptors attenuate blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow disturbance, edema formation and cell reactions following hyperthermic brain injury in the rat. *Acta Neurochir. Suppl.*, 76: 535-9. 2000.
- PATRONO, C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N. Eng. J. Med.*, 330(18): 1287-94. 1994.
- PAUL-CLARK, M.J.; GILROY, D.W.; WILLIS, D.; WILLOUGHBY, D.A. & TOMLINSON, A. Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. *J. immunol.*, 166: 1169-77. 2001.
- PAULSON, S.K.; ZHANG, J.Y.; BREAU, A.P.; HRIBAR, J.D.; KIU, N.W.K.; JESSEN, S.M.; LAWAL, Y.M.; COGBURN, J.N.; GRESK, C.J.; MARKOS, C.S.; MAZIASZ, T.J.; SCHOENHARD, G.L. & BURTON, E.G. Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats. *Drugs Met. Disp.*, 28(5): 514-21. 2000.
- PAZDRAK, K.; GORSKI, P. & RUTA, U. Inhibitory effect of levocabastine on allergen-induced increase of nasal reactivity to histamine and cell influx. *Allergy*, 48(8): 598-601. 1993.
- PENG, Y.I.; LIU, H.J.; GUO, L. & FU, T.C. Mechanisms of adrenaline-induced antinociception in mice. *Chin. J. Physiol.*, 35(3): 205-10. 1992.
- PERKINS, N.M. & TRACEY, D.J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neurosci.* 101 (3): 745-57. 2000.
- PERMIN, H.; SKOV, P.S.; NORN, S.; GEISLER, A.; KLYSNER, R.; ANDERSON, V.; WIJK, A.; MANTHORPE, R.; NIELSEN, H. & PETERSEN, J. Possible role of histamine in rheumatoid arthritis. Treatment with cimetidine and mepyramine. *Allergy*, 36(6): 435-6. 1981.

- PERRETTI, M.; SOLITO, E. & PARENTE, L. Evidence that endogenous interleukin-1 is involved in leukocyte migration in acute experimental inflammation in rats and mice. *Agents Actions*, 35(1-2): 71-8. 1992.
- PETTIPHER, E.R.; HENDERSON, B.; EDWARDS, J.C. & HIGGS, G.A. Effect of indomethacin on swelling, lymphocyte influx, and cartilage proteoglycan depletion in experimental arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 48(8): 623-7. 1989.
- PETTIPHER, E.R. & SALTER, E.D. Resident joint tissue, rather than infiltrating neutrophils and monocytes, are the predominant sources of TNF- α in zymosan-induced arthritis. *Cytokine*, 8(2): 130-3. 1996.
- PETTIPHER, E.R.; LABASI, J.M.; SALTER, E.D.; STAM, E.J.; CHENG, J.B. & GRIFFITHS, R.J. Regulation of tumour necrosis factor production by adrenal hormones *in vivo*: insights into the antiinflammatory activity of rolipram. *Br. J. Pharmacol.*, 117(7): 1530-4. 1996.
- PIERCE, P.A.; XIE, G.X.; PEROUTKA, S.J.; GREEN, P.G. & LEVINE, J.D. 5-hydroxytryptamine-induced synovial plasma extravasation is mediated via 5-hydroxytryptamine 2A receptors on sympathetic efferent terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275: 502-8. 1995.
- PIPER, P.J. Formation and actions of leukotrienes. *Physiol. Rev.*, 64(2): 744-61. 1984.
- POBER, J.S. & COTRAN, R.S. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*, 50(4): 537-44. 1990.
- PRABHAKAR, U.; LIPSHUTZ, D.; BARTUS, J.O.; SLIVJAK, M.J.; SMITH, E.F.; LEE, J.C. & ESSER, K.M. Characterization of cAMP-dependent inhibition of LPS-induced TNF- α production by rolipram, a specific phosphodiesterase IV (PDE IV) inhibitor. *Int. J. Immunopharmacol.*, 16(10): 805-16. 1994.
- PRADELLES, P.; GRASSI, J. MACLOUF, J. Enzyme of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal. Chem.*, 57(7): 1170-3. 1985.
- PRETE, P.E. & GURAKAR-OSBORNE, A. The contribution of synovial fluid lipoproteins to the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Prostaglandins*, 54(4): 689-98. 1997.
- QUINN, J.H. & BAZAN, N.G. Identification of prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ in the synovial fluid of painful, dysfunctional temporomandibular joints. *J. oral Maxillofac. Surg.*, 48(9): 968-71. 1990.
- RAE, S.A.; DAVIDSON, E.M. & SMITH, M.J.H. Leukotriene B₄, an inflammatory mediator in gout. *Lancet*, 2(8308): 1122-3. 1982.

- RAJA, S.N. Role of the sympathetic nervous system in acute pain and inflammation. *Ann. Med.*, 27(2): 241-6. 1995.
- RAJFER, J.; ARONSON, W.J.; BUSH, P.A.; DOREY, F.J. & IGNARRO, L.J. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *New Engl. J. Med.*, 326: 90-4. 1992.
- RAND, M.J. Nitrenergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 19(3): 147-69. 1992.
- RANDALL, L.O. & SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, CXI(4): 409-19. 1957.
- RANG, H.P.; BEVAN, S. & DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. *Br. Med. Bull.*, 47(3): 534-8. 1991.
- RANG, H.P.; DALE, M.M. & RITTER, J.M. *Farmacologia*. Penildon Silva (Trad.). 3^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 692p. 1995.
- RANKIN, J.A.; SYLVESTER, I.; SMITH, S.; YOSHIMURA, T. & LEONARD, E.J. Macrophages cultured *in vitro* release leukotriene B₄ and neutrophil attractant/activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *J. Clin. Invest.*, 86(5): 1556-64. 1990.
- RAO, J.S.; CURRIE, J.L. SHAFFER, A.E. & ISAKSON, P.C. *In vivo* characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. *J. Pharmacol., Exp. Ther.*, 269: 917-25. 1994.
- REDDY, S.V.; MADERDRUT, J.L. & YAKSH, T.L. Spinal cord pharmacology of adrenergic agonist-mediated antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 213(3): 525-33. 1980.
- REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; SCHULZ, R.; HODSON, H.F. & MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, 101: 746-52. 1990.
- RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.; POOLE, S. & FERREIRA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 387(1): 111-8. 2000.

- RIDGER, V.C.; PETTIPHER, E.R.; BRYANT, C.E. & BRAIN, S.D. Effect of the inducible nitric oxide synthase inhibitors aminoguanidine and L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine on zymosan-induced plasma extravasation in rat skin. *J. Immunol.*, 159: 383-90. 1997.
- RISTIMAKI, A; NARKO, K. & HLA, T. Down-regulation of cytokine-induced cyclooxygenase-2 transcript isoforms by dexametasone: evidence for post-transcriptional regulation. *Biochem. J.*, 318(Pt1): 325-31. 1996.
- RO, L. S.; CHEN, S.T.; TANG, L.M. & JACOBS, J.M. Effects of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Pain*, 79: 265-74. 1999.
- ROCHA, F.A.C.; ANDRADE, L.E.C. & JANCAR, S. Immune complex induced arthritis in rats: role of lipid mediators on cell infiltration. *Med. Inflamm.*, 5: 104-9. 1996.
- ROCHA, F.A.; ANDRADE, L.E.; RUSSO, M. & JANCAR, S. PAF modulates eicosanoids and TNF release in immune-complex arthritis in rats. *J. Lipid Mediat. Cell Signal*, 16(1): 1-10. 1997.
- ROCHA, F.A.C.; ARAGÃO, Jr., A.G.M.; OLIVEIRA, R.C.; POMPEU, M.M.L.; VALE, M.R. & RIBEIRO, R.A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflamm. Res.*, 48: 485-90. 1999.
- ROCHA, J.C.S. *Envolvimento do óxido nítrico na artrite induzida por zymosan em ratos*. Fortaleza. 129p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. 1999.
- ROULEAU, A.; GARBARG, M.; LIGNEAU, X.; MANTION, C.; LAVIE, P.; ADVENIER, C.; LECOMTE, J.M.; KRAUSE, M.; STARK, H.; SCHUNACK, W. & SCHWARTZ, J.C. Bioavailability, antinociceptive and antiinflammatory properties of BP 2-94, a histamine H₃ receptor agonist prodrug. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 281(2): 1085-94. 1997.
- RUMORE, M.M. & SCHLICHTING, D.A. Analgesic effects of antihistaminic. *Life Sci.*, 36(5): 403-16. 1985.
- SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TAN-NO, K.; YONEZAWA, A.; SAKURADA, S. & KISARA, K. Effect of spinal nitric oxide inhibition of capsaicin-induced nociceptive response. *Life Sci.*, 59(11): 921-30. 1996.
- SAKURAI, H.; KOHSAKA, H.; LIU, M.F.; HIGASHIYAMA, H.; HIRATA, Y.; KANNO, K.; SAITO, I. & MIYASAKA, N. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J. Clin. Invest.*, 96: 2357-63. 1995.

- SAMUELSSON, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, 220(4597): 568-75. 1983.
- SCHAIBLE, H.G. & GRUBB, B.D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*, 55(1): 5-54. 1993.
- SCHAIBLE, H.G. & SCHMIDT, R.F. Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. *J. Neurophysiol.*, 54(5): 1109-22. 1985.
- SCHPELMANN, K.; MESSLINGER, K.; SCHAIBLE, H.G. & SCHMIDT, R.F. Inflammatory mediators and nociception in the joint: excitation and sensitization of slowly conducting afferent fibers of cat's knee by prostaglandin I₂. *Neurosci.*, 50(1): 237-47. 1992.
- SCHIMMER, R.C.; SCHRIER, D.J.; FLORY, C.M.; DYKENS, J.; TUNG, D.K.; JACOBSON, P.B.; FRIEDL, H.P.; CONROY, M.C.; SCHIMMER, B.B. & WARD, P.A. Streptococcal cell wall-induced arthritis. Requirements for neutrophils, p-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and macrophage-inflammatory protein-2. *J. Immunol.*, 159(8): 4103-8. 1997.
- SCHULIGOI, R. Effect of colchicine on nerve growth factor-induced leukocyte accumulation and thermal hyperalgesia in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 358: 264-9. 1998.
- SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L. & ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91(25): 12013-7. 1994.
- SEKI, N.; SUDO, Y.; YOSHIOKA, T.; SUGIHARA, S.; FUJITSU, T.; SAKUMA, S.; OGAWA, T.; HAMAOKA, T.; SENOH, H. & FUJIWARA, H. Type II collagen-induced murine arthritis: induction and perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J. Immunol.*, 140(5): 1477-84. 1988.
- SEKUT, L.; YARNALL, D.; STIMPSON, S.A.; NOEL, L.S. BATEMAN-FITE, R.; CLARK, R.L.; BRACKEEN, M.F.; MENIUS Jr., J.A. & CONNOLLY, K.M. Antiinflammatory activity of phosphodiesterase (PDE)-IV inhibitors in acute and chronic models of inflammation. *Clin. Exp. Immunol.*, 100(1): 126-32. 1995.
- SEMMLER, J.; WACHTEL, H. & ENDRES, S. The specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram suppress tumor necrosis factor- α production by human mononuclear cells. *Int. J. Immunopharmacol.*, 15(3): 409-13. 1993.

- SHAFFER, J.E.; HAN, B.J.; CHERN, W.H. & LEE, F.W. Lack of tolerance to a 24-hour infusion of S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) in conscious rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 260(1): 286-93. 1992.
- SHARMA, H.S.; WINKLER, T.; STALBERG, E.; MOHANTY, S. & WESTMAN, J. *p*-Chlorophenylalanine, an inhibitor of serotonin synthesis reduces blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow, edema formation and cell injury following trauma to the rat brain. *Acta Neurochir. Suppl.*, 76: 91-5. 2000.
- SHIMIZU, T. & WOLFE, L.S. Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J. Neurochem.* 1-14. 1990.
- SHOWELL, H.J.; CONCLKYN, M.J.; ALPERT, P.; HINGORANI, G.P.; WRIGHT, K.F.; SMITH, M.A.; STAM, E.; SALTER, E.D.; SCAMPOLI, D.N.; MELTZER, S.; REITER, L.A.; KOCH, K.; PISCOPIO, A.D.; CORTINA, S.R.; LOPEZ-ANAYA, A.; PETTIPHER, E.R.; MILICI, A.J. & GRIFFITHS, R.J. The preclinical pharmacological profile of the potent and selective leukotriene B₄ antagonist CP-195543. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 285(3): 946-54. 1998.
- SINGH, R.J.; HOGG, N.; JOSEPH, J.; KONOREV, E. & KALYANARAMAN, B. The peroxy-nitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors. *Arch. Biochem. Biophys.*, 361(20): 331-9. 1999.
- SLOBODA, A.E.; BIRNBAUM, J.E.; ORONSKY, A.L. & KERWAR, S.S. Studies on type II collagen-induced polyarthritis in rats. Effect of antiinflammatory and antirheumatic agents. *Arthr. Rheum.*, 24(4): 616-24. 1981.
- SMITH, C.W.; ROTHLEIN, R.; HUGHES, B.J.; MARISCALCO, M.M.; RUDLOFF, H.E.; SCHMALSTIEG, F.C. & ANDERSON, D.C. Recognition of an endothelial determinant for a CD 18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J. Clin. Invest.*, 82(5): 1746-56. 1988.
- SMITH, C.W.; KISHINOTO, T.K.; ABBASSI, O.; HUGHES, B.; ROTHLEIN, R.; McINTIRE, L.V.; BUTCHER, E.; ANDERSON, D.C. & ABBASS, O. Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cell *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 87(2): 609-18. 1991.
- SOMMER, N.; LOSCHMANN, P.; NORTHOFF, G. WELLER, M.; STEINBRECHER, A.; STEINBACH, J.; LICHTENFELS, R.; MEYERMANN, R.; RIETHMULLER, A.; FONTANA, A.; DICHGANS, J. & MARTIN, R. The antidepressant rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Nature Med.*, 1: 244-8. 1995.
- SOUTHAM, E. & GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. *Neuropharmacol.*, 32(11): 1267-77. 1993.

- SOUZA, G.E. & FERREIRA, S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents Actions*, 17(1): 97-103. 1985.
- SPANGLER, R.S. Cyclooxygenase 1 and 2 in rheumatic disease: implications for nonsteroidal antiinflammatory drug therapy. *Seminars in Arth. Rheum.*, 26(1): 435-46. 1996.
- SPRINGER, T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346(6283): 425-34. 1990.
- STADLER, J.; STEFANOVIC-RACIC, M.; BILLIAR, T.R.; CURRAN, R.D.; McINTYRE, L.A.; GEORGESCU, H.I.; SIMMONS, R.L. & EVANS, C.H. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 147(11): 3915-20. 1991.
- STARUCH, M.J. & WOOD, D.D. Reduction of serum interleukin-1-like activity after treatment with dexamethasone. *Leukoc. Biol.*, 37(2): 193-207. 1985.
- STEFANOVIC-RACIC, M.; STADLER, J.; GEORGESCU, H.I. & EVANS, C.H. Nitric oxide synthesis and its regulation by rabbit synoviocytes. *J. Rheum.*, 21(10): 1892-8. 1994.
- STEFANOVIC-RACIC, M.; MEYERS, K.; MESCHTER, C.; COFFEY, J.W.; HOFFMAN, R.A. & EVANS, C.H. Comparison of the nitric oxide synthase inhibitors methylarginine and aminoguanidine as prophylactic and therapeutic agents in rat adjuvant arthritis. *J. Rheum.*, 22: 1922-8. 1995.
- STRAUB, R.H.; MAYER, M.; KREUTZ, M.; LEEB, S.; SCHOLMERICH, J. & FALK, W. Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 67(4): 553-8. 2000.
- SUZUKI, M.; ASAKO, H.; KUBES, P.; JENNINGS, S.; GRISHAM, M.B. & GRANGER, D.N. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc. Res.*, 42(2): 125-38. 1991.
- TAKANO, Y. & YAKSH, T.L. Characterization of the pharmacology of intrathecally administered α -2 agonists and antagonists in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 261(2): 764-72. 1992.
- TAL, M. A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. *Neuroreport*, 48: 1382-4. 1996.
- TANAKA, H.; UETA, Y.; YAMASHITA, U.; KANNAN, H. & YAMASHITA, H. Biphasic changes in behavioral, endocrine, and sympathetic systems in adjuvant arthritis in Lewis rats. *Brain Res. Bull.*, 39(1): 33-7. 1996.

- TANAKA, S.; SOHEN, S. & FUKUDA, K. A role for histamine receptors in rheumatoid arthritis. *Semi. Arthr. Rheum.*, 26(6): 824-33. 1997.
- TEDESCO, L.S.; FUSELER, J.; GRISHAM, M.; WOLF, R. & ROERIG, S.C. Therapeutic administration of nitric oxide synthase inhibitors reverses hyperalgesia but not inflammation in a rat model of polyarthritis. *Pain*, 95: 215-23. 2002.
- TEIXEIRA, M.M.; WILLIAMS, T.J. & HELLEWELL, P.G. Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 1515-1521. 1993.
- TEIXEIRA, M.M.; GRISTWOOD, R.W.; COOPER, N. & HELLEWELL, P.G. Phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitors: antiinflammatory drugs of the future? *Trends Pharmacol.*, 18: 164-70. 1997.
- TENOR, H.; HATZELMANN, A.; CHURCH, M.K.; SCHUDT, C. & SHUTE, J.K. Effects of theophylline and rolipram on leukotriene C4 (LTC₄) synthesis and chemotaxis of human eosinophils from normal and atopic subjects. *Br. J. Pharmacol.*, 118(7): 1727-35. 1996.
- THEODOSIOU, M.; RUSH, R.A.; ZHOU, X.F.; HU, D. & TRACEY, D.J. Hyperalgesia due to nerve damage – role of nerve growth factor. *Pain*: 81: 245-55. 1999.
- THOMASSEN, M.J. & KAVURU, M.S. Human alveolar macrophages and monocytes as a source and target for nitric oxide. *Intern. Immunopharmacol.*, 1: 1479-90. 2001.
- TOIVONEN, M.L.; TOKOLA, O. & VAPAATALO, H. Rat adjuvant arthritis as a model to test potential antirheumatic agents. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 4(6): 359-63. 1982.
- TOKUNAGA, A.; SAIKA, M. & SENBA, E. 5-HT_{2A} receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. *Pain*, 76(3): 349-55. 1998.
- TOMINAGA, K.; ALSTERGREN, P.; KURITA, H. & KOPP, S. Serotonin in an antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *Arch. Oral Biol.*, 44: 595-601. 1999.
- TONUSSI, C.R. & FERREIRA, S.H. Rat knee-joint incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain*, 48: 421-7. 1992.
- TRENTHAM, D.E.; TOWNES, A.S. & KANG, A.H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.*, 146(3): 857-68. 1977.

- TRENTHAM, D.E.; TOWNES, A.S.; KANG, A.H. & DAVID, J.R. Humoral and cellular sensitivity to collagen in type II collagen-induced arthritis in rats. *J. Clin. Invest.*, 61(1): 89-96. 1978.
- TSUJI, F.; OKI, K.; FUJISAWA, K.; OKAHARA, A.; HORIUCHI, M. & MITA, S. Involvement of leukotriene B₄ in arthritis models. *Life Sci.*, 64(3): PL51-6. 1999.
- TURNER, C.R.; ESSER, K.M. & WHEELDON, E.B. Therapeutic intervention in a rat model of ARDS: phosphodiesterase IV inhibition. *Circ. Shock*, 39(3): 237-45. 1993.
- TURNER, C.R.; ANDRESEN, C.J.; SMITH, W.B. & WATSON, J.W. Effects of rolipram on responses to acute and chronic antigen exposure in monkeys. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 149(5): 1153-9. 1994.
- TURNER, C.R.; COHAN, V.L.; CHENG, J.B.; SHOWELL, H.J.; PAZOLES, C.J. & WATSON, J.W. The *in vivo* pharmacology of CP-80,633, a selective inhibitor of phosphodiesterase 4. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 278(3): 1349-55. 1996.
- URBAN, L.; THOMPSON, S.W. & DRAY, A. Modulation of spinal excitability: cooperation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. *Trends Neurosci.*, 17(10): 432-8. 1994.
- URBAN, M.O. & GEBHART, G.F. Spinal contributions to hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 7684-92. 1999.
- van de LOO, F.A.; JOOSTEN, L.A.; van LENT, P.L.; ARNTZ, O.J. & van den BERG, W.B. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of *in situ* blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 38(2): 164-72. 1995.
- VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.*, 231: 232-5. 1971.
- VANE, J.R. & BOTTING, R.M. New insights into the model of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm. Res.*, 44: 1-10. 1995.
- VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S. & BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38: 97-120. 1998.
- VANEGAS, H. & SCHAIBLE, H.G. Prostaglandins and cyclooxygenase in the spinal cord. *Progress Neurobiol.*, 64: 327-63. 2001.
- VIANA, C.F.G.; ARAGÃO, Jr., A.G.M.;MAGALHÃES, J.F.G.; VALE, M.R. & RIBEIRO, R.A. Effects of *Ageratum conyzoides* in nociception and inflammatory response induced by zymosan. *Fitoterapia*, LXIX(4): 349-54. 1998.

- WALLACE, J.L.; CHAPMAN, K. & McKNIGHT, W. Limited anti-inflammatory efficacy of cyclo-oxygenase-2 inhibition in carrageenan-air pouch inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 126(5): 1200-4. 1999.
- WANIKIAT, P.; WOODWARD, D.F. & ARMSTRONG, R.A. Investigation of the role of nitric oxide and cyclic GMP in both the activation and inhibition of human neutrophils. *Br. J. Pharmacol.*, 122(6): 1135-45. 1997.
- WARNER, T.D.; GIULIANO, F.; VOJNOVIC, I.; BUKASA, A.; MITCHELL, J.A. & VANE, J.R. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full *in vitro* analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 7563-8. 1999.
- WEBSTER, R.O.; HONG, S.R.; JOHNSTON, R.B. & HENSON, P.M. Biological effects of the human complement fragments C5a and C5a des Arg on neutrophil function. *Immunopharmacol.*, 2(3): 201-19. 1980.
- WEINBLATT, M.E.; KREMER, J.M.; COBLYN, J.S.; HELFGOTT, S.; MAIER, A.L.; PETRILLO, G.; HENSON, B.; RUBIN, P. & SPERLING, R. Zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 19(10): 1537-41. 1992.
- WHELTON, A. Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: physiologic foundations and clinical implication. *Am. J. Med.*, 106(5B): 13s-24s. 1999.
- WHITE, D.M.; BASBAUM, A.I.; GOETZL, E.J. & LEVINE, J.D. The 15-lipoxygenase product, 8R,15s-dioHETE, stereoespecifically sensitizes C-fiber mechanoheat nociceptors in hairy skin of rat. *J. Neurophysiol.*, 63(5): 966-70. 1990.
- WIEGMANN, K.; MUTHYALA, S.; KIM, D.H.; ARNASON, B.G.; CHELMICKA-SCHORR, E. β -adrenergic agonists suppress chronic/relapsing experimental allergic encephalomyelitis (CREAE) in Lewis rats. *J. Neuroimmunol.*, 56(2): 201-6. 1995.
- WILLIAMS, T.J. & MORLEY, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. *Nature*, 246(5430): 215-7. 1973.
- WILLIAMS, T.J. Prostaglandin E₂, prostaglandin I₂ and their the vascular changes of inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 65(3): 517-24. 1979.
- WOOLF, C.J. Generation of acute pain: central mechanisms. *Br. Med. Bull.*, 47(3): 523-33. 1991.
- WOOLF, C.J. & MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*, 353: 1959-64. 1999.

- WOOLLEY, D.E. & TETLOW, L.C. Mast cell activation and its relation to proinflammatory cytokine production in the rheumatoid lesion. *Arth. Res.*, 2(1): 65-74. 2000.
- WRIGHT, C.D.; MULSCH, A.; BUSSE, R. & OSSWALD, H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160(2): 813-9. 1989.
- YAMAKI, K.; THORLACIUS, H.; XIE, X.; LINDBOM, L.; HEDQVIST, P. & RAUD, J. Characteristics of histamine-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Br. J. Pharmacol.*, 123(3): 390-9. 1998.
- YAN, L.; VANDIVIER, R.W.; SUFFREDINI, A.F. & DANNER, R.L. Human polymorphonuclear leukocytes lack detectable nitric oxide synthase activity. *J. Immunol.*, 153(4): 1825-34. 1994.
- YOON, Y.W.; SUNG, B. & CHUNG, J.M. Nitric oxide mediates behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. *Neuroreport*, 9(3): 367-72. 1998.
- YOSHIMURA, K.; NAKAGAWA, S.; KOYAMA, S.; KOBAYASHI, T. & HOMMA, T. Leukotriene B₄ induces lung injury in the rabbit: role of neutrophils and effect of indonethacin. *J. Appl. Physiol.*, 74(5): 2174-9. 1993.
- YUI, Y.; HATTORI, R.; KOSUGA, K.; EIZAWA, H.; HIKI, K. & KAWAI, C. Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J. Biol. Chem.*, 266(19): 12544-7. 1991.
- ZARCO, P.; MAESTRE, C.; HERRERO-BEAUMONT, G.; GONZALEZ, E.; GARCIA-HOYO, R.; NAVARRO, F.J.; BRAQUET, P. & EGIDO, J. Involvement of platelet-activating factor and tumour necrosis factor in the pathogenesis of joint inflammation in rabbits. *Clin. Exp. Immunol.*, 88(2): 318-23. 1992.
- ZENMYO, M.; HIRAOKA, K.; KOMIYA, S.; MORIMATSU, M. & SASAGURI, Y. Histamine-stimulated production of matrix metalloproteinase 1 by human rheumatoid synovial fibroblasts is mediated by histamine H₁-receptors. *Virchows Arch.*, 427(4): 437-44. 1995.
- ZENMYO, M.; HIRAOKA, K.; SASAGURI, T.; KOMIYA, S. INOUE, A.; MORIMATSU, M. & SASAGURI, Y. Interleukin-4 stimulates rheumatoid synovial fibroblasts to express matrix metalloproteinase-1 (tissue collagenase) and histamine H₁ receptor man. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 40(6): 1253-60. 1996.
- ZHANG, Y.; SHAFFER, A.; PORTANOVA, J.; SEIBERT, K. & ISAKSON, P.C. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E₂ production. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 283(3): 1069-75. 1997.

- ZHANG, Y.; YANG, Z.; GAO, X. & WU, G. The role of 5-hydroxytryptamine_{1A} and 5-hydroxytryptamine_{1B} receptors in modulating spinal nociceptive transmission in normal and carrageenan-injected rats. *Pain*, 92(1-2): 201-11. 2001a.
- ZHANG, Y.Q.; GAO, X.; JI, G.C.; HUANG, Y.L. & WU, G.C. Expression of 5-HT_{2A} receptor mRNA in rat nucleus raphe magnus neurons after peripheral inflammation. *Acta Pharmacol. Sin.*, 22(10): 923-8. 2001b.
- ZIESSEN, T.; MONCADA, S. & CELLEK, S. Characterization of the non-nitroergic NANC relaxation response in the rabbit vaginal wall. *Br. J. Pharmacol.*, 135(2): 546-54. 2002.

Anexo

ANEXO: trabalho completo publicado em periódico indexado.

Anexo 1.

Rocha, J.C.S.; Peixoto, M.E.B.; Jancar, S.; Cunha, F.Q.; Ribeiro, R.A. & Rocha, F.A.C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *British Journal of Pharmacology*, 136: 588-596. 2002.

Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats

¹José C. da S. Rocha, ¹Magno E.B. Peixoto, ¹Sônia Jancar, ¹Fernando de Q. Cunha, ¹Ronaldo de A. Ribeiro & ^{*,1}Francisco A.C. da Rocha

¹Faculdade de Medicina – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, 1127 – CEP 60430-270, Fortaleza – Ceará – Brasil

- 1 The contribution of nitric oxide (NO) to articular pain in arthritis induced by zymosan (1 mg, intra articular) in rats was assessed by measuring articular incapacitation (AI).
- 2 Systemic treatment with the non-selective NO synthase (NOS) inhibitor L-NAME (10–100 mg kg⁻¹ i.p.) or with the selective iNOS inhibitors aminoguanidine (AG; 10–100 mg kg⁻¹ i.p.) or 1400W (0.5–1 mg kg⁻¹ s.c.) inhibited the AI induced by injection of zymosan 30 min later.
- 3 Local (intra articular) treatment with the NOS inhibitors (L-NAME or AG, 0.1–1 μmol; 1400W, 0.01 (μmol) 30 min before zymosan also inhibited the AI.
- 4 Systemic or local treatment with the NOS inhibitors (L-NAME; AG, 100 mg kg⁻¹ i.p. or 0.1 μmol joint⁻¹; 1400W, 1 mg kg⁻¹ s.c. or 0.01 μmol joint⁻¹), 2 h after zymosan did not affect the subsequent AI.
- 5 Local treatment with the NO donors SNP or SIN-1, 2 h after zymosan did inhibit AI.
- 6 L-NAME and AG, given i.p. inhibited nitrite but not prostaglandin E₂ (PGE₂) levels in the joints. L-NAME (100 mg kg⁻¹) but not AG (100 mg kg⁻¹) increased mean arterial blood pressure. Neither L-NAME, AG nor the NO donor SIN-1 altered articular oedema induced by zymosan.
- 7 In conclusion, inhibitors of iNOS decrease pain in zymosan arthritis only when given before the zymosan. This was not due to inhibition of articular PGE₂ release or oedema. NO donors also promoted antinociception in zymosan arthritis without affecting oedema.

British Journal of Pharmacology (2002) **136**, 588–596

Keywords: Arthritis; zymosan; nitric oxide; 3-morpholinosydnonimine; sodium nitroprusside; pain; oedema; inflammatory hyperalgesia

Abbreviations: 1400W, N-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamide; AG, aminoguanidine; AI, articular incapacitation; ANOVA, one-way analysis of variance; cGMP, guanosine 3'5' cyclic monophosphate; D-NAME, D-N^G-nitroarginine methyl ester; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; i.art., intra-articular; i.p., intra-peritoneal; iNOS, inducible nitric oxide synthase; L-NAME, L-N^G-nitroarginine methyl ester; L-NMMA (L-N^G-monomethylarginine); MAP, mean arterial pressure; NGF, nerve growth factor; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; NSAID, non-steroidal antiinflammatory drug; NT, non-treated; p.o., per os; PET, paw elevation time; PGE₂, prostaglandin E₂; s.c., subcutaneous; SAL, saline; SIN-1 (3-morpholinosydnonimine); SNP, sodium nitroprusside; Zy, zymosan

Introduction

Nitric oxide (NO) is produced by nitric oxide synthase (NOS) using L-arginine as substrate. Three isoforms of NOS have been described. Endothelial (NOS1) and neuronal (NOS3) isoforms are constitutive (cNOS) whereas NOS2 is the inducible isoform (iNOS). The cNOS produces NO in picomolar amounts for short periods, operating through a calcium dependent mechanism, whereas iNOS produces large and sustained amounts of NO after cell activation by inflammatory stimuli. Production of NO via cNOS has been linked to homeostasis, for instance, the regulation of arterial blood pressure, whereas NO produced after iNOS induction appears to be involved in pathophysiological phenomena (Moncada *et al.*, 1991).

There is considerable evidence for the involvement of NO in experimental models of arthritis. Increased NO levels

were associated with the development of streptococcal cell wall arthritis (McCartney-Francis *et al.*, 1999) whereas administration of NOS inhibitors reversed inflammatory changes in experimental arthritis (Ialenti *et al.*, 1993; Stefanovic-Racic *et al.*, 1994; 1995). Limitation of movement is a serious burden to patients presenting with inflammatory arthropathies. Although pain relief is frequently the main goal in the acute treatment of these conditions, little is known about the mechanisms involved in pain development in arthropathies. The rat knee-joint incapacitation test was designed to study articular incapacitation (AI), defined as the inability of a rat with an experimentally induced arthritis to walk normally (Tonussi & Ferreira, 1992). In this test, AI is assumed to be due to altered nociception following injection of an inflammatory stimulus into the joints. Using this test, we have, in a previous paper, demonstrated the development of gait disturbances (AI) in rats with zymosan (Zy)-induced

*Author for correspondence; E-mail: arocha@ufc.br

thritus (Rocha *et al.*, 1999), with the animals developing it from 2 h, reaching a maximal value between 3 and 4 h, after the injection of zymosan (Rocha *et al.*, 1999).

There is also evidence supporting a role for NO in nociception. A NOS inhibitor, L-NMMA (L-N^G-monomethyl-L-glutamine), blocked acetylcholine induced peripheral analgesia (Quarte *et al.*, 1990). Peripheral antinociception induced by morphine in rats with PGE₂-induced hyperalgesia was shown to be mediated by NO release leading to cGMP activation (Sousa *et al.*, 1991). However, controversies regarding NO role in pain have arisen. For instance, injection of NO in humans produces pain, presumably through direct stimulation of local nociceptors (Holthusen & Arndt, 1994). Additionally, administration of L-NAME (L-N^G-nitroarginine ethyl ester), a non-selective NOS inhibitor, had antinociceptive effects in mice and reversed thermal hyperalgesia in rats with carrageenan arthritis (Lawand *et al.*, 1997). More recently, it was shown that the NO donor 3-morpholino-D-nitroimidazole (SIN-1) produced either analgesia or nociception in rats, depending on the dose and the pain model studied (Sousa & Prado, 2001).

Considering that both the exact role of NO in pain development and the mediators involved in pain mechanisms during inflammatory arthropathies are still not fully defined, we decided to investigate NO participation in AI in zymosan-induced arthritis. The results reported herein show that administration of an NO donor in ongoing zymosan arthritis produced analgesia. On the other hand, NOS inhibitors, acting via iNOS inhibition, exerted antinociceptive effects in this model only when given prior to the injection of zymosan to the joint. Moreover, these anti-nociceptive effects were not secondary to an inhibition of oedema or of prostaglandin (PG) release into the affected joint.

Methods

Animals

Male Wistar rats (180–220 g) from our own animal facilities were used throughout the experiments. All efforts were made to minimize animal suffering and the number of animals used. Surgical procedures and animal treatments were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (DHEW Publication, Bethesda, MD, U.S.A.).

Evaluation of articular incapacitation (AI)

During light ether anaesthesia, rats received a standard intrarticular (i.art.) injection of zymosan (1 mg in 50 µl total volume), dissolved in sterile saline, into their right knee joints. Control animals received saline. We used the rat knee joint incapacitation test, as described previously (Tonussi & Ferreira, 1992). Briefly, after zymosan injection, animals were allowed to walk on a steel rotary drum (30 cm wide × 50 cm diameter), covered with a fine-mesh non-oxidizable wire screen, which rotates at 3 r.p.m. Specially designed metal gaiters were wrapped around both hind paws. After placement of the gaiters, the animals were allowed to walk freely to accustom themselves to the gaiters. The right paw

was then connected via a simple circuit to a microcomputer data input/output port. The paw elevation time (PET) is the time that during a 60 s period the inflamed hind paw is not in contact with the cylinder. This is directly proportional to the articular incapacitation.

Evaluation of articular oedema and PGE₂ release

The animals were anaesthetized (chloral hydrate (400 mg kg⁻¹ i.p.), killed by cervical dislocation, and exsanguinated. The synovial cavity of the knee joints was then washed with 0.4 ml saline containing 5 U ml⁻¹ heparin. The synovial exudates were collected by aspiration. After centrifugation (500 × g, for 10 min⁻¹), the supernatant was stored at -70°C and used for determination of PGE₂ concentration using a commercially available ELISA kit (Cayman Chem. Co., Ann Arbor, U.S.A.) and also for assessing total nitrite released into the joints. After the synovial fluid was collected, the synovial membranes were surgically removed and the wet weight (g) was recorded. This material was dried (80°C) overnight and the dry weight (g) was recorded. The wet/dry (g) weight ratio was used as reflecting synovial oedema.

Measurement of mean arterial pressure (MAP)

In an attempt to disclose microcirculatory blood flow alterations due to cNOS inhibition, MAP was measured. Briefly, rats were anaesthetized and a cannula placed in the carotid artery. The rats were allowed to recover and the MAP was recorded by connecting the arterial cannula to a pressure transducer and recording the blood pressure in a polygraph. MAP was measured 30 min after i.p. injection of either L-NAME 100 mg kg⁻¹ i.p. or aminoguanidine 100 mg kg⁻¹ i.p. and then subsequently at hourly intervals for a period of 6 h and compared to the baseline values.

Determination of NO production

Production of NO was determined by measuring total nitrite/nitrate (NO₂⁻/NO₃⁻) by the Griess reaction. Total NO₂⁻/NO₃⁻ levels were determined with the NO₃⁻ in the samples (0.08 ml) converted to NO₂⁻ by incubation of 0.01 ml nitrate reductase from *Aspergillus* species (1 U ml⁻¹) and 0.01 ml NADPH (1 mM) for 30 min at 37°C. NO₂⁻ levels were determined spectrophotometrically at 540 nm by measuring the absorbance of test samples (0.1 ml) after adding 0.1 ml Griess reagent (sulphanilic acid (1% w v⁻¹) and N-(1-naphthyl)ethylenediamine (0.1 w v⁻¹) in 5% phosphoric acid) and comparing these values with those from standard solutions of NaNO₂ (1–100 µM).

Drug treatments

Prophylactic interventions In order to analyse the effect of NOS inhibitors injected systemically and administered prior to induction of zymosan arthritis, groups of rats received L-NAME (10–100 mg kg⁻¹ i.p.), aminoguanidine (10–100 mg kg⁻¹ i.p.) or 1400W (0.5–1 mg kg⁻¹ s.c.) 30 min prior to zymosan injection intra-articularly (i.art.). To analyse the prophylactic effect of NOS inhibitors administered locally either L-NAME 0.1–1 µmol joint⁻¹ (0.15–

1.39 mg kg⁻¹), aminoguanidine 0.1–1 µmol joint⁻¹ (0.06–0.61 mg kg⁻¹), or 1400W 0.01 µmol/joint (0.014 mg kg⁻¹) were administered i.art. 30 min prior to arthritis induction. Two other groups received either D-NAME (100 mg kg⁻¹ i.p.) or L-arginine (1 g kg⁻² p.o.) 30 min prior to L-NAME (100 mg kg⁻¹) followed by zymosan i.art., 30 min later.

Therapeutic interventions In order to evaluate the effects of NOS inhibitors injected systemically on existing zymosan arthritis, other groups of rats received either L-NAME (100 mg kg⁻¹ i.p.), aminoguanidine (100 mg kg⁻¹ i.p.) or 1400W (1 mg kg⁻¹ s.c.) 2 h after injection of zymosan i.art. In order to evaluate the effect of NOS inhibitors injected locally on existing zymosan-arthritis, groups of rats received either L-NAME (0.3 µmol joint⁻¹), aminoguanidine (0.1 µmol joint⁻¹) or 1400W (0.01 µmol joint⁻¹) 2 h after injection of zymosan i.art.

Therapeutic effect of NO donors In order to evaluate the local therapeutic effect of exogenous NO addition, either of two NO donors, sodium nitroprusside (SNP 100–500 µg i.art.) or 3-morpholinosydnonimine (SIN-1; 1–10 µg i.art.) were given 2 h after the injection of zymosan.

Control groups Non-treated (NT) groups consisted of rats with zymosan-arthritis that received 0.9% w v⁻¹ sterile saline either systemically or locally. The control groups of rats received only 0.9% w v⁻¹ sterile saline i.art.

Drugs and reagents

All drugs were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A., except for SIN-1 that was purchased from Cayman Chemical Co., Ann Arbor, U.S.A.

Statistics

Results are expressed as mean ± s.e.mean. Statistically significant differences between groups were analysed using one-way ANOVA followed by the Bonferroni test. *P* < 0.05 was considered significant.

Results

Effect of systemic treatment with NOS inhibitors on articular NO production

The time course of release of nitrite into the joint exudates of rats with zymosan-arthritis is shown in Figure 1A. The release started 1 h after zymosan injection and reached a maximum value at 6 h. In rats whose joints were injected only with saline (SAL), the nitrite concentrations in the joint exudates were low and remained at these levels throughout the experimental period.

Systemic prophylactic (30 min before zymosan) or therapeutic (2 h after zymosan) administration of the NOS inhibitors (L-NAME, AG, and 1400W) reduced this nitrite release into the joint exudates. At 6 h after zymosan, this reduction was to almost control (saline injected) levels at the

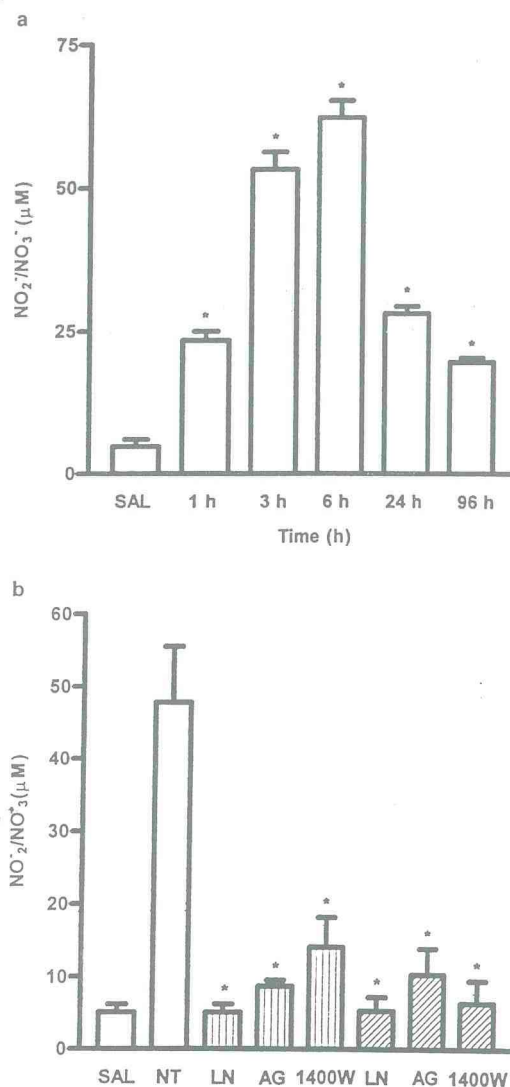


Figure 1 (A) Time-course of the release of NO into the joint exudate of rats with zymosan arthritis. Zymosan was injected intra-articularly (i.art.) and the NO release in exudates (as NO₂⁻/NO₃⁻) was measured at different times, as shown, after zymosan. Control (SAL) animals received only saline i.art. There was a rapid increase in NO release after zymosan, which was still raised at 96 h. Injection of saline into the joints did not increase NO release throughout the experiment. Results are expressed as the mean ± s.e.mean of values for each group of six animals. **P* < 0.05 compared to control rats. (B) Effect of systemic prophylactic (dotted bars) or therapeutic (hatched bars) administration of NOS inhibitors on nitrite release into the joint exudates in zymosan arthritis. Either L-NAME (LN) (100 mg kg⁻¹ i.p.), AG (100 mg kg⁻¹ i.p.) or 1400W (1 mg kg⁻¹ s.c.) were injected 30 min before (prophylactic) or 2 h after (therapeutic) zymosan. Non-treated (NT) rats were given saline i.p. 30 min prior to zymosan. Control (SAL) animals received only saline i.art. Release of NO was measured at 6 h after zymosan. All three inhibitors reduced the NO release to almost control levels at this time. Results are expressed as the mean ± s.e.mean of values for each group of six animals. **P* < 0.05 compared to NT rats.

highest doses of inhibitors used (Figure 1B). Similar data were obtained when these compounds were injected locally, whether administered in a prophylactic or therapeutic strategy (data not shown).

Effect of systemic treatment with NOS inhibitors on articular incapacitation (AI)

The effect of treatment with the NOS inhibitors (L-NAME, nitroguanidine or 1400W), given before the zymosan, on AI is shown in Figure 2A. Injection of zymosan into the articular joints of rats provoked an increase in paw elevation time (PET), starting 2 h, and peaking between 3–4 h, after zymosan injection. Increase in PET is assumed to reflect articular inflammatory pain and is due to stimulation of articular nociceptors (Rocha *et al.*, 1999). All three inhibitors of NOS dose-dependently reduced AI, measured between 3–4 h after zymosan. The reduction of AI observed after L-NAME or AG was about equal at the highest dose used, whereas the NOS inhibitor 1400W appeared more potent and to reduce AI almost to control level, i.e., to completely reverse the AI induced by zymosan. However, as shown in Figure 2B, when the NOS inhibitors were given 2 h after the zymosan, at the highest doses, none of them modified AI.

Figure 3 shows that administration of D-NAME (100 mg kg⁻¹ i.p.), the inactive enantiomer of L-NAME, did not alter AI and also that combined administration of the NOS substrate L-arginine (1 g kg⁻¹ p.o.) and L-NAME (100 mg kg⁻¹ i.p.) reversed the inhibitory effect of L-NAME on AI. Note that all these treatments were given before the zymosan.

Effect of local treatment with NOS inhibitors on AI

In a further series of experiments, the NOS inhibitors L-NAME (0.1–1 µmol joint⁻¹ (0.15–1.39 mg kg⁻¹), AG (0.1–1 µmol joint⁻¹ (0.06–0.61 mg kg⁻¹) or 1400W (0.1 µmol joint⁻¹ (0.014 mg kg⁻¹)) were given locally, i.e., by injection into the joint. Given 30 min before the zymosan, these inhibitors markedly decreased the AI (Figure 4A). However, as noted with systemic treatment, giving the inhibitors locally, 2 h after zymosan injection, had no effect on the AI (Figure 4B).

Effect of local therapeutic administration of two NO donors, SNP and SIN-1, on AI

To assess the effect of exogenous NO in our model of articular inflammatory pain, we used two NO donors, sodium nitroprusside (SNP) or 3-morpholinosydnonimine (SIN-1). The sources of NO were given after the induction of the arthritis, locally, 2 h after zymosan. Figure 5 shows that, over a range of doses, both SNP (100–500 µg i.art.) and SIN-1 (10–100 µmol, i.art.) inhibited AI, to a degree comparable to that obtained with the local application of NOS inhibitors, when given before zymosan (Figure 2A).

Effect of NOS inhibitors on PGE₂ release, synovial oedema, and mean arterial pressure (MAP)

Because of the interaction between NOS and PG synthesis (Alvemini *et al.*, 1993) and because PG-induced oedema could affect the incapacitation we were measuring, we searched for PGE₂ in the joint exudates and for articular oedema. Since the maximal inhibition of AI was achieved with L-NAME or AG, at 100 mg kg⁻¹ i.p., we decided to use

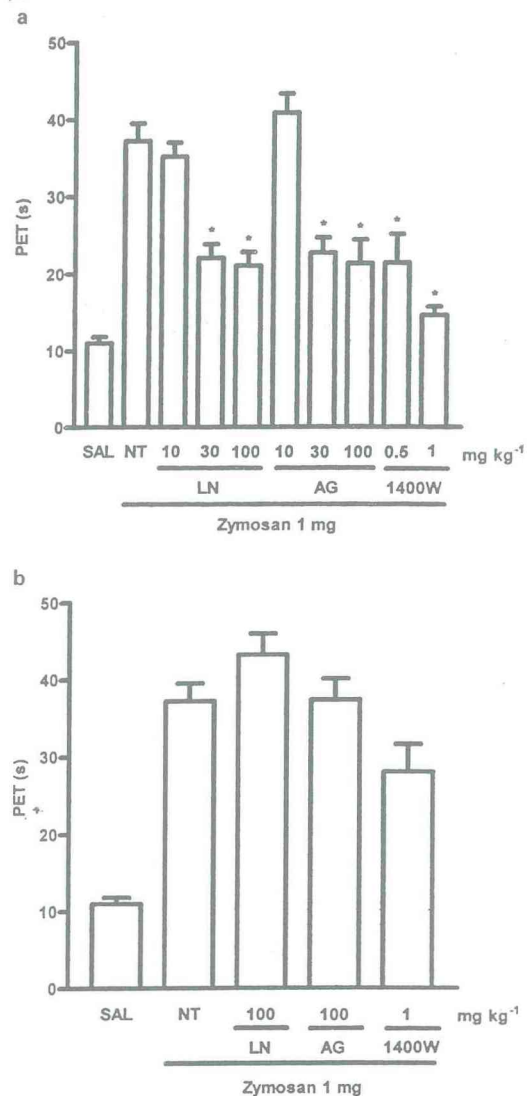


Figure 2 (A) Dose-dependent effects of systemic prophylactic administration of NOS inhibitors on articular incapacitation (AI) in zymosan arthritis. The AI was measured hourly over 4 h after zymosan injection as the increase in paw elevation time (PET) assessed using the rat knee joint incapacitation test (see text for details). Either L-NAME (LN - 10, 30, 100 mg kg⁻¹ i.p.), aminoguanidine (AG - 10, 30, 100 mg kg⁻¹ i.p.) or 1400W (0.5–1 mg kg⁻¹ s.c.) were injected 30 min prior to zymosan 1 mg injection i.a. Non-treated (NT) rats were given saline i.p., followed by zymosan. Control (SAL) animals received saline i.art. There was a dose dependent reduction of the AI response after treatment with any of the inhibitors. Results are expressed as the mean ± s.e. mean of maximal PET obtained during 3–4 h of arthritis; *n* = 6 animals for each group. **P* < 0.05 compared to NT rats. (B) Effect of systemic therapeutic administration of L-NAME (LN), aminoguanidine (AG) or 1400W on AI in zymosan arthritis. The AI was measured hourly over 4 h after zymosan. LN (100 mg kg⁻¹ i.p.), AG (100 mg kg⁻¹ i.p.) or 1400W (1 mg kg⁻¹ s.c.) was given 2 h after zymosan. Non-treated (NT) rats were given saline (i.p.), 2 h after zymosan. Control rats (SAL) received saline i.art. The inhibitors were no longer effective in reducing AI when given after the zymosan. Results are expressed as the mean ± s.e. mean of maximal PET measured 3–4 h after the zymosan; *n* = 6 animals for each group. **P* < 0.05 compared to NT rats.

these doses in these further experiments. As shown in Table 1, neither L-NAME nor AG, when administered prophylacti-

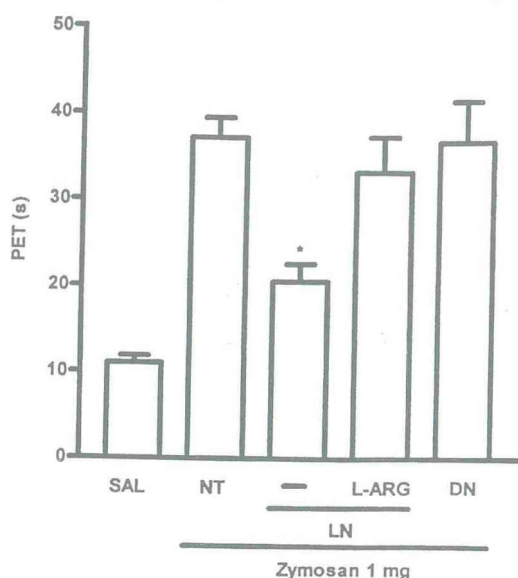


Figure 3 Effect of systemic prophylactic combined administration of L-arginine (L-ARG) and L-NAME (LN) and D-NAME (DN) on AI in zymosan arthritis. The AI was measured as previously described. LN or DN (100 mg kg^{-1} i.p.) was given 30 min before zymosan. L-ARG (1 g kg^{-1}) was given p.o., 30 min before the L-NAME. Non-treated (NT) rats received saline i.p. followed by zymosan. Control (SAL) animals received saline i.art. Results are expressed as the mean \pm s.e.mean of maximal PET obtained during 3–4 h of arthritis; $n=6$ animals for each group. * $P<0.05$ compared to NT rats.

cally, modified the increase in PGE_2 content in the affected joint at 6 h. The marked synovial oedema induced by zymosan was also unaffected by NOS inhibition. Treatment after zymosan (2 h) with systemic L-NAME or AG (which did not affect AI; see Figure 2B) or the nitric oxide donor SIN-1 locally (which reduced AI; see Figure 5) also did not modify articular oedema. Table 1 also shows that L-NAME (100 mg kg^{-1} i.p.) but not AG (100 mg kg^{-1} i.p.) administration caused a marked increase in MAP.

Discussion

Our experiments have shown that inhibitors of NOS decrease articular inflammatory pain when, given early, before induction of the arthritis, but not when given late, after the arthritis had been induced. However, treatment with NO donors after induction of arthritis was effective in reducing pain. These results appear paradoxical but we would conclude that, overall, NO has a direct anti-nociceptive effect on articular inflammatory pain in zymosan arthritis. The anti-nociceptive activity observed when NOS inhibitors were given prophylactically, before the zymosan, is probably due to suppression of the synovitis induced by zymosan, thus preventing the subsequent development of the inflammatory reactions leading to pain.

Administration of D-NAME, the inactive enantiomer of L-NAME, as well as combined administration of L-arginine and L-NAME did not alter articular incapacitation, suggesting that the anti-nociceptive effect of L-NAME was most likely to be due to inhibition of NO synthesis. The isoform of NOS most relevant here would appear to be the inducible

iNOS. Thus, aminoguanidine (AG), which is currently used as a selective iNOS inhibitor, was effective in reducing AI, our measure of articular pain, suggesting that both iNOS and cNOS inhibition produced antinociception in our model. There are many reports showing that AG is a selective iNOS inhibitor (Griffiths *et al.*, 1993). AG was shown to reduce plasma leakage in the mouse skin (Fuji *et al.*, 1996) and to reduce rat paw inflammation induced by carrageenan (Salvemini *et al.*, 1996b), effects that were assumed to be due to iNOS inhibition. However, AG, in the presence of calcium, calmodulin, and other cofactors can also inhibit cNOS (Wolff & Lubeskie, 1995a, b; Laszlo *et al.*, 1995). We therefore used 1400W, which is approximately 500 times more potent and specific as an iNOS inhibitor than AG, and currently one of the most selective iNOS inhibitors available (Garvey *et al.*, 1997). Our results showed that 1400W also dose-dependently inhibited AI, reinforcing our suggestion that the anti-nociceptive effects observed with L-NAME and AG were due to the inhibition of iNOS.

The anti-inflammatory properties of L-arginine analogues have been linked to local microcirculatory vasoconstriction that could be reversed by vasodilators (Ridger *et al.*, 1997). Although there is marked heterogeneity of the influence of NO in the regional microvasculature among different tissues (Greenblatt *et al.*, 1993) MAP is influenced by alterations in peripheral vascular resistance occurring in the microcirculation. Thus, significant microcirculatory vasoconstriction resulting from cNOS inhibition should lead to an increase in MAP. In the present study, animals treated with the highest effective dose of L-NAME did exhibit an increase in MAP. However, MAP was not altered in animals that received the highest effective dose of AG. Hence, in the present study, local vasoconstriction and increased MAP was not necessary for the anti-nociceptive actions of AG.

It is possible that articular oedema, rather than articular pain, may have caused the lack of joint mobility that we recorded as AI. This possibility is less likely in our experiments since the prophylactic administration of the iNOS inhibitors or the therapeutic injection of SIN-1, though being able to inhibit AI, did not alter local oedema. In concordance with these data, intra-articular injection of dextran, that promotes non-inflammatory oedema, did not elicit AI, as measured by the rat-knee joint as in the present study (Tonussi & Ferreira, 1992). L-NAME has been shown to reduce the oedema induced by bradykinin, histamine, and zymosan-activated plasma, carragenin, or dextran (Teixeira *et al.*, 1993; Salvemini *et al.*, 1996a, b; Ialenti *et al.*, 1992). However, L-NAME and haemoglobin, which acts as an NO scavenger, reduced paw oedema in rats only in the initial phase (1 h) after stimulus injection (Cuzzocrea *et al.*, 1997) whereas we measured articular oedema 6 h after zymosan. Controversies have also arisen concerning the contribution of NO to oedema development. Systemic administration of L-NAME or 1400W inhibited the oedema formation in experimental colitis (Kankuri *et al.*, 2001). On the other hand, L-NAME promoted an increase in vascular permeability in the isolated perfused rat lung (Mundy & Dorrington, 2000) and administration of L-arginine, the NOS substrate, prevented the increase in vascular permeability induced by contrast-media in the rat lung (Sendo *et al.*, 2000). More recently, local (intra-pleural) and systemic administration of NOS inhibitors increased and reduced

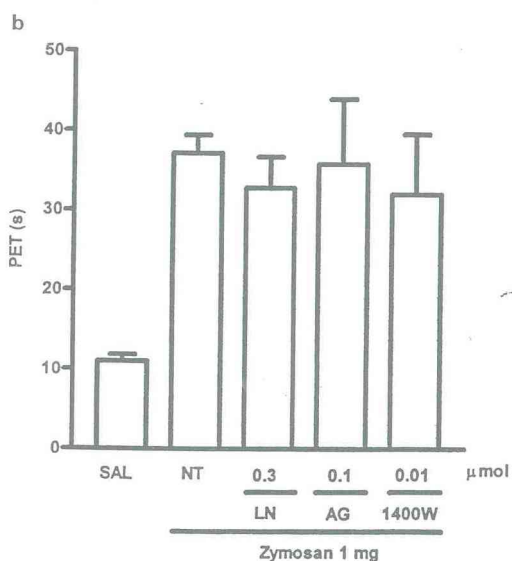
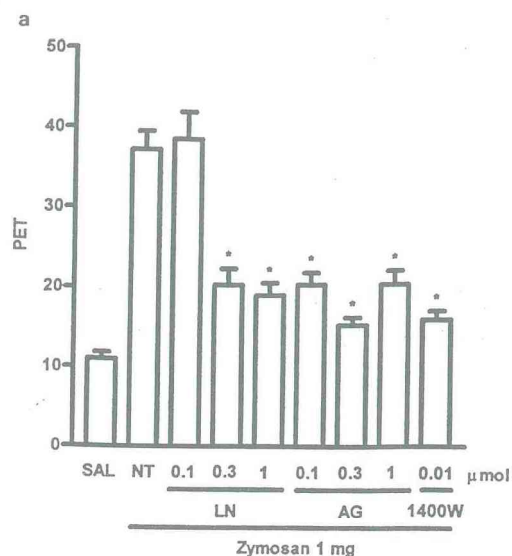


Figure 4 Dose-dependent effect of local prophylactic administration of NOS inhibitors on AI in zymosan arthritis in rats. Either L-NAME (LN) 0.1, 0.3 and 1.0 $\mu\text{mol joint}^{-1}$, AG (0.1, 0.3 and 1.0 $\mu\text{mol joint}^{-1}$) or 1400W (0.01 $\mu\text{mol joint}^{-1}$) were injected i.art. in prior to zymosan injection. Non-treated (NT) rats were given saline (50 μl) i.art. followed by zymosan. Control (SAL) rats received saline (50 μl) i.art. All three inhibitors given locally were highly effective in reducing AI. Results are expressed as the mean \pm s.e. mean of maximal PET obtained during 3–4 h of arthritis; $n=6$ animals for each group. * $P<0.05$ compared to NT rats. (B) Effect of local prophylactic administration of L-NAME (LN), aminoguanidine (AG) and 1400W on AI. The AI was measured hourly over 4 h. LN (0.3 $\mu\text{mol joint}^{-1}$), AG (0.1 $\mu\text{mol joint}^{-1}$) or 1400W (0.01 $\mu\text{mol joint}^{-1}$) were given i.art. 2 h after zymosan. Non-treated (NT) rats were given saline i.p., 2 h after zymosan. Control (SAL) rats received saline (50 μl) i.art. Local application of the NOS inhibitors, at the highest dose used prophylactically (see A), did not reduce AI. Results are expressed as the mean \pm s.e. mean of maximal PET measured 3–4 h after zymosan; $n=6$ animals for each group. * $P<0.05$ compared to NT rats.

in carrageenin-induced pleuritis, respectively (Paulsen et al., 2001). Another recent study showed that administration of a selective iNOS inhibitor did not reduce acute inflammatory response and exacerbated the chronic

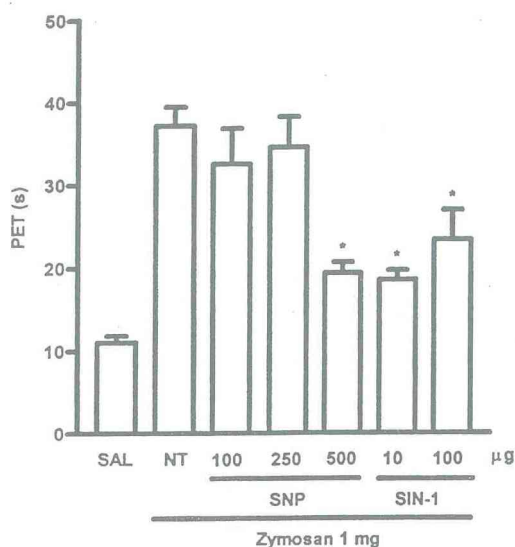


Figure 5 Effect of local therapeutic administration of sodium nitroprusside (SNP) or 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) on AI. SNP (100–500 μg) or SIN-1 (10–100 μg) were injected i.art. 2 h after zymosan. Non-treated (NT) rats were given saline (i.art.) 2 h after zymosan. Control (SAL) animals received saline i.art. Local injection of the NO donors after zymosan was able to reduce AI, showing a direct anti-nociceptive effect of NO in the inflamed joint. Results are expressed as the mean \pm s.e. mean of maximal PET measured 3–4 h after zymosan; $n=6$ animals for each group. * $P<0.05$ compared to NT rats.

inflammation in rats subjected to streptococcal cell wall arthritis (McCartney-Francis et al., 2001). As a whole, these results suggest that NO may have different effects on oedema development depending on the route of administration and also on the tissue studied.

Anti-nociception has previously been associated with inhibition of NOS. L-NAME provoked dose-dependent anti-nociception in the formalin-induced paw-licking model in mice (Moore et al., 1991). Intrathecal administration of AG and 2-amino-5,6-dihydro-methylthiazine, another selective iNOS inhibitor, decreased carrageenan-induced thermal hyperalgesia in rats (Osborne & Coderre, 1999). In joints, local administration of either L-NAME or 7-nitro-indazole, a selective neuronal NOS inhibitor, prevented radiant heat hyperalgesia in rats subjected to carrageenan-kaolin arthritis (Lawand et al., 1997). However, to our knowledge, the present study is the first to evaluate the role of NO in articular inflammatory pain.

A particularly relevant interaction in inflammatory models is that between NO and cyclo-oxygenase, the rate-limiting enzyme in PG biosynthesis (Salvemini et al., 1993) but the outcome of this interaction varies from model to model. Thus, NO either promoted the release of prostaglandins through iNOS activation (Salvemini et al., 1995a, b) or decreased prostaglandin production (Swierkosz et al., 1995). This could be caused by a biphasic effect of NO that was demonstrated on a macrophage cell line of mice (Tetsuka et al., 1994; Milano et al., 1995). In our model of arthritis, neither L-NAME nor AG administration altered PGE₂ release into the synovial fluid, showing that the anti-nociception following iNOS blockade was not due to inhibition of PGE₂ release. This is in concordance with a

Table 1 Effect of NOS inhibitors on mean arterial pressure (MAP) and prostaglandin E₂ (PGE₂) release, and articular oedema in zymosan-induced arthritis

Groups	MAP (mmHg)	PGE ₂ (picomol ml ⁻¹)	Wet/dry weight ratio (g)
Saline	91.2±6	100.2±22.3	6.9±0.48
Zymosan	96.0±4	550.4±210	14.2±0.8
Zymosan +L-NAME	153.0±7*	1375.5±261.3	15.8±1.8
Zymosan +Aminoguanidine	97.6±4	549.6±128	17.1±1.5

Rats were given zymosan into their right knee joints (i.art.). Mean arterial pressure (MAP) was evaluated at hourly intervals over 4 h in conscious animals, through a carotid artery cannula. PGE₂ released into the articular cavity, 6 h after zymosan, was measured using ELISA. Articular oedema was evaluated as the wet/dry weight ratio (g) of the synovial membranes that were surgically removed 6 h after zymosan. Groups were treated with either L-NAME or aminoguanidine (100 mg kg⁻¹ i.p.) 30 min prior to zymosan. Zymosan rats were given only zymosan. Control (SAL) animals received only saline i.art. Data represent mean±s.e.mean of *n* = six animals per group. **P*<0.05 compared to zymosan rats.

ent study showing that, in carrageenin-induced pleurisy, S-aminoethyl) isothioarea (AE-ITU), a specific iNOS inhibitor, did not alter PGE₂ release (Paul-Clark *et al.*, 2001). In our experiments, inhibition of iNOS was anti-nociceptive. However, in the hyperalgesia provoked by local injection either carrageenan or PGE₂ in the rat hind paw it was reported that the anti-nociceptive effect of acetylcholine was due to NO release (Duarte *et al.*, 1990). This apparent discrepancy could perhaps be explained by the fact that these authors studied the effect of local administration and used different pain models. However, in our experiments, all three NOS inhibitors L-NAME, AG, or 1400W were effective in inhibiting AI when administered locally (intra-articularly). Thus, systemic as well as local iNOS inhibition, given prophylactically, was equally anti-nociceptive in our model. In zymosan-induced arthritis, AI peaks between 3–4 h after injection of zymosan (Rocha *et al.*, 1999) and in order to assess the effect of NOS inhibition on established AI, we gave L-NAME or AG, 2 h after zymosan. In contrast with the results giving NOS inhibitors before the zymosan, this later administration did not affect AI, irrespective of systemic or local application. Because of this failure, we decided to evaluate the effect of NO donors, also given therapeutically, i.e., 2 h after zymosan. Our results have clearly shown that local administration of two NO donors (SNP or SIN-1) significantly reduced AI. We must emphasize that these NO donors were used as therapeutic interventions when the arthritis was already well established, pointing to a direct analgesic effect of NO donors in articular inflammatory pain.

At least two points of discussion emerge from the results. First, the apparent paradox of both NOS inhibitors and NO donors providing anti-nociceptive effects. This we believe may be resolved by postulating that the anti-nociceptive effect of NOS inhibitors given prophylactically is due to prevention of local inflammation. Once the synoviocytes are stimulated by zymosan, leading to the release of pro-inflammatory mediators, the subsequent administration of NOS inhibitors (therapeutic intervention) cannot prevent the

activation of nociceptors by the algogenic mediators already present. However, NO donors were effective in the presence of algogenic mediators because NO has a direct anti-nociceptive effect.

This direct effect of NO provides the second point of discussion, as there are several reports that NO donors may produce either hyperalgesia or anti-nociception depending on the model, route of administration and species studied. In the rat paw pressure test, high dose SIN-1 was hyperalgesic (Aley *et al.*, 1998) whereas another study showed that SIN-1 reduced PGE₂ induced hyperalgesia (Ferreira *et al.*, 1991). Local intradermal or intravenous NO injection was shown to evoke pain (Holthusen & Arndt, 1994; Kindgen-Milles & Arndt, 1996) whereas dermal nitroglycerin patches decreased postoperative pain in humans (Lauretto *et al.*, 1999). With respect to joint pain, to our knowledge there is only one study showing that transdermal nitroglycerin provided partial symptomatic pain relief in patients with painful shoulders (Berrazueta *et al.*, 1996). However, prolonged or extensive use of nitroglycerin is unlikely, as its vasodilating activity induces side effects such as headache and hypotension. Our study extends this earlier observation and suggests that NO donors other than nitroglycerin may also provide analgesia in human articular inflammatory pain.

The mechanisms to explain how NO is affecting pain transduction pathways are probably multiple. In the present study, NO donors could be analgesic through down-regulation of peripheral nociceptors in the joint, operating through activation of cGMP. As we mentioned above, in the prostaglandin E₂-induced hyperalgesia in the rat hind paw, NO promoted analgesia that was blocked by a cGMP inhibitor (Duarte *et al.*, 1990). In agreement with this proposal, the anti-nociceptive effect of sildenafil in the abdominal writhings test in mice was recently shown to be mediated by the inhibition of the phosphodiesterase 5 enzyme, thus increasing NO and cGMP production. This effect of sildenafil was potentiated by the combined administration of sodium nitroprusside and L-arginine (Jain *et al.*, 2001). Also, the antinociceptive activity of the non-steroidal antiinflammatory drug (NSAID) ketorolac was shown to involve the activation of the NO-cGMP pathway, followed by opening of ATP-sensitive potassium channels (Lazaro-Ibanez *et al.*, 2001). In addition to these effects, reaction of NO with thiol groups could also promote analgesia, through down-regulation of NMDA receptors, by inhibiting calcium influx. This mechanism could be important in neuropathic pain, where excessive activation of NMDA receptors occurs (Lipton & Stamler, 1994).

The NO donors effects may also be indirectly mediated, through the inhibition of the release of other pain mediators. For instance, NO donors were shown to inhibit the *in vitro* release of substance P from dorsal horn neurons, an effect that was associated with an increase in cGMP levels (Kamisaki *et al.*, 1995). The production of cytokines and nerve growth factor (NGF) has also been associated with pain development during inflammatory conditions (Tal, 1999; Pezet *et al.*, 2001). In addition, tumour necrosis factor- α induced interleukin-1 β and NGF production were associated with the acute hyperalgesia provoked by the intraplantar injection of Freund's adjuvant in rats (Woolf *et al.*, 1997). Reduction of pro-inflammatory cytokines production by NO-naproxen was reported to be due to the addition of NO to

NSAID naproxen (Cicala *et al.*, 2000). Based on these data, we cannot exclude the possibility that the NO donors nociceptive effect in zymosan-induced arthritis is related to decreased NGF release, secondary to an inhibition of pro-inflammatory cytokines production.

In conclusion, the results presented in this study show that the administration of an NO donor was anti-nociceptive in zymosan arthritis, by reducing articular inflammatory pain. Additionally, we have also shown that prophylactic administration of NOS inhibitors also reduced this inflammatory

pain. The latter effect reflected inhibition of the iNOS isoform and probably prevention of the inflammatory condition but did not depend on inhibition of articular oedema or of PGE₂ release into the joints.

This work was supported by CAPES, CNPq, FAPESP, and FUNCAP.

References

- Y, K.O., MCCARTER, G. & LEVINE, J.D. (1998). Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J. Neurosci.*, **18**, 7008–7014.
- RAZUETA, J.R., LOSADA, A., POVEDA, J., OCHOTEGA, A., GONZALEZ, A., SALAS, E. & AMADO, J.A. (1996). Successful treatment of shoulder pain syndrome due to supraspinatus tendinitis with transdermal nitroglycerin. A double blind study. *Pain*, **66**, 63–67.
- VALA, C., IANARO, A., FIORUCCI, S., CALIGNANO, A., BUCCI, M., FERLI, R., SANTUCCI, L., WALLACE, J.L. & CIRINO, G. (2000). NO-naproxen modulates inflammation, nociception and down-regulates T cell response in rat Freund's adjuvant arthritis. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 1399–1405.
- ZOCREA, S., ZINGARELLI, B., CALAPAI, G., NAVA, F. & APUTI, A.P. (1997). Zymosan-activated plasma induces paw edema by nitric oxide and prostaglandin production. *Life Sci.*, **60**, 215–220.
- ARTE, I.D.G., LORENZETTI, B.B. & FERREIRA, S.H. (1990). Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, **186**, 289–293.
- REIRA, S.H., DUARTE, I.D. & LORENZETTI, B.B. (1991). The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.*, **201**, 121–122.
- VALA, C., IRIE, K., OGAWA, K. & MURAKI, T. (1996). Role of nitric oxide and prostaglandins in lipopolysaccharide-induced increase in vascular permeability in mouse skin. *Eur. J. Pharmacol.*, **297**, 57–263.
- VEY, E.P., OPLINGER, J.A., FURFINE, E.S., KIFF, R.J., LASZLO, F., WHITTLE, B.J.R. & KNOWLES, R.G. (1997). 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4959–963.
- ENBLATT, E.P., LOEB, A.L. & LONGNECKER, D.E. (1993). Altered regional heterogeneity in the magnitude of EDRF/NO-mediated vascular tone in awake rats. *J. Cardiovasc. Res.*, **21**, 35–240.
- FIFTHS, M.J.D., MESSENT, R.J., MACALLISTER, R.J. & EVBANS, J.W. (1993). Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 963–968.
- THUSEN, H. & ARNDT, J.O. (1994). Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. *Neurosci. Lett.*, **165**, 71–74.
- NTI, A., IANARO, A., MONCADA, S. & DI ROSA, M. (1992). Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **211**, 177–182.
- NTI, A., MONCADA, S. & DI ROSA, M. (1993). Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, **10**, 701–706.
- VALA, C., PATIL, C.S., SINGH, A. & KULKAMI, S.K. (2001). Idenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Brain Res.*, **909**, 170–178.
- YASAKI, Y., NAKAMOTO, K., WADA, K. & ITOH, T. (1995). Nitric oxide regulates substance P release from rat spinal cord nAChR-positive cells. *J. Neurochem.*, **65**, 2050–2056.
- KURI, E., VAALI, K., KNOWLES, R.G., LAHDE, M., KORPELA, M., VAPAATALO, H. & MOILANEN, E. (2001). Suppression of acute experimental colitis by a highly selective inducible nitric oxide synthase inhibitor, N-[3-(aminomethyl)benzyl]acetaminine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 1128–1132.
- KINDGEN-MILLES, D. & ARNDT, J.O. (1996). Nitric oxide as a chemical link in generation of pain from veins in humans. *Pain*, **64**, 139–142.
- LASZLO, F., EVANS, S.M. & WHITTLE, B.J.R. (1995). Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, **272**, 169–175.
- LAURETTI, G.R., LIMA, I.C., REIS, M.P., PRADO, W.A. & PEREIRA, N.L. (1999). Oral ketamine and transdermal nitroglycerin as analgesic adjuvants to oral morphine therapy for cancer pain management. *Anesthesiology*, **90**, 1528–1533.
- LAWAND, N.B., WILLIS, W.D. & WESTLUND, K.N. (1997). Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide inhibitor. *Neuroreport*, **8**, 895–899.
- LAZARO-IBANEZ, G.G., TORRES-LOPEZ, J.E. & GRANADOS-SOTO, V. (2001). Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K(+) channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur. J. Pharmacol.*, **426**, 39–44.
- LIPTON, S.A. & STAMLER, J.S. (1994). Actions of redox congeners of nitric oxide at the NMDA receptor. *Neuropharmacology*, **33**, 1229–1233.
- MCCARTNEY-FRANCIS, N.L., SONG, X.Y., MIZEL, D.E., WAHL, C.L. & WAHL, S.M. (1999). Hemoglobin protects from streptococcal cell wall-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, **42**, 1119–1127.
- MCCARTNEY-FRANCIS, N.L., SONG, X.Y., MIZEL, D.E. & WAHL, S.M. (2001). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. *J. Immunol.*, **166**, 2734–2740.
- MILANO, S., ARCOLEO, F., DIELE, M., D'AGOSTINO, P., DE NUCCI, G. & CILLARI, E. (1995). Prostaglandin E₂ regulates inducible nitric oxide in the murine macrophage cell line J774. *Prostaglandins*, **49**, 105–115.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J. & HIGGS, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **43**, 109–141.
- MOORE, P.K., OLUYOMI, R.C., BABBEDGE, R.C., WALLACE, P. & HART, S.L. (1991). L-N^G-nitro-arginine-methyl-ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 198–202.
- MUNDY, A.L. & DORRINGTON, K.L. (2000). Inhibition of nitric oxide synthesis augments pulmonary oedema in isolated perfused rabbit lung. *Br. J. Anaesth.*, **85**, 570–576.
- OSBORNE, M.G. & CODERRE, T.J. (1999). Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 1840–1846.
- PAUL-CLARK, M.J., GILROY, D.W., WILLIS, D., WILLOUGHBY, D.A. & TOMLINSON, A. (2001). Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. *J. Immunol.*, **166**, 1169–1177.
- PEZET, S., ONTENIENTE, B., JULLIEN, J., JUNIER, M.P., GRANNEC, G., RUDKIN, B.B. & CALVINO, B. (2001). Differential regulation of NGF receptors in primary sensory neurons by adjuvant-induced arthritis in the rat. *Pain*, **90**, 113–125.
- RIDGER, V.C., PETTIPHER, E.R., BRYANT, C.E. & BRAIN, S.D. (1997). Effect of the inducible nitric oxide synthase inhibitors aminoguanidine and L-N^G-(iminoethyl)lysine on zymosan induced plasma extravasation in rat skin. *J. Immunol.*, **159**, 383–390.

- OCHA, F.A.C., ARAGÃO Jr, A.G.M., DE OLIVEIRA, R.C., VALE, M.R. & RIBEIRO, R.A. (1999). Periarthritis promotes articular incapacitation in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflam. Res.*, **48**, 485–490.
- ALVEMINI, D., MANNING, P.T., ZWEIFEL, B.S., SEIBERT, K., CONNOR, J., CURRIE, M.G., NEEDLEMAN, P. & MASFERRER, J.L. (1995a). Dual inhibition of nitric oxide and prostaglandin production contributes to the antiinflammatory properties of nitric oxide synthase inhibitors. *J. Clin. Invest.*, **96**, 301–308.
- ALVEMINI, D., MISKO, T.P., MASFERRER, J.L., SEIBERT, K., CURRIE, M.G. & NEEDLEMAN, P. (1993). Nitric oxide activates cyclo-oxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 7140–7144.
- ALVEMINI, D., SETTLE, S.L., MASFERRER, J.L., SEIBERT, K., CURRIE, M. & CURRIE, M. & NEEDLEMAN, P. (1995b). Regulation of prostaglandin by nitric oxide: an in vivo analysis. *Br. J. Pharmacol.*, **114**, 1171–1178.
- ALVEMINI, D., WANG, Z.Q., BOURDON, D.M., STERN, M.K., CURRIE, M.G. & MANNING, P.T. (1996a). Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. *Eur. J. Pharmacol.*, **303**, 217–220.
- ALVEMINI, D., WANG, Z.Q., WYATT, P.S., BOURDON, D.M., MARINO, M.H., MANNING, P.T. & CURRIE, M.G. (1996b). Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, **118**, 829–838.
- ENDO, T., KATAOKA, Y., TAKEDA, Y., FURUTA, W. & OISHI, R. (2000). Nitric oxide protects against contrast media-increased pulmonary vascular permeability in rats. *Invest. Radiol.*, **35**, 472–478.
- USA, A.M. & PRADO, W.A. (2001). The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.*, **897**, 9–19.
- STEFANOVIC-RACIC, M., MEYERS, K., MESCHTER, C., COFFEY, J.W., HOFFMAN, R.A. & EVANS, C.H. (1994). N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. *Arthritis Rheum.*, **37**, 1062–1069.
- STEFANOVIC-RACIC, M., MEYERS, K., MESCHTER, C., COFFEY, J.W., HOFFMAN, R.A. & EVANS, C.H. (1995). Comparison of the nitric oxide synthase inhibitors methylarginine and aminoguanidine as prophylactic and therapeutic agents in rat adjuvant arthritis. *J. Rheumatol.*, **22**, 1922–1928.
- SWIERKOSZ, T.A., MITCHELL, J.A., WARNER, T.D., BOTTING, R.M. & VANE, J.R. (1995). Co-induction of nitric oxide and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanooids. *Br. J. Pharmacol.*, **114**, 1335–1342.
- TAL, M. (1999). A role for inflammation in chronic pain. *Curr. Rev. Pain*, **3**, 440–446.
- TEIXEIRA, M.M., WILLIAMS, T.J. & HELLEWELL, P.G. (1993). Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 1515–1521.
- TETSUKA, T., DAPHNA-IKEN, D., SRIVASTAVA, S.K., BAIER, L.D., DUMAINE, J. & MORRISON, A.R. (1994). Cross-talk between cyclooxygenase and nitric oxide pathways prostaglandin E₂ negatively modulates induction of nitric oxide synthase by interleukin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 12168–12172.
- TONUSSI, C.R. & FERREIRA, S.H. (1992). Rat knee-joint incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain*, **48**, 421–427.
- WOLFF, D.J. & LUBESKIE, A. (1995a). Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **316**, 290–301.
- WOLFF, D.J. & LUBESKIE, A. (1995b). Inactivation of nitric oxide synthase isoforms by diaminoguanidine and N^G-amino-L-arginine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **325**, 227–234.
- WOOLF, C.J., ALLCHORNE, A., SAFIEH-GARABEDIAN, B. & POOLE, S. (1997). Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumor necrosis factor alpha. *Br. J. Pharmacol.*, **121**, 417–424.

(Received February 14, 2002

Revised April 4, 2002

Accepted April 9, 2002)