

C 565806
R 1162373
05/10/99

AC-38796

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
FARMACOLOGIA

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
Nº. R 1162373	
05 / 10 / 99	

*Envolvimento do Óxido Nítrico na Artrite Induzida por
Zymosan em Ratos*

JOSE CARLOS DA SILVA ROCHA

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e
Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como pré-
requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

FC-00006281-8

Fortaleza-Ceará

Agosto/1999

D
616.722
R 5732
1999

FICHA CATALOGRÁFICA

R573e Rocha, José Carlos da Silva

Envolvimento do óxido nítrico na artrite induzida por zymosan em ratos / José Carlos da Silva Rocha. – Fortaleza, 1999.

150f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Artrite – Óxido Nítrico. 2. Dor. 3. Migração celular. 4. Inflamação. I. Título

CDD 616.722

*Envolvimento do Óxido Nítrico na Artrite Induzida por
Zymosan em Ratos*

*Dissertação aprovada, com Louvor, em 20 de
Agosto de 1.999*

José Carlos da Silva Rocha

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro

Prof. Dr. Vieta Satyanarayana Rao

Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), na Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Ao João, Maria, Deuvanir, Jaqueline e Jonatan, minha pequena família, por ter mostrado que mesmo nos momentos de dificuldades extremas, é possível ter esperança.

À minha esposa, amiga e companheira Simone Hounsell, pela alegria e companheirismo nos momentos de alegria e pela paciência e amor nas dificuldades.

Pegadas na Areia

“Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia, com o Senhor, e através do céu passavam cenas da minha vida. Para cada cena que se passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era o meu e o outro era do senhor. Quando a última cena da minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida havia apenas um par de pegadas na areia. Notei, também, que isso acontecia nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso entristeceu-me deveras, e perguntei então ao Senhor:

“Senhor, Tu me dissestes que, uma vez que eu resolvi Te seguir, Tu andarias sempre comigo todo o caminho mas, notei que durante as maiores atribulações do meu viver havia na areia dos caminhos da vida, apenas um par de pegadas. Não compreendo por que, na hora que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixastes.” O Senhor me respondeu:

“Meu precioso filho, Eu te amo e jamais Te deixaria nas horas da tua prova e do teu sofrimento. Quando vistes na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí que Eu, nos braços...Te carreguei.”

“A vida é bela e útil quando se firma no trabalho, a virtude a ilumina e o bem geral a conduz.”

Clóvis Beviláqua

AGRADECIMENTOS

À Jeová, deus dos meus pais, que me deu a vida e a força para superar os obstáculos.

Ao professor Airton, meu orientador, cujo senso de humor, capacidade e experiência permitiu chegarmos ao fim desta tarefa hercúlea.

Ao professor Ronaldo Albuquerque, por sua paciência, experiência e inúmeras sugestões.

Ao professor Fernando Cunha, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela determinação de prostaglandina.

À professora Gerly Anne pela sua gentileza e presteza em sempre ajudar.

Aos professores Marcos Valle e Vietla Rao, sempre pacientes e amigos.

Ao professor Armênio Aguiar, pela sua disponibilidade.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que, de uma forma ou de outra, deram contribuição inestimável para a minha formação científica e intelectual.

Ao trio odontológico, Mirna, Veruska e Vilma, pelo amizade em todos os momentos.

Às amigas da pós-graduação Lurdemiller, Angélica, Regilaine, Ana Maria Assreuy e Luilma, pelo companheirismo.

Aos amigos Rômulo, Luiz Fernando, Pergentino e Clielder, parceiros na busca do conhecimento.

Ao aluno de iniciação científica Magno Peixoto, sempre disposto ao trabalho.

Aos funcionários do Departamento e do Curso de Pós-Graduação Marta, Sílvia, Haroldo, Samuel, Artemísia, Sobrinho e Nísia, sempre dispostos a ajudar.

Aos meus pares do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Pará, em especial o prof. José Ribamar Mesquita Teixeira, grande mestre, os quais foram sensíveis a necessidade de qualificação dos docentes.

Aqueles pequenos seres que, indefesos e sem alternativa, são imolados em nome da ciência e do bem estar do Homem.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN. José

Carlos da Silva Rocha. Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

No modelo de artrite experimental induzida pela administração do agente inflamatório zymosan (AZy) ocorre uma resposta inflamatória caracterizada por influxo celular para o foco inflamatório e dor inflamatória articular demonstrada pela incapacitação articular (IA). A administração de inibidores da síntese de óxido nítrico (NO) reduziram a resposta inflamatória articular por mecanismos ainda não esclarecidos. Em virtude disto, resolvemos investigar o papel do NO na IA e no influxo de leucócitos na AZy. Ratos Wistar receberam injeção intra-articular (iart) de zymosan (1 mg) no joelho direito e o pico de IA foi obtido na 3^a ou 4^a hora de artrite, através do registro do Tempo de Suspensão da Pata, durante 60 segundos. Na 6^a h de artrite, os animais foram sacrificados sob anestesia com hidrato de cloral e o exsudato articular coletado para contagem do número de células em câmara de Neubauer. O grupo controle recebeu apenas salina iart. Grupos foram pré-tratados (1 h) com L-NAME (inibidor de NOS), ou aminoguanidina (inibidor de iNOS) nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg-i.p.; L-NAME e aminoguanidina reduziram a IA em 22.3%, 51.2% e 49.8% para L-NAME 30, 100 e 300 mg, respectivamente, e em 44.9%, 52.9% e 53.2% para aminoguanidina 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente, em relação ao grupo não-tratado ($p < 0.05$). L-NAME e aminoguanidina reduziram o influxo de leucócitos em 47.9%, 81.2% e 72.9% para L-NAME 30, 100 e 300 mg/kg respectivamente, e em 56.2%, 75.0% e 68.8% para aminoguanidina 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente, em relação ao grupo não tratado ($p < 0,05$). A administração prévia de L-arginina (1 g/kg-vo) reverteu o efeito de L-NAME 100 mg/kg sobre a IA e o influxo de leucócitos. Administração de D-NAME (100 mg/kg-ip) não teve efeito sobre IA ou influxo de leucócitos. A administração prévia de naloxona (1 mg/kg-ip) reverteu o efeito de L-NAME ou aminoguanidina 100 mg/kg sobre a IA. L-NAME ou AMG 100 mg/kg administrados 2 h após indução da AZy não reduziram a IA ou influxo de leucócitos. Injeção local de nitroprussiato de sódio (500 µg/iart), dado após 2 h

de AZy, reduziu a IA em 42.0% em relação ao grupo não tratado ($p < 0.05$). Azul de metileno (500 $\mu\text{g}/\text{art}$), reduziu a IA em 56.3% e a influxo de leucócitos em 70.8% em relação ao controle ($p < 0.05$). Hemoglobina (30 $\mu\text{mol}/\text{art}$) não teve efeito sobre a IA ou o influxo de leucócitos. O edema articular, avaliado pela diferença entre peso seco e peso úmido do tecido sinovial e periarticular, não foi alterado pela administração de L-NAME ou aminoguanidina. L-NAME (100 mg/kg), mas não aminoguanidina (100 mg/kg), provocou aumento da pressão arterial média ($p < 0.05$). A liberação de PGE2 (medida por ELISA) no lavado articular, na 6^a h de AZy, não foi alterada pelo tratamento com L-NAME ou aminoguanidina. L-NAME ou aminoguanidina, como pré-tratamento, provocaram redução da IA e do influxo de leucócitos na AZy provavelmente por inibição da óxido nítrico sintase induzida. O efeito sobre a IA de L-NAME e aminoguanidina ocorre por liberação de opióides endógenos. O efeito de L-NAME e aminoguanidina não depende de alteração da permeabilidade vascular local, alteração hemodinâmica sistêmica ou liberação de PGE2 e parece envolver a via guanilato ciclase solúvel. NPS tem efeito antinociceptivo na AZy.

NITRIC OXIDE ROLE IN ZYMOSAN-INDUCED ARTHRITIS, José Carlos da Silva Rocha. Prof. Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Zymosan-induced arthritis (ZyA) presents leukocyte influx and pain measured by the rat-knee joint articular incapacitation (AI) model. Nitric oxide (NO) synthesis inhibitors reduce articular inflammation through as yet unknown mechanisms. We decided to investigate the role of NO in AI and leukocyte influx in ZyA. Wistar rats were subjected to intraarticular (iart) injection of Zy (1 mg) in the right knee and AI peak was measured after 3 or 4 h of arthritis by measuring the Paw Elevation Time during 60s. After 6h of arthritis, rats were killed under anesthesia with and the articular exudate was collected for cell counting using Neubauer chamber. Control received saline (iart). Groups were pretreated (1 h) with either L-NAME (NOS inhibitor) or aminoguanidine (NOSi inhibitor) 30, 100, or 300 mg/kg-i.p.; both L-NAME and aminoguanidine reduced AI being 22.3%, 51.2% and 49.8% less for L-NAME 30, 100, and 300 mg groups, respectively and 44.9%, 52.9% and 53.2% less for aminoguanidine 30, 100, and 300 mg/kg groups, respectively, as compared to a non-treated group ($p < 0.05$). Both L-NAME and aminoguanidine reduced leukocyte influx being 47.9%, 81.2% and 72.9% less for L-NAME 30, 100 and 300 mg/kg groups respectively, and 56.2%, 75.0% e 68.8% less for aminoguanidine 30, 100 and 300 mg/kg groups, respectively, as compared to a non-treated group ($p < 0.05$). Co-treatment with L-arginine (1g/kg-per os) and L-NAME(100 mg/kg) reversed L-NAME effect upon AI and leukocyte influx. D-NAME (100 mg/kg-ip) had no effect on either AI or leukocyte influx. Co-treatment with naloxone (1 mg/kg-ip) and either L-NAME or aminoguanidine (100 mg/kg) reversed their effect on AI. Either L-NAME or aminoguanidine (100 mg/kg) administered 2 h after arthritis induction did not alter AI or leukocyte influx in ZyA. Sodium nitroprusside (500 μ g/iart), given after 2 h of ZyA reduced AI by 42.0% as compared to a non-treated group ($p < 0.05$). Local methylene blue injection (500 μ g/iart) reduced both AI and leukocyte influx beng 56.3% and 70.8% less, respectively, compared to control ($p < 0.05$). Local hemoglobyn injection (30 μ mol/iart), did no

alter AI or leukocyte influx. Articular edema evaluated as the wet/dry weight difference of synovial and periarticular tissue was altered neither by L-NAME nor by aminoguanidine. L-NAME(100 mg/kg) but not aminoguanidine (100 mg/kg), increased mean arterial pressure ($p < 0.05$), compared to baseline. PGE2 release (measured by ELISA) into the articular exsudate at 6 h of ZyA was unaltered by either L-NAME or aminoguanidine. Both L-NAME or aminoguanidine, given as pre-treatment, provoked reduction of AI and leukocyte influx in ZyA probably through iNOS inhibition. This effect upon AI of L-NAME and aminoguanidine is mediated through endogenous opioids release and does not appear to depend on either vascular permeability alteration, systemic hemodynamic changes or local PGE2 release. This effect is mediated via soluble guanylate cyclase. NPS has an antinociceptive effect on ZyA.

Sumário

Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Lista de Tabelas.....	xvi
Lista de Abreviaturas.....	xx
Lista de Figuras.....	xvii
1. Introdução.....	2
1.1. Artrite reumatóide.....	2
1.2 Dor.....	4
1.2.1. Descrição.....	4
1.2.2. Nociceptores.....	5
1.2.3. Hiperalgisia.....	7
1.2.4. Dor inflamatória.....	10
1.2.5. Dor inflamatória articular.....	13
1.3. Modelos experimentais para estudo da artrite.....	15
1.3.1. Artrite induzida por zymosan.....	20
1.4. Óxido nítrico (NO).....	22
1.4.1. Descoberta	22
1.4.2. Biossíntese e Metabolização.....	24
1.4.3. Estudo da participação do óxido nítrico em processos fisiopatológicos.....	27
1.4.4. Ações do óxido nítrico.....	29
1.4.5. Óxido nítrico e artrite.....	30
1.4.6. Óxido nítrico e dor.....	32
1.5. Objetivos.....	35

2.0. Materiais e Métodos.....	38
2.1. Animais.....	38
2.2. Soluções, drogas e solventes.....	38
2.3. Registro da incapacitação articular.....	39
2.3.1 Descrição do sistema.....	39
2.4. Indução da artrite por zymosan.....	40
2.5. Influxo de leucócitos.....	42
2.6. Análise do edema articular.....	42
2.7. Medida da pressão arterial média.....	43
2.8. Dosagem de prostaglandina E2.....	43
2.9. Modulação farmacológica.....	44
2.10. Análise estatística.....	45
3.0 Resultados.....	47
3.1. Incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	47
3.1.2. Efeito da administração de L-NAME sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	47
3.1.3. Efeito da administração de L-arginina e L-NAME sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	48
3.1.4. Efeito da administração de D-NAME sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	48
3.1.5. Efeito da administração de aminoguanidina sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos	52

3.1.6. Efeito da administração de L-NAME ou aminoguanidina sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	52
3.1.7. Efeito da administração de naloxona e L-NAME ou aminoguanidina sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	53
3.1.8. Efeito da administração de nitroprussiato de sódio sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	53
3.1.9. Efeito da administração de azul de metileno sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	58
3.1.10. Efeito da administração de hemoglobina sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	58
3.2. Influxo de leucócitos.....	58
3.2.1. Efeito da administração de L-NAME sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	59
3.2.2. Efeito da administração de L-arginina e L-NAME sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	65
3.2.3. Efeito da administração de D-NAME sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	65

3.2.4. Efeito da administração de aminoguanidina sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	65
3.2.5. Efeito da administração de L-NAME ou aminoguanidina sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	66
3.2.6. Efeito da administração de nitroprussiato de sódio sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	70
3.2.7. Efeito da administração de azul de metileno sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	70
3.2.8. Efeito da administração de hemoglobina sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	70
3.3. Efeito de inibidores da síntese de óxido nítrico sobre o edema articular.....	71
3.3.1. Efeito de L-NAME ou aminoguanidina sobre o edema articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	71
3.4. Efeito de inibidores da síntese de óxido nítrico sobre a pressão arterial média de ratos.....	76
3.4.1. Efeito de L-NAME sobre a pressão arterial média de ratos.....	76
3.4.2 Efeito de aminoguanidina sobre a pressão arterial média de ratos.....	76

3.5. Efeito de inibidores da síntese de óxido nítrico sobre a liberação de prostaglandina E2 no lavado articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	76
3.5.1. Efeito de L-NAME ou aminoguanidina sobre a liberação de prostaglandina E2 no lavado articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	77
4.0. Discussão.....	81
5.0. Conclusões.....	100
6.0. Bibliografia.....	102

Lista de Tabelas

Tabela 1 . Artrite experimental induzida por zymosan em ratos – Aumento do influxo de leucócitos.....	62
Tabela 2. Efeito de L-NAME ou aminoguanidina sobre edema articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	75
Tabela 3. Efeito de L-NAME ou aminoguanidina sobre a pressão arterial média de ratos.....	78
Tabela 4. Efeito de L-NAME ou aminoguanidina sobre a liberação de prostaglandina E2 no lavado articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	79

Lista de Figuras

Figura 1. Via L-arginina:Óxido Nítrico:GMPc.....	26
Figura 2. Sistema de Registro da incapacitação articular.....	41
Figura 3. Tempo de incapacitação articular em ratos submetidos a artrite experimental induzida por zymosan	49
Figura 4. Efeito da administração de L-NAME ou D-NAME sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	50
Figura 5. Efeito da administração de L-arginina e L-NAME sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	51
Figura 6. Efeito da administração de aminoguanidina sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	54
Figura 7. Efeito do tratamento com L-NAME ou aminoguanidina sobre a incapacitação articular após a indução da artrite experimental por zymosan em ratos.....	55
Figura 8. Efeito da administração de naloxona e L-NAME ou aminoguanidina sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	56
Figura 9. Efeito da administração de nitroprussiato de sódio sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	57

Figura 10. Efeito da administração de azul de metileno sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	60
Figura 11. Efeito da administração de hemoglobina sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	61
Figura 12. Fotomicrografia da região periarticular de joelho de ratos.....	63
Figura 13. Efeito da administração de L-NAME ou D-NAME sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	64
Fig. 14. Efeito da administração de L-arginina e L-NAME sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	67
Figura 15. Efeito da administração de aminoguanidina sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	68
Figura 16. Efeito da administração de L-NAME ou aminoguanidina sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	69
Figura 17. Efeito da administração de nitroprussiato de sódio sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	72

Figura 18. Efeito da administração de azul de metileno sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	73
Figura. 19. Efeito da administração de hemoglobina sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA: artrite induzida por adjuvante
- AIA: artrite induzida por antígeno
- AIC: artrite induzida por imunocomplexos
- AMPc: adenosina monofosfato cíclico
- AZy: artrite induzida por zymosan
- CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- cNOS: óxido nítrico sintase constitutiva
- COX: ciclooxigenase
- e.p.m.: erro padrão da média
- eNOS: óxido nítrico sintase endotelial
- FRDE: fator de relaxamento derivado do endotélio
- GMPc: guanilato monofosfato cíclico
- GTN: trinitrato de gliceril
- IFN- γ : interferon gama
- iNOS: óxido nítrico sintase induzida
- L-NAME: N^o-nitro-L-arginina metil ester
- L-NIO: L ^{δ} -iminoetil-L-ornitina
- L-NMMA: N^o-monometil-L-arginina
- LPS: lipopolissacarídeo de *S. coli*

NMDA: N-metil-D-aspartato

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

NO: óxido nítrico

NO⁻²: nitrato

NO⁻³: nitrito

NOS: óxido nítrico sintase

NPS: nitroprussiato de sódio

PAF: fator ativador de plaquetas

q.s.p.: quantidade suficiente para

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

rpm: rotações por minuto

SNAP: S-nitroso-N-acetil-D-penicilamina

TSP: tempo de suspensão da pata

UI: unidade internacional

Zy: zymosan

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. Artrite reumatóide

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crônica caracterizada por proliferação da membrana sinovial, com destruição da cartilagem articular e invasão inflamatória do osso subcondral. Tem grande importância epidemiológica devido à alta prevalência na população (cerca de 1%), associada ao caráter incapacitante da patologia. Apesar do grande progresso no tratamento da artrite reumatóide, a falta de conhecimentos mais precisos sobre sua etiopatogenia tem dificultado o encontro de uma terapêutica que possa alterar significativamente o curso da doença (Harris, 1990).

A membrana sinovial normal reveste as articulações, exceto na região de cartilagem articular. A superfície interna dessa membrana é composta por dois tipos de células: sinoviócitos do tipo A, que se assemelham estrutural e funcionalmente a macrófagos, e os do tipo B, os quais têm características de fibroblastos. Estas células repousam sobre um tecido conjuntivo que pode ser frouxo,

denso ou adiposo. A artrite reumatóide caracteriza-se por sinovite intensa com aumento do influxo celular tanto na membrana como no líquido sinovial. No líquido sinovial, as células na fase aguda ou nas crises de agudização são principalmente neutrófilos, enquanto na sinovite crônica reumatóide predominam células linfomononucleares. Ocorre intensa proliferação linfóide devido, possivelmente, à produção local de citocinas a partir de células residentes uma vez que, como dito acima, as células sinoviais do tipo A são semelhantes a macrófagos e, portanto, uma vez estimuladas, podem liberar citocinas e outros mediadores da resposta inflamatória. Além do aumento do número e da hiperplasia de sinoviócitos, ocorre migração de monócitos do sistema periférico para a sinóvia (Harris, 1990) o que aumenta a população de células imunocompetentes na fase crônica da sinovite reumatóide. Acrescentem-se as células endoteliais dos vasos da membrana sinovial, que é ricamente irrigada, e os condrócitos da cartilagem articular, e teremos um conjunto de células capazes de potencializar uma reação inflamatória a partir de um estímulo inicial (Seki *et alii*, 1988; Cannon *et alii*, 1996) .

1.2. Dor

1.2.1. Descrição

A atividade em fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro dos nervos periféricos, em condições normais, está associada a dor. Esses nervos possuem terminações sensoriais nos tecidos periféricos e são ativados por estímulos de natureza mecânica, térmica ou química.

A dor, aguda ou crônica, é uma modalidade sensorial e emocionalmente desagradável que desempenha, entre outros, o papel de alerta para o organismo, embora a dor crônica não tenha qualquer função de alerta e gere acentuado estresse. Pode ser consequência da aplicação de estímulo potencialmente lesivo aos nociceptores (dor nociceptiva ou somática), à lesão do sistema nervoso (injúria neural), a fenômenos de natureza puramente psíquica (dor neurogênica) ou uma associação desses mecanismos (dor mista). Na essência, é uma manifestação subjetiva que varia de acordo com a experiência individual (Besson e Chaouch, 1987; Coderre *et alii*, 1993; Schaible e Grubb, 1993).

A dor aguda pode ser explicada em termos de nocicepção, um estímulo nocivo excessivo que dá origem a uma sensação intensa e desagradável. Por outro lado, a maioria dos estados com dor crônica estão associados com alterações graves da via fisiológica normal, dando origem à hiperalgesia (uma maior intensidade da dor associada a um estímulo nocivo e leve), alodinia (dor evocada por um estímulo não-nocivo) ou espasmos espontâneos de dor sem qualquer estímulo desencadeante. A lesão tecidual é uma causa imediata de dor e resulta da liberação local de vários agentes químicos que agem diretamente sobre os nociceptores estimulando-os ou, indiretamente, sensibilizando-os para outras formas de estimulação (Rang *et alii*, 1991).

1.2.2. Nociceptores

Os nociceptores são estruturas nervosas específicas que agem como um sistema de alarme imediato que detecta danos teciduais ou estímulos potencialmente lesivos. A excitação dos nociceptores, fenômeno imprescindível para o aparecimento da dor nociceptiva, pode ser breve (dor aguda) ou prolongada (dor

crônica). Essas fibras nervosas podem ser excitadas por trauma mecânico excessivo ou lesão mecânica dos tecidos (nociceptores mecanossensíveis da dor); outras são sensíveis aos extremos do calor e frio (nociceptores termossensíveis da dor) e há ainda aquelas sensíveis a várias substâncias químicas (nociceptores quimiossensíveis ou quimioceptores) (Besson e Chaouch, 1987; Schaible e Grubb, 1993)

Os nociceptores apresentam uma característica importante, a plasticidade, através da qual sua resposta a estímulos pode variar e, no caso dos nociceptores quimiossensíveis, que têm um limiar de excitabilidade relativamente elevado, só são ativados por estímulo de intensidade nociva o suficiente para produzir certo grau de lesão tecidual (Rang *et alii*, 1991).

A lesão tecidual libera substâncias, como bradicinina, serotonina, histamina, prostaglandinas, acetilcolina e enzimas proteolíticas, que ativam os nociceptores e a observação de que a liberação destas substâncias provoca intensa dor no homem e animais permitiu a proposição de que os nociceptores para a dor são, geralmente, quimioceptores (Guyton e Hall, 1996).

Embora se considere que os nociceptores sejam basicamente

sensíveis a estimulação específica (química, térmica ou mecânica) muitos são sensíveis a mais de um tipo de estímulo haja visto que as substâncias químicas supra-citadas não estimulam apenas os quimioceptores mas também reduzem grandemente o limiar de excitabilidade dos demais nociceptores (Guyton e Hall, 1996).

1.2.3. Hiperalgisia

A hiperalgisia envolve sensibilização de terminações nervosas nociceptivas e facilitação central da transmissão ao nível do corno dorsal da medula espinhal e do tálamo. No sistema nervoso periférico, os mediadores químicos agem sobre as terminações nervosas, enquanto no sistema nervoso central ocorre facilitação da transmissão sináptica.

A facilitação central é bloqueada por agonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), como o glutamato, por antagonistas de substância P e por inibidores da síntese de óxido nítrico (NO) (McMahon *et alii*, 1993).

O glutamato medeia respostas sinápticas excitatórias rápidas no sistema nervoso central e está envolvido nos fenômenos da

plasticidade neuronal, mas também participa ativamente de fenômenos degenerativos via ativação de receptores NMDA e da via de síntese do NO. Demonstrou-se que a administração de antagonistas de NO, N^o-monometil-L-arginina (L-NMMA) e nitro-arginina, previnem a neurotoxicidade induzida por ativação dos receptores NMDA (Garthwaite *et alii*, 1989; Snyder, 1992).

A substância P é um neuropeptídeo da família das taquicininas que ocorre principalmente no sistema nervoso central e, em particular, nos neurônios sensitivos nociceptivos. As taquicininas freqüentemente são liberadas em associação com outros mediadores, e parecem estar envolvidas em diferentes estados patológicos entre os quais a dor (Linden *et alii*, 1999a; Linden *et alii*, 1999b).

A substância P exacerba a transmissão mediada pelo receptor NMDA resultando em ativação de neurotransmissores que aumentam o influxo de cálcio, um evento crítico na hiperalgesia em modelos experimentais de dor (placa quente, teste de contorções e teste de formalina) onde a sensibilização central e a plasticidade neuronal estão presentes (Coderre *et alii*, 1993). A substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), uma outra

taquicinina, também afeta os vasos sanguíneos e células do sistema imune provocando a chamada inflamação neurogênica, amplificando e facilitando a reação inflamatória assim como a ativação posterior de fibras aferentes nociceptivas (Maggi *et alii*, 1993; Neugebauer *et alii*, 1996; Heppelmann e Pawlak, 1997). Nos vasos sinoviais de coelho demonstrou-se vasodilatação induzida por administração de CGRP, provavelmente por ativação de um receptor específico de CGRP (Rocha *et alii*, 1994).

O mecanismo bioquímico da hiperalgesia ainda não está completamente entendido. Observou-se que, no modelo de hiperalgesia em pata de rato, inibidores de fosfodiesterase ou bloqueadores de canais de cálcio (como o verapamil) potenciam a sensibilização dos receptores induzida por prostaglandinas ou dopamina. Estes dois potentes ativadores de adenilciclase são hiperalgésicos, demonstrando que, ao nível do nociceptor, é importante o aumento das concentrações intracelulares de adenosina mono-fosfato cíclico (AMPC) e dos íons cálcio sendo que o próprio AMPC exógeno e ionóforo de cálcio A23187 induzem hiperalgesia em pata de ratos (Ferreira e Nakamura, 1979a).

1.2.4. Dor inflamatória

Os mediadores da dor inflamatória são classicamente divididos em dois grupos: as substâncias que ativam diretamente os nociceptores, como bradicinina e histamina, e aquelas que induzem hiperalgesia, como serotonina, histamina, dopamina e prostaglandinas. A sensibilidade química dos nociceptores explicaria a atividade contínua durante o processo inflamatório, o que poderia causar, ou facilitar, a dor, mesmo em condições de repouso. Na maioria dos casos, a estimulação das terminações nociceptivas periféricas é de origem química. Os estímulos mecânicos ou térmicos excessivos podem causar dor aguda, porém, a persistência dessa dor após a remoção do estímulo ou a dor que resulta de alterações inflamatórias ou isquêmicas nos tecidos em geral reflete uma estimulação química dos aferentes da dor (Rang *et alii*, 1991; Woof, 1991).

Na inflamação, células não-neuronais produzem uma variedade de mediadores, como bradicinina, serotonina e neuropeptídeos, que agem sobre as terminações nervosas aferentes. Nos seres humanos, muitas dessas terminações são

fibras C não-mielinizadas com baixa velocidade de condução (< 1 m/s) e conhecidas como nociceptores polimodais C, que respondem tanto a estimulação mecânica quanto térmica, e a maioria destas fibras estão associadas com terminações nociceptivas polimodais (Kerr *et alii*, 1978; Rang *et alii*, 1991).

Um nova classe de nociceptores foi descrito e se caracterizam por não responderem a estímulos nocivos mecânicos ou térmicos e são por isso chamados de “silenciosos”, mas são ativados durante o processo inflamatório, por serem quimiossensíveis (Grigg *et alii*, 1986; Schaible e Schmidt, 1988). Tais nociceptores já foram identificados em vários tecidos como na pele, articulação e vísceras e em várias espécies animais incluindo gatos e coelhos (Grigg *et alii*, 1986; Meyer e Campbell, 1988; Häbler *et alii*, 1990). Sua função parece estar claramente associada ao processo inflamatório, pois na artrite experimental, estas fibras, virtualmente não-responsivas, passam a disparar sob os mais leves movimentos articulares (Grigg *et alii*, 1986; Schaible e Schmidt, 1988). Na pele de orelha de coelho (Cohen e Perl, 1990) e em neurônios aferentes de bexiga de gatos (Häbler *et alii*, 1990) foram obtidos resultados semelhantes.

Considerando os mecanismos complementares da dor inflamatória, excitação direta e sensibilização, descritos anteriormente, é possível definir, segundo Ferreira (1994), as seguintes classes de analgésicos periféricos:

1. Inibidores da ativação dos nociceptores prevenindo a dor mediante a inibição da ativação de nociceptores sensibilizados através de antagonismo ou evitando a estimulação excitatória. Este tipo de mecanismo pode ser observado com os antihistamínicos, α -simpatolíticos, anestésicos locais e, ainda, através da eliminação do estímulo mecânico ou térmico.
2. Prevenção da hiperalgesia através dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's) que inibem a ciclooxigenase (COX) reduzindo a liberação dos produtos da cascata do ácido araquidônico; com os simpatolíticos que inibem a liberação de aminas simpáticas (guanetidina) ou antagonismo β e dos receptores dopaminérgico; inibidores da atividade ou liberação de citocinas (AINE's), antagonistas de interleucina-1 e antagonistas da bradicinina.
3. Bloqueio direto da hiperalgesia através da estimulação do sistema L-arginina:óxido nítrico:guanosina mono-fosfato cíclico (L-arginina:NO:GMPc), através de redução da sensibilidade

nociceptiva (opioides periféricos, dipirona, diclofenaco) ou através da regulação indireta da sensibilidade dos nociceptores liberando opioides endógenos de ação periférica (clonidina).

1.2.5. Dor inflamatória articular

No estudo da dor inflamatória articular, vários modelos experimentais têm demonstrado que a compressão de uma pata inflamada ou injetada com mediadores que sensibilizem os nociceptores provoca uma resposta de aversão no animal, que é mais rápida do que seria num animal não sensibilizado. Essa abreviação é tida como sinal de hiperalgesia e tem sido utilizada para investigação dos mecanismos de dor em artrites.

Diversas substâncias têm sido empregadas para estudo da dor inflamatória articular, com destaque para os cristais de urato de sódio (Faires e McCarty, 1962; Coderre e Wall, 1987), o adjuvante de Freund (Larsen e Arnt, 1985; Attal *et alii*, 1988), a formalina (Pardo e Rodrigues, 1966) a carragenina (van Arman *et alii*, 1970) e, mais recentemente, o zymosan (Comerford e Etwebi, 1995; Gegout *et alii*, 1995; Magalhães *et alii*, 1997; Viana *et alii*, 1998).

nociceptiva (opióides periféricos, dipirona, diclofenaco) ou através da regulação indireta da sensibilidade dos nociceptores liberando opióides endógenos de ação periférica (clonidina).

1.2.5. Dor inflamatória articular

No estudo da dor inflamatória articular, vários modelos experimentais têm demonstrado que a compressão de uma pata inflamada ou injetada com mediadores que sensibilizem os nociceptores provoca uma resposta de aversão no animal, que é mais rápida do que seria num animal não sensibilizado. Essa abreviação é tida como sinal de hiperalgesia e tem sido utilizada para investigação dos mecanismos de dor em artrites.

Diversas substâncias têm sido empregadas para estudo da dor inflamatória articular, com destaque para os cristais de urato de sódio (Faires e McCarty, 1962; Coderre e Wall, 1987), o adjuvante de Freund (Larsen e Arnt, 1985; Attal *et alii*, 1988), a formalina (Pardo e Rodrigues, 1966) a carragenina (van Arman *et alii*, 1970) e, mais recentemente, o zymosan (Comerford e Etwebi, 1995; Gegout *et alii*, 1995; Magalhães *et alii*, 1997; Viana *et alii*, 1998).

De acordo com o modelo experimental empregado, diferentes comportamentos podem ser observados no animal. A nocicepção já foi avaliada pela observação de retirada espontânea do membro afetado após receber estimulação lesiva enquanto outros modelos, que aumentam a carga sobre a articulação ou forçam a sua flexão, empregam a estimulação externa para provocar a nocicepção (Payne *et alii*, 1989; Rates e Barros, 1994). Esses modelos permitem o estudo de drogas analgésicas, mas são poucos os modelos que permitem avaliar os mecanismos subjacentes à nocicepção inflamatória articular.

A limitação da mobilidade em artrites já foi usada como parâmetro de lesão em um modelo de artrite induzida por lipopolissacarídeo de *E. coli*. Neste estudo, foi sugerido que a liberação sistêmica de mediadores inflamatórios seria responsável pela limitação dos movimentos dos animais submetidos à artrite (Otterness *et alii*, 1993).

Há dois tipos de testes algésimétricos que se baseiam na resposta inflamatória. No teste de compressão da pata (Ferreira *et alii*, 1978) e no teste da retirada da pata inflamada provocada pela estimulação térmica (Hargreaves *et alii*, 1988), a resposta

comportamental é produzida por um estímulo exógeno térmico, químico ou mecânico aplicado sobre a região inflamada. É um modelo onde a resposta inflamatória modifica a latência para o aparecimento do comportamento relacionado à nocicepção. O estudo dos mediadores isolados mostrará apenas se ele modificará ou não a latência da resposta ao estímulo, ou seja, se ele produz ou não hiperalgesia.

Por outro lado, nos testes de contorções abdominais (Sigmund *et alii*, 1957) e incapacitação articular (Tonussi e Ferreira, 1992), o próprio estímulo provoca uma resposta nociceptiva espontânea. Nestes modelos, o estudo de um mediador isoladamente pode verificar se ele, *per se*, induz nocicepção ou se facilita a indução do comportamento provocado pelo próprio agente ou pelo próprio mediador, induzindo sensibilização e hiperalgesia. Neste caso, o mesmo mediador pode induzir nocicepção e hiperalgesia.

1.3. Modelos experimentais para estudo da artrite

Apesar das limitações próprias do estudo de modelos

experimentais e de não se dispor de uma forma de AR em animais, a maioria dos modelos atualmente empregados apresentam similaridades com a doença humana, entre as quais é importante citar o aumento da permeabilidade vascular demonstrado pelo edema na fase aguda, associado ao aumento do influxo celular. Na fase crônica, ocorre hiperplasia sinovial e proliferação linfomonocitária (Harris, 1990)

Entre os modelos empregados para estudo da artrite, destacam-se a artrite por adjuvante (AA), a artrite induzida por antígeno (AIA), a artrite induzida por colágeno (AIC) e a artrite induzida por imunocomplexos. Na AIA emprega-se o coelho como animal e estuda-se, basicamente, o componente do imunocomplexo no desenvolvimento da sinovite, o que representa uma limitação. Na AIC emprega-se como animal experimental o camundongo o que dificulta a obtenção de material articular para análise. Em resumo, os diferentes modelos experimentais apresentam vantagens e limitações que os tornam válidos dependendo da abordagem que se pretende fazer, porém há mais similaridades que diferenças entre estes modelos e a artrite reumatóide, o que justifica o seu emprego. Além do mais, muito do que se conhece sobre a fisiopatologia e os

mecanismos de ação de drogas nas artropatias foi obtido, inicialmente, a partir de modelos animais.

Não obstante o desenvolvimento de modelos experimentais para estudos da nocicepção, a maioria dos parâmetros observados ainda permanece sujeita ao treinamento cuidadoso do observador e os modelos em uso são dispendiosos e pouco úteis para a avaliação de drogas analgésicas.

Até o momento, o estudo de analgésicos de ação central e periférico tem como base variações do teste de “tail flick”, placa quente e “pinch test”, o modelo de contorção abdominal e o teste de compressão da pata. No entanto, estes modelos são pouco específicos, particularmente o teste de contorção, além de exibirem uma grande variabilidade e terem componente comportamental a influenciá-los. No caso específico do teste de compressão da pata, tem sido observada uma grande variação entre os registros obtidos, dificultando a comparação entre os dados. O teste da formalina goza de ampla aceitação talvez mais por sua simplicidade do que por sua sensibilidade e eficiência, os quais dependem do treinamento do observador.

Mais recentemente, Tonussi e Ferreira (1992) descreveram

um novo modelo que se mostrou útil para avaliação de dor inflamatória articular. Antes de discutirmos o modelo, faremos um breve relato do seu emprego no estudo do processo inflamatório.

O modelo de incapacitação articular foi originalmente descrito por Bustamante (1982), que empregou cristais de urato para induzir incapacitação femuro-tibial em animais e usou como parâmetro de avaliação o número de toques que a pata correspondente a articulação lesada exercia sobre uma superfície metálica. Partindo desta idéia inicial, Tonussi e Ferreira (1992) passaram a utilizar como agente indutor da incapacitação articular a carragenina e desenvolveram um modelo baseado em microcomputador que, por suas características, permitem que circuitos eletrônicos sejam simulados por programação, o que os torna mais simples, seguros e sensíveis.

Adaptando o modelo para as nossas condições de laboratório passamos a estudar, além da incapacitação articular, também o influxo de neutrófilos para o processo inflamatório (Magalhães *et alii*, 1997). A seguir, passamos a empregar como agente inflamatório o zymosan (Viana *et alii*, 1988) e a estudar a permeabilidade vascular (Rocha *et alii*, IN PRESS). Desta forma,

além do estudo da incapacitação articular o modelo permite analisar o influxo celular e a permeabilidade vascular no foco inflamatório.

Neste método, ratos são colocados para andar em um cilindro metálico. Os animais são “calçados” com uma sapatilha metálica, de tal forma que, ao deambular, eles tocam o cilindro. Conecta-se um fio à sapatilha e o fio é ligado a um sistema de aquisição e processamento de dados computadorizado. O tempo, durante um intervalo de 60 segundos, em que o animal deambula sem que toque o cilindro é tomado como Tempo de Suspensão da Pata (TSP). Dessa forma, quanto maior o tempo que o animal mantiver a pata erguida, ou seja, deambula sem tocar essa pata no cilindro, maior será a incapacitação articular, conforme definido pelos autores. Assim, uma vez injetado um estímulo na pata do animal, quanto maior a dor que esse estímulo provocar, maior será o TSP e, por conseguinte, maior será a incapacitação articular. O sistema apresenta a vantagem de permitir avaliar vários animais simultaneamente, ter sua medida independente do observador e apresentar boa reprodutibilidade.

Usando esse método, demonstrou-se que a incapacitação articular é um fenômeno que não depende de edema local, uma vez

que animais submetidos à injeção de dextran intra-articular, apesar de apresentarem edema, não têm alteração no TSP. A administração de inibidores da COX, como indometacina, simpatolíticos como a guanetidina e de opióides centrais provoca redução no TSP na artrite induzida por carragenina, revelando o caráter multimediado da incapacitação articular e a adequação do método para a sua avaliação (Tonussi e Ferreira, 1992; 1997; 1999). O nosso laboratório, utilizando o mesmo sistema, observou que o extrato aquoso de uma planta, *Ageratum conyzoides*, tem efeito analgésico em ratos submetidos à artrite por carragenina (Magalhães *et alii*, 1997) enquanto no modelo de artrite induzida por zymosan, demonstrou-se que a IA depende do sítio de injeção do estímulo, que leva à sensibilização de nociceptores localizados nos tecidos periarticulares (Rocha *et alii*, IN PRESS).

1.3.1. Artrite induzida por zymosan

O zymosan é um polissacarídeo constituinte da parede de células de fungos que causa uma resposta inflamatória quando injetado intradérmica (Ridger *et alii*, 1997), intraperitoneal (Rao *et*

alii, 1994; Boughton-Smith e Ghelani, 1995; Ajuebor *et alii*, 98) ou intra-articularmente (Gegout *et alii*, 1995; Comerford e Etwebi, 1995; Pettipher e Salter, 1996). O zymosan induz extravasamento de proteínas plasmáticas e infiltrado de células inflamatórias, resultando numa cascata de eventos incluindo ativação do sistema do complemento, degranulação de mastócitos e geração dos produtos do metabolismo do ácido araquidônico (Griffiths *et alii*, 1991).

A injeção intra-articular de zymosan produz uma monoartrite caracterizada inicialmente por edema e grande influxo celular para a cavidade articular. Posteriormente, ocorre proliferação sinovial e aumento da população celular na sinóvia, predominando linfomononucleares. Há ainda estudos sugerindo degradação da cartilagem articular e do osso subcondral na fase crônica da artrite por zymosan (Gegout *et alii*, 1995).

O modelo de artrite induzida por zymosan tem a vantagem de utilizar ratos, o que torna o modelo de fácil reprodução e de baixo custo. Adicionalmente, em nosso laboratório, demonstramos que é possível obter o lavado articular para análise do influxo celular e dosagem de mediadores. Também, consegue-se saber exatamente

o início do processo inflamatório e os estudos do nosso grupo têm demonstrado que a lesão sinovial na artrite por zymosan cronifica, com participação de componente imunológico, evidenciado por proliferação linfomonocitária e presença de células gigantes na sinovite, em sua fase crônica. Neste modelo, é possível ainda obter material de cartilagem articular e já foi demonstrado perda da matriz articular (glicosaminoglicanos) a partir de 14 dias de artrite por zymosan (Oliveira *et alii*, 1997).

1.4. Óxido nítrico (NO)

1.4.1. Descoberta

O NO é formado a partir do oxigênio molecular e da porção aminoterminal da L-arginina em células e tecidos de várias espécies animais, inclusive mamíferos.

Sua participação em eventos fisiopatológicos começou a ser delineada a partir dos trabalhos de Furchgott e Zawadzki (1980) que, estudando aorta isolada de coelho, observaram que a vasodilatação induzida por acetilcolina era dependente da

integridade do endotélio, sugerindo que a acetilcolina liberaria uma substância a qual foi denominada Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio (FRDE) (Moncada *et alii*, 1991; Moncada e Higgs, 1993; Moncada *et alii*, 1997).

Nos trabalhos que se seguiram, foi determinado que o FRDE não era um prostanóide, pelo fato de a indometacina, um bloqueador da via da COX, não inibir o relaxamento do endotélio produzido pela acetilcolina e por agonistas como histamina (van de Voorde e Leusen, 1983). Determinou-se que o FRDE era difusível e sua síntese dependente de íons cálcio (Furchgott, 1983). Observou-se também que o relaxamento da musculatura lisa dos vasos estava associado a elevação dos níveis de GMPc e que essa elevação poderia ser inibida por azul de metileno (inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel) (Martin *et alii*, 1985) ou por bloqueadores (scavengers) de radicais livres como a hemoglobina (Murad *et alii*, 1978) assim como por ânions superóxido e outros radicais livres (Ignarro *et alii*, 1988b; Moncada *et alii*, 1986; Rubanyi e Vanhoutte, 1986; Gryglewski *et alii*, 1986) demonstrando que o FRDE poderia ser um radical livre. Embora controverso no início, o acúmulo de evidências permitiu que Furchgott (1988) e Ignarro *et*

alii, (1988a) identificassem, independentemente, que o FRDE seria o NO. A síntese de L-citrulina a partir da L-arginina, numa reação inibida por L-NMMA, demonstrou que a L-citrulina e o NO são produtos da mesma reação enzimática (Hibbs *et alii*, 1987; Palmer e Moncada, 1989). Finalmente, Moncada e Palmer (1990) demonstraram a síntese de NO a partir da enzima óxido nítrico sintase (NOS).

1.4.2. Biossíntese e Metabolização

Diversas células são capazes de produzir NO, destacando-se células endoteliais, neurônios, neutrófilos (Fierro *et alii*, 1995; Wright *et alii*, 1989), macrófagos (di Rosa *et alii*, 1990), sinoviócitos (McInnes *et alii*, 1996) e condrócitos (Stadler *et alii*, 1991).

A biossíntese (Figura 1) de NO ocorre a partir da L-arginina e do oxigênio molecular, gerando NO e L-citrulina através das isoenzimas óxido nítrico sintase (NOS). A via é estereoespecífica visto que a D-arginina não funciona como substrato para a produção do NO. Foram detectados, até o momento, três subtipos de NOS: a NOS endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), ambas

constitutivas, e a NOS induzida (iNOS).

A via das enzimas constitutivas (cNOS) é cálcio-calmodulina dependente, produzindo picomoles de NO por curtos períodos de tempo. Sua ativação é importante na comunicação celular e manutenção de processos fisiológicos normais. Por outro lado, a via da iNOS independe de cálcio-calmodulina e produz nanomoles de NO por períodos prolongados e, do ponto de vista inflamatório e fisiopatológico, parece ser a mais importante e talvez a única envolvida já que em situações inflamatórias e modelos fisiopatológicos ocorre a liberação de NO e ativação do gene da iNOS bem como a expressão da enzima em tecidos inflamados. Um outro diferencial entre os sistemas é que apenas a via induzida é afetada por glicocorticóides (Radomski *et alii*, 1990).

A metabolização do NO ocorre por oxidação originando nitrito (NO^{-2}) e nitrato (NO^{-3}). O NO^{-2} é rapidamente metabolizado a nitrato (Ignarro, 1990).

VIA L-ARGININA:ÓXIDO NÍTRICO: GMPc

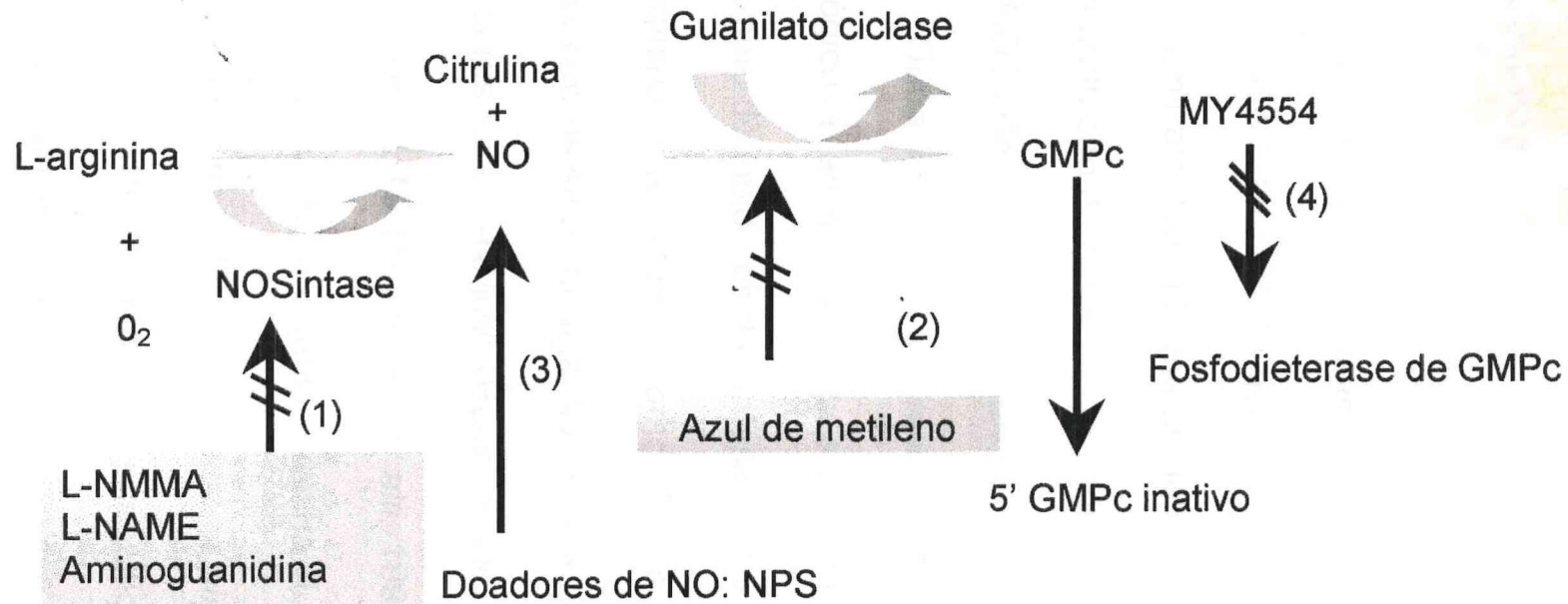


Figura 1. Vias de biotransformação do óxido nítrico. O óxido nítrico (NO) é sintetizado através da L-arginina pelas isoenzimas NOS e exerce seus efeitos através da ativação de GMPc. Seus efeitos podem ser bloqueados por inibidores da NOS (1), inibidores da guanilato ciclase (2). Doadores de NO (3) e inibidores da metabolização de GMPc (4) produzem efeitos similares aos obtidos com NO.

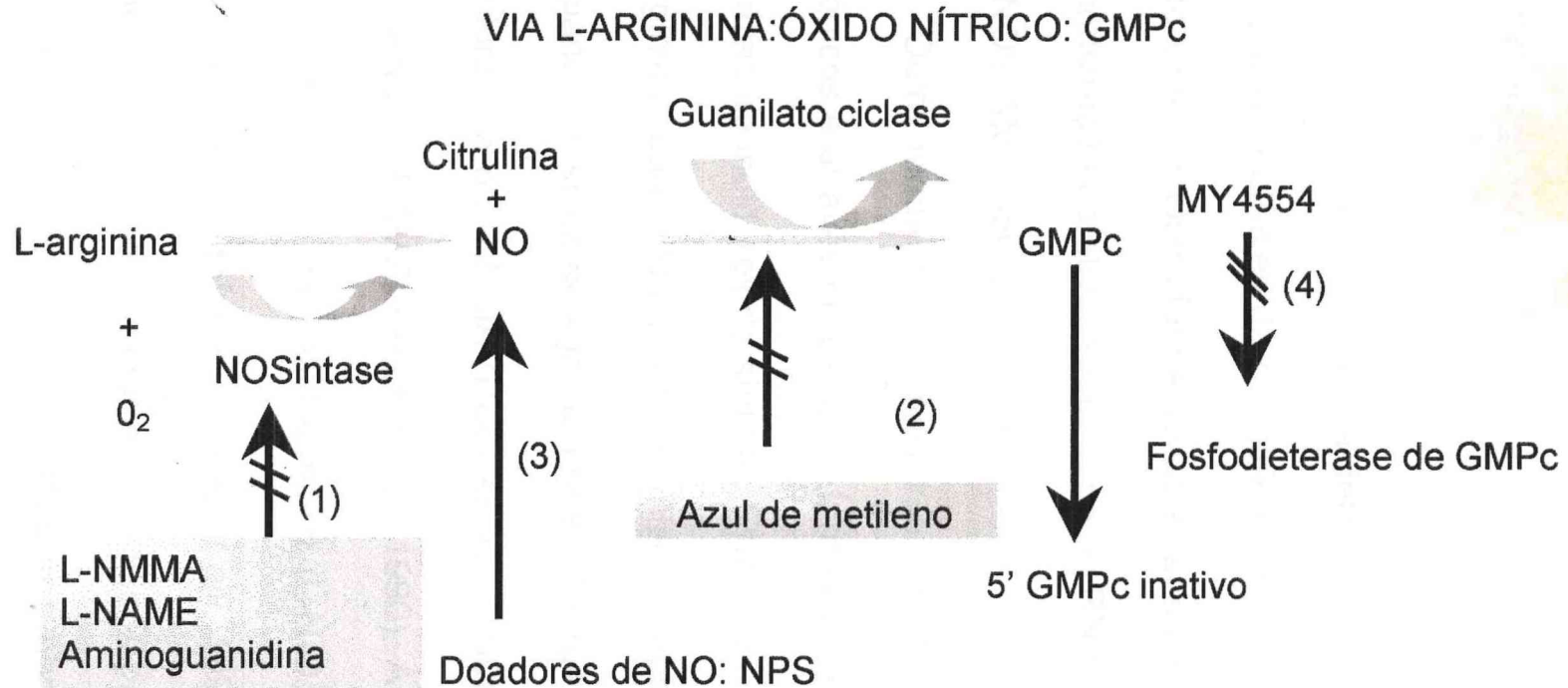


Figura 1. Vias de biotransformação do óxido nítrico. O óxido nítrico (NO) é sintetizado através da L-arginina pelas isoenzimas NOS e exerce seus efeitos através da ativação de GMPc. Seus efeitos podem ser bloqueados por inibidores da NOS (1), inibidores da guanilato ciclase (2). Doadores de NO (3) e inibidores da metabolização de GMPc (4) produzem efeitos similares aos obtidos com NO.

1.4.3. Estudo da participação do NO em processos fisiopatológicos

Por ser um gás instável a detecção do NO nos tecidos é difícil, mas possível através da quantificação dos seus metabólitos finais, nitrito e nitrato. Outra forma de detectar a participação do NO é por demonstração da ativação do gene do RNAm que leva à expressão da iNOS (Mohaupt *et alii*, 1994).

Outra forma de se avaliar o papel do NO em fenômenos biológicos é através do bloqueio farmacológico da produção de NO por meio de inibidores da síntese. Estes são análogos estruturais de L-arginina que atuam como falsos substratos enzimáticos e ocupando os sítios de ligação entre a L-arginina e a NOS. Entre os inibidores há o L-NMMA (Rees *et alii*, 1990), o N^ω-nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME) (Rees *et alii*, 1990). A enzima induzida pode ser inibida por N^δ-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) (Rees *et alii*, 1990) e aminoguanidina (Stefanovic-Racic *et alii*, 1995; Ridger *et alii*, 1997). O ideal seria termos inibidores específicos para a iNOS ou cNOS o que, tecnicamente, permitiria distinguir a participação de cada uma delas nos diferentes eventos estudados. A rigor, considera-se que a

aminoguanidina e o L-NIO sejam inibidores seletivos de iNOS. Adicionalmente, foi relatado a inibição seletiva da iNOS através do composto U-1945A (uma S-metil-isotio-uréia), com elevada afinidade pelo tecidos nervosos, que não afetaria a nNOS (Stratman *et alii*, 1996).

Outra alternativa de se detectar a participação do NO é através da administração de substâncias que liberem NO ao serem biotransformadas, como o nitroprussiato de sódio (NPS) (Fidecka e Lalewicz, 1997), o trinitrato de glicerila (GTN) (Shafter *et alii*, 1992) e a S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP) (Gibson *et alii*, 1992; Shafter *et alii*, 1992). A administração da L-arginina, aminoácido precursor da síntese de NO, é uma forma de reverter os efeitos dos inibidores enzimáticos da síntese de NO, funcionando como ferramenta para demonstrar especificamente participação do NO em eventos biológicos. Adicionalmente, a contra-prova com seu estereoisômero D-arginina, que não funciona como substrato, ajuda nos estudos das ações do NO.

1.4.4. Ações do óxido nítrico

A via L-arginina-NO é um mecanismo vasodilatador que influencia a pressão arterial; inibe a aderência e agregação de plaquetas, leucócitos, neutrófilos e monócitos; parece participar dos mecanismos de neurotransmissão e plasticidade neuronal; no sistema nervoso periférico é apontado como transmissor não-adrenérgico e não-colinérgico em vários tecidos e participa dos mecanismos de ereção peniana (Rajfer *et alii*, 1992).

O NO tem efeitos citotóxicos e citostáticos que são importantes na defesa inespecífica do hospedeiro contra células tumorais e patógenos tais como bactérias, fungos e parasitas (metazoários e protozoários). O efeito antivirótico do IFN- γ provavelmente deve-se à indução de NOS. A produção de NO por neutrófilos e monócitos é acompanhada por produção de ânion superóxido que reage com NO produzindo peroxinitrito, que é citotóxico e destrói microrganismos invasores mas pode também lesar tecidos do hospedeiro, quando produzido em excesso. Outros mecanismos de lesão celular induzidos pelo NO incluem nitrosilação de ácidos nucleicos e a combinação a enzimas que

contêm grupo heme, inclusive as envolvidas no ciclo celular (Ignarro, 1990).

1.4.5. Óxido nítrico e artrite

A importância do NO na artrite ainda merece estudos mais aprofundados pois diferentes tipos celulares, como condrócitos, fibroblastos, neutrófilos, sinoviócitos, macrófagos e células endoteliais, todas presentes nas sinovites, podem liberar NO (Moulton, 1996; Clancy *et alii*, 1998) e vários trabalhos já demonstraram que existe a participação do NO em artrite através da detecção da liberação de NO e nitrito no líquido sinovial de pacientes com AR (Farrell *et alii*, 1992; Grabowski *et alii*, 1996; McInnes *et alii*, 1996; Miyasaka e Hirata, 1997).

Foi demonstrado no modelo experimental de artrite induzida por *Streptococcus* que houve aumento da produção de NO e da expressão da NOS no tecido sinovial dos animais submetidos à artrite (McCartney-Francis *et alii*, 1993). Também foi observado melhora dos animais após tratamento com inibidores da síntese de NO (Ialenti *et alii*, 1993; Connor *et alii*, 1994; Stefanovic-Racic *et alii*,

1994).

Adicionalmente, foi mostrada a presença de S-nitrosoproteínas, produto estável resultante da redução de grupos tióis que retêm a atividade farmacológica do NO, tanto no líquido sinovial quanto no soro de pacientes artríticos, fornecendo evidência adicional da participação do NO em artrites (Hilliquin *et alii*, 1997).

Ademais, foi observado ação do NO sobre os osteoclastos. Os osteoclastos são células envolvidas na reabsorção óssea e sua atividade está aumentada em patologias como artrite reumatóide. O NO, localmente, exerce efeito inibitório sobre a atividade reabsortiva dos osteoclastos por um mecanismo independente de GMPc e diferente do efeito da calcitonina (MacIntyre *et alii*, 1991).

Por outro lado, há controvérsias sobre o papel pró ou anti-inflamatório do NO na artrite reumatóide. Por exemplo, foi demonstrado que a aminoguanidina, um inibidor específico da iNOS, suprimiu apenas a excreção urinária de nitrato sem reduzir a gravidade da artrite induzida por adjuvante (Stefanovic-Racic *et alii*, 1995). Os mesmos autores observaram pouca eficácia tanto da aminoguanidina como do L-NAME, em animais submetidos à artrite

por adjuvante. Ainda nesta linha de argumentação, tem-se apontado que o NO também pode exercer efeitos claramente anti-inflamatórios e que contribuem para modificar o curso da artrite reumatóide (Miyasaka e Hirata, 1997; Clancy *et alii*, 1998). Todas estas evidências apontam para o provável envolvimento do NO em artropatias inflamatórias, embora ainda não esteja claro esse papel nos mecanismos de lesão articular.

1.4.6. Óxido nítrico e dor

Há muita controvérsia acerca da participação do NO nos mecanismos envolvidos na resposta nociceptiva.

O efeito antinociceptivo das drogas colinérgicas foi demonstrada após administração intra-cerebroventricular (Pedigo *et alii*, 1975), intratecal (Yaksh *et alii*, 1985) e sistêmica (Houser, 1976). Antinocicepção periférica também foi demonstrada em modelos de hiperalgisia em pata de ratos (Ferreira e Nakamura 1979b) e no método de vocalização e resposta motora de defesa a estímulos elétricos em cobaias (Nakamura, 1984). Foi sugerido que o efeito analgésico periférico dos colinérgicos estaria relacionado ao

aumento dos níveis de GMPc nos receptores já que foi relatado que o GMPc exógeno, o dibutiril-GMPc (Db-GMPc) também produz antinocicepção (Ferreira e Nakamura, 1979a). Realmente, observou-se que a acetilcolina causa acúmulo de GMPc em coração isolado de rato (George, 1970) e no córtex cerebral e cerebelo de camundongos (Ferrendelli *et alii*, 1970).

O efeito antinociceptivo periférico das drogas colinérgicas também foi demonstrado por Duarte *et alii* (1990a) em modelo de hiperalgisia em pata de ratos (Randal e Selitto, 1957) sensibilizada por carragenina ou prostaglandina E2. A confirmação foi feita logo após, no mesmo modelo, onde observou-se bloqueio da analgesia periférica da acetilcolina por L-NMMA, inibidor da síntese de NO, ou azul de metileno, inibidor de guanilato ciclase solúvel, e potenciação com MY 5445, inibidor da fosfodiesterase de GMPc, sugerindo que a analgesia periférica induzida por acetilcolina envolve a ativação da via L-arginina:NO:GMPc (Duarte *et alii*, 1990b).

Também observou-se que a morfina tem efeito antinociceptivo periférico via ativação de GMPc tanto no modelo de hiperalgisia em pata de ratos sensibilizada por prostaglandina E (Ferreira *et alii*, 1991) quanto no teste da formalina em pata de ratos (Granados-

Soto *et alii*, 1997). Similarmente, foi relatado a inibição do efeito de dipirona e mirceno, dois analgésicos periféricos de ação direta, por L-NMMA e azul de metileno (Duarte *et alii*, 1992) reforçando a hipótese de participação do sistema L-arginina:NO:GMPc no mecanismo antinociceptivo periférico ou central.

Por outro lado, Moore *et alii* (1991) utilizando o teste da formalina, demonstraram que L-NAME, administrado pelas vias intraperitoneal, cerebroventricular ou oral, induziu antinocicepção de forma dose-dependente. No mesmo trabalho, foi demonstrado efeito antinociceptivo de L-NAME no teste da placa aquecida (hot plate test) e no modelo de contorção abdominal por ácido acético.

Outros autores também obtiveram resultados similares. Assim, foi demonstrado que o L-NAME provocou analgesia em modelo de nocicepção induzida por capsaicina (Sakurada *et alii*, 1996). Por fim, observou-se que a administração de L-NAME ou L-NMMA resultou em reversão da hiperalgisia induzida por bradicinina na pata de ratos (Nakamura *et alii*, 1996).

Estes dados apontam para a participação do NO na mediação dos fenômenos da dor inflamatória articular. No entanto, as controvérsias sobre o efeito analgésico ou indutor pelo NO ainda

carecem de investigação, particularmente no que diz respeito a dor articular no modelo que nos propomos estudar.

1.5. OBJETIVOS

A artrite reumatóide é uma doença que reduz significativamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. O tratamento ainda é muito pouco eficiente e freqüentemente traz apenas alívio sintomático sem atingir a causa subjacente da doença. Assim, é de grande interesse buscar informações que permitam conhecer melhor essa patologia e elaborar novas abordagens terapêuticas. No que diz respeito especificamente ao NO, as controvérsias existentes na literatura justificam a investigação de suas ações, particularmente na mediação da dor articular. Desta forma, constitui-se objetivos deste trabalho investigar o papel do NO no modelo de artrite por zymosan analisando:

1. O envolvimento do NO na dor articular através da avaliação da incapacitação articular e,

2. O envolvimento de NO no influxo celular através da medida do influxo de leucócitos (neutrófilos e monócitos) no líquido sinovial.

Materiais e Métodos

2. 0. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) machos ou fêmeas, pesando entre 170 e 210 g, fornecidos pelo Biotério Central do Campus do Pici-Universidade Federal do Ceará e Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum*.

2.2. Soluções, drogas e solventes

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza e propriedades analíticas.

Aminoguanidina: Sigma - USA

Azul de metileno: Sigma - USA

D-NAME: Sigma - USA

Etanol: Merck - Alemanha

Hemoglobina: Sigma - USA

Heparina: Cristália - Brasil

L-arginina: Sigma -USA

Corante de Turk

Ácido acético glacial P.A. (Merck).....20.0 ml

Violeta de genciana..... 2.0 ml

Água destilada q.s.p.....1000.0 ml

L-NAME: Sigma - USA

Naloxona: Rhodia - USA

Nitroprussiato de sódio (NPS): Sigma - USA

Solução Salina 0.9%: Cristália – Brasil – estéril e apirogênica

2.3. Registro da incapacitação articular

2.3.1. Descrição do sistema

O modelo empregado foi descrito anteriormente (Tonussi & Ferreira, 1992) e sofreu adaptações em nosso laboratório (Magalhães *et alii*, 1997; Viana *et alii*, 1998). O sistema consiste de um cilindro metálico giratório de 30 cm x 50 cm (diâmetro x largura), que gira a uma velocidade de 3 rpm. O cilindro é dividido em três pistas e ligado a um fio terra (Figura 2). Os animais são calçados

com sapatilhas metálicas, que são colocadas nas patas posteriores, permitindo-se um período de deambulação para que os animais se habituem. A seguir, conecta-se a sapatilha direita à porta de entrada de dados de um microcomputador, mantendo-se a sapatilha esquerda para o equilíbrio do animal. O tempo em que o animal deambula sem tocar a superfície do cilindro é tomado como o Tempo de Suspensão da Pata (TSP), que é registrado no microcomputador, durante um período de 60 segundos, por um programa de aquisição de dados que foi desenvolvido em nosso laboratório. Dessa forma, um aumento no TSP, em relação ao registro basal, é tomado como refletindo incapacidade do animal para deambular normalmente (incapacitação articular), o que refletiria dor inflamatória articular.

2.4. Indução da artrite por zymosan

A artrite foi induzida na articulação do joelho direito através da administração de zymosan 1 mg/intra-articular (iart) (Rocha *et alii*, IN PRESS) diluído em 50 µl de solução salina. O grupo controle recebeu apenas solução salina.

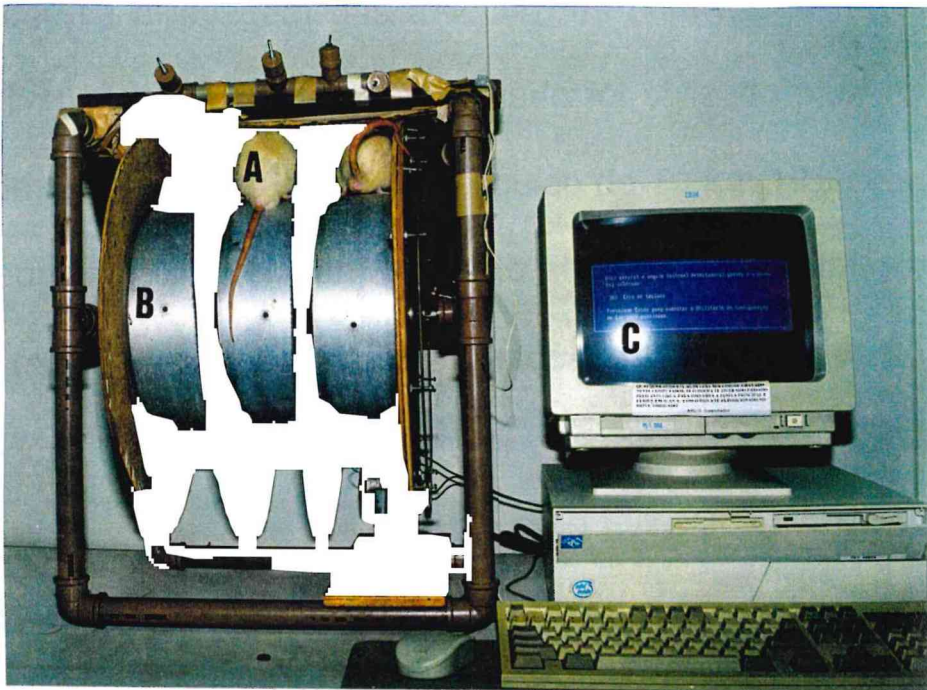


Figura 2. Fotografia do sistema de registro da incapacitação articular. Os animais (A) são postos a deambular, isoladamente, sobre o cilindro giratório (B) conectado a um microcomputador (C), que registra o Tempo de Suspensão da Pata para cada animal.

2.5. Influxo de leucócitos

Os animais foram sacrificados, sob anestesia (hidrato de cloral – 400 mg/kg-i.p.), por decapitação e exsangüinação. A seguir, procedeu-se à lavagem das articulações com salina heparinizada (40 UI/ml). Uma alíquota desse lavado foi utilizada para contagem total de células, após diluição em líquido de Turk a 10%, em câmara de Neubauer. Em seguida, o lavado articular era centrifugado (500 g/10 min.) e o sobrenadante estocado à -20°C para análise posterior.

2.6. Análise do edema articular

Grupos de animais foram sacrificados após 3 horas de artrite, quando o edema nesse modelo é máximo, conforme descrito anteriormente (Rocha *et alii*, 1996). Em seguida procedeu-se à retirada cirúrgica do tecido periarticular, incluindo patela e sinóvia, cujo peso úmido foi registrado. O material foi incubado em estufa à 80°C por 24 horas, sendo então obtido o peso seco. A diferença entre peso úmido e peso seco foi tomada como refletindo edema

articular.

2.7. Medida de pressão arterial média

Grupos de animais foram anestesiados com éter e submetidos à canulação da artéria carótida comum direita para colocação de uma cânula de polietileno, contendo solução salina heparinizada. Em seguida, após os animais estarem despertos, foram feitos registros da pressão arterial, por acoplamento da cânula a um transdutor de pressão e registrado em polígrafo da marca Marco Biosystems. Os resultados obtidos foram comparados a um registro de calibração prévia, com manômetro de pressão. As medidas, para os animais tratados com antagonistas de óxido nítrico, foram efetuadas a intervalos horários, por até 4 horas.

2.8. Dosagem de prostaglandina E2

Foi efetuada no sobrenadante dos lavados articulares coletados e estocados, através de ensaio imunoenzimático, adquirido comercialmente, conforme descrito anteriormente

(Pradelles *et alii*, 1985).

2.9. Modulação farmacológica

a) L-NAME: diluído em solução salina (0.9%) nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg-intra-peritoneal (i.p.), 1 hora antes da indução da artrite. Um grupo recebeu L-NAME 100 mg/kg-i.p., 2 horas após a indução da artrite.

b) D-NAME: diluído em solução salina (0.9%) na dose de 100 mg/kg-i.p., 1 hora antes da indução da artrite.

c) L-Arginina: diluída em solução salina (0.9%) na dose de 1 g/kg-via oral, 30 minutos antes da administração de L-NAME 100 mg/kg-i.p. ou isolada.

d) Aminoguanidina: diluída em solução salina (0.9%) nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg-i.p., 1 hora antes da indução da artrite. Um grupo recebeu aminoguanidina 100 mg/kg-i.p., 2 horas após a indução da artrite.

e) **Naloxona:** na dose de 1 mg/kg-i.p., 1 hora antes da administração de L-NAME 100 mg/kg-i.p. ou de aminoguanidina 100 mg/kg/-i.p.

f) **Nitroprussiato de sódio:** diluído com solução salina (0.9%) nas doses de 100, 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{iart}$ 2 horas após a indução da artrite.

h) **Azul de metileno:** diluído com solução salina (0.9%) na dose de 500 $\mu\text{g}/\text{iart}$ 1 hora antes da indução da artrite.

i) **Hemoglobina:** diluída com solução salina (0.9%) na dose 30 $\mu\text{mol}/\text{iart}$ concomitante à indução da artrite.

2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. Para comparação entre médias, utilizou-se ANOVA univariada. Para múltiplas comparações, seguindo-se o teste de Tukey, quando havia diferença entre os grupos, $p < 0.05$ foi considerado significativo.

Resultados

3.0. RESULTADOS

3.1. Incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A injeção de zymosan 1 (mg) no joelho direito de ratos produz incapacitação articular dose e tempo dependente (Figura 3) com pico entre a 3^a e 4^a hora após a indução da artrite, com o Tempo de Suspensão da Pata (TSP) de 41.2 segundos (s), em comparação ao controle, cujo TSP é de 9.9 s.

3.1.2. Efeito da administração de L-NAME sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração de L-NAME 1 hora antes da indução da artrite inibiu, de forma significativa ($p < 0.05$) e dose-dependente, a incapacitação articular medida entre a 3^a e 4^a hora de artrite, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg-i.p. (Figura 4) sendo 22.3%, 51.2% e 49.8% menor em relação ao grupo não-tratado ($p < 0,05$). Em

experimentos posteriores, utilizou-se a dose de 100 mg/kg-i.p., por ter reduzido a incapacitação articular de forma reprodutível e não ter havido diferença em relação à dose de 300 mg/kg-i.p.

3.1.3. Efeito da administração de L-arginina e L-NAME sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração prévia de L-arginina 1 g/kg-v.o. reverteu o efeito do L-NAME 100 mg/kg-i.p., sobre a incapacitação articular. Apenas L-arginina não alterou a incapacitação articular quando comparada com o grupo não-tratado ($p>0.05$) (Figura 5).

3.1.4. Efeito da administração de D-NAME sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração de D-NAME 100 mg/kg-i.p. 1 hora antes da indução da artrite não inibiu a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan ($p>0.05$) (Figura 4).

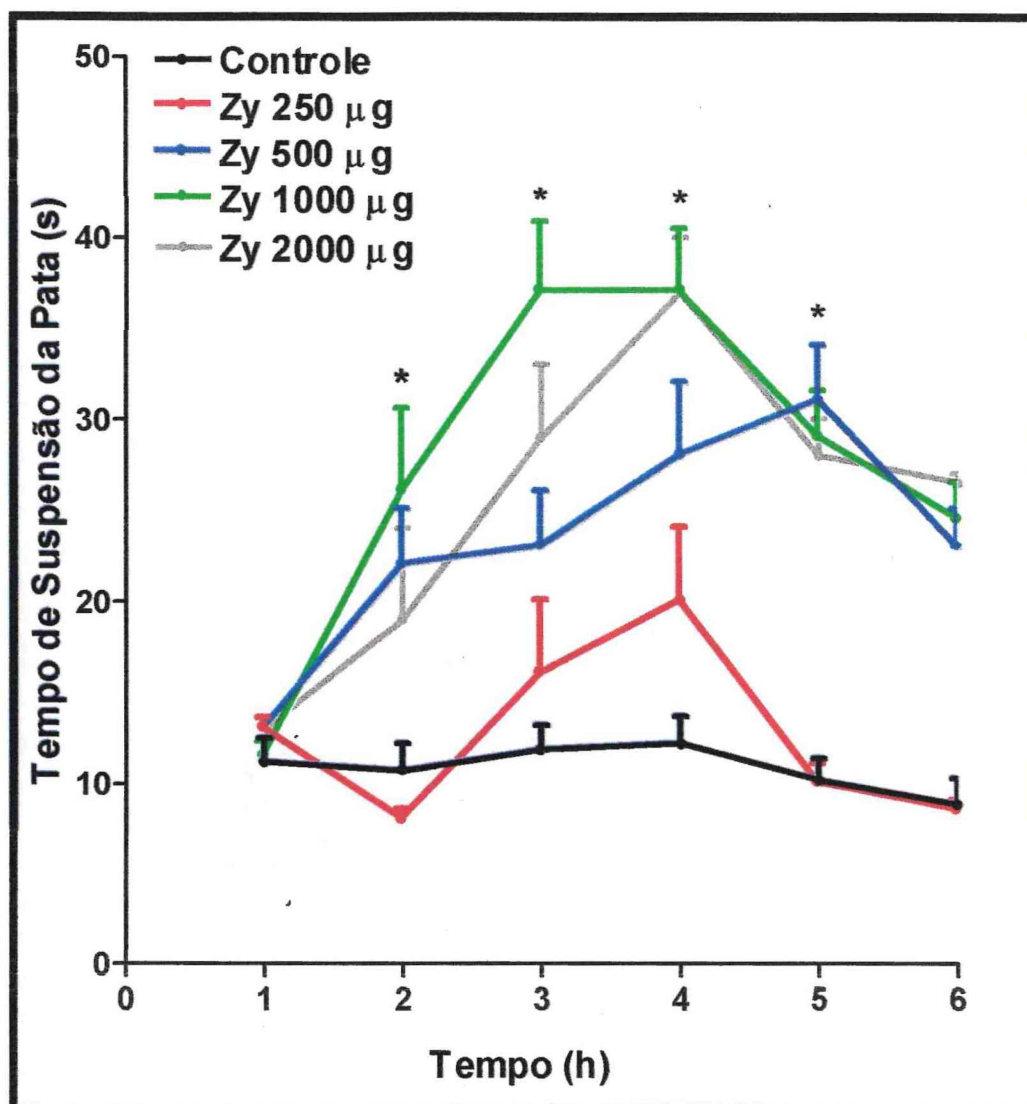


Figura 3. Tempo de incapacitação articular em ratos submetidos a artrite experimental induzida por zymosan. A artrite foi induzida através da administração de zymosan nas doses de 250, 500, 1000 ou 2000 µg no joelho direito dos animais e a incapacitação articular foi registrada até a 6ª hora através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos, representado no gráfico. O grupo controle recebeu apenas salina. Os dados representam a média±EPM (n=6). * p<0.05 em relação ao grupo salina (ANOVA).

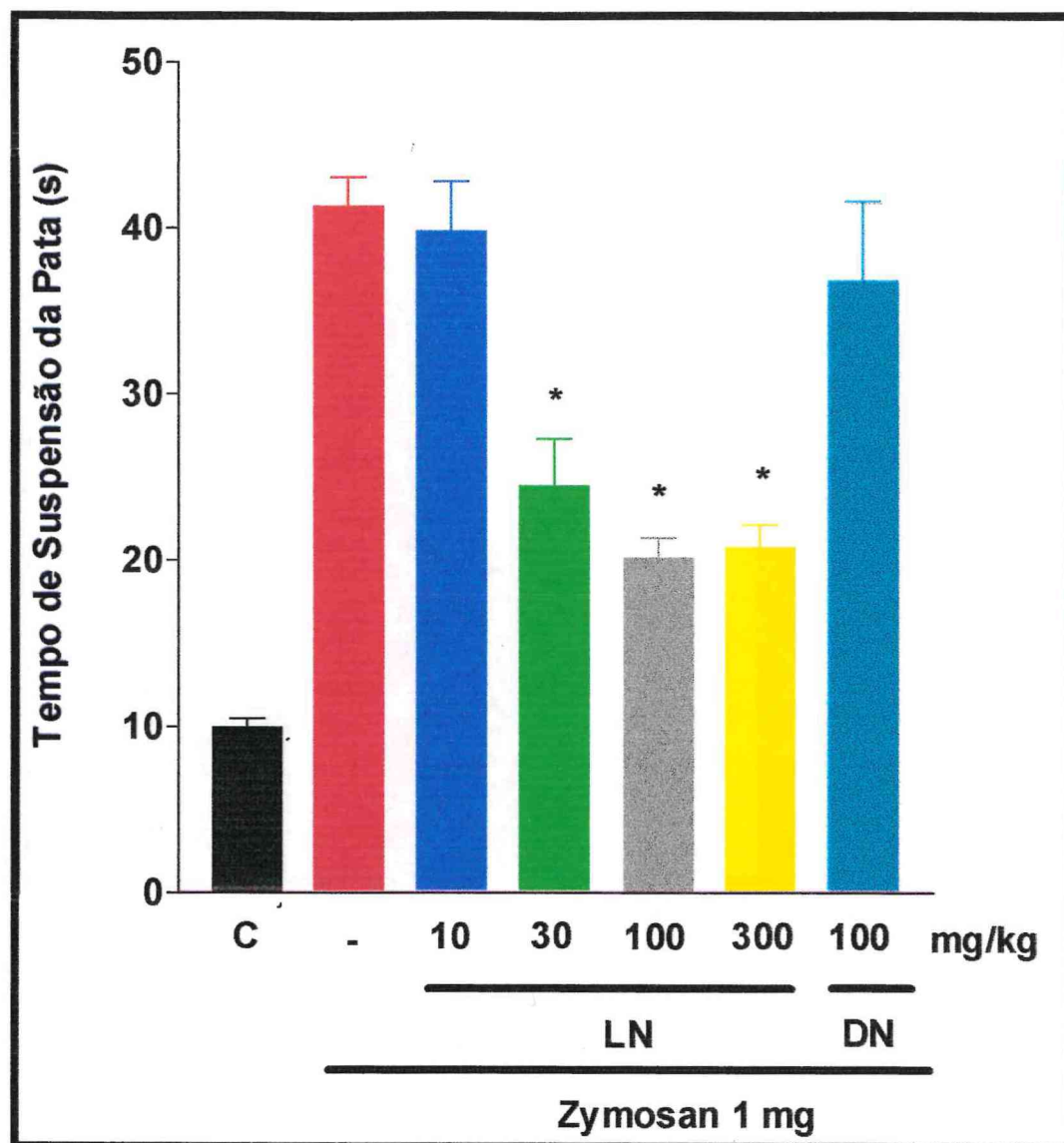


Figura 4. Efeito da administração de L-NAME (LN) ou D-NAME (DN) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite experimental induzida por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. LN, nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg-i.p., ou DN 100 mg/kg-i.p., foi administrado 1 hora antes da indução da AZy. A IA foi registrada até a 6ª hora através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de IA, registrado entre a 3ª e 4ª hora. 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 (-) (ANOVA).

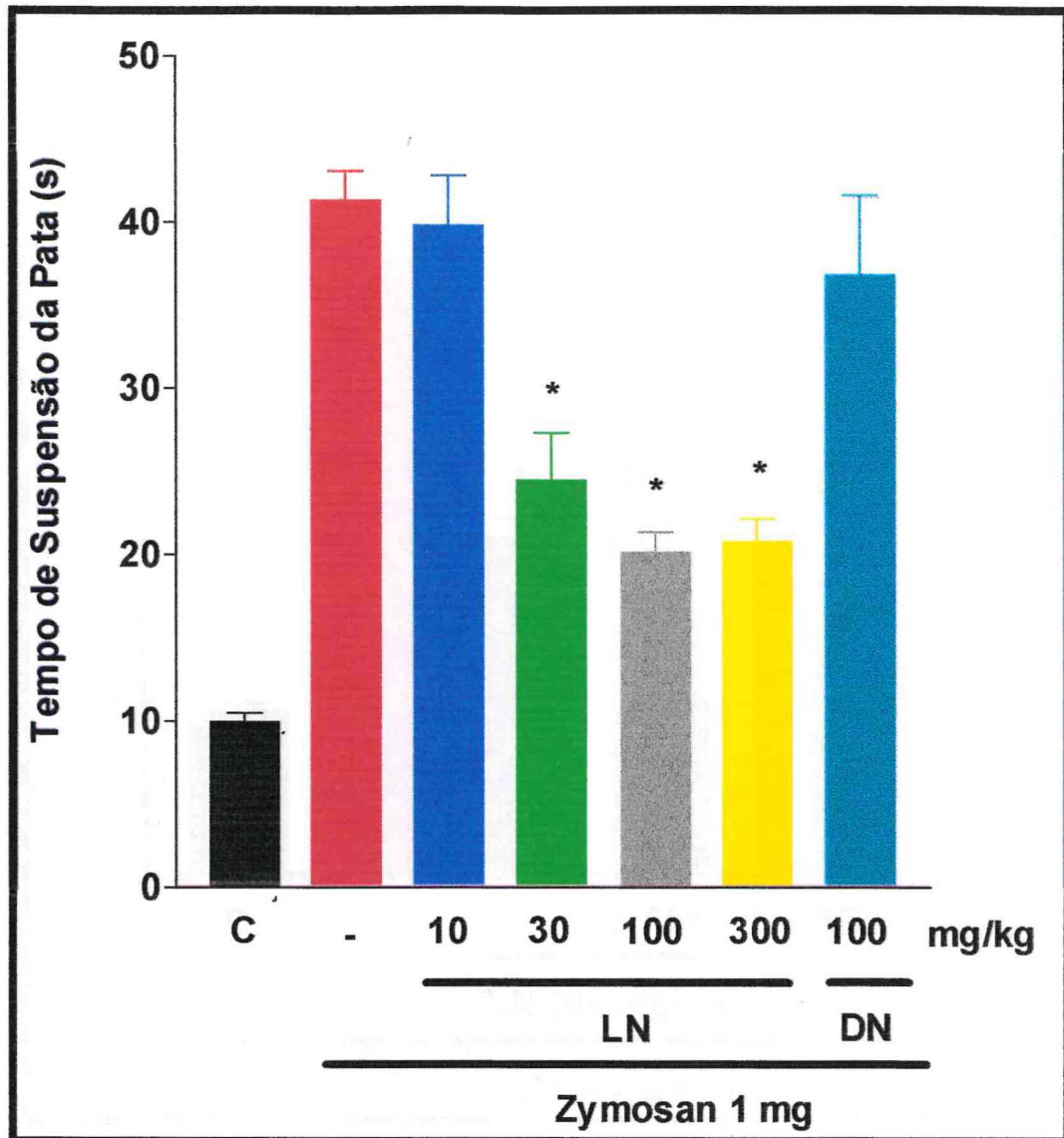


Figura 4. Efeito da administração de L-NAME (LN) ou D-NAME (DN) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite experimental induzida por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. LN, nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg-i.p., ou DN 100 mg/kg-i.p., foi administrado 1 hora antes da indução da AZy. A IA foi registrada até a 6ª hora através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de IA, registrado entre a 3ª e 4ª hora. 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 (-) (ANOVA).

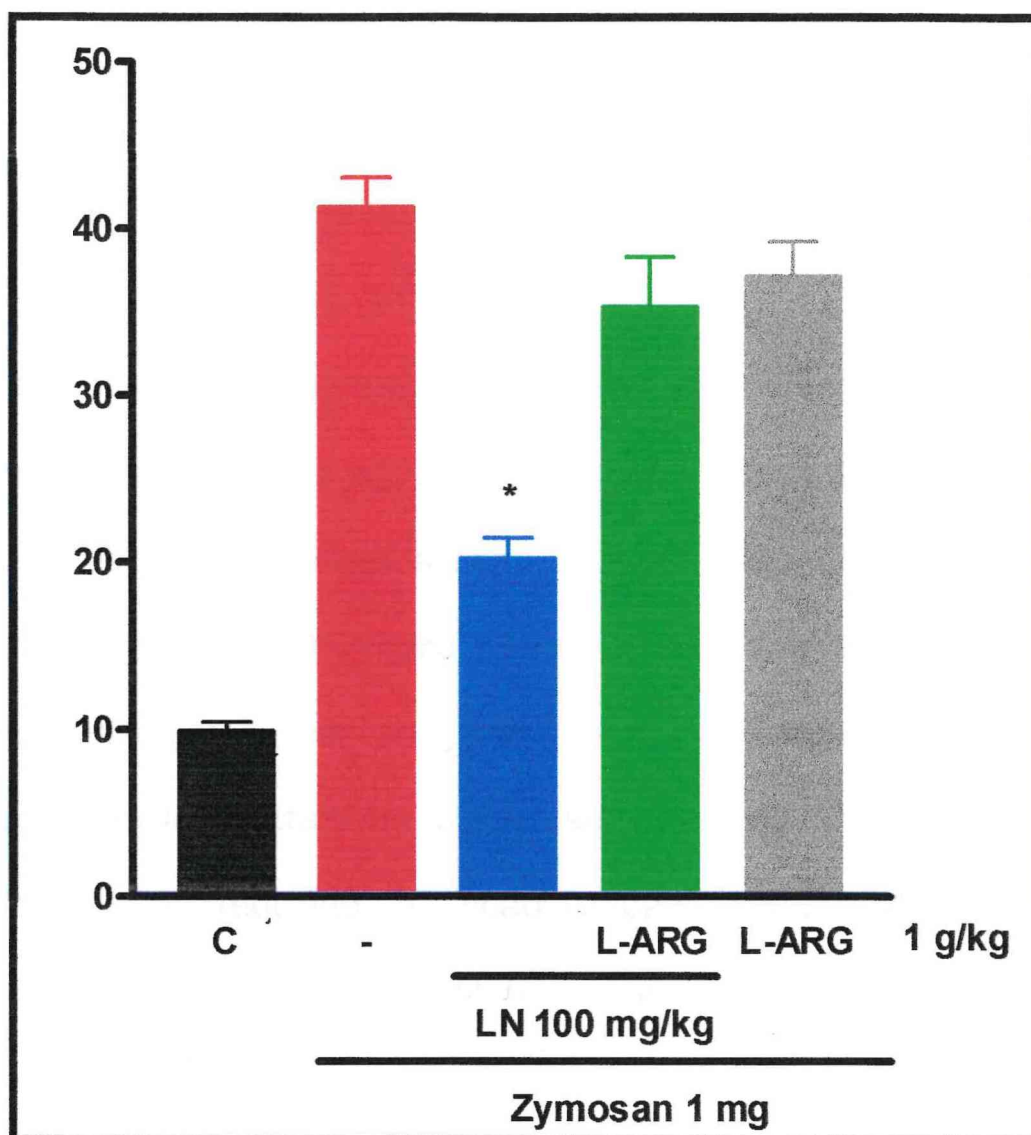


Figura. 5. Efeito da administração de L-arginina (L-ARG) e L-NAME (LN) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite experimental induzida por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. L-ARG 1g/kg-v.o. foi administrada 30 minutos antes de LN 100 mg/kg-i.p. LN foi administrado 1 hora antes da indução da AZy. A IA foi registrada até a 6ª hora através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de IA, registrado entre a 3ª e 4ª horas. 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(-) (ANOVA).

3.1.5. Efeito da administração de aminoguanidina sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração de aminoguanidina 1 hora antes da indução da artrite inibiu, de forma significativa ($p < 0.05$) e dose dependente a incapacitação articular medida entre a 3^a e 4^a hora de artrite, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (Figura 6) sendo 44.9%, 52.9% e 53.2% menor em relação ao grupo não-tratado, respectivamente. Em experimentos posteriores, utilizou-se a dose de 100 mg/kg, em virtude de ter reduzido a incapacitação articular de forma reprodutível e não ter havido diferença significativa em relação à dose de 300 mg/kg-i.p.

3.1.6. Efeito da administração de L-NAME ou aminoguanidina sobre a incapacitação articular após a indução da artrite experimental por zymosan em ratos

A administração de L-NAME ou aminoguanidina 100 mg/kg-i.p. 2 horas após a indução da artrite induzida por zymosan não modificou a incapacitação articular em relação ao grupo não-tratado

($p > 0.05$) (Figura 7).

3.1.7. Efeito da administração de naloxona e L-NAME ou aminoguanidina sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração prévia de naloxona 1 mg/kg-i.p. reverteu o efeito do L-NAME ou aminoguanidina 100 mg/kg-i.p., administrado 1 hora antes da indução da artrite, sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan (Figura 8).

3.1.8. Efeito da administração de nitroprussiato de sódio sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração de nitroprussiato de sódio, 2 horas após a indução da artrite, inibiu de forma significativa ($p < 0.05$) e dose-dependente a incapacitação articular na dose 500 $\mu\text{g}/\text{iart}$ (Figura 9), sendo 42.0% menor em relação ao grupo não-tratado.

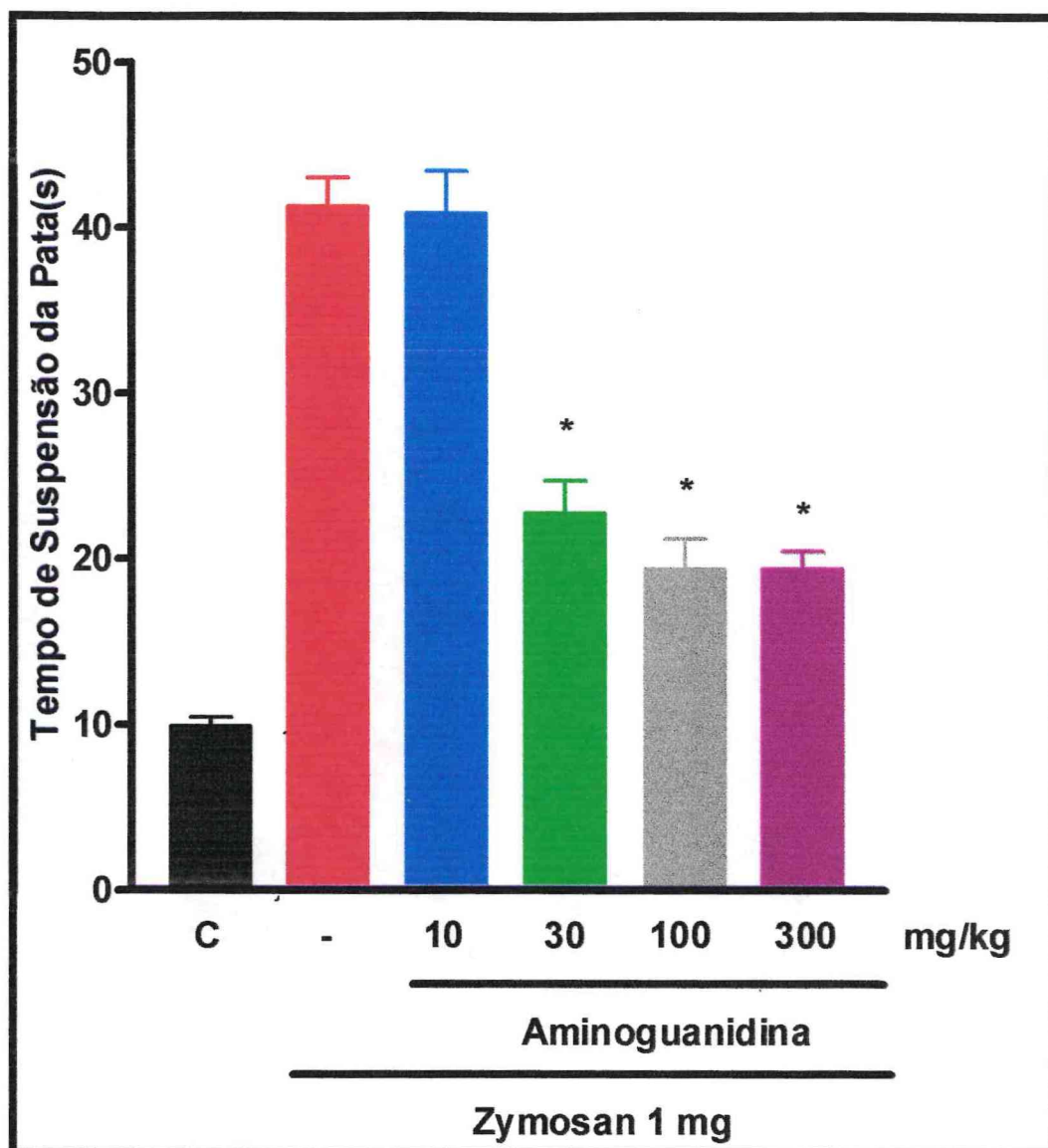


Figura 6. Efeito da administração de aminoguanidina sobre a incapacitação articular (IA) na artrite experimental induzida por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. Aminoguanidina foi administrado nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg-i.p. 1 hora antes da indução da AZy. A IA foi registrada até a 6^a hora através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico o TSP representa o pico de IA, registrado entre a 3^a e 4^a hora. 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 (-)(ANOVA).

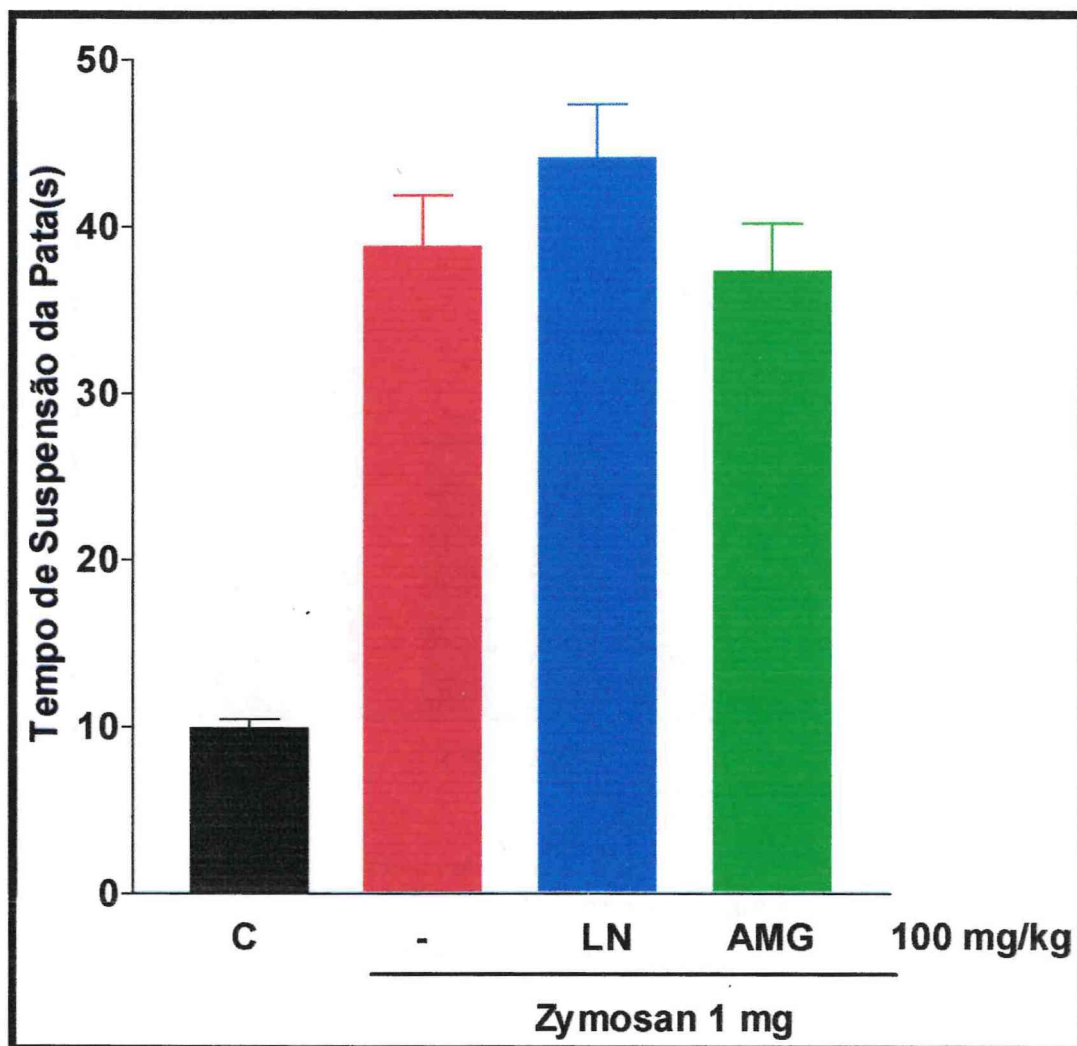


Figura 7. Efeito do tratamento com L-NAME (LN) ou aminoguanidina (AMG) sobre a incapacitação articular (IA) após a indução da artrite experimental por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. LN ou AMG foi administrado na dose de 100 mg/kg-i.p. 2 horas após a indução da AZy. A IA foi registrada até a 6^a hora através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de IA, registrado entre a 3^a e 4^a hora. O grupo controle (C) representa os animais sem artrite. Os dados representam a média±EPM (n=6).

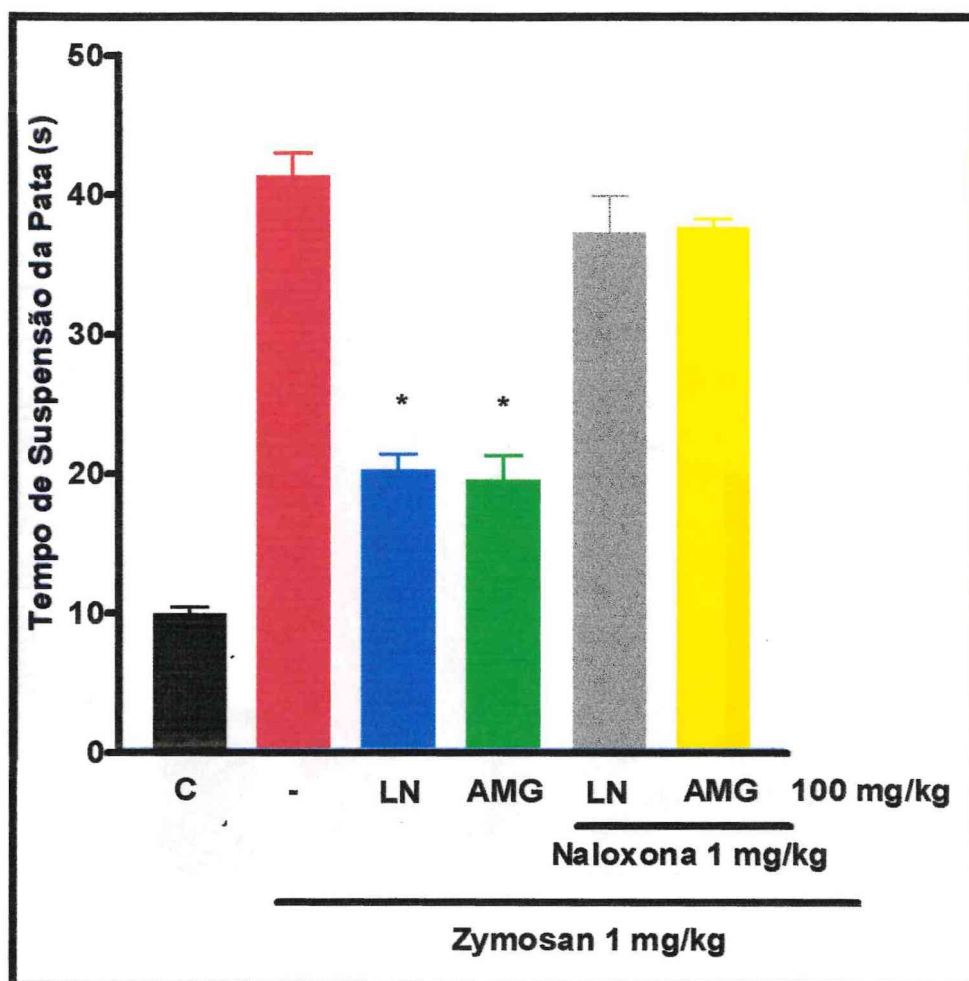


Figura 8. Efeito da administração de naloxona e L-NAME (LN) ou aminoguanidina (AMG) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite experimental induzida por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. Naloxona 1 mg/kg-i.p. foi administrada 1 hora antes de LN 100 mg/kg/i.p. ou AMG 100 mg/kg-i.p. LN ou AMG foi administrado 1 hora antes da indução da AZy. A IA foi registrada até a 6ª hora através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de IA, registrado entre a 3ª e 4ª hora. 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(-) (ANOVA).

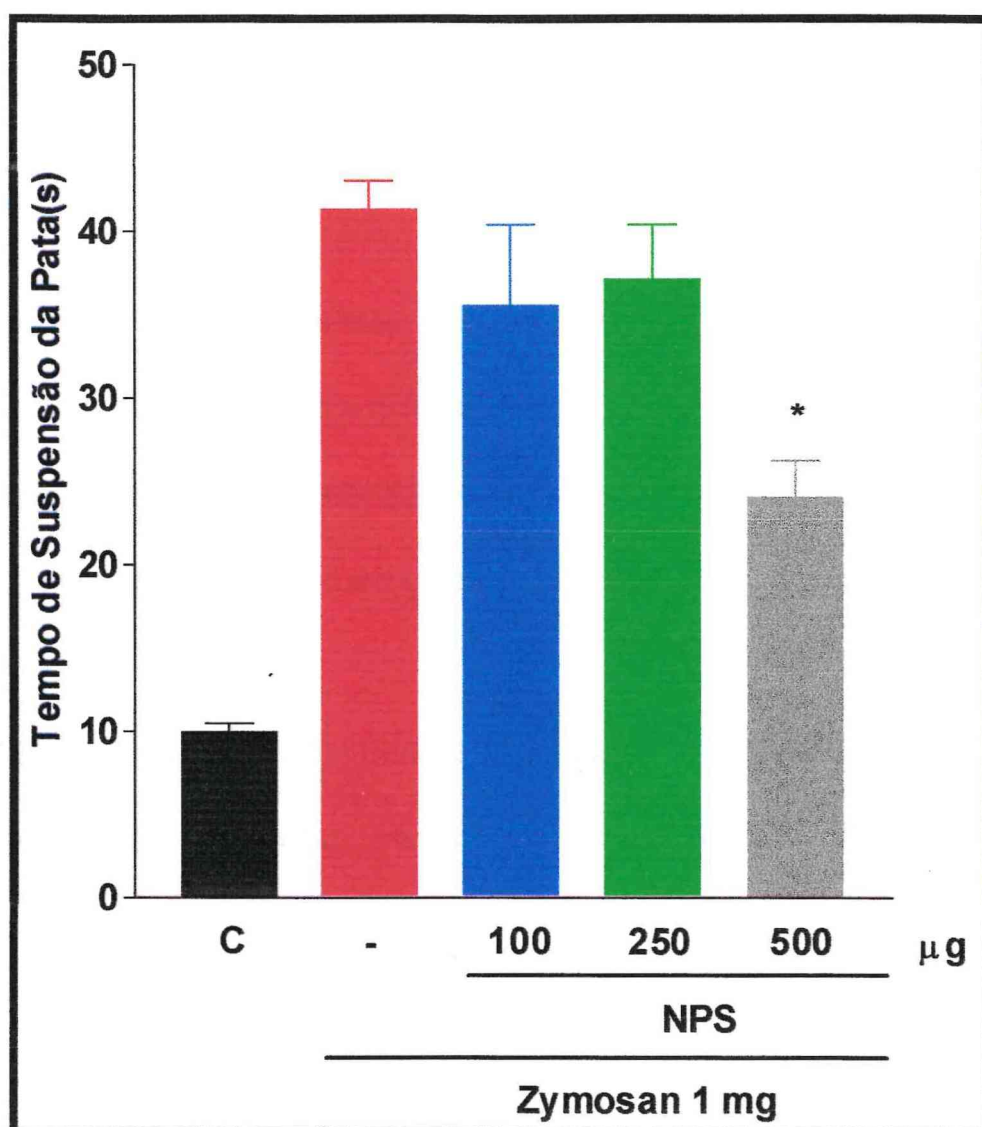


Figura 9. Efeito da administração de nitroprussiato de sódio (NPS) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite experimental induzida por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. NPS foi administrado nas doses de 100, 250 e 500 µg/iart., na 2^a hora de AZy. A IA foi registrada até a 6^a hora através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de IA, registrado entre a 3^a e 4^a hora. 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(-) (ANOVA).

3.1.9. Efeito da administração de azul de metileno sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração de azul de metileno, na dose de 500 $\mu\text{g}/\text{iaart}$, 1 hora antes da indução da artrite, inibiu significativamente ($p < 0.05$), a incapacitação articular na artrite por zymosan (Figura 10) sendo 56.3% menor em relação ao grupo não-tratado.

3.1.10. Efeito da administração de hemoglobina sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração de hemoglobina, na dose de 30 $\mu\text{mol}/\text{iaart}$ concomitante a indução da artrite, não inibiu a incapacitação articular na artrite por zymosan ($p > 0.05$) (Figura 11).

3.2. Influxo de leucócitos

O influxo de leucócitos para o foco inflamatório é máximo na 6^a hora após a administração de zymosan (Tabela 1) e se compõe, principalmente, de neutrófilos ($\geq 80\%$), sendo de $4.8 \times 10^3/\text{mm}^3$, em

comparação ao controle, que é de $0.3 \times 10^3/\text{mm}^3$, com predomínio de mononucleares.

A título de ilustração demonstramos um corte histológico onde podemos observar o intenso infiltrado celular resultante da administração de zymosan intra-articular (Figura 12).

3.2.1. Efeito da administração de L-NAME sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração de L-NAME 1 hora antes da indução da artrite inibiu, de forma significativa ($p < 0.05$) e dose-dependente o influxo de leucócitos medido na 6^a hora de artrite, sendo de $2.5 \times 10^3/\text{mm}^3$, $0.9 \times 10^3/\text{mm}^3$ e $1.3 \times 10^3/\text{mm}^3$, para as doses de 30, 100 e 300 mg/kg-i.p (Figura 13), sendo 47.9%, 81.2% e 72.9% menor em relação ao grupo não-tratado, respectivamente. Em experimentos posteriores, utilizou-se a dose de 100 mg/kg-i.p por ter reduzido o influxo de leucócitos de forma reprodutível e não ter havido diferença significativa em relação à dose de 300 mg/kg-i.p.

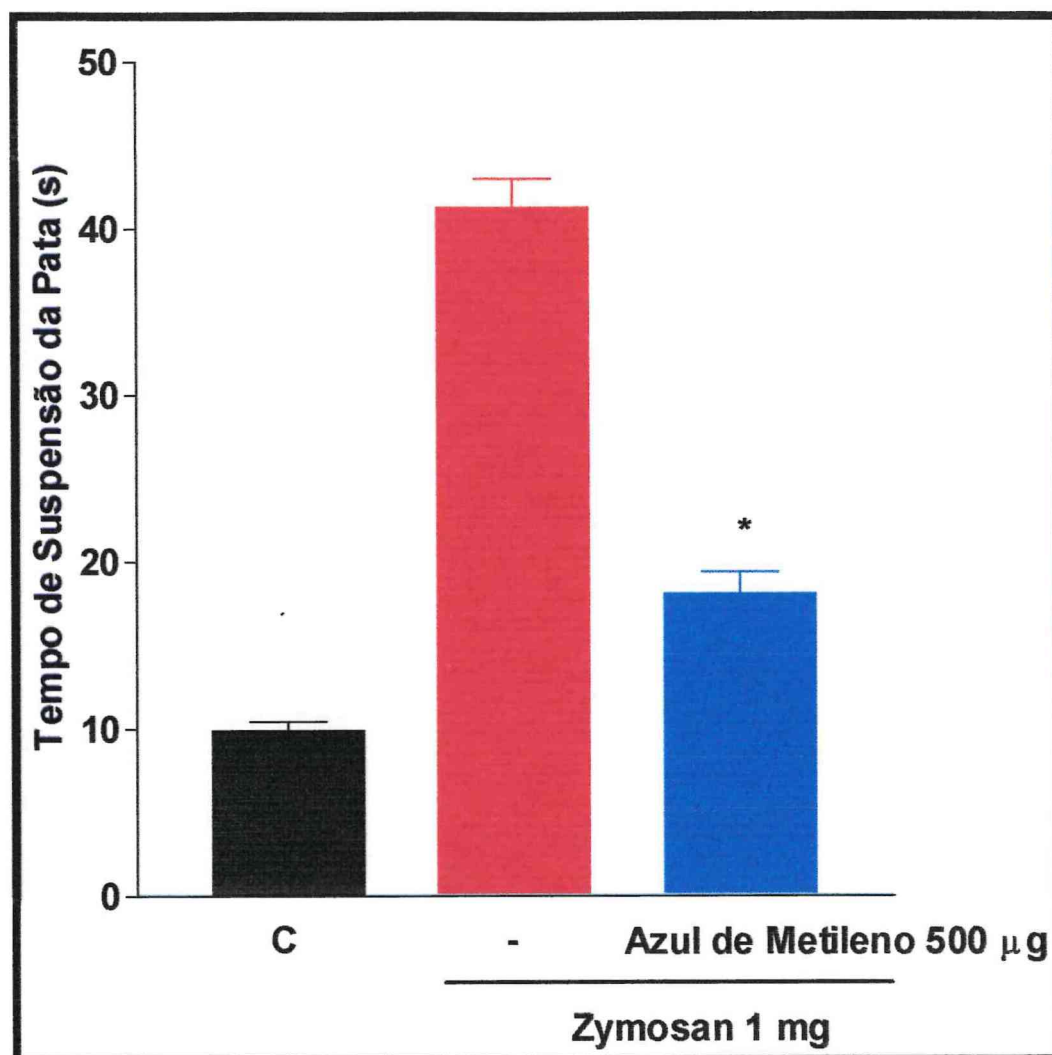


Figura 10. Efeito da administração de azul de metileno sobre a incapacitação articular (IA) na artrite experimental induzida por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. Azul de metileno foi administrado nas doses 500 µg/iart 1 hora antes da indução da AZy. A IA foi registrada até a 6^a hora através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico o TSP representa o pico de IA, registrado entre a 3^a e 4^a hora. 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 (-)(ANOVA).

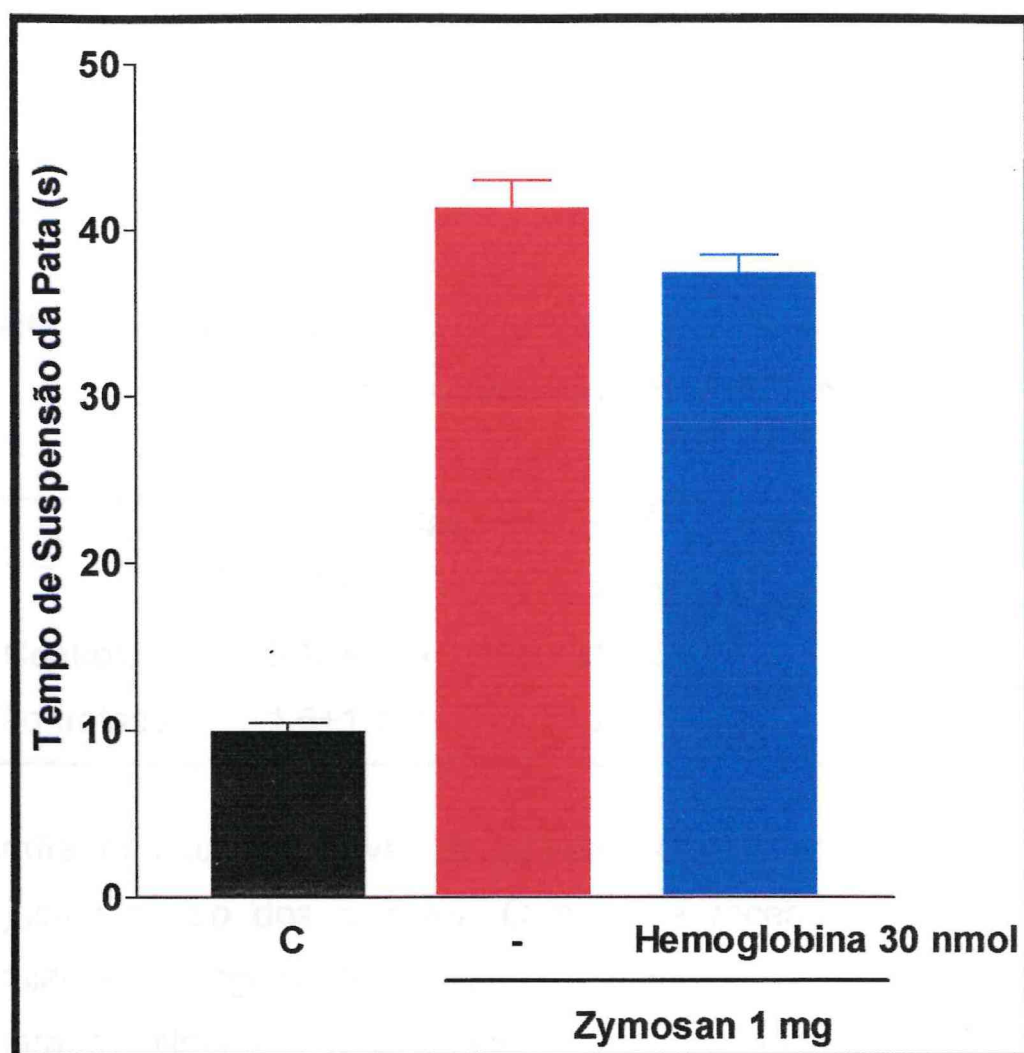


Figura 11. Efeito da administração de hemoglobina sobre a incapacitação articular (IA) na artrite experimental induzida por zymosan (AZy) em ratos . A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. Hemoglobina foi administrada na dose de 30 μ mol/iart. 1 hora antes da indução da AZy. A IA foi registrada até a 6^a hora através do Tempo de Suspensão da Pata (TSP), em segundos. No gráfico, o TSP representa o pico de IA, registrado entre a 3^a e 4^a hora. 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(-) (ANOVA).

Tabela 1. Artrite experimental induzida por zymosan em ratos
Aumento do influxo de leucócitos

	Células x 10 ³ /mm ³		
	3 ^a hora	4 ^a hora	6 ^a hora
Controle	0.12±0.69	0.11±0.80	0.13±0.49
Não-tratado	1.6±1.17*	1.7±1.82*	9.2±4.60*

A artrite foi induzida através da administração de zymosan (1 mg) no joelho direito dos animais. O controle recebeu salina intra-articular. A contagem das células no exsudato sinovial foi feita em câmara de Neubauer na terceira, quarta e sexta hora após a administração do estímulo. Os dados representam a média±DP de pelo menos cinco experimentos.* p<0.01 em relação ao grupo controle (ANOVA).

Figura 12. Fotomicrografia da região posterior do joelho direito de ratos. Artrite experimental induzida por zymosan. O aumento do influxo de leucócitos é evidente na terceira, quarta e sexta hora após a administração do estímulo. Quinta hora. Zymosan 1 mg. HE, 100x.

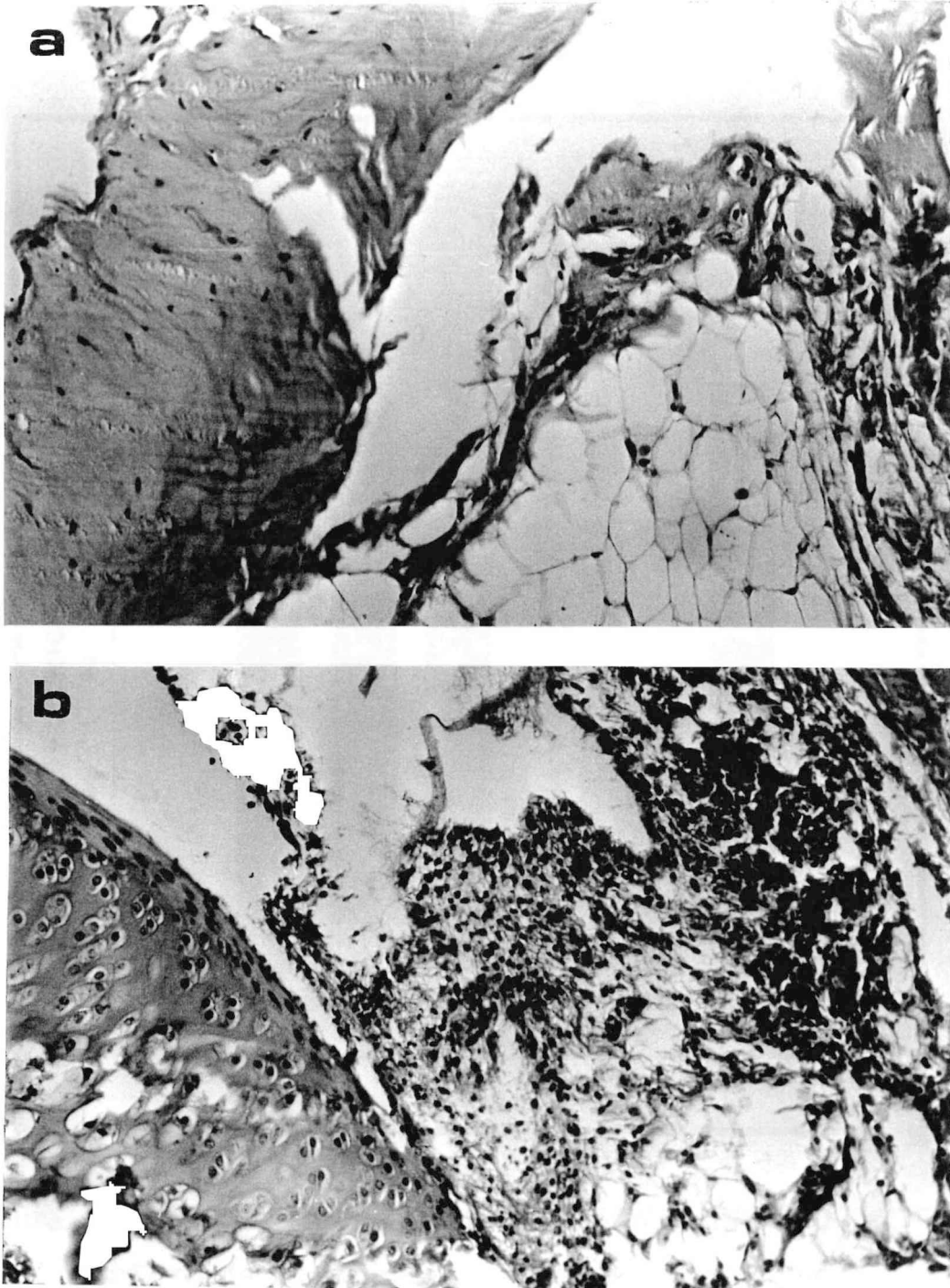


Figura 12. Fotomicrografia da região periarticular de joelho de ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan (1 mg) na articulação do joelho direito. Os animais foram sacrificados 6 horas após a injeção do estímulo. Observa-se intenso influxo celular (b), em comparação com os animais controle (a) que receberam apenas salina. HE, 100x.

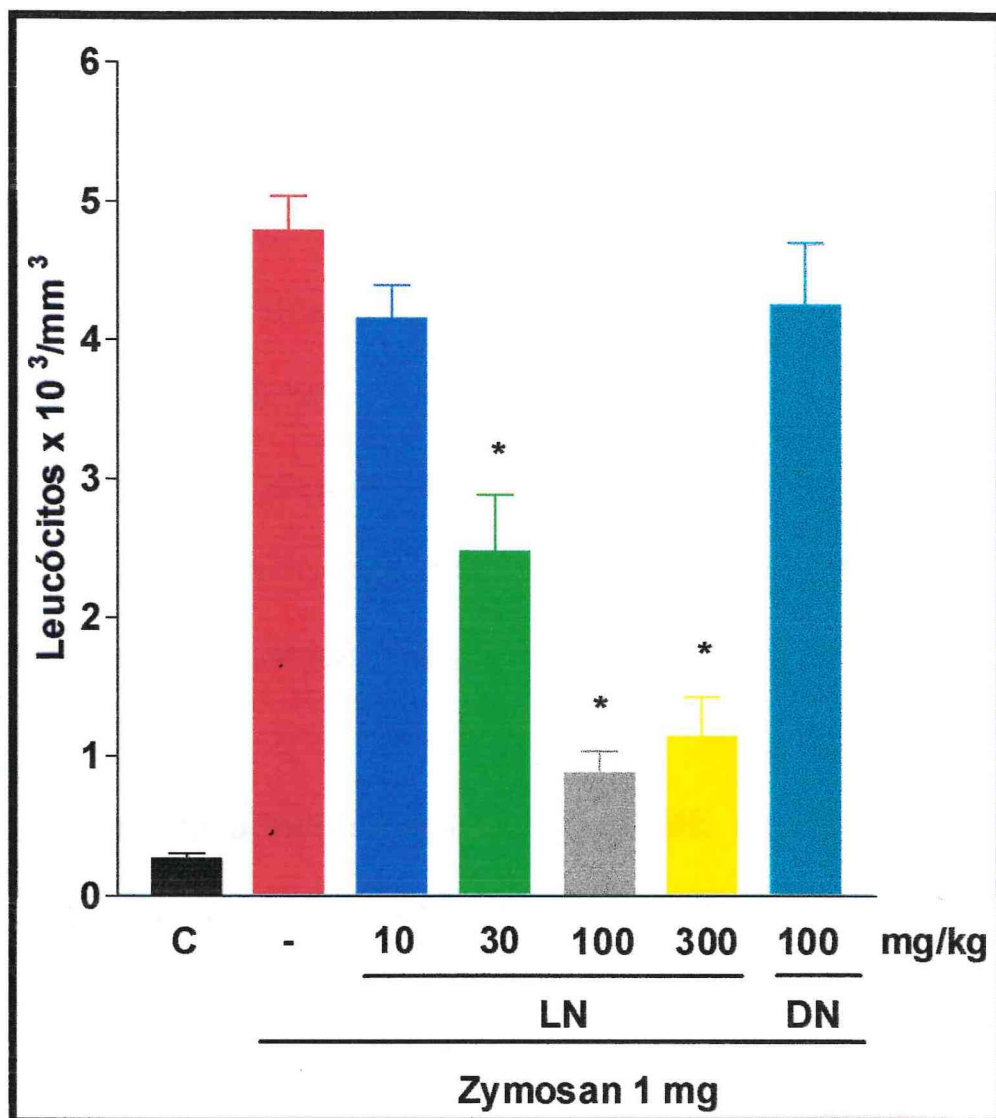


Figura. 13 - Efeito da administração de L-NAME (LN) ou D-NAME (DN) sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. LN, nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg-i.p., ou DN 100 mg/kg-i.p., foi administrado 1 hora antes da indução da AZy e o lavado articular foi coletado na 6^a hora 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(-) (ANOVA).

3.2.2. Efeito da administração de L-arginina e de L-NAME sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração prévia de L-arginina 1 g/kg-v.o. reverteu o efeito do L-NAME 100 mg/kg-i.p., administrado 1 hora antes da indução da artrite por zymosan, sobre o influxo de leucócitos na artrite por zymosan. L-arginina, sozinha, não alterou o influxo de leucócitos em comparação com o controle ($p>0.05$) (Figura 14).

3.2.3. Efeito da administração de D-NAME sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração de D-NAME 100 mg/kg-i.p., 1 hora antes da indução da artrite, não inibiu o influxo de leucócitos na artrite por zymosan ($p>0.05$) (Figura 13).

3.2.4. Efeito da administração de aminoguanidina sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por

zymosan em ratos

A administração de aminoguanidina 1 hora antes da indução da artrite inibiu, de forma significativa ($p < 0.05$) e dose-dependente o influxo de leucócitos medido na 6^a hora de artrite, sendo de $2.1 \times 10^3/\text{mm}^3$, $1.2 \times 10^3/\text{mm}^3$ e $1.5 \times 10^3/\text{mm}^3$, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg-i.p. (Figura 15), sendo 56.2%, 75.0% e 68.8% menor em relação ao grupo não-tratado, respectivamente. Em experimentos posteriores, utilizou-se a dose de 100 mg/kg-i.p. em virtude de ter reduzido o influxo de leucócitos de forma reprodutível e não ter havido diferença significativa em relação à dose de 300 mg/kg-i.p.

3.2.5. Efeito da administração de L-NAME ou aminoguanidina sobre o influxo de leucócitos após a indução da artrite experimental por zymosan em ratos

A administração de L-NAME ou aminoguanidina 100 mg/kg-i.p. 2 horas após a indução da artrite por zymosan não modificou o influxo de leucócitos em relação ao grupo não-tratado ($p > 0.05$) (Figura 16).

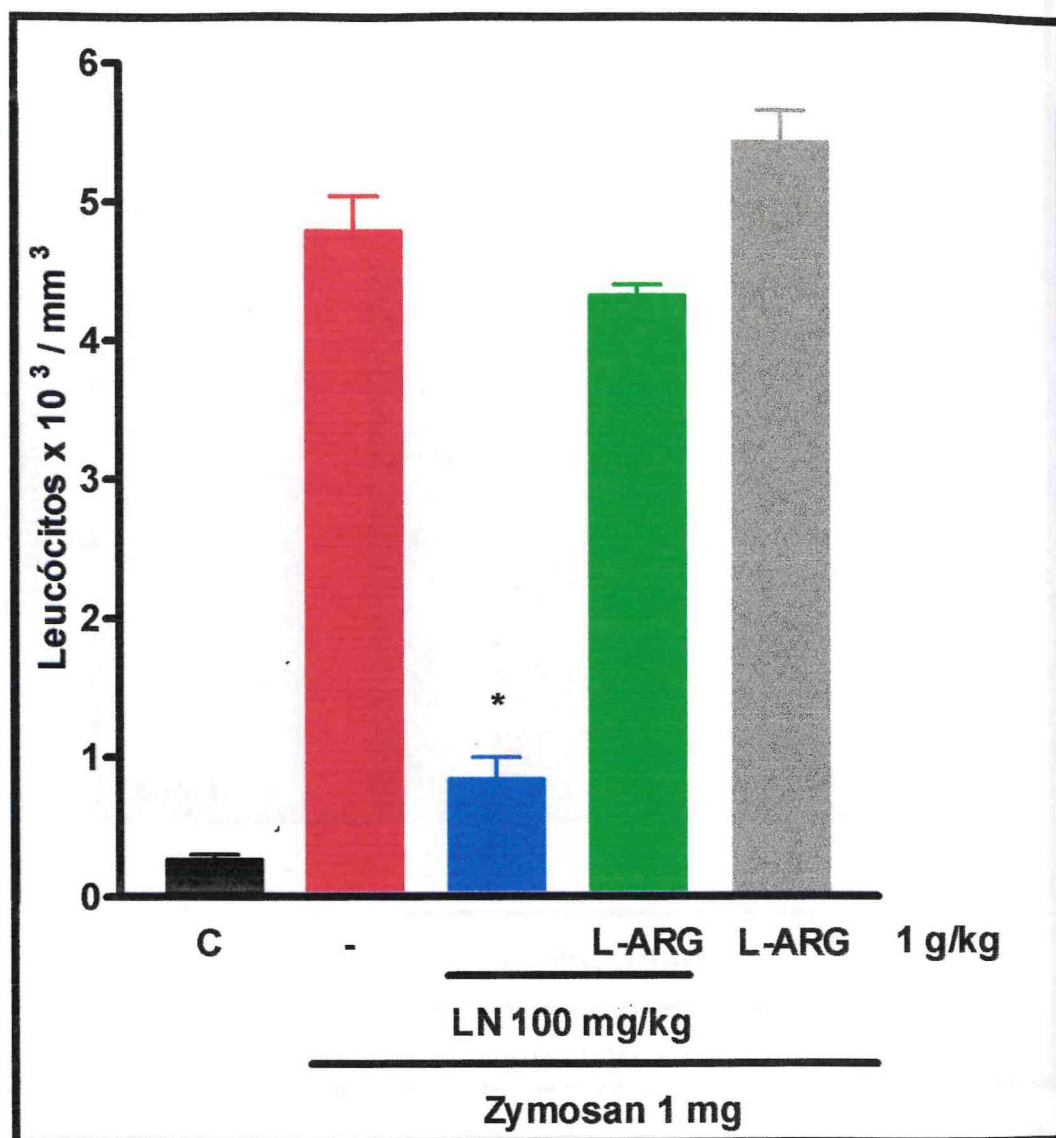


Figura. 14. Efeito da administração de L-arginina (L-ARG) e L-NAME (LN) sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. L-ARG 1g/kg-v.o. foi administrada 30 minutos antes de LN 100 mg/kg-i.p. LN foi administrado 1 hora antes da indução da artrite e o lavado articular foi coletado na 6^a hora 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(-) (ANOVA)

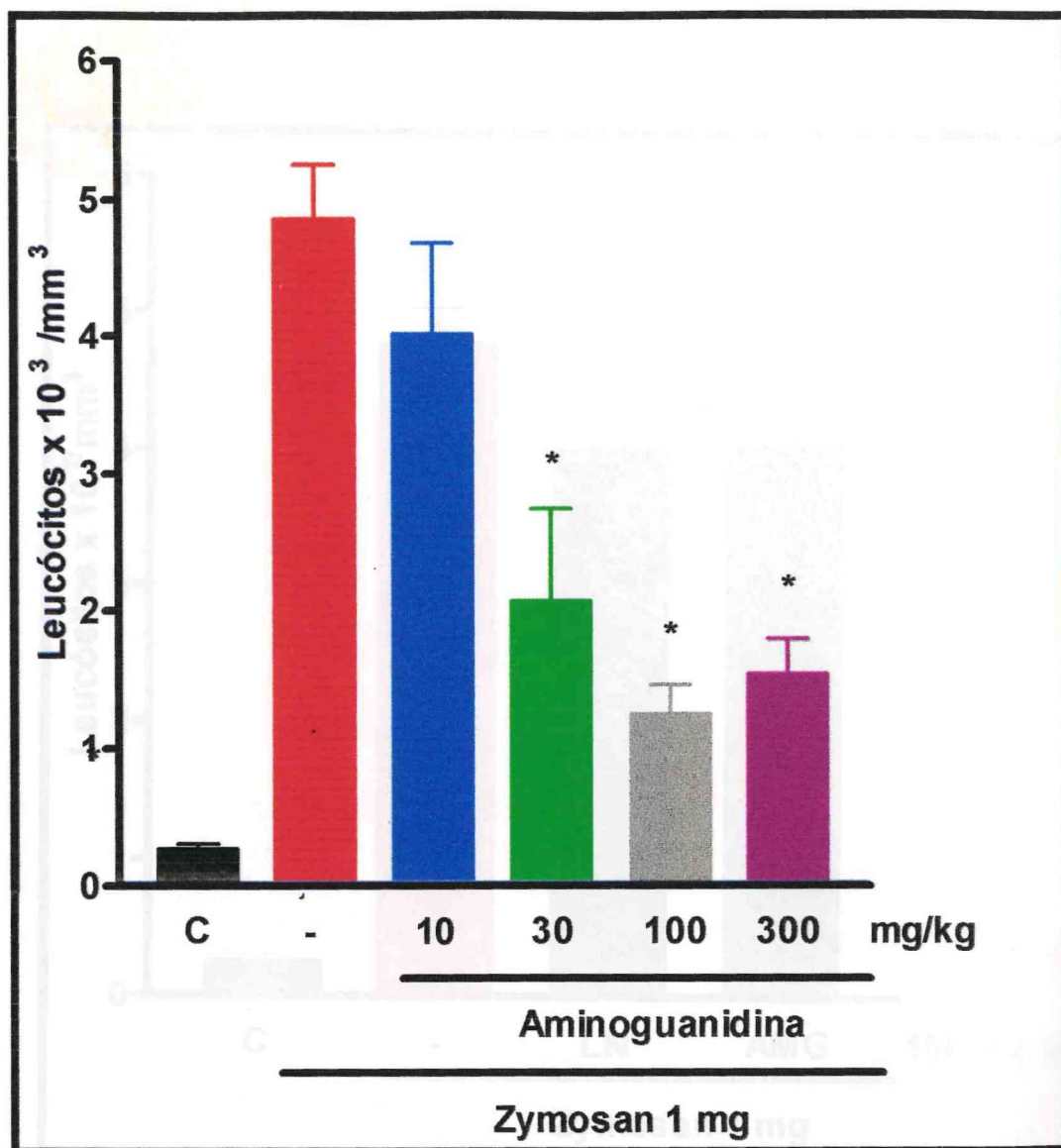


Figura 15. Efeito da administração de aminoguanidina sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. Aminoguanidina foi administrado nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg-i.p. 1 hora antes da indução da AZy e o lavado articular foi coletado na 6^a hora 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 (-)(ANOVA).

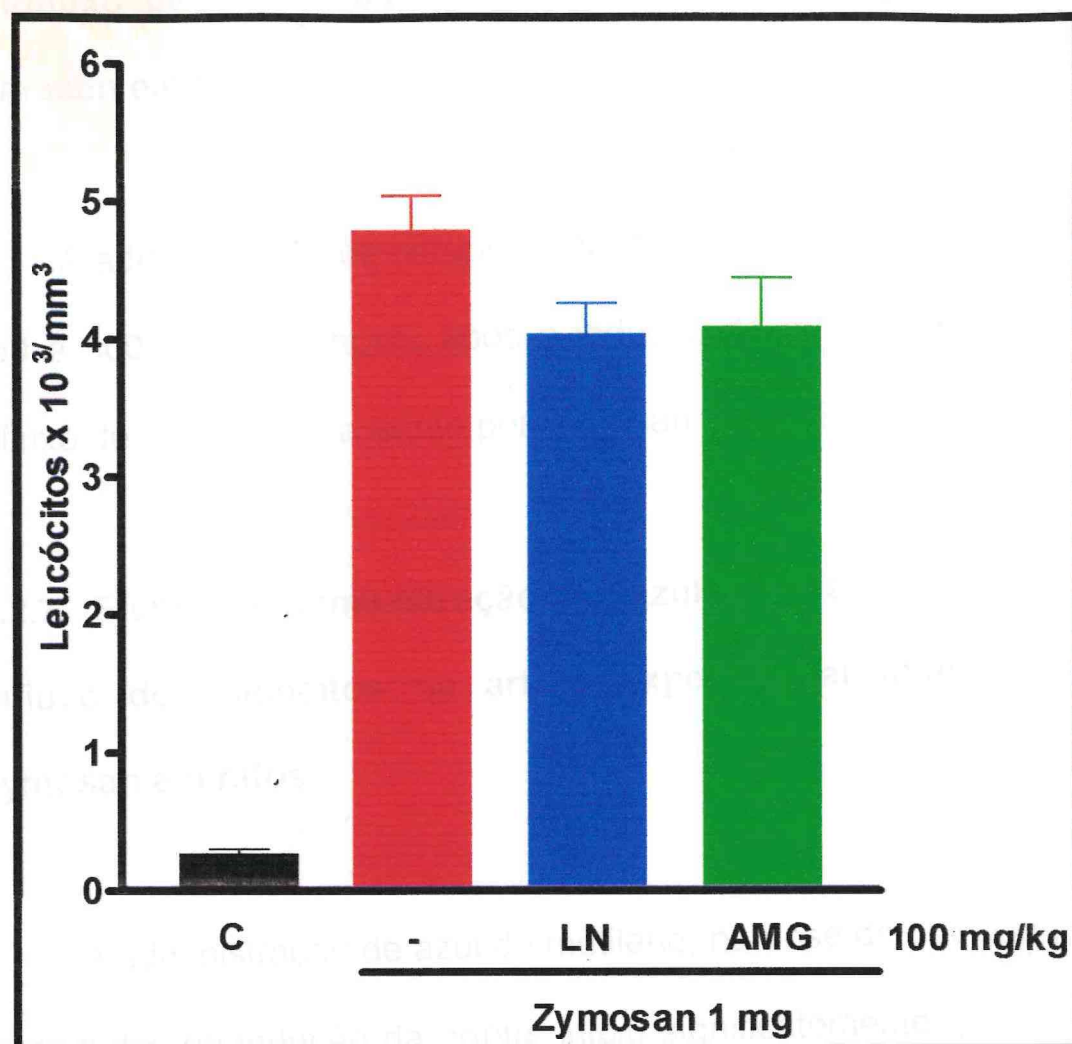


Figura 16. Efeito do tratamento com L-NAME (LN) ou aminoguanidina (AMG) sobre o influxo de leucócitos após a indução da artrite experimental por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. LN ou AMG foi administrado na dose de 100 mg/kg-i.p. 2 horas após a indução da AZy e o lavado articular foi coletado na 6^a hora 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 (-)(ANOVA).

3.2.6. Efeito da administração de nitroprussiato de sódio sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração de nitroprussiato de sódio, nas doses de 100, 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{ia}rt$, 2 horas após a indução da artrite, não inibiu o influxo de leucócitos na artrite por zymosan ($p>0.05$) (Figura 17).

3.2.7. Efeito da administração de azul de metileno sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração de azul de metileno, na dose de 500 $\mu\text{g}/\text{ia}rt$, 1 hora antes da indução da artrite, inibiu significativamente ($p<0.05$), o influxo de leucócitos na artrite por zymosan (Figura 18) sendo 70.8% menor em relação ao grupo não-tratado.

3.2.8. Efeito da administração de hemoglobina sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos.

A administração de hemoglobina, na dose de 30 $\mu\text{mol}/\text{art}$ concomitante a indução da artrite, não inibiu o influxo de leucócitos na artrite por zymosan ($p>0.05$) (Figura 19).

3.3. Efeito de inibidores da síntese de óxido nítrico sobre o edema articular

A diferença média observado entre o peso seco e o peso úmido no grupo controle foi de $69,2\pm 4,8$ g enquanto no grupo não-tratado a administração de zymosan (1mg) induziu um aumento da diferença média para $142\pm 8,0$ g (Tabela 2).

3.3.1. Efeito de L-NAME ou aminoguanidina sobre o edema articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração de L-NAME ou aminoguanidina 100 mg/kg-i.p não alterou ($p>0.05$) o edema articular em relação ao grupo não-tratado (Tabela 2).

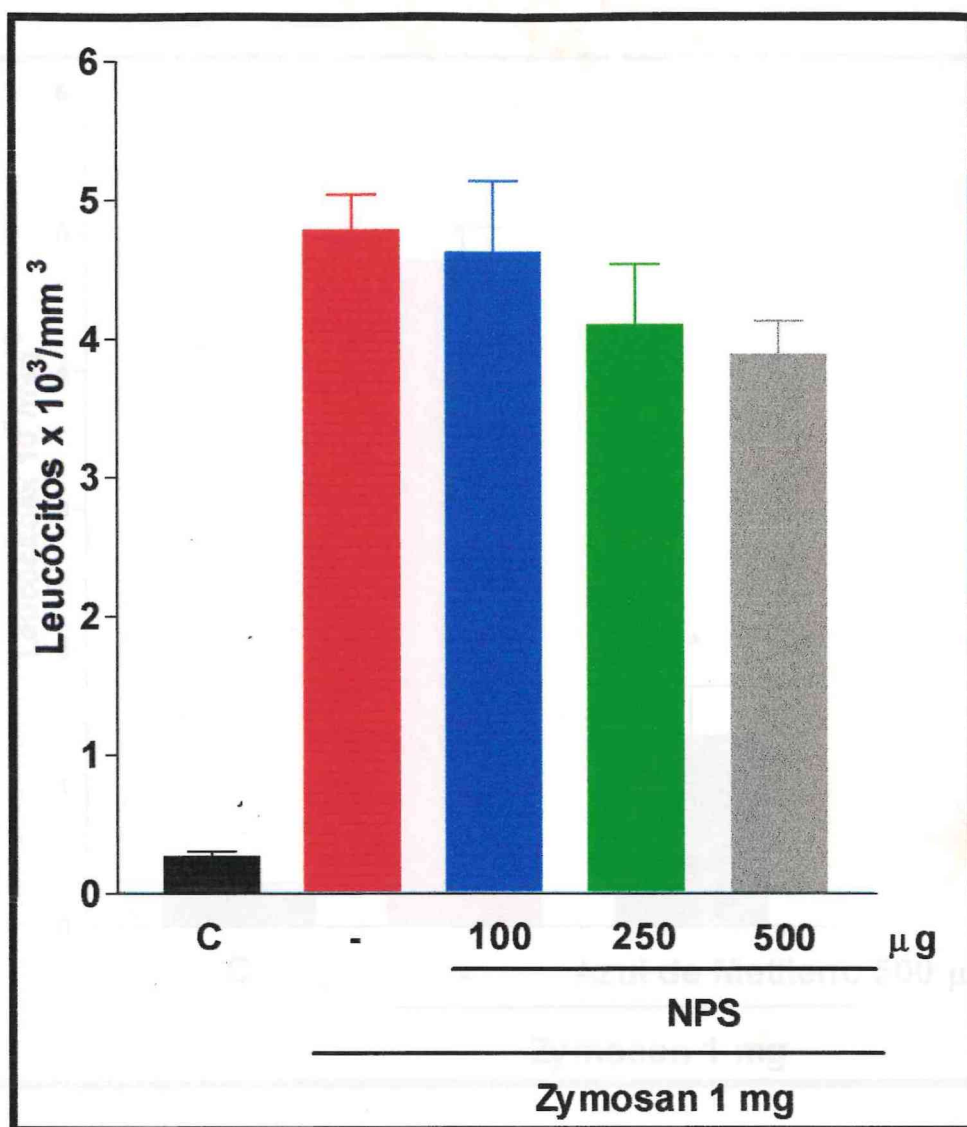


Fig. 17 - Efeito da administração de nitroprussiato de sódio (NPS) sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. NPS foi administrado nas doses de 100, 250 e 500 µg/iart. na 2^a hora de AZy e o lavado articular foi coletado na 6^a hora para contagem do número total de células. 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(-)

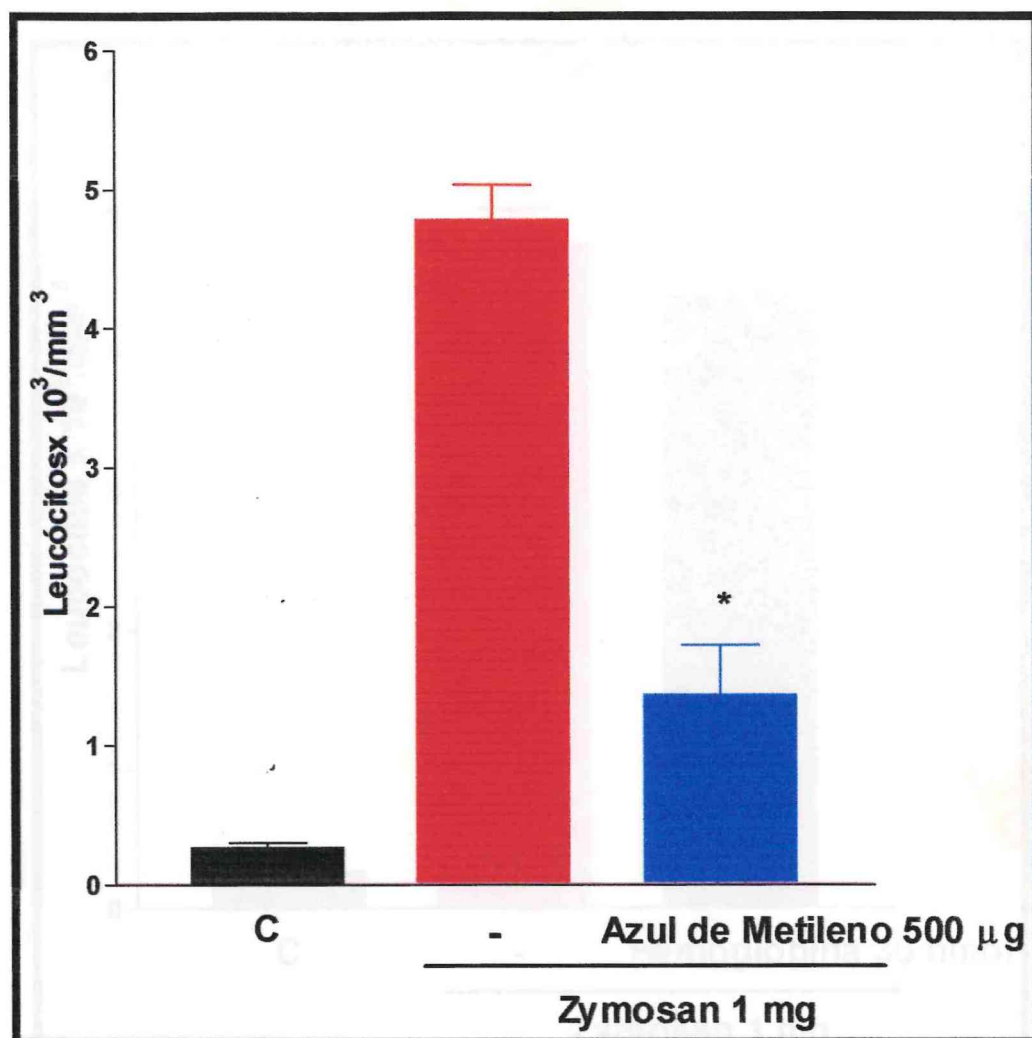


Figura 18. Efeito da administração de azul de metileno sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan (AZy) em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. Azul de metileno foi administrado na dose de 500 μg /iart 1 hora antes da indução da AZy e o lavado articular foi coletado na 6ª hora 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(-) (ANOVA)

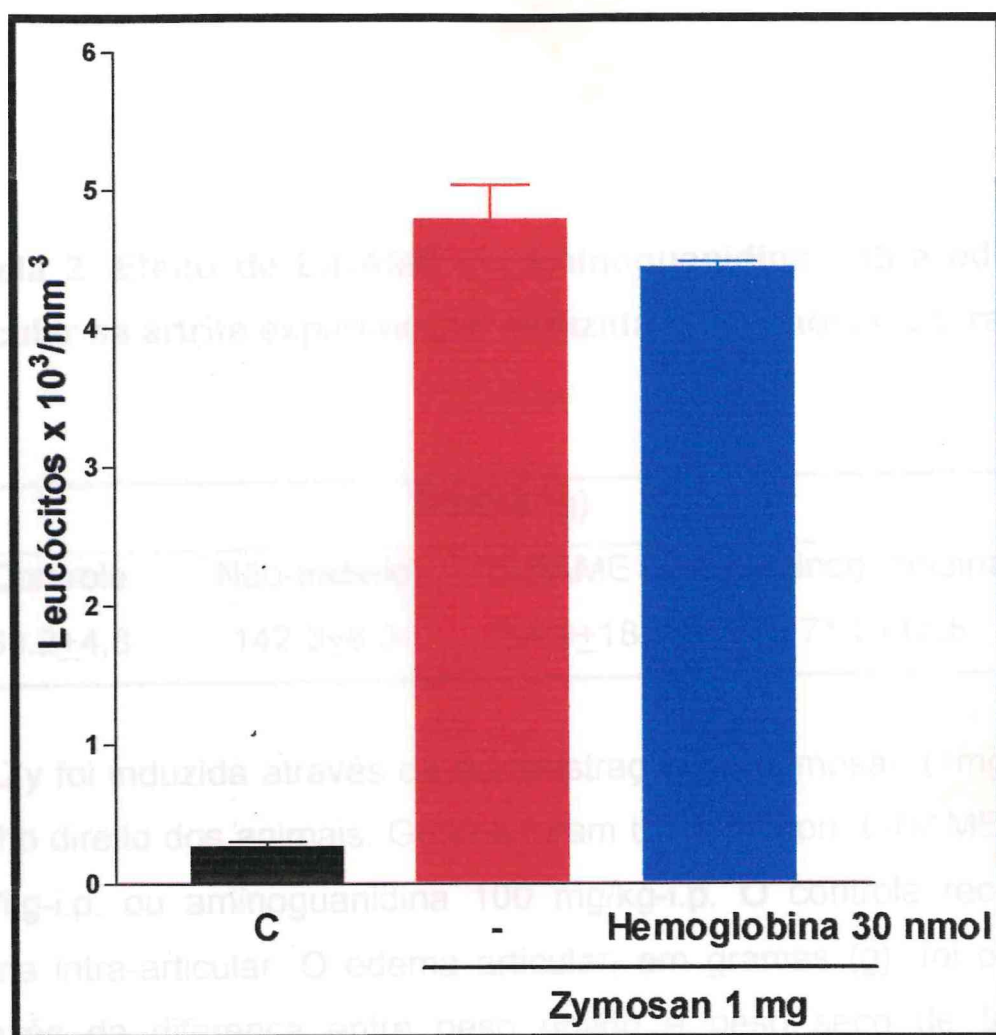


Figura. 19 - Efeito da administração de hemoglobina (HB) sobre o influxo de leucócitos na artrite experimental induzida por zymosan em ratos. A artrite foi induzida através da administração de zymosan 1 mg/iart. HB foi administrada na dose de 30 μ mol/iart. concomitante a indução da AZy e o lavado articular foi coletado na 6^a hora 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(-) (ANOVA).

Tabela 2. Efeito de L-NAME ou aminoguanidina sobre edema articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

Edema (g)			
Controle	Não-tratado	L-NAME	Aminoguanidina
69.2±4,8	142.3±8,0	154.9±18	171.3±15.5

A AZy foi induzida através da administração de zymosan (1mg) no joelho direito dos animais. Grupos foram tratados com L-NAME 100 mg/kg-i.p. ou aminoguanidina 100 mg/kg-i.p. O controle recebeu salina intra-articular. O edema articular, em gramas (g), foi obtido através da diferença entre peso úmido e peso seco de tecido periarticular e sinóvia após a 3^a hora da AZy. Os dados representam a média±DP (n=6).

3.4. Efeito de inibidores da síntese de NO sobre a pressão arterial média de ratos

3.4.1 Efeito de L-NAME sobre a pressão arterial média de ratos

O tratamento com L-NAME 100 mg/kg elevou significativamente ($p < 0.05$) a pressão arterial média dos animais em relação ao grupo controle, que recebeu apenas salina, sendo de 144.5 ± 3.3 mmHg na dose de 100 mg/kg-i.p. (Tabela 3).

3.4.2. Efeito de aminoguanidina sobre a pressão arterial média de ratos

O tratamento com aminoguanidina 100 mg/kg-i.p. não alterou significativamente ($p > 0.05$) a pressão arterial média dos animais em relação ao grupo controle, que recebeu apenas salina, sendo de 101.3 ± 1.7 mmHg na dose de 100 mg/kg-i.p. (Tabela 3).

3.5. Efeito de inibidores da síntese de óxido nítrico sobre a liberação de prostaglandina E2 na artrite experimental induzida

por zymosan em ratos

3.5.1 Efeito de L-NAME ou aminoguanidina sobre a liberação de prostaglandina E2 no lavado articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

A administração de L-NAME ou aminoguanidina 100 mg/kg-i.p não alterou a liberação de prostaglandina E2 no lavado articular, colhido na 6^a h de artrite por zymosan, quando comparado com o grupo não-tratado ($p>0.05$) (Tabela 4).

Tabela 3. Efeito de L-NAME ou aminoguanidina sobre a pressão arterial média de ratos

Pressão Arterial (mmHg)		
Controle	L-NAME	Aminoguanidina
96.0 \pm 4	153.0 \pm 7*	97.6 \pm 4

Grupos de animais foram tratados com L-NAME ou aminoguanidina 100 mg/kg-i.p. O controle recebeu salina intra-articular. A pressão arterial média, em mmHg, representa o valor máximo obtido entre o momento da administração das drogas até a 6^a hora de artrite. Os dados representam a média \pm DP (n=6). *p<0,05 em relação ao grupo controle (ANOVA).

Tabela 4. Efeito de L-NAME ou aminoguanidina sobre a liberação de prostaglandina E2 no lavado articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos

Controle	Prostaglandina (pg/ml)		
	Não-tratado	L-NAME	Aminoguanidina
99.0 \pm 47*	550.2 \pm 364	1375 \pm 523*	549.6 \pm 256

A artrite foi induzida por administração de zymosan (1 mg) no joelho direito dos animais. Grupos foram tratados com L-NAME ou aminoguanidina 100 mg/kg-i.p. O controle recebeu salina intra-articular. PGE2 foi medida, por ensaio imunoenzimático, no lavado articular após 6 horas de artrite. Os dados representam a média \pm DP de pelo menos três animais.* $p < 0.05$ em relação ao grupo não-tratado (ANOVA).

Discussão

4.0. DISCUSSÃO

A primeira parte do presente estudo compreendeu a execução do modelo de artrite experimental induzida por zymosan em ratos enfocando aspectos da fase aguda, com o objetivo de reproduzir achados relatados neste e em outros modelos de artrite (Magalhães *et alii*, 1997; Viana *et alii*, 1998).

A injeção de zymosan (1 mg) no joelho de animais provocou reação inflamatória intensa, caracterizada por aumento de permeabilidade vascular, influxo de leucócitos, liberação de prostaglandina E2 (PGE2) e incapacitação articular .

O influxo de leucócitos para o interior da cavidade articular se iniciou a partir das três horas de artrite e foi máximo na sexta hora, com predomínio de polimorfonucleares neutrófilos. O aumento de permeabilidade vascular, avaliado pela medida da diferença entre peso úmido e peso seco do tecido sinovial e periarticular, o que traduz edema local, foi máximo após três horas de artrite. No intuito de demonstrar a liberação de mediadores inflamatórios, determinamos a concentração de PGE2 no líquido sinovial na sexta hora de artrite, tempo que corresponde ao pico do influxo de

leucócitos.

Abordando um parâmetro indireto de dor inflamatória articular, avaliado pelo teste de incapacitação articular, obtivemos que a incapacitação articular se inicia a partir da segunda hora de artrite, tornando-se máxima entre a terceira e quarta horas após aplicação do estímulo. Apesar de ser significativamente menor na sexta hora, a incapacitação articular ainda persiste até esse tempo, quando o tempo de suspensão da pata do animal ainda é maior que o valor obtido no tempo basal.

Em uma abordagem geral, recapitulamos os achados já obtidos na artrite induzida por zymosan tanto por nosso grupo como por outros autores. Realmente, foi demonstrado que o pico do influxo celular ocorre na sexta hora de artrite, tanto na artrite por zymosan (Rocha *et alii*, IN PRESS) como em outros modelos tais como na artrite induzida por imunocomplexos (Rocha *et alii*, 1996), ocorrendo redução nesse influxo a partir de vinte e quatro horas de artrite. No que diz respeito ao edema, nosso grupo demonstrou ocorrência do pico na terceira hora de artrite, medindo o aumento de permeabilidade vascular através da quantificação do extravasamento do azul de Evans no interior da cavidade articular

(Rocha *et alii*, IN PRESS). Corroborando este achado, avaliamos, no presente estudo, o edema articular através da diferença entre o peso seco e o peso úmido do tecido periarticular. De forma similar, a cinética de liberação de PGE2 aqui observado é semelhante ao demonstrado por Gegout *et alii* (1995), que também utilizou modelo de artrite por zymosan em ratos assim como na artrite induzida por antígeno em coelhos (de Brum-Fernandes *et alii*, 1992) e na artrite induzida por imunocomplexos em ratos (Rocha *et alii*, 1996)

Com relação a dor articular, Tonussi e Ferreira (1992), modificando o modelo descrito inicialmente por Bustamente (1982) e empregando como agente inflamatório a carragenina, quantificaram-na através da medida de incapacitação articular. Tonussi e Ferreira (1992) introduziram um sistema de aquisição de dados baseado em computador e conseguiram eliminar a subjetividade do observador, freqüentemente apontado como importante fator de erros na análise dos dados. O grupo do professor Ronaldo Ribeiro, em colaboração com o professor Marcos Vale, ambos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, adaptou e pôs em funcionamento o modelo de incapacitação articular com aferição por computador

usando o mesmo estímulo inflamatório, a carragenina (Magalhães *et alii*, 1997) ou usando, de forma pioneira, um outro estímulo inflamatório, o zymosan (Viana *et alii*, 1998). Os dados do nosso trabalho confirmam os resultados relatados nos trabalhos anteriores no que diz respeito aos parâmetros inflamatórios na artrite por zymosan, particularmente incapacitação articular.

A administração de inibidores de óxido nítrico, na forma de pré-tratamento, aos animais submetidos a artrite por zymosan, reduziu a incapacitação articular de forma dose-dependente, não havendo aumento no bloqueio quando se aumentou a dose para 300 mg/kg-i.p., seja para o grupo tratado com L-NAME, seja para o grupo tratado com aminoguanidina. Vale ressaltar que a co-administração de L-arginina, substrato da produção de NO, foi capaz de reverter os efeitos observados nos animais tratados com L-NAME. Ainda, o pré-tratamento com D-NAME, estereoisômero inativo de L-NAME, em dose igual a máxima efetiva de L-NAME, também não afetou a incapacitação articular. Juntos, os dados permitem concluir que a inibição da síntese de NO modificou, reduzindo a incapacitação articular na artrite por zymosan. Esse efeito deve-se, provavelmente, a ação específica sobre o bloqueio

da óxido nítrico sintase (NOS), uma vez que pode ser revertido por L-arginina. O fato de a administração de D-NAME não ter alterado a incapacitação articular reforça a hipótese de ação específica sobre a produção de NO.

Interessante notar que o bloqueio sobre a incapacitação articular foi obtido tanto quanto se administrou um inibidor inespecífico, L-NAME, da NOS constitutiva (cNOS) ou induzida (iNOS), como nos animais tratados com uma substância que é admitida como tendo bloqueio seletivo sobre a iNOS, a aminoguanidina. Embora haja controvérsias, vários grupos admitem que a aminoguanidina exerce bloqueio específico sobre a iNOS (Griffiths *et alii*, 1993; Misko *et alii*, 1993). Em modelo de contração de músculo liso foi relatado que a aminoguanidina, na dose de 300 μ mol, reduziu significativamente a sensibilidade do músculo liso, sensibilizado por endotoxina, ao relaxamento por L-arginina sem afetar o relaxamento máximo sugerindo inibição específica da iNOS (Griffiths *et alii*, 1993). Similarmente, um estudo da ordem de potência de inibidores de NO contra as enzimas iNOS (induzida em macrófagos e monócitos) ou cNOS (neuronal ou endotelial) concluiu que a aminoguanidina inibe seletivamente a iNOS quando

comparada com L-NMMA, um inibidor específico da cNOS (Misko *et alii*, 1993). Entretanto, Lazlo *et alii*, (1995) em modelo de permeabilidade vascular induzido por endotoxina, propôs que a aminoguanidina, numa faixa de dose de 12.5-50 mg/kg-s.c., inibe, inespecificamente, ambas as enzimas NOS (a constitutiva e induzida). Eles observaram redução do fluxo vascular e reversão deste efeito através do tratamento prévio com L-arginina. Reforçando a hipótese defendida pelos autores, a aminoguanidina, na dose de 50 mg/kg-s.c. elevou a pressão arterial (Lazlo *et alii*, 1995). No entanto, para avaliar a competição entre L-arginina e aminoguanidina, foi estudado o papel da aminoguanidina no relaxamento induzido por L-arginina em anéis de artéria de ratos pré-contraídas por endotoxina e observou-se que o tratamento com L-arginina promovia relaxamento dose-dependente (Griffiths *et alii*, 1993). Este achado é consistente com estudos em aorta de ratos demonstrando que a atividade da iNOS pode ser limitada através do fornecimento de L-arginina extracelular (Schini e Vanhoutte, 1991; Julou-Schaeffer *et alii*, 1990). Adicionalmente, a dose máxima de aminoguanidina é cerca de 10 vezes a máxima de L-NMMA, inibidor específico da cNOS. No que diz respeito a pressão arterial

seria interessante um registro prolongada da pressão arterial e uso de outras vias de administração a fim de confirmar este efeito. Por fim, salientamos que, em nosso modelo experimental, apenas L-NAME, na dose máxima efetiva sobre a incapacitação articular (100 mg/kg), elevou a pressão arterial reforçando a nossa proposta de que, no modelo de artrite por zymosan, a aminoguanidina inibe, seletivamente, a iNOS.

A analgesia produzida por inibidores da síntese de NO também foi proposto por outros autores. Moore *et alii* (1991) empregando o modelo de hiperalgisia induzida por formalina em pata de rato e o teste de contorção induzida por ácido acético, demonstraram efeito antinociceptivo através dos inibidores da síntese de NO em ambos os modelos. Similarmente, a ação analgésica de inibidores de NO foi observada nos modelos de lambidas induzida por capsaicina em camundongos (Sakurada *et alii*, 1996), na hiperalgisia induzida por bradicinina (Nakamura *et alii*, 1996) ou através do emprego de estimulação térmica (Lawand *et alii*, 1997).

Ainda a este respeito, em nosso laboratório, demonstramos que L-NAME e aminoguanidina, na dose de 100 mg/kg-i.p., inibiram

em 58.3% e 64.4%, respectivamente, as contorções abdominais induzidas por zymosan, em camundongos, em relação ao controle ($p < 0.05$) (dados não publicados).

Por outro lado, Duarte *et alii* (1990b), utilizando o modelo de pressão de pata de ratos (Randall e Selitto, 1957) sensibilizadas por carragenina ou PGE₂, propuseram que a ação analgésica periférica da acetilcolina envolve a participação de NO via estimulação de GMPc, o que ajudaria a explicar a ação de analgésicos periféricos como dipirona e mirceno (Duarte *et alii*, 1992). Esta controvérsia provavelmente deve-se ao fato de os modelos experimentais serem distintos, bem como variações na via de administração haja visto que Ferreira *et alii* (1991) obtiveram analgesia através da administração de nitroprussiato de sódio, um gerador não-enzimático de NO, enquanto em nosso modelo experimental empregamos os inibidores da síntese de NO de forma sistêmica e como pré-tratamento. É importante destacar que, em nossos experimentos, o tratamento com L-NAME ou aminoguanidina, após a indução da artrite, não logrou reverter a incapacitação articular o que sugere que a analgesia promovida pelo pré-tratamento com esses compostos pode ter sido devido a efeito inespecífico,

reduzindo a resposta inflamatória como um todo. Desta forma, uma vez desencadeada a artrite, a inibição da síntese de NO, *per se*, não teve efeito analgésico. De fato, quando se administrou nitroprussiato de sódio duas horas após a indução da artrite, obteve-se praticamente abolição da incapacitação articular, sem que fosse alterado o influxo de células. Esse dado, aparentemente contraditório, sugere que a liberação de NO, por um doador exógeno, teve ação analgésica específica na artrite por zymosan. O mecanismo preciso operante nesses achados ainda demanda investigação.

Em conjunto, estes dados apontam para a ação analgésica de antagonistas de NO através de ação direta, por inibir a ativação dos nociceptores, ou indiretamente, afetando as células residentes articulares pois o influxo celular na artrite por zymosan inicia-se na terceira hora e atinge o pico por volta da sexta hora enquanto a incapacitação articular atinge o pico entre a terceira e quarta horas. De fato, foi proposto que a incapacitação articular na artrite por zymosan independe da participação de polimorfonucleares neutrófilos e se deve à estimulação de nociceptores localizados em estruturas periarticulares (Rocha *et alii*, IN PRESS).

Ainda com relação aos nossos resultados, a co-administração de naloxona, um antagonista opióide, reverteu de maneira significativamente o bloqueio da incapacitação articular induzido por L-NAME ou aminoguanidina levando-nos a supor que o possível efeito analgésico dos inibidores de NO na artrite por zymosan se dê por liberação de opióides endógenos.

A naloxona é um antagonista específico que se liga particularmente a receptores opióides do tipo μ . Tem curta duração de ação, cerca de uma a duas horas após injeção e inibe dramaticamente a ação da morfina em apenas 1 a 3 minutos após sua injeção (Rang *et alii*, 1997). Assim, a reversão do efeito analgésico provocado pela naloxona observado nos animais que receberam L-NAME ou aminoguanidina pode ter sido devido a bloqueio de receptores opióides do tipo μ . No entanto, não nos é possível discernir se o efeito analgésico dos inibidores de NOS se deu por ação direta, o que entretanto é pouco provável, ou através da liberação de um mediador opióide endógeno (Machelska *et alii*, 1997).

Semelhante ao que foi observado para a incapacitação articular, tanto L-NAME quanto aminoguanidina inibiram de forma

significante e dose-dependente o influxo de leucócitos na artrite por zymosan, em doses semelhantes às necessárias para inibir a incapacitação articular. Da mesma forma, essa ação provavelmente deveu-se a inibição específica da síntese de NO pois a co-administração de L-arginina reverteu o efeito inibitório do L-NAME, enquanto o estereoisômero inativo D-NAME não alterou o influxo de leucócitos. Similarmente, o bloqueio do influxo de leucócitos nos animais tratados com aminoguanidina sugere que NO participa na mediação deste evento na artrite por zymosan, provavelmente, via ativação da iNOS.

A redução do influxo celular por inibidores da síntese de NO também já foi demonstrada no modelo de artrite induzida por antígeno em coelhos, no qual a administração crônica de L-NAME, na dose de 20 mg/kg/d via oral, reduziu o influxo celular (de Mello *et alii*, 1997). Resultado similar foi observado em outros modelos experimentais. Assim, foi demonstrado que a administração local de L-NAME, em várias doses, inibiu o acúmulo de eosinófilos e neutrófilos induzido na pele de cobaias por plasma ativado por zymosan, PAF e reação de anafilaxia (Teixeira *et alii*, 1993). No modelo de pleurisia induzida em ratos (Tracey *et alii*, 1995; Ferreira

et alii, 1996; Menezes de Lima Jr. *et alii*, 1997) ou em ratos previamente sensibilizados por ovoalbumina (Ferreira *et alii*, 1998) também foi relatado redução da migração de eosinófilos e neutrófilos através do tratamento com L-NAME.

O mecanismo através do qual os inibidores da síntese de NO bloqueiam o influxo celular não foi investigado no presente trabalho. No entanto, já foi demonstrado que L-NAME ou L-NMMA aumentam a aderência de leucócitos às células endoteliais, sugerindo que o NO tem papel importante na modulação endógeno da adesão destas células (Kubes *et alii*, 1991).

Corroborando, estes achados, foi demonstrado por Ma *et alii*, (1993) em modelo de isquemia e reperfusão em miocárdio de gatos, que a diminuição da liberação basal de NO após injúria miocárdica precede o aumento da aderência de leucócitos polimorfonucleares coronariano. Adicionalmente, a superfusão *in vivo* de músculo cremaster de ratos com L-NAME também aumentou a adesão de leucócitos ao endotélio venular (Akimitsu *et alii*, 1995).

Os mecanismos exatos envolvidos na inibição da adesão de leucócitos pelo NO não estão esclarecidos na literatura. Uma possibilidade sugerida por Niu *et alii* (1992) é de que a inibição da

síntese de NO levaria ao aumento do stress oxidativo intracelular com conseqüente inibição da interação entre neutrófilos e células endoteliais. Outra hipótese plausível envolve a elevação dos níveis de GMPc pois foi observado, por vários autores em distintos modelos experimentais, que o aumento da concentração de GMPc (Sandler *et alii*, 1975; Anderson *et alii*, 1976; Gallin *et alii*, 1978; Kaplan *et alii*, 1989) altera as funções celulares envolvidas no processo de migração através dos espaços intercelulares

Por outro lado, observamos que L-NAME e aminoguanidina não inibiram o edema articular medido na terceira hora após a indução da artrite. Mas foi demonstrado que a administração local de L-NAME inibiu de forma dose-dependente o edema induzido por injeção intradérmica de bradicinina, histamina, plasma ativado por zymosan, reação de anafilaxia passiva cutânea (Teixeira *et alii*, 1993), carragenina (Salvemini *et alii*, 1996a; Salvemini, 1996b; Ialenti *et alii*, 1992) ou dextran (Ialenti *et alii*, 1992). Resultado similar foi observado no edema induzido na pele de ratos por substância P (Hughes *et alii*, 1990). Em vista desta evidência da modulação do edema por inibidores de NO, convém destacar que, provavelmente, por medirmos a variação de edema apenas na

terceira hora de artrite por zymosan, quando o edema é máximo, não pudemos observar variação nesta hora. Além do mais, nos trabalhos em que relatam redução do edema, os inibidores de NO foram administrados em, no máximo, uma hora antes da indução do edema. Reforçando esta hipótese, já foi demonstrado que L-NAME, L-NMMA ou hemoglobina foram potentes inibidores do aumento do volume da pata apenas na primeira hora, sendo pouco efetivos nas horas subsequentes (Cuzzocrea *et alii*, 1997). O segundo ponto a ser destacado é que não há controvérsia em inibir a incapacitação articular e influxo celular e não inibir o edema. Já foi demonstrado que o edema não é responsável pela incapacitação pois a administração de uma substância edematogênica, como dextran, não causou incapacitação (Tonussi e Ferreira, 1992). Em outro trabalho também foi demonstrado que o influxo celular não foi responsável pela incapacitação articular (Rocha *et alii*, IN PRESS).

Também avaliamos a interação entre NO e prostaglandina E2 (PGE2) e encontramos que os inibidores da síntese de NO, L-NAME e aminoguanidina, na dose que inibiu a incapacitação articular e o influxo de células (100 mg/kg), não reduziram a liberação de PGE2 avaliada na sexta hora da AZy. A este respeito,

foi relatado que os inibidores da síntese de NO parecem reduzir a resposta inflamatória por inibirem tanto a produção de NO citotóxico como de prostaglandina inflamatória (Salvemini *et alii*, 1995a; Salvemini *et alii*, 1995b). Contudo foi demonstrado em macrófagos ativados por LPS e em experimentos *in vivo* que o NO tem um efeito duplo sobre a COX. Assim, pequena quantidade de NO (quando ocorre inibição da NOS, por exemplo) parece potenciar a atividade da COX enquanto quantidade elevada parece inibi-la (Swierkosz *et alii*, 1995). Este efeito inibitório do NO sobre a atividade da ciclooxigenase pode ser explicada pela capacidade do NO em reduzir a forma ferro-ativa da COX para forma ferro-inativa (Kanner *et alii*, 1992).

Adicionalmente, parece haver relação entre a atividade inibitória e os níveis de outros radicais livres formados na reação inflamatória como ânions superóxidos ou peróxido de nitrogênio (Beckman *et alii*, 1990; Heinzl *et alii*, 1992). Finalmente, a influencia do NO sobre a síntese de prostanóides pode variar de acordo com o tipo celular, o estado de ativação celular e a quantidade de iNOS e COX-2 (induzida) presente (Swierkosz *et alii*, 1995)

A hemoglobina possui uma molécula relativamente grande e, por isso, dificilmente ultrapassa a barreira intercelular e, devido a sua ávida ligação ao NO, é uma ferramenta para estudo da participação de NO extracelular em fenômenos fisiopatológicos (Martin *et alii*, 1985; Kelm e Schrader, 1990). Com esta finalidade, administramos hemoglobina na articulação dos ratos e não observamos alteração seja na incapacitação articular seja no influxo de leucócitos para o foco inflamatório. A este respeito, foi relatado que a hemoglobina, administrada sistemicamente, inibe a resposta inflamatória na artrite induzida por adjuvante em ratos (McCartney-Francis *et alii*, 1999). Em outros trabalhos foi demonstrada a ação inibitória da hemoglobina por via intratecal, prolongando a resposta ao teste do "tail flick" em ratos (Inoue *et alii*, 1997) ou reduzindo a resposta álgica no modelo de hiperalgisia térmica após injúria nervosa em ratos (Inoue *et alii*, 1998).

Por outro lado, foi demonstrado que a administração local de hemoglobina reduziu o edema de pata induzido por zymosan em ratos apenas aos 30 e 120 minutos após a administração com pouca redução no tempo de 180 minutos o que demonstra eficácia apenas na fase inicial da resposta inflamatória (Cuzzocrea *et alii*,

1996). No que diz respeito aos nossos resultados, podemos apenas afirmar que a incapacitação articular e o influxo celular na artrite por zymosan não parece depender de NO exógeno.

Em vista de a maioria dos efeitos do NO serem mediados através da elevação dos níveis de GMPc, avaliamos a participação de mensageiro celular nos parâmetros avaliados e empregamos o azul de metileno, um inibidor da guanilato ciclase solúvel e observamos redução significativa da incapacitação articular e do influxo de leucócitos na artrite por zymosan. No entanto, os relatos da literatura tem mostrado que a via NO:GMPc tem efeito antinociceptivo periférico (Duarte *et alii*, 1990b) ou central (Duarte e Ferreira, 1992).

Ainda, é importante destacar que há várias observações sugerindo que esta mesma via exerce um efeito hiperalgésico, ao invés de analgésico. Realmente, foi relatado que a administração intradérmica de azul de metileno aboliu a hiperalgesia induzida por bradicinina no modelo de pressão de pata de ratos (Nakamura *et alii*, 1996) enquanto a administração intratecal provocou reversão da hiperalgesia induzida por um doador de NO (Inoue *et alii*, 1997). O papel nociceptivo ou inflamatório da via L-arginina:NO:GMPc

também foi demonstrado por outros autores (Kaplan *et alii*, 1989; Bauer *et alii*, 1995; Salter *et alii*, 1996; Nakamura *et alii*, 1996).

Esta controvérsia nos remete à conclusão que chegou Granados-Soto *et alii* (1997) segundo o qual a explicação para esta controvérsia acerca do efeito pró- ou anti-inflamatório da via L-arginina:NO:GMPc provavelmente depende do estímulo nociceptivo e do tipo de neurônios sensoriais envolvidos, necessitando ainda maior investigação.

também foi demonstrado por outros autores (Kaplan *et alii*, 1989; Bauer *et alii*, 1995; Salter *et alii*, 1996; Nakamura *et alii*, 1996).

Esta controvérsia nos remete à conclusão que chegou Granados-Soto *et alii* (1997) segundo o qual a explicação para esta controvérsia acerca do efeito pró- ou anti-inflamatório da via L-arginina:NO:GMPc provavelmente depende do estímulo nociceptivo e do tipo de neurônios sensoriais envolvidos, necessitando ainda maior investigação.

Conclusões

5.0. CONCLUSÕES

1. Na artrite experimental induzida por zymosan o óxido nítrico participa:

- a) da incapacitação articular e,
- b) da migração de leucócitos para o foco inflamatório.

2. O efeito analgésico dos inibidores de óxido nítrico sobre a incapacitação articular parece envolver opióides endógenos.

3. O efeito hiperalgésico de óxido nítrico neste modelo parece envolver o sistema L-arginina:NO:GMPc.

4. O efeito dos inibidores de óxido nítrico sobre a incapacitação articular e a migração de leucócitos independe da ação anti-edematogênia destas substâncias, pelo menos na terceira hora de artrite por zymosan.

5. Os nossos resultados reiteram a participação do óxido nítrico na resposta inflamatória articular e reforçam a sensibilidade deste modelo experimental para estudo da dor inflamatória articular e migração celular.

Bibliografia

VI. BIBLIOGRAFIA

AJUEBOR, M.N.; VIRÁG, L.; FLOWER, R.J. PERRETTI, M. e SZABO, C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. **Immunology**, **95**: 625-30, 1998.

AKIMITSU, T.; GUTE, D.C. e KORTHUIS, R.J. Leukocyte adhesion induced by inhibition of nitric oxide production in skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.**, **78**: 1725-32, 1995.

ANDERSON, R.; GLOVER, A.; KOORNHOF, H.J. e RABSON, A.R. *In vitro* stimulation of neutrophil motility by levamisole: maintenance of cGMP levels in chemotactically stimulated levamisole-treated neutrophils. **The Journal of Immunology**, **117(2)**: 428-32, 1976.

ATTAL, N.; KAYSER, V.; ESCHALIER, A.; BENOIST, J.M. e GUILBAUD, G. Behavioural and electrophysiological evidence for an analgesic effect of a non-steroidal anti-inflammatory agent, sodium diclofenac. **Pain**, **35**: 341-8, 1988.

BAUER, M.B.; MURPHY, S. e GEBHART, G.F. Stimulation of cyclic GMP production via a nitrosyl factor in sensory neuronal cultures by algescic or inflammatory agents. **J. Neurochem.**, **65(1)**: 363-72, 1995.

- BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN J.; MARSHALL, P.A. e FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. USA**, **87(4)**: 162-4. 1990.
- BESSON, J.M. e CHAOUCH, A. peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Reviews**, **67(1)**: 67-186. 1987.
- BOUGHTON-SMITH, N.K. e GHELANI, A. Role of induced nitric oxide synthase and increased NO levels in zymosan peritonitis in the rat. **Inflammation Res. Supplement**. (2): S149-S150, 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, 1982. Tese. Universidade Autônoma del México.
- CANNON, G.W.; OPENSHAW, S.J.; HIBBS, J.B.; HOIDAL, J.R.; HUECKSTEADT, T.P. e GRIFFITHS, M.M. Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, **39(10)**: 1677-84, 1996.
- CLANCY, R.M.; AMIN, A.R. e ABRAMSON, S.B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. **Arthritis & Rheumatism**, **41(7)**: 1141-51, 1998.

- CODERRE, T.J.; WALL, P.D. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative model of arthritis to that produced by Freud's adjuvant. **Pain**, **28(3)**: 379-93, 1987.
- CODERRE, T.J.; KATZ, J.; VACCARINO, A.L. e MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, **52**: 259-85, 1993.
- COHEN, R.H. e PERL, E.R. Contributions of arachidonic acid derivatives and substance P to the sensitization of cutaneous nociceptors. **J. Neurophysiol.**, **64(2)**: 457-64, 1990.
- COMERFORD, F.R. e ETWEBI, A.B. Zymosan arthritis: a model of inflammatory erosive joint disease. **Annals of the Rheumatic Diseases**, **54(6)**: 527-8, 1995.
- CONNOR, J.R.; MANNING, P.T.; SETTLE, S.L.; MOORE, W.M.; JEROME, G.M.; WEBBER, R.K.; TJONG, F.S. e CURRIE, M.G. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. **European Journal of Pharmacology**, **273**: 15-24, 1995.
- CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; CALAPAI, G.; NAVA, F. e CAPUTI, A.P. Zymosan-activated plasma induces paw oedema by nitric oxide and prostaglandin production. **Life Sciences**, **60(3)**: 215-20, 1997.

- de BRUM-FERNANDES, A.J.; de FALCO, V.; ROCHA, F.A. e JANCAR, S. Paradoxical effect of dexametasone: administration to rabbits with antigen-induced arthritis. **Inflammapharmacol.**, **213**:63-70, 1992.
- de MELLO, S.B.; NOVAES, G.S.; LAURINDO, I.M.; MUSCARA, M.N.; MACIEL, F.M. e COSSERMELLI, W. Nitric oxide synthase inhibitor influences prostaglandin and interleukin-1 production in experimental arthritic joints. **Inflamm. Res.**, **46(2)**:72-7, 1997.
- di ROSA, M.; RADOMSKI, R. CARNUCCIO, R. & MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, **172(3)**: 1246-52, 1990.
- DUARTE, I. G.; LORENZETTI, B.B. e FERREIRA, S.H. Acetylcholine induces peripheral analgesia by the release of nitric oxide. In: **Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system**. S. Moncada e E.A.Higgs, ed. 165-71, 1990a.
- DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B. e FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, **186**: 289-93, 1990b.
- DUARTE, I.D.G.; dos SANTOS, I.R.; LORENZETTI, B.B. e FERREIRA, S.H.; Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, **217**: 225-27, 1992.

DUARTE, I.D.G. e FERREIRA, S.H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, **221(1)**: 171-4, 1992.

FAIRES, J.S. & McCARTY Jr., D.J. Acute arthritis in man and dog after intrasynovial injection of sodium urate crystals. **The Lancet**, **6**: 682-5, 1962.

FARRELL, A.J.; BLAKE, D.R.; PALMER, R.M. e 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.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B. e CORRÊA, F.M.A. Central and peripheral antialgic action of aspirin-like drugs. **European Journal of Pharmacology**, **53**: 39-48, 1978.

FERREIRA, S.H. e NAKAMURA, M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandin**, **18(2)**: 179-90, 1979a.

FERREIRA, S.H. e NAKAMURA, M. II – Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioids antagonists. **Prostaglandins**, **18(2)**: 191-200, 1979b.

FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D. e LORENZETTI, B.B. Molecular base of acetylcholine and morphine analgesia. **Agents Actions Suppl.**, **32**:101-6, 1991.

FERREIRA, S.H. **Analgesia com óxido nítrico y analgésicos**. IN: Berrazueta, J.M., ed. **Óxido nítrico endógeno y fármacos nitrovasodilatadores**, 1^a ed., Universidad de Cantabria, Barcelona, 149-62, 1994.

FERREIRA, H.A.; MEDEIROS, M.V.; LIMAS, C.S.P.; FLORES, C.A.; SANNOMIYA, P.; ANTUNES, E. e de NUCCI, G. Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. **European Journal of Pharmacology**, **310**: 201-7, 1996.

FERREIRA, H.H.Á.; BEVILACQUA, E.; GAGIOTI, S.M.; de LUCA, I.M.S.; ZANARDO, R.C.O.; TEIXEIRA, C.E.; SANNOMIYA, P.; ANTUNES E. e de NUCCI, G. Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. **European Journal of Pharmacology**, **358**: 253-59, 1998.

FERRENDELLI, J.A.; STEINER, A.L.; MCDUGAL, D.B. e KIPNIS, D.M. The effect of oxotremorine and atropine on cGMP and cAMP levels in mouse cerebral cortex and cerebellum. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **41(4)**: 1061-7, 1970.

FIDECKA, S. e LALEWICZ, S. Studies on the antinociceptive effects of sodium nitroprusside and moldosine in mice. **Pol. J. Pharmacol.**, **49(6)**: 395-400, 1997.

FIERRO, I.M.; BARJA-FIDALGO, C.; CANEDO, R.M.; CUNHA, F.Q. e FERREIRA, S.H. An increased in nitric oxide produced by rat peritoneal neutrophils is not involved in cells apoptosis. **Mediators of Inflammation**, **4**: 222-8, 1995.

FURCHGOTT, R.F. e ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, **288**: 373-6, 1980.

FURCHGOTT, R.F. Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. **Circulation Research**, **53(5)**: 557-73, 1983.

FURCHGOTT, R.F. Studies on relation of rabbit aorta by sodium nitrite: basis for proposal that the acid-activable component of inhibitory factor from retrator penis is inorganic nitrite and EDRF is nitric oxide. IN: VANHOUTTE, P.M. **Mechanisms of vasodilation**. New York, Raven Press, 1988. p. 401-14.

GALLIN, J.I.; SANDLER, J.A.; CLYMAN, R.I.; MANGANIELLO, V.C. e VAUGHAN, M. Agents that increase cyclic AMP inhibit accumulation of cGMP and depress human monocyte locomotion. **The Journal of Immunology**, **120**: 492-9, 1978.

- GARTHWAITE, J.; GARTHWAITE, G.; PALMER, R.M.J. e MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **European Journal of Pharmacology**, **172**: 413-6, 1989.
- GEGOUT, P.; GILLET, P.; TERLAIN, B. e NETTER, P. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life Sciences**, **56(20)**: 389-94, 1995.
- GEORGE, W.J.; POLSON, J.B.; O'TOOLE, A.G. e GOLDBERG, N.D. Elevation of guanosine 3',5'-cyclic phosphate in rat heart after perfusion with acetylcholine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **66(2)**: 398-403, 1970.
- GIBSON, A.; BABBEDGE, R.; BRAVE, S.R.; HART, S.L.; HOBBS, A.J.; TUCKER, J.F.; WALLACE, P e MOORE, P.K. An investigation of some S-nitrosothiols, and of hydroxyl-arginine, on the mouse anococcygeus. **Br. J. Pharmacol.**, **107**: 715-21, 1992.
- GRABOWSKY, P.S.; ENGLAND, A.J.; DYKHUIZEN, R. COPLAND, M.; BENJAMIN, N.; REID, D.M.; e RALSTON, S.T. Elevated nitric oxide production in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, **39(4)**: 643-7, 1996.

- GRANADOS-SOTO, V.; RUFINO, M.O.; LOPES, L.D.G. e FERREIRA, S.H. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, **340**: 177-80, 1997.
- GRIFFITHS, R.J.; LI, S.W.; WOOD, B.E. e BLACKHAM, A. A comparison of the anti-inflammatory activity of selective 5-lipoxygenase inhibitors with dexamethasone and colchicine in a model of zymosan induced inflammation in the rat knee-joint and peritoneal cavity. **Agents and Actions** **32(3-4)**: 312-20, 1991.
- GRIFFITHS, M.J.D.; MESSENT, M.; MacALLISTER, R.J. e EVANS, T.W. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase, **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 963-8, 1993.
- GRIGG, P.; SCHAIBLE, H.G. e SCHMIDT, 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.
- GRYGLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M. e MONCADA, S. Superoxide anions is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, **320(6061)**: 454-6, 1986.
- GUYTON, A. e HALL, J.E. **Textbook of Medical Physiology**. 9^a ed. USA, McGraw-Hill, 1996, 1148p.

- HÄBLER, H.J.; JANIG, W. e KOLTZENBURG, M. Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the bladder in the cat. **J. Physiol.**, **425**: 545-62, 1990.
- HANDY, R.L. e MOORE, P.K. Effects of selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia. **Neuropharmacology**, **37(1)**: 37-43, 1998.
- HARGREAVES, H.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C. e JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, **32**: 77-88, 1988.
- HARRIS, E. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. **The New England Journal of Medicine**, **322(18)**: 1277-89, 1990.
- HEINZEL, B.; JONH, M.; BOHME, E. e MAYER, B. Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. **Biochem. J.**, **281(Pt 3)**: 627-30. 1992.
- HEPPELMANN, B. e PAWLAK, M. Sensitisation of articular afferents in normal and inflammed knee joint by substance P in the rat. **Neurosci. Lett.**, **223(2)**: 97-100, 1997.

- HÄBLER, H.J.; JANIG, W. e KOLTZENBURG, M. Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the bladder in the cat. **J. Physiol.**, **425**: 545-62, 1990.
- HANDY, R.L. e MOORE, P.K. Effects of selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia. **Neuropharmacology**, **37(1)**: 37-43, 1998.
- HARGREAVES, H.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C. e JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, **32**: 77-88, 1988.
- HARRIS, E. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. **The New England Journal of Medicine**, **322(18)**: 1277-89, 1990.
- HEINZEL, B.; JONH, M.; BOHME, E. e MAYER, B. Ca^{2+} /calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. **Biochem. J.**, **281(Pt 3)**: 627-30. 1992.
- HEPPELMANN, B. e PAWLAK, M. Sensitisation of articular afferents in normal and inflammed knee joint by substance P in the rat. **Neurosci. Lett.**, **223(2)**: 97-100, 1997.

HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R. e VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, **235(4748)**: 473-6, 1987.

HILLIQUIN, P.; BORDERIE, D.; HERNVANN, A.; MENKÈS, C.J. e EKINDJIAN, O.G. Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid disease. **Arthritis & Rheumatism**, **40(8)**: 1512-17, 1997.

HOUSER, V.P. Modulation of the aversive qualities of shock through a central inhibitory cholinergic system in the rat. **Pharmacol. Biochem Behav.**, **4(5)**: 561-8, 1976.

HUGHES, S.R.; WILLIAMS, T.J. e BRAIN, S.D. Evidence that endogenous nitric oxide modulates oedema formation induced by substance P. **European Journal of Pharmacology**, **191**: 481-83, 1990.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MONCADA, S. e di ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **European Journal of Pharmacology**, **211**: 177-82, 1992.

IALENTI, A.; MONCADA, S. e Di ROSA, M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. **British Journal of Pharmacology**, **110**: 701-6, 1993.

IGNARRO, L.J.; BYRNS, R.E. e WOOD, K.S. Biochemical and pharmacological properties of EDRF and its similarity to nitric oxide radical. IN: VANHOUTTE, P.M. **Mechanisms of vasodilation**. New York, Raven Press, 1988a.

IGNARRO, L.J.; BYRNS, R.E.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S. e CHAUDHURI, G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **244(1)**: 181-9, 1988b.

IGNARRO, L.J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. **Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.**, **30**: 535-60, 1990.

INOUE, T.; MASHIMO, T.; SHIBUTA, S. e YOSHIYA, I. 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.

INOUE, T.; MASHIMO, T.; SHIBATA, M.; SHIBUTA, S. e YOSHIYA, I. Rapid development of nitric oxide-induced hyperalgesia depends on an alternate to the cGMP-mediated pathway in the rat neuropathic pain model. **Brain Research**, **792**: 263-70, 1998.

- JULOU-SCHAEFFER, G.; GRAY, G.A.; FLEMING, I.; SCHOTT, C.; PARRATT, J.R. e STOCLET, J.C. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. **Am. J. Physiol.**, **259(4 Pt 2)**: H1038-43, 1990.
- KANNER, J.; HARREL, S. e GRANIT, R. Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. **Lipids**, **27(1)**:46-9, 1992.
- KAPLAN, S.S.; BILLIAR, T.R.; CURAN, R.D.; ZDZIARSKI, V.E.; SIMMONS, R.L. e BASFORD, R.E. Inhibition of chemotaxis with Ng-monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. **Blood**, **74(6)**: 1885-7, 1989.
- KELM, M. e SCHRADER, J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. **Circ. Res.**, **66(6)**: 1561-75, 1990.
- KERR, F.W.L. e WILSON, P.R. Pain. **Ann. Rev. Neurosci.**, **1**: 83-102, 1978.
- KUBES, P.; SUZUKI, M. e GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 4651-55, 1991.
- LARSEN, J.J. e ARNT, J. Reduction in locomotor activity of arthritic rats as parameter for chronic pain: effect of morphine, acetylsalicylic acid and citalopram. **Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)**, **57(5)**: 345-51, 1985.

LASZLO, F.; EVANS, S.M. e WHITTLE, B.J.R. Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature in vivo. **European Journal of Pharmacology**, **272**:169-75, 1995.

LAWAND, N.B.; WILLIS, W.D. e WESTLUND, K.N. Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide inhibitor. **Neuroreport**, **8(4)**: 895-9, 1997.

LINDEN, D.R. e SEYBOLD, V.S. Spinal neurokinin₃ receptors mediate thermal but not mechanical hyperalgesia via nitric oxide. **Pain**, **80**: 309-17, 1999a.

LINDEN, R.D.; JIA, Y.P. e SEYBOLD, V.S. Spinal neurokinin₃ receptors facilitate the nociceptive flexor reflex via a pathway involving nitric oxide. **Pain**, **80**: 301-8, 1999b.

MA, X.L.; WEYRICH, A.S.; LEFER, D.J. e LEFER, A.M. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. **Circ. Res.**, **72**: 403-12, 1993.

MACHELSKA, H.; LABUZ, D.; PRZEWLOCKI, R. e PRZEWLOCKA, B. Inhibition of nitric oxide synthase enhances antinociception mediated by mu, delta and kappa opioid receptors in acute and prolonged pain in the rat spinal cord. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **282(2)**: 977-84, 1997.

MacINTYRE, I.; ZAIDI, M.; ALAM, A.S.M.T.; DATTA, H.K.; MOONGA, B.S.; LIDBURY, P.S.; HECKER, M. e VANE, J.R. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 2936-40, 1991.

MAGALHÃES, J.F.G.; VIANA, C.F.G.; ARAGÃO Jr., A.G.M.; MORAES, V.G.; RIBEIRO, R.A. e VALE, M.R. Analgesic and antiinflammatory activities of *Ageratum conyzoides* in rats. **Phytotherapy Research**, **11**: 183-8, 1997.

MAGGI, C.A.; PATACCHINI, R.; MEINI, S. e GIULIANI, S. Nitric oxide is the mediator of tachykinin NK3 receptor-induced relaxation in the circular muscle of the guinea-pig ileum. **Eur. J. Pharmacol.**, **240(1)**: 45-50, 1993.

MARTIN, W.; VILLANI, G.M., DESINGARO, J. e FURCHGOTT, R.F. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. **The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics**, **232(3)**: 708-16, 1985

McCARTNEY-FRANCIS, N.; ALLEN, J.B.; MIZEL, D.E.; ALBINA, J.E.; XIE, Q-W.; NATHAN, C.F. e WAHL, S.M. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. **The Journal of Experimental Medicine**, **178**: 749-54, 1993.

McCARTNEY-FRANCIS, N.L.; SONG, X.Y.; MIZEL, D.E.; WAHL, C.L. e WAHL, S.M. Hemoglobin protects from streptococcal cell wall-induced arthritis. **Arthritis & Rheum.**, **42(6)**: 1119-27, 1999.

McINNES, I.B.; LEUNG, B.P.; FIELD, M.; WEI, X.Q.; HUANG, F.P.; STURROCK, R.D.; KINNINMONTH, A.; WEIDNER, J.; MUNFORD, R. e 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.B.; LEWIN, G.R. e WALL, P.D. Central hyperexcitability triggered by noxious inputs. **Curr. Opin. Neurobiol.**, **3(4)**: 602-10, 1993.

MENEZES-de-LIMA, Jr.; O.; WERNECK-BARROSO, E.; CORDEIRO, R.S. e CORDEIRO, M.G. Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin in mouse pleurisy. **J. Leukoc. Biol.**, **62(6)**: 778-85, 1997.

MEYER, R.A. e CAMPBELL, J.N. A novel electrophysiological technique for locating cutaneous nociceptive and chemospecific receptors. **Brain Res.**, **441(1-2)**: 81-6, 1988

MISKO, T.P.; MOORE, W.M.; KASTEN, T.P.; NICKOLS, G.A.; CORBETT, J.A.; TILTON, R.G.; McDANIEL, M.L.; WILLIAMSON, J.R. e CURRIE, M. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. **European Journal of Pharmacology**, **233**: 119-25, 1993.

MIYASAKA, N. e HIRATA, Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. **Life Sciences**, **61(21)**: 2073-81, 1997.

MOHAUPT, M.G; ELZIE, J.L.; AHN, K.Y.; CLAPP, W.L.; WILCOX, C.S. e KONE, B. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. **Kidney International**, **46**: 653-65, 1994.

MONCADA, S.; PALMER, R.M. & GRYGLEWSKI, R.J. Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **83(23)**: 9164-8, 1986.

MONCADA, S e PALMER, R.M.J. The L-arginine:nitric oxide pathway in the vessel wall. IN: MONCADA, S. e HIGGS, E.A. **Nitric oxide from L-arginina: a bioregulatory system**. London, Elsevier Science Publishers, 1990, p. 19-33.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J. e HIGGS, A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, **43(2)**: 109-41, 1991.

MONCADA, S. e HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, **329(27)**: 2002-12, 1993.

MONCADA, S.; HIGGS, A. e FURCHGOTT, R. XIV Internacional Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacological Reviews**, **49(2)**:137-42, 1997.

MOORE, P.K.; OLUYOMI, R.C.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P. e HART, S.L. L-N^G-nitro-arginine-methyl-ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, **102**: 198-202, 1991.

MOULTON, P.J. Inflammatory joint disease: the role of cytokines, cyclooxygenases and reactive oxygen species. **British Journal of Biomedical Science**, **53**: 317-24, 1996.

MURAD, F.; MITTAL, C.K. ARNOLD, W.P.; KATSUKI, S. e KIMURA, H. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. **Adv. Cyclic Nucleotides Res.**, **9**: 145-58, 1978.

NAKAMURA, M. **Estudo do efeito periférico de neurotransmissores e íons na resposta a estimulação nociva na cobaia acordada.** Ribeirão Preto, 1984, 133p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

NAKAMURA, A.; FUJITA, M. e SHIOMI, H. Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, **117(3)**: 407-12, 1996.

NEUGEBAUER, V.; RUMENAPP, P. e SCHAIBLE, H.G. Calcitonin gene-related peptide is involved in the spinal processing of mechanosensory input from the rat's knee joint and in the generation and maintenance of hyperexcitability of dorsal horn-neurons during development of acute inflammation. **Neuroscience**, **71(4)**: 1095-109, 1996.

NIU, X.F.; SMITH, C.W. e KUBES, P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. **Circ. Res.**, **74**: 1133-40, 1994.

OLIVEIRA, K.R.B.; ARAGÃO Jr., A.G.M.; OLIVEIRA, R.C.; PAIVA, I.; RAMOS, A.M.; JERÔNIMO, S.M.B e ROCHA, F.A.C. Degradação da cartilagem articular na artrite induzida por zymosan (zy). **FESBE**, 201, 1997.

OTTERNESS, I.G.; MILICI, A.J. e BLIVENM M.L. Some factors affecting inhibition and restoration of mobility after induction of an acute arthritis in the hamster. **Agents and Actions**, **40**: 224-7, 1993.

- PALMER, R.M. e MONCADA, S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **158(1)**:348-52, 1989.
- PARDO, E.G. e RODRIGUES, R. Reversal by acetylsalicylic acid of pain induced functional impairment. **Life Sciences**, **5**: 775-81, 1966.
- PAYNE, A.N. de NUCCI, G. e PETTIPHER, E.R. Experimental models of pulmonary and joint inflammation and their relevance to man. **IN: Eicosanoids in inflammatory conditions**, 190-215, 1989.
- PEDIGO, N.W.; DEWEY, W.L. e HARRIS, L.S. Determination and characterization of the antinociceptive activity of intraventricularly administered acetylcholine in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **193(3)**: 845-52, 1975.
- PETTIPHER, E.R. e SALTER, E.D. Resident joint tissues, rather than infiltrating neutrophils and monocytes, are the predominant sources of TNF-alfa in zymosan arthritis. **Cytokine**, **8(2)**: 130:3, 1996.
- PRADELLES, P.; GRASSI, J. e MACLOUF, J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. **Anal. Chem.**, **57(7)**: 1170-3. 1985.

RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M. e MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. USA**, **87(24)**: 10043-7, 1990.

RAJFER, J.; ARONSON, W.J.; BUSH, P.A.; DOREY, F.J. e IGNARRO, L.J. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. **The New England Journal of Medicine**, **326(2)**: 90-4, 1992.

RANDALL, L.O. e 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. e DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. **British Medical Bulletin**, **47(3)**: 534-48, 1991.

RANG, H.P.; DALE, M.M. e RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3^a edição. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1997, 692p.

RAO, T.S.; CURRIE, J.L.; SHAFTER, A.F. e ISAKSON, P.C. *In vivo* characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **269(3)**: 917-25, 1994.

RATES, S.M.K. e BARROS, H.M.T. Modelos animais para avaliação da dor: métodos para triagem de novos analgésicos. **Rev. Bras. Farm.**, **75(2)**: 31-4, 1994.

REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; SCHULZ, R.; HODSON, H.F. e MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.**, **101**:746-52, 1990.

RIDGER, V.C.; PETTIPHER, E.R.; BRYANT, C.E. e BRAIN, S.D. Effect of the inducible nitric oxide synthase inhibitors aminoguanidine and L-N⁶-(1-iminoethyl)lisine on zymosan-induced plasma extravasation in rat skin. **The Journal of Immunology**, **159**: 383-90, 1997a.

ROCHA, F.A.C.; CAMBRIDGE, H.; OLIVEIRA, M.A.; BRAIN, S.D. e FORTES, Z.B. The effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on blood flow in the rabbit synovium measured by laser-Doppler flowmetry. **Journal of Physiology**: **475P**, 1994.

ROCHA, F.A.C.; ANDRADE, L.E.C. e JANCAR, S. Immune complex induced arthritis in rats: role of lipid mediators on cell infiltration, **Mediators of Inflammation**, **5**: 104-9, 1996.

ROCHA, F.A.C.; ARAGÃO Jr.; A.G.M.; de OLIVEIRA, R.C.; VALE, M.R. e RIBEIRO, R.A. Periarthritis promotes articular incapacitation in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflammation Research**, IN PRESS.

RUBANYI, G.M. e VANHOUTTE, P.M. Superoxide anions and hyperoxia inactive endothelium-derived relaxing factor. **Am. J. Physiol.**, **250(5 Pt 2)**: H822-7, 1986.

SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C. TAN-NO, K.; YONEZAWA, A.; SAKURADA, S. e KISARA, K. Effect of spinal nitric oxide inhibition on capsaicin-induced nociceptive response. **Life Sciences**, **59(11)**: 921-30, 1996.

SALTER, M.; STRIJBOS, P.J.; NEALE, S.; DUFFY, C.; FOLLEFANT, R.L. e GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMP pathway is required for nociceptive signalling at specific loci within the somatosensory pathway. **Neuroscience**, **73(3)**: 649-55, 1996.

SALVEMINI, D.; MISKO, T.P.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M.G. e NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activate cyclooxygenase enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: 7140-4, 1993.

SALVEMINI, D.; MANNING, P.T.; ZWEIFEL, B.S.; SEIBERT, K.; CONNOR, J.; CURRIE, M.G.; NEEDLEMAN, P. e MASFERRER, J.L. Dual inhibition of nitric oxide and prostaglandin production contributes to the antiinflammatory properties of nitric oxide synthase inhibitors. **J. Clin. Inves.**, **96**: 301-8, 1995a.

SALVEMINI, D.; SETTLE, S.L.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M. e NEEDLEMAN, P. Regulation of prostaglandin by nitric oxide; an *in vivo* analysis. **British Journal of Pharmacology**, **114**: 1171-8, 1995b.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.Q.; BOURDON, D.M.; STERN, M.K.; CURRIE, M.G. e MANNING, P.T. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. **European Journal of Pharmacology**, **303**: 217-20, 1996a.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.Q.; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINO, M.H.; MANNING, P.T. e CURRIE, M.G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, **118(4)**: 829-38, 1996b.

SANDLER, J.A.; GALLIN, J.I. e VAUGHAN, M. Effects of serotonin, carbamylcholine and ascorbic acid on leukocyte cyclic GMP and chemotaxis, **J. Cell Bio.**, **67(2PT.1)**: 480-4, 1975.

SCHAIBLE, H.G. e GRUBB, B.D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. **Pain**, **55**: 5-54, 1993.

SCHAIBLE, H.G. e SCHMIDT, R.F. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. **J. Neurophysiol.**, **60(6)**: 2180-95, 1988.

SCHINI, V.B. e VANHOUTTE, P.M. L-arginine evokes both endothelium-dependent and -independent relaxations in L-arginine-depleted aorta of the rat. **Circ. Res.**, **68(1)**: 209-16, 1991.

SEKI, N.; SUDO, Y.; YOSHIOKA, T.; SUGIHARA, S.; FUJITSU, T.; SAKUMA, S.; OGAWA, T.; HAMAOKA, T.; SENOH, H. e FUJIWARA, H. Type II collagen-induced murine arthritis. I. Induction and perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity. **The Journal of Immunology**, **140(5)**: 1477-84, 1988.

SIEGMUND, E.; CAMUS, R. e LU, G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Biol. Med.**, **95**: 729-31, 1957.

SHAFFER, J.E.; HAN, B.J.; CHERN, W.H. e LEE, F.W. Lack of tolerance to a 24-hour of S-nitroso N-acetylpenicillamine (SNAP) in conscious rabbit. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic**, **260(1)**: 286-93, 1992

SNYDER, S. Nitric oxide and neurons. **Current Opinion in Neurobiology**, **2**: 323-7, 1992.

STADLER, J.; STEFANOVIC-RACIC, M.; BILLIAR, T.; CURRAN, R.D.; McINTYRE, L.A.; GEORGESCU, H.I.; SIMMONS, R.L. e EVANS, C.H. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response cytokines and lipopolysaccharide. **The Journal of Immunology**, **147**: 3915-20, 1991.

STEFANOVIC-RACIC, M.; MEYERS, K.; MESCHTER, C.; COFFEY, J.W.; HOFFMAN, R.A. e EVANS, C.H. N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. **Arthritis Rheum.**, **37(7)**: 1062-9, 1994.

STEFANOVIC-RACIC, M.; MEYERS, K.; MESCHTER, C.; COFFEY, J.W.; HOFFMAN, R.A. e EVANS, C.H. Comparison of the nitric oxide synthase inhibitors methylarginine and aminoguanidine as prophylactic and therapeutic agents in rat adjuvant arthritis. **J. Rheumatol.**, **22(10)**: 1922-28, 1995.

STRATMAN, N.C.; FICI, G.J. e SETHY, V.H. U-19451-A: A selective inducible nitric oxide synthase inhibitor. **Life Sciences**, **59(11)**: 945-61, 1996.

SWIERKOSZ, T.A.; MITCHELL, J.A.; WARNER, T. D.; BOTTING, R.M. e VANE, J.R. Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. **British Journal of Pharmacology**, **114**: 1335-42, 1995.

- TEIXEIRA, M.M.; WILLIAMS, T.J. e HELLEWELL, P.G. Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 1515-21, 1993.
- TONUSSI, C.R. e FERREIRA, S.H. Rat knee-joint incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, **48**: 421-7, 1992.
- TONUSSI, C.R. e FERREIRA, S.H. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B₂ receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B₁ receptor-mediated nociception. **European Journal of Pharmacology**, **326**: 61-5, 1997.
- TONUSSI, C.R. e FERREIRA, S.H. Tumour necrosis factor- α mediates carrageenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. **Pain**, **82**: 81-7, 1999.
- TRACEY, W.R.; NAKANE, M.; KUK, J.L.; BUDZIK, G.; KLINGHOFER, V.; HARRIS R. e CARTER, G. The nitric oxide synthase inhibitor, L-N^G-monomethylarginine, reduces carrageenan-induced pleurisy in the rat. **The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics**, **273(3)**: 1295-99, 1995.

van ARMAN, C.G.; CARLSON, R.P.; RISLEY, E.A.; THOMAS, R.H. e NUSS, G.W. Inhibitory effects of indomethacin, aspirin and certain other drugs on inflammations induced in rat and dog by carrageenan, sodium urate and ellagic acid. **The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutic**, **175(2)**: 459-68, 1970.

van de VOORDE, J. e LEUSEN, I. Role of the endothelium in the vasodilator response of rat thoracic aorta to histamine. **Eur. J. Pharmacol.** **87(1)**: 113-20, 1983.

VIANA, C.F.G.; ARAGÃO; A.G.M.; RIBEIRO, R.A.; MAGALHÃES, J.F.G. e VALE, M.R. Effects of *Ageratum conyzoides* in nociception and inflammatory response induced by zymosan. **Fitoterapia**, **LXIX (4)**: 349- 54, 1998.

WOOF, C.J. Generation of acute pain: central mechanism. **British Medical Bulletin**, **47 (3)**: 523-33, 1991.

WRIGHT, C. MULSCH, A. BUSSE, R. e OSSWALD, H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **160(2)**: 813-19, 1989.

YAKSH, T.L.; DIRKSEN, R. e HARTY, G.J. Antinociceptive effects of intrathecally injected cholinomimetic drugs in the rat and cat. **Eur. J. Pharmacol.**, **117(1)**: 81-8, 1985.