

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

VIRGÍNIA CLÁUDIA CARNEIRO GIRÃO

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA MODULAÇÃO
CENTRAL DA HIPERALGESIA NA ARTRITE INDUZIDA POR
ZYMOSAN (AZy) EM RATOS.**

FORTALEZA

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

VIRGÍNIA CLÁUDIA CARNEIRO GIRÃO

PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA MODULAÇÃO
CENTRAL DA HIPERALGESIA NA ARTRITE INDUZIDA POR
ZYMOSAN (AZy) EM RATOS.

Tese submetida à Coordenação do
Curso de Pós-graduação em Farmacologia
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia.

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

FORTALEZA

2006

G433p Girão, Virgínia Cláudia Carneiro

Participação do óxido nítrico (NO) na modulação central da hiperalgesia da artrite induzida por zymosan (Azy) em ratos / Virgínia Cláudia Carneiro Girão. - Fortaleza, 2006.

104p.; il. ;

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro a Rocha

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Artrite 2. Dor. 3. Óxido Nítrico

CDD: 616.722

VIRGÍNIA CLÁUDIA CARNEIRO GIRÃO

PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA MODULAÇÃO
CENTRAL DA HIPERALGESIA DA ARTRITE INDUZIDA POR
ZYMOSAN (AZY) EM RATOS.

Tese submetida à Coordenação do
Curso de Pós-graduação em Farmacologia
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia.

APROVADA COM LOUVOR EM 15/03/2006

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Profa. Dra. Geane Matos de Andrade Cunha
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Maria José Pereira Vilar
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Ao meu irmão Max Weber Saraiva Girão, in memoriam.

Resta-me apenas acostumar com a imensa saudade que sinto de você, mas acredito que sua verdadeira natureza está num reino além dos ciclos do sofrimento, de absoluta pureza e felicidade.

Aos meus pais, Lindalva Saraiva e Valter Girão (in memorian), exemplos de dedicação.

*Aos inúmeros animais que contribuem de forma
imensurável para as descobertas da ciência.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha, pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada pela atenção e confiança em mim depositada e pelos conhecimentos valiosos transmitidos em todos os momentos e que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e científico.

Ao Prof. Dr. William Alves do Prado, Departamento de Farmacologia – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, pela atenção em permitir o treinamento na técnica de administração intratecal em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, Departamento de Farmacologia – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, pela atenciosa contribuição para execução deste trabalho.

A Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner, Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará – Sobral, por ter desbravado comigo parte deste trabalho, com paciência, presteza e dedicação.

Ao Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos, pelo auxílio no início dos experimentos.

À Profa. Dra. Gisela Costa Camarão, por possibilitar a utilização do equipamento para esterotaxia.

Aos membros da banca examinadora pela valiosa contribuição adicionada ao estudo.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, que contribuíram para minha formação científica.

A toda a equipe da Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde, UFC, pela disponibilidade em me auxiliar sempre que necessário, especialmente Maria Dolores Prado Carvalho, Norma de Carvalho Linhares e Rosane Maria Costa.

Aos Técnicos de Laboratório, Departamento de Farmacologia – Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, pela imensurável paciência durante o treinamento da técnica de administração intratecal em seu laboratório.

Aos Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, especialmente a Aura Rhanes Farias Nogueira Yida, Fernando Rodrigues Teixeira, Francisco Antonio Nunes, Irislene Ferreira de Assis e Maria Rosilene Matias Ferreira, pela atenção a mim dispensada.

Aos Colegas de Pós-Graduação pelos momentos de alegria e solidariedade.

Aos Colegas que se tornaram amigos presentes, Ingrid Chaves Cavalcante, Raquel Carvalho, Renata Leitão, Silvia Bonna e Vilma de Lima.

Aos colegas do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias, Ana Karine Rocha de Melo Leite, Luciana Brandão Paim, Francisco Saraiva Silva Júnior e Rondinele Ribeiro de Castro, pelos momentos de convívio e aprendizado.

Agradeço, especialmente, aos próximos doutores Ana Caroline Rocha de Melo Leite, Raimundo Palheta Júnior, Roberto César Pereira Lima Júnior e Carlos Tiago Moura, pois, nos momentos de desespero dos experimentos, vocês souberam me auxiliar com atenção e carinho.

Aos Alunos de Iniciação Científica pelo auxílio na execução dos experimentos, Aline Pinho Carvalho, Denis Colares Siqueira de Oliveira, Isabele de Sá Silveira Melo, Larissa Teles, Márcio Xenofonte, Maria da Glória Carneiro Menezes, Maria Marcela Fernandes Monteiro, Marcus Paulo Fernandes Amarante e Patrícia Maria Miranda Gadelha.

Ao estagiário do Programa Interação Ciência e Educação - Busca de Jovens Talentosos da Seara da Ciência, Anaésio Carvalho Clementino, pela valiosa contribuição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes, pela bolsa concedida durante a realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

A todos que fazem parte do Biotério Central e do Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará pela colaboração, disponibilizando os animais para os experimentos.

Ao meu marido, Humberto Carmona, não só pela paciência e zelo com que confeccionou a roda e o software para incapacitação articular e ajuda na preparação gráfica que faz parte desta tese, mas principalmente por ter abraçado a causa deste trabalho, estando ao meu lado em todos os momentos, incentivando-me e me cobrando atenção focada.

À minha família, pelo carinho, apoio e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus amigos da Universidade Estadual do Ceará, Adriana Wanderley de Pinho Pessoa, Adriana de Queiroz Pinheiro, Célia Maria de Souza Sampaio, Cláudio Cabral Campello, Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro, Jackson Coelho Sampaio, Tereza Neuma de Albuquerque Gomes, Verônica de Moraes Campello, o incentivo sempre constante foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos Ana Beatriz Felismino, Andréa Leite, Denise Raymundo, Isaac Brito, Roberta Brandão, Virna Sales, Welma Vieira e Wanderléia Gomes, sei que minha alegria também é de vocês.

Aos Animais, motivo de minha curiosidade científica, especialmente aos ratos de laboratório que tanto contribuem para o desenvolvimento da ciência.

E agradeço, especialmente, a energia de viver que existe em cada um de nós e nos permeia! Independe do nome a ela atribuído, o que importa é o amor!

*Lembre-se que não obter aquilo que você quer
é algumas vezes uma sorte muito grande.*

XIV Dalai Lama

RESUMO

PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA MODULAÇÃO CENTRAL DA HIPERALGESIA NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN (AZy) EM RATOS.

Orientanda: Virgínia Cláudia Carneiro Girão

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Nesse trabalho, investigamos a participação do sistema nervoso central (SNC) na modulação da dor inflamatória periférica na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos. Coletou-se o líquido (LCR) e lavado articular dos animais em diferentes tempos de artrite (1, 3, 6, 12 e 24 horas) para a determinação dos níveis de nitrito. Em seguida, diferentes grupos de ratos (n=6) machos, Wistar, pesando entre 250-300g, foram submetidos ao procedimento cirúrgico para colocação de uma cânula no espaço subaracnóideo, para permitir a administração intratecal (i.t) de substâncias. Os animais foram também submetidos à artrite induzida por zymosan (AZy) seguida da realização do teste de suspensão da pata (TSP) para permitir a avaliação da incapacitação articular (IA), refletindo a hiperalgisia no modelo. A modulação farmacológica foi realizada através da administração i.t, de forma profilática ou terapêutica, de um doador de NO (SIN-1), de inibidores de NOS (L-NAME, 1400W), de um inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ), de um análogo do GMPc (8-Bromo-GMPc) e de um antagonista dos receptores NMDA (MK-801). Em um grupo, o ODQ foi também administrado por via i.a. Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m., seguida de ANOVA e Teste de Tukey, comparando-se aos grupos que receberam o veículo. Os níveis de nitrito no LCR foram menores à 1 e 3 h após a injeção do zymosan, em relação aos valores basais ($P < 0,05$). O procedimento cirúrgico não alterou a hiperalgisia. SIN-1 i.t (10 μ g) reduziu a IA, mas 40 μ g de SIN-1 aumentaram a IA ($P < 0,05$). L-NAME ou 1400W, de forma profilática ou terapêutica, reduziram a IA ($P < 0,05$). ODQ i.t, profilático, mas não terapêutico, reduziu a IA da AZy e também reverteu a IA promovida por 40 μ g de SIN-1. Ainda, ODQ, intra-articular, reverteu a IA promovida por 40 μ g de SIN-1, i.t., MK-801 i.t inibiu a IA tanto da AZy quanto de 40 μ g de SIN-1. Os resultados sugerem um papel antinociceptivo endógeno central do NO na hiperalgisia articular aguda da AZy. O NO, a depender da dose e do local de ação, pode ter efeito pró ou anti-nociceptivo, por ativação de GMPc e excitação de receptores NMDA. De forma inédita, demonstramos a existência de uma via de ativação periférico-central modulando a hiperalgisia articular na fase aguda da AZy.

ABSTRACT**NITRIC OXIDE (NO) PARTICIPATION IN CENTRAL HYPERALGESIA
MODULATION IN THE ZYMOBAN INDUCED ARTHRITIS (AZy) IN RATS.****Student: Virgínia Cláudia Carneiro Girão****Supervisor: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha**

We investigate in this work the role of the central nervous system in the modulation of the inflammatory peripheral pain in the zymosan induced arthritis (AZy) in rats. Cerebrospinal fluid (CSF) and sinovial fluid were collected from animals at different AZy times (1, 3, 6, 12 and 14 hours) in order to determine the nitrite level. Different groups of male, Wistar rats (n=6), 250 to 300g weight, were then submitted to surgery in order to place a cannula in the subarachnoid space, to allow for intrathecal (i.t) insertion of substances. The animals were also submitted to AZy followed by the paw suspension test (PST) that measures articular incapacitation (AI), aiming to analyze hyperalgesia in this experimental model. The pharmacological modulation was achieved by the prophylactic or therapeutic i.t administration of a NO donor (SIN-1), NOS inhibitors (L-NAME, 1400W), a soluble Guanylate cyclase inhibitor (ODQ), a GMPc analogue (8-Bromo-GMPc) and an NMDA receptor antagonist (MK-801). The ODQ was also administered intraarticular to one group of animals. The results are expressed as mean \pm s.e.m, followed by ANOVA and the Tukey test, comparing to the groups that received the vehicle. The levels of nitrite in the CSF were smaller at 1 and 3 hours after zymosan injection, as compared with basal levels ($P < 0.05$). The surgical procedure did not alter hyperalgesia. SIN-1 i.t (10 μ g) reduced the AI, while 40 μ g increased the AI ($P < 0.05$). L-NAME or 1400W, prophylactic or therapeutic, reduced the AI ($P < 0.05$). ODQ i.t, prophylactic, but not therapeutic, reduced the AI, and also reverted the AI promoted by the 40 μ g of SIN-1. Besides, ODQ, intraarticular, reverted the AI promoted by the 40 μ g of SIN-1, administered i.t. MK-801 i.t inhibited the AI, both caused by AZy and by the 40 μ g of SIN-1. The results suggest a central endogenous anti-nociceptive role of NO in the acute articular hyperalgesia of the AZy. The NO, depending on the dose and local where it acts, may present an anti-nociceptive or pro-nociceptive effect in the AZy, both due to the activation of GMPc and the excitation of NMDA receptors. We have shown, for the first time, the existence of a peripheral-central activation way modulating the articular hyperalgesia in the AZy acute phase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama da teoria do controle do portão dos mecanismos da dor.	36
Figura 2 -	Regulação da guanilato ciclase solúvel no músculo liso pelo NO.	41
Figura 3 -	Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no estudo.	53
Figura 4 -	Esquema ilustrativo do sítio de inserção da agulha no espaço intratecal.	54
Figura 5 -	Fotografia do sistema utilizado para o teste de incapacitação articular.	55
Figura 6 -	TSP de ratos submetidos à AZy e à cirurgia para canulação intratecal.	60
Figura 7 -	Níveis de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ no líquido de ratos submetidos à AZy.	61
Figura 8 -	Níveis de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ no lavado articular de ratos submetidos à AZy.	62
Figura 9 -	Cinética do TSP de ratos submetidos à AZy.	63
Figura 10 -	TSP de ratos submetidos à AZy e tratados com SIN-1 (i.t).	64
Figura 11 -	TSP de ratos submetidos à AZy e tratados com inibidores da NOS (i.t).	65
Figura 12 -	TSP de ratos submetidos à AZy e tratados com inibidores da NOS (i.t).	66
Figura 13 -	TSP de ratos submetidos à AZy e tratados com ODQ (i.t).	66
Figura 14 -	TSP de ratos submetidos à AZy e tratados com ODQ (i.t) e SIN-1 (i.t).	67
Figura 15 -	TSP de ratos submetidos à AZy e tratados com ODQ (i.a) e SIN-1 (i.t).	68
Figura 16 -	TSP de ratos submetidos à AZy e tratados com 8-Bromo-GMPc (i.t).	69
Figura 17 -	TSP de ratos submetidos à AZy e tratados com MK-801 (i.t).	70
Figura 18 -	TSP de ratos submetidos à AZy e tratados com MK-801 (i.t) e SIN-1 (i.t).	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Ácido L – amino – 3 – hidroxí – 5 – metilsoxasole – propiônico
AMPc	Adenosina 3,5-monofosfato cíclica
ACP	área cinzenta periaquedutal
AR	Artrite reumatóide
AZy	Artrite induzida por zymosan
C	Grupo controle
CCK	Colecistocinina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
C5a	Componente C5a do sistema complemento
DMSO	Dimetilsulfóxido
D-NAME	N(G)-nitro-D-arginina metil éster
EPM	Erro padrão da média
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FRDE	Fator de relaxamento derivado do endotélio
GC	Glicocorticóides
GMPc	Guanosina 3,5-monofosfato cíclica
IA	Incapacitação articular
i.a	Intra-articular
IASP	Associação internacional para ao estudo da dor
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
i.t	Intratecal
LC	Locus ceruleus
LCR	Líquido cefalorraquidiano

L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina metil éster
L-NIO	L ^δ -iminoetil-L-ornitina
L-NMMA	N ^ω -momometil-L-arginina
LMT	Neurônios mecanossensíveis de baixo limiar
L-NOARG	L-NG-nitro-arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
MK-801	Maleato de dizocilpina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NAPs	Neurônios aferentes primários
NAS	Neurônio aferente secundário
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO ⁻²	Nitrito
NO ⁻³	Nitrato
NO	Óxido nítrico
NOS	NO sintase
NOSe	NO sintase endotelial
NOSi	NO sintase indutível
NOSn	NO sintase neuronal
NPS	Nitroprussiato de sódio
NRPG	Núcleo reticular paragigantocelular
NRM	Núcleo da rafe magna
NS	Neurônios nociceptivos específicos
NT	Grupo não tratado
ODQ	1H-[1, 2,3]oxadiazolo[4,3-α]quinoxalin-1-one
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
RPM	Rotações por minuto
SG	Substância gelatinosa
SIN-1	3-4-morphino-sydnonimina
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF	Fator de necrose tumoral

TSP	Tempo de suspensão da pata
UFC	Universidade Federal do Ceará
UI	Unidade internacional
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
WDR	Neurônios de variação dinâmica ampla
Zy	Zymosan
7-NIL	7-nitroindazole
1400W	N - [[3 - (aminoetil) fenil] metil] - etanimidamida dihidroclorida

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Artrite reumatóide	23
2.1.1 Modelos experimentais de artrite.	24
2.1.2 Artrite induzida por zymosan.	26
2.2 Nocicepção	27
2.2.1 Conceitos e epidemiologia .	27
2.2.2 Anatomia e fisiologia da nocicepção.	29
2.2.3 Controle endógeno da nocicepção.	35
2.2.4 Mediadores químicos envolvidos na nocicepção.	38
2.3 Óxido nítrico (NO)	40
2.3.1 Óxido nítrico e artrite.	46
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Animais	52
4.2 Soluções, drogas e reagentes	52
4.3 Protocolo experimental	53
4.4 Indução da artrite por zymosan (AZy)	53
4.5 Administração de fármacos	54
4.6 Avaliação da incapacitação articular (IA)	55
4.7 Coleta de líquido	55
4.8 Coleta do lavado articular	56
4.9 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)	56
4.10 Cinética dos níveis endógenos de nitrato/nitrito	56
4.11 Modulação farmacológica	57
4.11.1 Doador de óxido nítrico.	57
4.11.2 Inibidores da óxido nítrico sintase.	57
4.11.3 Inibidor da guanilato ciclase solúvel.	58
4.11.4 Análogo da guanosina 3',5' monofosfato cíclica (GMPc).	58

4.11.5 Antagonista do receptor de NMDA.	58
4.12 Análise estatística	59
5 RESULTADOS	60
5.1 Efeito da canulação intratecal sobre a medida da hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos	60
5.1.1 Incapacitação articular (IA) na AZy- efeito da canulação intratecal	60
5.1.2 Cinética das concentrações de nitrito no líquido e no lavado articular de ratos na AZy.	61
5.1.3 Cinética do Tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos na AZy.	63
5.2 Modulação farmacológica	64
5.2.1 Efeito da administração de um doador de óxido nítrico (SIN-1) na hipernocicepção da AZy.	64
5.2.2 Efeito da administração de inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS) sobre a hipernocicepção da AZy.	65
5.2.3 Efeito da administração de um inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, na hipernocicepção da AZy.	66
5.2.4 Efeito do bloqueio da guanilato ciclase solúvel sobre a ação do SIN-1 na hipernocicepção da AZy.	67
5.2.5 Efeito da administração de um análogo da guanosina 3',5'monofosfato cíclica (GMPC) (8-Bromo-GMPc), sobre a ação do SIN-1 na hipernocicepção da AZy.	69
5.2.6 Efeito da administração de um antagonista do receptor NMDA, MK-801, na hipernocicepção da AZy.	70
5.2.7 Efeito da administração de MK-801 sobre a ação do SIN-1 na hipernocicepção da AZy.	71
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÕES	82
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9 ANEXOS	104

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (AR) é caracterizada por uma poliartrite crônica com comprometimento das várias articulações, apresenta considerável prevalência na população e a dor articular é um achado comum (Hochberg et al., 2003). No seu desenvolvimento ocorre a liberação de diversos mediadores inflamatórios, incluindo eicosanóides, citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6) e óxido nítrico (NO) (Stefanovic-Racic et al., 1993; Hobbs et al., 1999; Armour et al., 1999; Pelletier et al., 2000). A etiologia da AR permanece desconhecida, limitando a sua terapêutica (Harris, 1990).

A artrite induzida por zymosan (AZy) representa um excelente modelo experimental para o estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da AR, permitindo avaliar, através do teste de incapacitação articular, a hiperalgesia periférica que se estabelece neste modelo (Rocha et al., 1999).

A dor representa uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou descrita em termos de lesões teciduais, podendo ser classificada em aguda ou crônica. Além de sua classificação clínica, a dor pode ainda ser caracterizada como nociceptiva normal, neuropática ou inflamatória (Guyton e Hall, 1997; Okeson, 1998; Cunha, et al., 1999; Costigan e Woolf, 2000.).

A dor associada a doenças inflamatórias, como na AR, é caracterizada pela produção e liberação de diversos mediadores químicos que contribuem para o estabelecimento de um estado doloroso, estando associada à ação das substâncias, como bradicinina e prostaglandinas liberadas durante o processo inflamatório, além da participação da adenosina 3,5-monofosfato cíclica (AMPc), da guanosina 3,5-monofosfato cíclica (GMPc) e de íons cálcio (Cunha, et al., 1999; Costigan e Woolf, 2000; Wood e Heath, 2000).

Recentemente, tem sido também enfatizada a participação do NO em fenômenos de hiperalgesia, tanto periférica quanto medular. Esse gás tem a propriedade de ativar a guanilato ciclase em terminais do neurônio aferente primário (NAP), promovendo aumento da concentração intracelular de GMPc. Embora parte da literatura aponte o NO como agente analgésico na periferia e hiperalgésico na medula espinhal, o seu real papel em fenômenos de nocicepção e anti-nocicepção ainda é controverso. A rigor, considera-se que o NO gerado após a indução da NOSi está envolvido em fenômenos fisiopatológicos. Tem sido demonstrado que o NO

participa dos eventos fisiopatológicos da artrite através da detecção de nitrito/nitrato no líquido sinovial de pacientes com AR (Lawand et al., 1997; Urban et al.; 1999; Dolan et al, 2000; Davis et al., 2001; Sekiguchi et al., 2004). No entanto, ainda não está claro se a sua participação é de natureza pró ou antiinflamatória.

Na artrite induzida por zymosan em ratos, foi observado que o tratamento profilático, mas não o terapêutico, com L-NAME ou aminoguanidina, inibiu a incapacitação articular presente no modelo quando administrados de forma sistêmica ou local. O mesmo foi observado com o tratamento profilático com 1400W, inibidor seletivo da NOSi, quando administrado por via i.a. Neste mesmo modelo, foi ainda observado que o tratamento i.a com doadores de NO, 3-4-morfino-sidnonimina (SIN-1) ou nitroprussiato de sódio (NPS), inibiu a incapacitação articular quando administrados terapêuticamente (Rocha et al., 2002).

No modelo de dor neuropática induzida pela ligadura crônica do nervo ciático em ratos, por exemplo, a administração intratecal (i.t) de baixas doses de SIN-1 reduziu a alodinia mecânica, enquanto que em altas doses não apresentaram efeito ou aumentaram a resposta nociceptiva. Nesse estudo, foi também observado que a administração i.t. de 1H-[1, 2,3]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-one (ODQ), inibidor da guanilato solúvel, ou de hemoglobina, “scavenger” de NO, reverteu o efeito antinociceptivo de baixas doses de SIN-1, além de ter reduzido seu efeito nociceptivo em altas doses. Além disso, o uso de um análogo da guanilato ciclase, 8-Bromo-GMP, ou de inibidores da NOS, L-NOARG ou L-NMMA, reduziu a alodinia mecânica nos ratos com dor neuropática. Esses efeitos foram inibidos pelo tratamento prévio com ODQ. Tais resultados sugerem que SIN-1 e inibidores da NOS reduzem a dor no modelo utilizado através de um mecanismo espinhal que envolve a ativação da guanilato ciclase. Além disso, os possíveis efeitos do SIN-1 dependem da dose utilizada e do modelo estudado (Sousa e Prado, 2001).

Existem ainda estudos que relatam o envolvimento dos receptores NMDA nos mecanismos espinhais que modulam a hiperalgesia térmica. Acredita-se que a participação desses receptores é mediada através da produção de NO, havendo, portanto, uma relação próxima entre o NO e os receptores NMDA na modulação da sensação dolorosa (Meller e Gebhart, 1993).

Estudos experimentais também revelam que a hiperalgesia associada com a tolerância narcótica pode ser revertida pelo tratamento com MK-801, um antagonista do receptor de NMDA, indicando que os receptores de NMDA são importantes também para a expressão da hiperalgesia térmica em ratos tolerantes a morfina (Mao et al., 1994).

Embora exista uma grande quantidade de estudos avaliando os mecanismos e mediadores envolvidos nos diferentes modelos de dor, ainda há muito que se esclarecer no que se refere ao envolvimento de componentes do sistema nervoso central na modulação da dor periférica. Este fato se torna particularmente importante no papel do NO na modulação da dor inflamatória.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Artrite reumatóide

As doenças reumáticas são representadas por um grupo diverso de enfermidades que comprometem o sistema imunológico e o sistema musculoesquelético. Dentre estas, a artrite reumatóide (AR) é uma freqüente artropatia inflamatória, com prevalência de cerca de 1% da população em todo o mundo (Harris, 1990). Essa doença apresenta-se, geralmente, como uma poliartrite crônica, estando seus sintomas específicos associados ao comprometimento das várias articulações. Nesse distúrbio, a dor articular é um achado importante nos pacientes acometidos (Hochberg et al., 2003).

Clinicamente, a inflamação sinovial causa edema, dor à palpação e limitação de movimentos, levando a um quadro de incapacitação funcional associada à lise da cartilagem articular e à erosão do osso subcondral. Essas alterações conduzem a episódios de dor articular que reduzem significativamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos (Arnett, 1988).

No desenvolvimento da AR, ocorre uma resposta imuno-inflamatória, com a liberação de mediadores inflamatórios, incluindo eicosanóides e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6) que contribuem para a perpetuação e progressão da sinovite (Paya et al., 1997). Ainda, outros mediadores, como o óxido nítrico (NO), desempenham importante papel em artropatias inflamatórias (Stefanovic-Racic et al., 1993; Hobbs et al., 1999; Armour et al., 1999; Pelletier et al., 2000). De fato, foi demonstrada elevada concentração de nitrito (um produto da oxidação do NO) no plasma e fluido sinovial de pacientes com AR (Farrel et al., 1992; Stichtenoth et al., 1995; Ueki et al., 1996).

Apesar de sua elevada prevalência, a etiologia da AR permanece desconhecida e sua terapêutica limita-se a minimizar os sintomas flogísticos articulares, não se conhecendo um tratamento que altere de forma definitiva a evolução da doença (Harris, 1990). A compreensão da fisiopatologia dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dor articular contribuiria para a

descoberta de tratamentos que pudessem alterar a limitação funcional marcante no curso evolutivo da AR.

2.1.1 Modelos experimentais de artrite

Os modelos experimentais representam uma alternativa para o estudo de diversas doenças humanas e animais. Apesar de não se dispor de uma forma de AR em animais, os modelos empregados são bastante semelhantes à doença humana, permitindo a avaliação da permeabilidade vascular, da migração celular, da dor, além da hiperplasia sinovial, que são achados comuns na doença em humanos (Harris, 1990).

Vários modelos animais são empregados para o estudo da AR, dentre os quais destacam-se a artrite induzida por adjuvante, a artrite induzida por antígeno, a artrite induzida por colágeno, a artrite induzida por imunocomplexos e a artrite induzida por zymosan.

A artrite induzida por adjuvante ocorre a partir da injeção intradérmica de uma suspensão em óleo de *Mycobacterium tuberculosis* ou *butyricum* mortos pelo calor (Chang et al., 1980). Nesse modelo, a reação inflamatória leva à formação do *pannus* e evolui com erosão da cartilagem e do osso subcondral. A impossibilidade de determinação do início da inflamação, a sistemização das lesões, afetando inclusive cartilagem elástica, e a restrição a uma cepa de ratos são limitações desse modelo, quando comparado à AR em humanos.

A artrite induzida por antígeno consiste na sensibilização prévia do animal a um antígeno, com posterior indução a partir da injeção intra-articular da substância antigênica (p. ex.: soro-albumina bovina) (Dumonde e Glynn, 1962). Nesse modelo, é possível determinar o início preciso da artrite e foi demonstrada a expressão de anticorpos na membrana sinovial (Jasin e Ziff, 1969), presença do fator reumatóide (Heymer et al., 1982), além da presença de depósitos de imunocomplexos e complemento nos tecidos avasculares, semelhante à doença reumatóide humana. Dentre as limitações desse modelo, destacam-se o seu emprego principalmente em coelhos, cujo sistema imune difere em muito da espécie humana, além da

especificidade da resposta ao antígeno utilizado na sensibilização, que contrasta com o possível caráter policlonal na AR humana .

No modelo de artrite induzida por colágeno, a indução é desencadeada pela injeção intradérmica de colágeno tipo II emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (Heymer et al., 1982). O início da artrite ocorre em torno do 16º dia após a imunização, com desenvolvimento de anquilose (Brahm, 1991). Suas limitações prendem-se principalmente à especificidade ao antígeno de indução e à dificuldade em se estabelecer o início da lesão, o que limita a observação do efeito de intervenções farmacológicas.

Na artrite induzida por imunocomplexo, ratos são submetidos à injeção intra-articular de um anticorpo (p.ex.: anti-soro albumina bovina), seguida da injeção sistêmica do respectivo antígeno (p.ex.: soro albumina bovina). Há, nesse modelo, deposição de complexo antígeno-anticorpo na sinóvia, assim como presença de intenso infiltrado celular, liberação de eicosanóides e síntese de TNF- α no líquido sinovial (Rocha et al., 1997). O caráter auto-limitado da reação é a limitação mais importante nesse modelo, ao lado da relativa benignidade da evolução, contrastando com a AR humana. Ademais, não está clara a contribuição de complexos imunes na fisiopatologia da sinovite reumatóide *per se*.

A diversidade dos modelos demonstra a falta de um modelo ideal, embora possibilite o estudo dos vários mecanismos envolvidos no desenvolvimento de artropatias inflamatórias, à semelhança da AR.

Além disso, também não se dispõem de modelos próprios para estudo de dor (hipernocicepção) em modelos animais de artrite. A experiência do nosso grupo com a caracterização e o estudo de mediadores na fisiopatologia da hipernocicepção articular na artrite induzida por zymosan em ratos fez-nos optar por esse modelo, no presente estudo. Na artrite induzida por zymosan em ratos, podemos avaliar a hipernocicepção inflamatória articular através da medida de incapacitação articular instalada. Paralelamente, podemos estudar o influxo celular, aumento de permeabilidade vascular, liberação de mediadores inflamatórios no espaço articular e alterações histológicas locais, como descreveremos a seguir.

2.1.2 Artrite induzida por zymosan

O zymosan (Zy) é um polissacarídeo derivado do fungo *Saccharomyces cerevisiae* que induz reação inflamatória quando injetado em tecidos, como na cavidade peritoneal (Doherty et al., 1985), na pele (Ridger et al., 1997; Greenacre et al., 2001) e na cavidade articular de animais (Gadó e Gigler, 1991).

A atividade inflamatória do Zy foi relacionada à sua capacidade de ativar a via alternativa do complemento (Fernandez et al., 1978; Keystone et al., 1989; Snyderman et al., 1970). Esse evento leva à geração de C5a, um potente mediador da ativação de mastócitos e acúmulo de neutrófilos (Becker, 1990; Johnson et al., 1975). Ademais, uma grande variedade de mediadores inflamatórios contribui para essa resposta, incluindo citocinas (TNF, IL-6, IL-8), eicosanóides e NO (Ajuebor et al., 1998; Amin, et al., 1995; Beaubien et al., 1990; Coates e McColl, 2001; Van de Loo et al., 1998; Von Asmuth et al., 1990).

A injeção de Zy na cavidade articular de ratos produz uma sinovite erosiva e grave (Keystone et al., 1989). A fase aguda da artrite induzida por Zy (AZy) é caracterizada por aumento da permeabilidade vascular, edema e influxo celular inflamatório para a cavidade articular. Posteriormente, observa-se progressiva sinovite, com infiltrado celular mononuclear e ativação dos fibroblastos, assemelhando-se à sinovite reumatóide crônica (*pannus* reumatóide) (Gegout et al., 1994).

Na fase crônica da AZy, ocorre degradação da cartilagem articular e do osso subcondral (Gegout et al., 1995). Estudando esse modelo, nosso grupo demonstrou que, 21 dias após a indução da AZy, ocorre intenso infiltrado mononuclear, com formação de células gigantes, neoformação vascular, proliferação de fibroblastos, perda de proteoglicanos da matriz articular e erosão do osso subcondral (Rocha et al., 1999). Em outro estudo, demonstramos associação entre a formação de peroxinitrito (potente agente oxidante formado a partir da reação entre NO e o ânion superóxido) e a destruição da cartilagem articular, através da quantificação de glicosaminoglicanos na cartilagem articular de ratos submetido a AZy (Bezerra et al., 2004).

2. 2 Nocicepcão

2.2.1 Conceitos e epidemiologia

A dor é uma das mais importantes e complexas experiências humanas relacionadas ao dano tecidual, muitas vezes, de etiologia indefinida, resultando em incapacidade e inabilidade e implicando em elevados custos pessoais e sociais (Teixeira et al., 1994; Teixeira e Figueró, 2001).

Estudos epidemiológicos demonstram que 10 a 50% dos indivíduos procuram atendimento médico devido à dor, estando presente em cerca de 70% dos doentes acometidos pelas mais diversas doenças (James et al., 1991).

No Brasil e em outros países, 50 a 60% dos doentes com dor tornam-se parcial ou totalmente incapacitados, seja de forma transitória ou permanente (James et al., 1991). Vale salientar que 38% dos adultos, com 50 a 70 anos de idade, apresentam afecções reumáticas e dor de duração superior a seis semanas (Jacobson et al., 1989). Esses achados ressaltam a importância do estudo a respeito dos mecanismos envolvidos no desencadeamento e manutenção do estado doloroso em diversas doenças.

O comitê de taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou descrita em termos de lesões teciduais. Assim, a sensação dolorosa apresenta um componente subjetivo que está associado com o aprendizado pessoal frente a experiências prévias (Merskey e Trimble, 1979).

Além disso, a dor é fundamental para alertar o indivíduo sobre a ocorrência de alguma forma de lesão orgânica instalada ou em vias de se instalar, apresentando assim, importante valor biológico para o indivíduo (Besson, 1999).

A sensação dolorosa pode ser classificada em nociceptiva aguda, de natureza fisiológica ou inflamatória ou de dor crônica, de natureza inflamatória ou neuropática.

A dor aguda resulta da estimulação nociva intensa ou potencialmente injuriante, é bem localizada e transitória, quando não ocorre dano tecidual. Apresenta importante papel na informação do corpo sobre o perigo potencial,

iniciando respostas reflexas de retirada do segmento corporal da fonte de estímulo nocivo (Guyton e Hall, 1997, Carr e Goudas, 1999).

Esse tipo de dor é funcionalmente associado à resposta decorrente da estimulação de neurônios aferentes primários (NAPs) especializados, capazes de discriminar o estímulo nocivo quanto a sua modalidade, intensidade, duração e localização (Okeson, 1998; Andrade Filho, 2001).

A dor crônica ocorre em resposta à lesão tecidual e é caracterizada pela sensação de dor em resposta a estímulos normalmente inócuos ou mesmo pela ocorrência de dor espontânea (Guyton e Hall, 1997).

Esse tipo de dor representa um fenômeno de sensibilização nociceptiva, com redução do limiar à dor (alodinia), amplificação da resposta a estímulos nocivos (hiperalgesia) e sensação de dor prolongada após estimulação (hiperpatia) (Okeson, 1998; Andrade Filho, 2001).

É importante relatar que mesmo a dor crônica possui uma fase aguda, geralmente associada a dano tecidual e inflamação. Além disso, na fase crônica, a dor está geralmente associada a alterações ou danos ao tecido nervoso, caracterizando-se a dor neuropática. Nessa condição, a dor perde qualquer função adaptativa e torna-se de fato patológica (Okeson, 1998).

Assim, é importante ressaltar que a dor, além de sua classificação clínica, pode também ser caracterizada como dor nociceptiva normal, dor neuropática, dor inflamatória, dentre outras definições.

A dor nociceptiva normal se refere à percepção de sinais dolorosos pelo sistema nervoso central (SNC) que se originam de receptores sensoriais especializados, os chamados nociceptores, e chegam ao SNC através de vias nervosas íntegras. Esses nociceptores são representados por terminações nervosas livres presentes em fibras aferentes sensitivas, como as fibras C e as fibras A-delta (Dubner e Gold, 1999).

A atividade desses nociceptores é modulada por substâncias químicas presentes no ambiente tecidual. Essas substâncias algio gênicas podem ser liberadas por mastócitos, macrófagos ou vasos sanguíneos e são representadas principalmente por acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, substância P, prostaglandinas e citocinas (Wood e Heath, 2000).

A dor neuropática, por sua vez, refere-se à dor associada à lesão neural, periférica ou central, gerada dentro do próprio sistema nervoso. Esse tipo de

sensação dolorosa pode ser atribuído a lesões traumáticas de natureza física ou química, a doenças inflamatórias, infecciosas ou degenerativas, além de lesões oncológicas, vasculares ou tóxicas (Millan, 1999).

Dentre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dor neuropática, destaca-se a atividade ectópica nos neurônios danificados e nos gânglios das raízes sensitivas (Teixeira e Figueró, 2001).

No caso da dor associada a doenças inflamatórias, ocorre a produção e liberação de diversos mediadores químicos que contribuem para o estabelecimento de um estado doloroso. Essa sensação dolorosa é classificada como dor inflamatória, estando, portanto, associada à ação das substâncias como bradicinina e prostaglandinas liberadas durante o processo inflamatório, além da participação da adenosina 3,5-monofosfato cíclica (AMPc), da guanosina 3,5-monofosfato cíclica (GMPc) e de íons cálcio (Costigan e Woolf, 2000; Cunha et al., 1999).

Esses mediadores agem aumentando a vasodilatação local e a permeabilidade capilar, além de alterarem a sensibilidade e a receptividade dos nociceptores da área inflamada (Costigan e Woolf, 2000; Cunha et al., 1999, Wood e Heath, 2000).

Dessa forma, o limiar doloroso é diminuído e os nociceptores tornam-se mais sensíveis ao estímulo e os mecanoreceptores de limiar mais alto são sensibilizados a uma mais ampla variedade de estímulos. Conseqüentemente, estabelecem-se as dores primárias espontânea e a hiperalgesia (amplificação da resposta a estímulos nocivos, evocada por estímulo) (Besson, 1999; Dubner e Gold, 1999).

2.2.2 Anatomia e fisiologia da nocicepção

Em condições normais, a informação sensorial é captada por estruturas do sistema nervoso periférico (SNP), transmitida ao sistema nervoso central (SNC), e daí para os centros superiores do tronco encefálico e córtex cerebral, onde é decodificada e interpretada (Teixeira e Figueró, 2001).

Para chegar à medula espinhal, a informação depende da participação dos neurônios aferentes primários (NAPs). Os NAPs que inervam regiões abaixo da cabeça são células pseudobipolares e seus corpos celulares se localizam no gânglio da raiz dorsal, enquanto que aqueles que inervam a região cefálica possuem corpos

celulares nos gânglios sensoriais dos nervos cranianos V, VII, IX, e X (Warfield e Bajwa, 2004).

O NAP, também chamado de neurônio de primeira ordem, recebe estímulos do receptor sensitivo. Este impulso é transmitido pelo NAP para dentro do SNC através da sinapse do corno dorsal da medula espinhal com um neurônio aferente secundário (NAS), também chamado de neurônio de segunda ordem (Besson, 1999; Dubner e Gold, 1999).

Em seguida, esse impulso é transmitido pelo NAS cruzando a medula espinhal através do trato espinotalâmico ântero-lateral, o qual ascende para os centros superiores. É importante referir que interneurônios múltiplos podem também participar da transferência do referido impulso para o tálamo e para o córtex. Esses interneurônios podem fazer sinapse diretamente com um neurônio eferente, originado externamente ao SNC através da raiz ventral, estimulando um órgão eferente, como um músculo, por exemplo, (Okeson, 1998).

O ramo central do NAP adentra a medula espinhal e suas terminações realizam sinapses com células espinhais de segunda ordem, localizadas no corno dorsal da medula espinhal. Parece haver três tipos específicos de neurônios de segunda ordem que transferem impulsos para os centros superiores. Esses neurônios são nomeados de acordo com o tipo predominante de impulso que eles transmitem, a saber: *i*: neurônios mecanossensíveis de baixo limiar (LMT), que transmitem informações de propriocepção, pressão e toque leve; *ii*: neurônios nociceptivos específicos (NS), que transmitem exclusivamente impulsos relacionados ao estímulo nocivo; *iii*: neurônios de variação dinâmica ampla (WDR), capazes de responder a uma ampla faixa de intensidade de estímulos (Sessle e Hu, 1991).

O axônio periférico do NAP, por sua vez, possui terminações livres, denominadas de nociceptores, que são capazes de detectar estímulos dolorosos. Assim, a informação gerada nos nociceptores é então conduzida antidromicamente até o neurônio do gânglio da raiz dorsal e, em seguida, até a medula espinhal, ao longo do axônio central, de forma ortodrômica (Andrade-Filho, 2001).

Esses referidos axônios, por sua vez, podem ser encontrados em variadas espessuras, havendo uma relação entre o diâmetro das fibras nervosas e sua velocidade de condução. Dessa forma, as fibras mais calibrosas, denominadas de fibras A, conduzem os impulsos mais rapidamente que as mais delgadas,

denominadas de fibras C. As fibras A são ainda subdivididas, segundo o seu diâmetro, em alfa, beta, gama e delta (Okeson, 1998).

A classificação dos nociceptores é feita segundo o tipo de estímulo capaz de ativá-los e as características da resposta. Assim, há os mecanonociceptores (nociceptores A δ de alta limiar), nociceptores polimodais (tipo C), nociceptores mecanotérmicos (nociceptores do tipo A δ) e nociceptores para o frio (tipo A δ ou C) (Besson, 1999; Dubner e Gold, 1999).

Os mecanonociceptores normalmente respondem apenas a estímulos mecânicos nocivos intensos, mas a aplicação repetitiva de estímulos térmicos nocivos é também capaz de sensibilizá-los. Os nociceptores polimodais representam cerca de 95% das unidades sensoriais da pele humana e respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos. Já os nociceptores mecanotérmicos respondem a estímulos mecânicos de alta intensidade ou térmicos, enquanto que nociceptores para o frio respondem a intensa estimulação nociva provocada por baixas temperaturas (Warfield e Bajwa, 2004).

Há, ainda, uma classe interessante de nociceptores, denominados de nociceptores silenciosos. Esses nociceptores são representados por uma porção de fibras C mielínicas, 10 a 20%, presentes na pele, articulações e vísceras que normalmente não respondem a estímulos nocivos agudos. No entanto, em condições de inflamação ou dano tecidual, esses nociceptores são sensibilizados e ativados por uma variedade de mediadores químicos (Schaible e Grubb, 1993; Cervero et al., 1994).

O recrutamento desses nociceptores silenciosos pode contribuir para a sensibilização e para as modificações de adaptação central que suportam a hiperalgesia primária causada, por exemplo, pela inflamação tecidual (Millan, 1999).

Os neurônios do gânglio da raiz dorsal que processam a informação dolorosa apresentam receptores μ -opiídeos e NMDA. Esses neurônios representam a origem da via ascendente da dor “normal” e da dor patológica. Os impulsos nos aferentes nociceptivos primários levam a uma excitação intensa e rápida nos neurônios nociceptivos da raiz dorsal, que é seguida por uma descarga de menor intensidade e de maior duração. Impulsos contínuos sobre os aferentes nociceptivos polimodais levam ao aumento da sensação dolorosa devido a receptores NMDA. Esse mecanismo de ação explica a modulação central da hiperalgesia que ocorre em

estados dolorosos persistentes, como a dor inflamatória que se segue à lesão tecidual (Dickenson e Sullivan, 1990; Woolf e Thompson, 1991).

O corno dorsal da medula está subdividido em dez camadas ou lâminas. Essas lâminas são numeradas de acordo com sua profundidade no corno dorsal de I a VI, no que diz respeito à sensibilidade. Estudos sugerem que os impulsos nociceptivos entram no corno dorsal pela via dos neurônios NS e WDR numa área das lâminas I, II e V (Dubner e Bennett, 1983). Os neurônios LMT, que normalmente não transmitem nocicepcão, parecem estar concentrados nas lâminas III e IV (Okeson, 1998).

Os axônios das células de segunda ordem, que recebem informações dos vários segmentos corporais, juntam-se para formar os tratos ascendentes. Distinguem-se tratos que cursam lateralmente no tronco cerebral, capazes de conduzir rapidamente a dor, e os que cursam medialmente no tronco cerebral, estes conduzem a dor mais lentamente (Warfield e Bajwa, 2004).

O trato neoespinal é o mais importante na condução rápida e precisa da dor. Seus axônios cruzam a medula espinhal e juntam-se para se projetarem até o tálamo ventral póstero-lateral e porção medial do tálamo posterior. Há ainda os tratos espinocervical e dos núcleos da coluna dorsal. Esses tratos irão também se projetar no tálamo (Besson, 1999; Dubner e Gold, 1999).

O sistema de condução lenta e difusa da dor inclui os tratos paleoespinal, espinomesencefálico, espinoreticular e proprioespinal. Esses tratos são poli-sinápticos e envolvem múltiplas estações intermediárias antes de atingir o córtex sensoriomotor (Warfield e Bajwa, 2004).

Uma vez que os impulsos tenham passado pelos neurônios de segunda ordem, esses neurônios transmitem-nos para os centros superiores para interpretação e avaliação.

Existem numerosos centros no tronco encefálico e no encéfalo que ajudam a dar significado aos impulsos. Deve-se também lembrar que diversos interneurônios podem estar envolvidos na transmissão dos impulsos para os centros superiores (Woolf e Decosterd, 1999).

Os centros superiores do sistema nervoso central podem ser subdivididos em tronco encefálico (bulbo, ponte e mesencéfalo), cerebelo, diencefalo (tálamo e hipotálamo) e cérebro (córtex cerebral, núcleos da base e estruturas límbicas) (Warfield e Bajwa, 2004).

Cada uma dessas estruturas apresenta peculiaridades próprias, contribuindo para o desenvolvimento da sensação dolorosa. Dentre essas, algumas são particularmente importantes no contexto do desenvolvimento da sensação dolorosa.

O bulbo, por exemplo, também chamado de medula oblonga, é composto de substância branca, projetando tratos que conduzem impulsos do trato espinotalâmico para o tálamo. Há ainda uma região composta de substância branca e substância cinzenta, chamada de formação reticular. Nesse local, há a presença de núcleos com altas concentrações de neurotransmissores importantes para a transmissão de impulsos sensitivos e dolorosos (Okeson, 1998).

O tálamo, por sua vez, está envolvido em quase todos os impulsos provenientes do mesencéfalo e das regiões superiores do encéfalo, bem como da medula espinhal. Ao atingirem o tálamo, esses impulsos são avaliados e direcionados para as regiões adequadas nos centros superiores para interpretação e resposta (Okeson, 1998).

Além de ser o principal centro do encéfalo para o controle das funções corporais internas, o hipotálamo, ao ser estimulado por tensão emocional, pode exacerbar a regulação do sistema nervoso simpático e, conseqüentemente, influenciar os impulsos nociceptivos que entram no encéfalo (Okeson, 1998).

Dentre as estruturas no córtex cerebral, há uma área sensitiva que recebe impulsos somatossensitivos para avaliação. Já as estruturas límbicas estão envolvidas em respostas comportamentais específicas. Parece haver um centro de dor/prazer que direciona, instintivamente, o indivíduo para os comportamentos que estimulam o lado do prazer desse centro, apresentando importante impacto sobre a função geral do indivíduo. Ademais, esse centro tem um papel importante nos problemas de dor crônica (Woolf e Decosterd, 1999).

Existem outras estruturas, na parte interna do tronco encefálico, importantes no desenvolvimento da dor, como os ventrículos, a região periaquedutal e o núcleo magno da rafe.

Nos ventrículos, está confinado o líquido cefalorraquidiano que, além de atuar como coxim durante traumatismos, serve de transporte para neurotransmissores. Na região cinzenta periaquedutal, há elevada concentração de neurônios capazes de produzir potentes neurotransmissores que podem modular os impulsos nociceptivos. De forma semelhante, o núcleo magno da rafe funciona na modulação dos impulsos nociceptivos ascendentes ao tálamo (Andrade-Filho, 2001).

A informação dolorosa iniciada no segmento cefálico caminha pelo NAP originário do V, principalmente, e dos VII, IX e X pares cranianos. Os NAP desses pares projetam-se ao sistema de núcleos trigeminais, cujos axônios, em sua maioria, também se projetam ao tálamo, antes de chegar ao córtex somatossensorial. Além disso, outros neurônios emitem projeções à formação reticular e ao tálamo (Guyton e Hall, 1997).

Vale salientar que algumas condições dolorosas podem ser influenciadas e até mesmo mantidas pela atividade do sistema nervoso autônomo (Woolf e Decosterd, 1999).

Anatomicamente, o sistema nervoso autônomo é composto de duas divisões: a porção craniosacral, conhecida como parassimpática, e a porção toracolombar, conhecida como simpática. Os elementos aferentes desses nervos recebem estímulos que normalmente não atingem o nível da consciência. No entanto, sob condições anormais ou adversas, tais estímulos podem ser percebidos como dor (Guyton e Hall, 1997). Os elementos eferentes desses nervos constituem o sistema nervoso autônomo. Os eferentes viscerais craniosacrais constituem o sistema autônomo parassimpático e os eferentes toracolombares constituem o sistema autônomo simpático. O sistema nervoso autônomo é ativado, principalmente, por centros localizados na medula espinhal, no tronco encefálico e no hipotálamo. Além disso, as porções do córtex e o sistema límbico também influenciam na sua atividade (Costigan e Woolf, 2000).

A integração da informação dolorosa em centros nervosos superiores é bastante complexa. O componente discriminativo da dor é somatotopicamente específico e envolve tanto o córtex sensorial primário quanto o secundário. As informações que chegam ao córtex vêm, predominantemente, do complexo ventro-basal do tálamo. O componente afetivo da dor é integrado em diversas estruturas, como o córtex cingulado, a amígdala e outras estruturas límbicas (Dubner e Ren, 1999).

Os impulsos nociceptivos que chegam ao sistema nervoso central, além de informar sobre os componentes da dor, ativam também estruturas cerebrais capazes de modular a passagem de novos impulsos nociceptivos do NAP para células espinhais. A matéria cinzenta periaquedutal foi a primeira estrutura cerebral a ser demonstrada como capaz de produzir inibição da dor quando estimulada eletricamente. Outras estruturas, tais como o córtex somatossensorial, o hipotálamo

lateral, o núcleo pré-tectal anterior, a área tegmental lateral, o núcleo magno da rafe, o núcleo parabraquial, o lócus cerúleo e os núcleos reticulares gigantocelular e paragigantocelular foram, posteriormente, demonstrados como igualmente capazes de promover analgesia quando estimulados elétrica ou quimicamente (Werfield e Bajwa, 2004).

2.2.3 Controle endógeno da nocicepção

Os sinais nervosos são transmitidos de um neurônio para o próximo através de junções interneuronais chamadas de sinapses, sendo conduzidos através de um potencial de ação. O estado de repouso da membrana celular é dito polarizado com leve carga negativa. Quando a membrana se torna despolarizada, há uma permeabilidade transitória aos íons sódio; em seguida, há fechamento dos canais de sódio e abertura dos canais de potássio, restabelecendo o potencial de repouso negativo normal da membrana e promovendo assim a repolarização da mesma (Guyton e Hall, 1997).

As vesículas sinápticas contêm substâncias transmissoras que, quando liberadas, excitam ou inibem o neurônio pós-sináptico. Além disso, a membrana neural pós-sináptica apresenta receptores inibitórios e excitatórios. Assim, através da interação entre o neurotransmissor liberado e o receptor ativado poderá ocorrer excitação ou inibição de uma determinada atividade neural (Warfield e Bajwa, 2004).

As membranas sinápticas dos terminais pré-sinápticos apresentam também inúmeros canais de cálcio voltagem-dependente; já a membrana dos neurônios pós-sinápticos contém grande número de proteínas receptoras. Esses receptores podem se apresentar como um canal iônico, quimicamente ativado, ou como uma enzima que ativa uma alteração metabólica interna na célula.

O sódio, o potássio e o cloreto agem em receptores de canais iônicos e podem estar submetidos a neurotransmissores excitatórios, como ocorre com os canais de sódio, ou inibitórios, como ocorre com os canais de potássio e cloreto (Guyton e Hall, 1997). Os estímulos dos receptores enzimáticos podem ativar genes celulares ou proteínas quinases, levando ao aumento ou diminuição do número de receptores, respectivamente (Carr e Goudas, 1999).

É importante considerar os vários fatores que podem influenciar a inibição e a excitação da experiência dolorosa. Em 1965, Melzack e Wall, propuseram a chamada teoria do portão para explicar a modulação da dor (**Figura 1**).

Esse sistema regularia a passagem de impulsos das fibras aferentes periféricas para o tálamo através de neurônios de transmissão que se originam no corno dorsal da medula. Os neurônios na substância gelatinosa (SG) do corno dorsal atuam ao inibir a via de transmissão. Os interneurônios seriam ativados por neurônios inibitórios descendentes ou por estimulação aferente não nociceptiva e seriam inibidos por estímulos nociceptivos das fibras C, de forma que a atividade persistente dessas fibras facilitaria a excitação das células de transmissão por influxos tanto nociceptivos quanto não-nociceptivos.

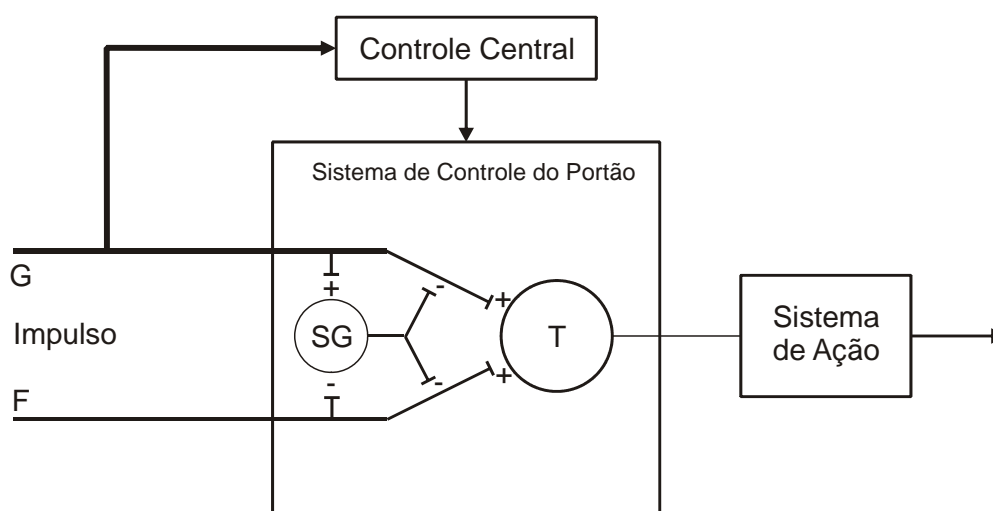


Figura 1- Diagrama esquemático da teoria do controle do portão dos mecanismos da dor. G= fibras grossas; F= fibras finas. As fibras projetar-se-iam para a substância gelatinosa (SG) e para as primeiras células de transmissão central (T). O efeito inibitório exercido pela SG sobre os terminais das fibras aferentes seria exacerbado pela atividade nas fibras G e deprimido pela atividade nas fibras F. O desencadeamento do controle central é representado por uma linha que vai desde o sistema de fibras grossas até os mecanismos de controle central; esses mecanismos, por sua vez, projetar-se-iam para o sistema de controle do portão. As células T (neurônios de segunda ordem) projetam-se para as células de entrada do sistema de ação. + = excitação; - = inibição (Melzack e Wall, 1965).

Essa auto-facilitação provoca surtos sucessivos de atividade nos aferentes nociceptivos, tornando-se cada vez mais eficaz na ativação dos neurônios de transmissão. Assim, de acordo com a teoria do portão, as células da SG responderiam tanto à atividade das fibras aferentes que penetram na medula espinhal quanto à atividade das vias descendentes.

As vias descendentes, por sua vez, constituiriam um dos mecanismos de portão que controlam a transmissão de impulsos no corno dorsal. Uma parte essencial desse sistema é a área cinzenta periaquedutal (ACP). Pesquisas demonstraram que a estimulação elétrica dessa área no cérebro do rato causava analgesia intensa suficiente para permitir a realização de cirurgia abdominal sem anestesia e sem induzir qualquer resposta acentuada (Reynolds et al., 1969).

A principal via neuronal ativada pela estimulação da ACP dirige-se, inicialmente, para uma área do bulbo próxima à linha média, conhecida como núcleo magno da rafe (NRM) e, a partir daí, através de fibras que percorrem o funículo dorso-lateral da medula espinhal, formando conexões sinápticas nos interneurônios do corno dorsal.

O próprio NRM recebe um influxo dos neurônios espinotalâmicos através do núcleo reticular paragigantocelular (NRPG), de modo que esse sistema inibitório descendente pode fazer parte de uma alça de retroalimentação reguladora, através da qual a transmissão pelo corno dorsal é controlada de acordo com a quantidade de atividade que alcança o tálamo. Além disso, há uma via noradrenérgica proveniente do lócus cerúleo (LC) que possui efeito inibitório semelhante sobre a transmissão no corno dorsal (Warfield e Bajwa, 2004).

Ocorre ainda que a SG é rica em peptídeos opióides e em receptores opióides, podendo constituir um importante local de ação para drogas semelhantes à morfina (Carr e Goudas, 1999). Os opióides excitam os neurônios da ACP e no NRPG que, por sua vez se projetam para o bulbo rostroventral, que inclui o NRM. A partir do NRM, os neurônios que contêm 5-HT e encefalina dirigem-se para a SG do corno dorsal e exercem uma influência inibitória sobre a transmissão (Dubner e Ren, 1999). Esses peptídeos opióides também atuam diretamente sobre o corno dorsal, bem como sobre as terminações periféricas dos neurônios aferentes nociceptivos; além disso, o LC envia neurônios noradrenérgicos para o corno dorsal, que também inibem a transmissão. Assim, a via inibitória descendente pode representar um importante local de ação para os analgésicos opióides. (Spetea et al., 2002).

Vale salientar que todo o mecanismo envolvido no desencadeamento e na modulação da dor está diretamente relacionado com a ação de substâncias

neuroquímicas. Essas substâncias que transmitem os impulsos através da fenda sináptica são chamadas de neurotransmissores.

2.2.4 Mediadores químicos envolvidos na nocicepção

Os gânglios da raiz dorsal, onde se encontram os corpos celulares dos NAPs, sintetizam diversas substâncias com potencial para atuar como neurotransmissores ou neuromoduladores da dor. Tais substâncias podem ser transportadas tanto para o ramo periférico quanto para o ramo central do NAP, exercendo assim papel na dor periférica ou central (Andrade-Filho, 2001).

Dentre as diversas substâncias capazes de estimular células espinhais nociceptivas, estão a substância P, o glutamato, a neurocinina A, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), a colecistocinina (CCK), a nociceptina e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP). Há, ainda, aquelas que possuem ação predominantemente inibitória e são representadas por peptídeos opióides (encefalinas e dinorfinas), somatostatina e galanina. Outros neurotransmissores sintetizados no gânglio da raiz dorsal, com função ainda não totalmente estabelecida, incluem a bombesina, o hormônio liberador de tirosina, o neuropeptídeo Y, a neurotensina A, as neuromedinas B e C, os peptídeos natriuréticos atrial e cerebral, o peptídeoYY e a proctolina (Wood e Heath, 2000).

Além disso, os nociceptores reconhecem e interagem com substâncias como a bradicinina (via receptores do tipo B₂), as prostaglandinas (tipos I₂ e E₂), os opióides (via receptores μ , δ e κ), a histamina, a serotonina, a noradrenalina (via receptor β_2) e a acetilcolina, que podem ser liberadas em tecidos lesados, como ocorreria durante reações inflamatórias (Tonussi e Ferreira, 1992).

Vale salientar que nociceptores não-mielinizados, presentes no sistema nervoso central, liberam glutamato como neurotransmissor e os neurônios espinhais, que recebem estímulos desses nociceptores, expressam diferentes subtipos de receptores, como o N – metil – D – aspartato (NMDA), o ácido L – amino – 3 – hidróxi – 5 – metiloxasole – propiônico (AMPA), o metabotrópico (Warfield e Bajwa, 2004).

O glutamato liberado desses nociceptores age sobre os receptores NMDA, induzindo modificações na sensibilidade da célula pós-sináptica com conseqüente

aumento da resposta dolorosa a todos os tipos de estímulos, sendo este efeito chamado de sensibilização central. Estudos sugerem processo semelhante nos receptores do tipo AMPA (Bennett, 2000).

As lesões celulares, por sua vez, iniciam cascatas de eventos que, inicialmente, favorecem a síntese de prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos, a partir da ação das ciclooxygenases dos tipos 1 e 2 (COX 1 e COX 2) sobre o ácido araquidônico, presente nas membranas celulares, após ativação de fosfolipases durante a resposta inflamatória (Chandrasekharan et al., 2002; Botting, 2003; Gaciong, 2003; Schwab, et al. 2003).

Esses produtos da inflamação podem agir como autacóides sobre receptores próprios localizados nos nociceptores, ativando a produção de AMP cíclico, o qual facilita a geração local de estímulos e então induz fenômenos de hipersensibilização ou hiperalgesia periférica (Schwab, et al. 2003).

Além disso, há, ainda, o extravasamento de bradicinina, a partir de vasos rompidos que, através de receptores B₂, ativam nociceptores, produzem dor quer por ação direta ou indireta, como pela liberação de substância P. Esta, ao ser liberada, atua sobre vasos locais, levando ao aumento da liberação de bradicinina, agindo sobre os mastócitos, induzindo a liberação de histamina, e, sobre as plaquetas, conduzindo à liberação do fator de agregação plaquetária e serotonina (Wood e Heath, 2000).

Esses autacóides, além de participarem de eventos clássicos da inflamação como o aumento da permeabilidade vascular, produzindo edema, também participam do fenômeno de hipersensibilização do nociceptor.

Há, ainda, em resposta ao estímulo lesivo, a migração de células para o local da lesão. Os leucócitos e os macrófagos são igualmente importantes na hipersensibilização dos nociceptores. Essa participação ocorre, por exemplo, a partir da ação da substância P e da bradicinina sobre a produção e liberação do fator de necrose tumoral do tipo α (TNF- α) por essas células (Cunha et al., 1992).

O TNF- α induz outras células residentes a secretarem citocinas, como as interleucinas 1 e 6. Essa ação potencia o efeito pró-nociceptivo, uma vez que pode induzir a expressão de COX-2, aumentando síntese de prostaglandinas, bem como de interleucina 8, que é capaz de promover a liberação de noradrenalina por terminações nervosas simpáticas da região lesada, contribuindo para a hipersensibilização dos nociceptores (Cunha et al., 1991).

Por outro lado, a acetilcolina estimula a produção de GMP cíclico (GMPc) no nociceptor, o que promove efeito oposto ao da hipersensibilização. Esse mecanismo pode compensar, pelo menos parcialmente, os estímulos pró-nociceptivos, agindo como a buscar um equilíbrio natural do organismo entre os elementos capazes de induzir e de abolir a percepção dolorosa (Cunha et al., 1999).

Recentemente, tem sido também enfatizada a participação do óxido nítrico em fenômenos de hiperalgesia tanto periférica quanto medular. Esse gás tem a propriedade de ativar guanilato ciclase em terminais do NAP, promovendo aumento da concentração intracelular de GMPc. Embora parte da literatura aponte o óxido nítrico como agente analgésico na periferia e hiperalgésico na medula espinhal, o seu real papel em fenômenos de nocicepção e anti-nocicepção ainda é controverso (Lawand et al., 1997; Urban et al., 1999; Dolan et al., 2000; Davis et al., 2001; Sekiguchi et al., 2004).

O NO é um importante mediador dos processos inflamatórios ósteo-articulares. Foi observado, por exemplo, um aumento de sua concentração em resposta à injeção de Zy em uma grande variedade de modelos animais (Cuzzocrea et al., 1997; Paya et al., 1997; Setoquchi et al., 1996), bem como a sua redução pela administração dos inibidores do NO (Paya et al., 1997).

No entanto, ainda é bastante controversa a atuação do NO na modulação da dor em diferentes modelos experimentais.

2.3. Óxido nítrico (NO)

O reconhecimento do óxido nítrico (NO) como sendo o previamente demonstrado fator de relaxamento derivado do endotélio (FRDE) marcou uma fase de novos estudos a respeito dos mecanismos envolvidos em diversos eventos biológicos, como a pressão arterial e a inflamação.

O NO é um radical livre gasoso produzido a partir da arginina catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (**Figura 2**) (Moncada et al., 1990).

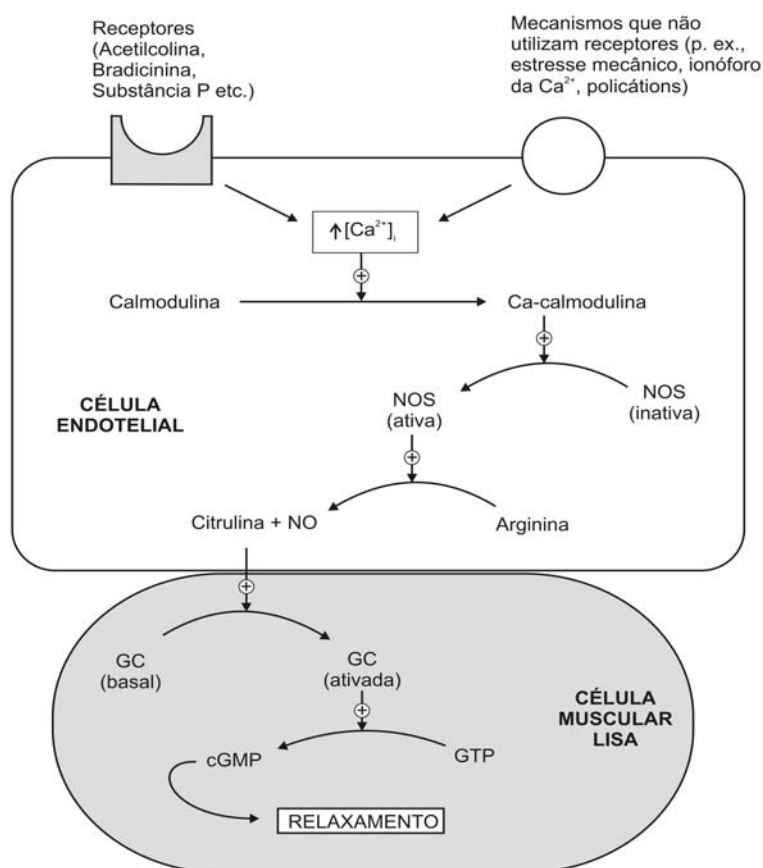


Figura 2. Regulação da guanilato ciclase solúvel no músculo liso pelo NO formado no endotélio adjacente (Knowles et al., 1989).

Essa reação tem também como produto L-citrulina e necessita da participação de cofatores como o NADPH e FAD (Knowles et al., 1989). Essa conversão é estereoespecífica, pois D-arginina não funciona como substrato para a produção de NO. Uma vez produzido, a maioria das ações do NO se devem à ativação da guanilato ciclase, resultando na formação do segundo mensageiro intracelular GMPc (Murad et al., 1990; Ignarro, 1991).

Uma grande variedade de células é capaz de produzir NO, dentre as quais se destacam células endoteliais, neutrófilos (Rees et al., 1990; McCall et al., 1991), macrófagos (Stuehr e Marletta, 1987) sinoviócitos e condrócitos (Stefanovic-Racic et al., 1994; Stichtenoth et al., 1995). Com relação aos últimos tipos celulares, foi demonstrado que o NO derivado dos condrócitos contribui de forma significativa para a quantidade total de NO produzido na cavidade articular durante artropatias inflamatórias (Stefanovic-Racic et al., 1993).

Foram descritas três isoformas da NOS, a saber: NOS endotelial (NOS1) e neuronal (NOS3), ambas expressas constitutivamente (NOSc), e a NOS2 (NOS induzida-NOSi), que tem sido detectada em algumas células após exposição a agentes inflamatórios (Fukuto e Chaudhuri, 1995).

As isoformas constitutivas levam à produção de pequenas quantidades de NO (picomoles), por curtos períodos de tempo, são cálcio-calmodulina-NADPH dependentes e estão presentes no endotélio vascular, plaquetas e cérebro. Além disso, essas isoformas estão envolvidas primariamente na modulação de processos fisiológicos associados a homeostase, tais como, relaxamento vascular, agregação plaquetária, regulação da pressão sangüínea e neurotransmissão. Por outro lado, a NOS2 pode ter sua expressão induzida em uma grande variedade de células, incluindo macrófagos, células endoteliais, hepatócitos e células da glia, por estímulos inflamatórios como citocinas (IL-1, IL-2, TNF- α) e LPS, produzindo grandes quantidades de NO (nanomoles), por longos períodos de tempo. Essa isoforma é cálcio independente e sua expressão é inibida por algumas citocinas (IL-4, IL-8, IL-10) (Oswald et al., 1992; McCall et al., 1991) e glicocorticóides (GC) (Kengatharan et al., 1996).

A inibição da NOSi pode explicar alguns dos efeitos benéficos dos GC sobre o choque séptico, asma e artrite reumatóide, em que a liberação excessiva de NO pode ser responsável pela vasodilatação e dano tissular (Moncada et al., 1991). A rigor, considera-se que o NO gerado após a indução da NOSi está envolvido em fenômenos fisiopatológicos (Moncada et al., 1991). Dados da literatura também demonstram que as atividades tumoricida e microbicida dos macrófagos são dependentes da geração de grandes quantidades de NO nessas células pela NOSi (Moncada et al., 1991).

Devido ao fato de ser um radical livre gasoso, o NO tem uma meia-vida de poucos segundos nos fluidos biológicos, sendo metabolizado, por oxidação, a nitrito (NO^{-2}), que é rapidamente metabolizado a nitrato (NO^{-3}), e excretado na urina (Cederqvist et al., 1994; Grabowski et al., 1996).

Embora o NO esteja envolvido na regulação de vários processos fisiológicos, sua liberação em excesso tem sido associada a muitos eventos patológicos, tais

como choque séptico (Thiemermann e Vane, 1990), doenças neurodegenerativas (Jenner e Olanow, 1996) e inflamatórias como a artrite reumatóide (Palmer et al., 1993; Stefanovic-Racic et al., 1994). A princípio, foi proposto que níveis elevados do NO estariam associados a dano tecidual nessas patologias. Dessa forma, agentes que modulem a atividade do NO, em particular aqueles que reduzem sua produção a partir da NOS_i, poderiam ser de considerável valor terapêutico.

Vale salientar que devido a sua curta meia-vida, a detecção do NO em sistemas *in vivo* é difícil de ser alcançada. Assim, uma forma de se estudar o envolvimento do NO em processos patológicos é através da utilização de substâncias capazes de produzir NO exógeno ou através de inibidores de sua síntese.

Os análogos estruturais da L-arginina, que atuam como falsos substratos enzimáticos ocupando os sítios de ligação entre L-arginina e a NOS, são os agentes mais comumente utilizados para inibir a produção de NO. O primeiro inibidor descrito, N^ω-monometil-L-arginina (L-NMMA), ativo por via oral, tem sido usado para identificar muitas ações fisiológicas do NO e para investigar seu papel em processos fisiopatológicos (Palmer et al., 1988; Moncada et al., 1989).

Demonstrou-se que, no modelo de artrite induzida por streptococos, L-NMMA inibiu o acúmulo de neutrófilos e a produção de NO no fluido sinovial (McCartney-Francis et al., 2001). Outros análogos da L-arginina têm sido descritos como inibidores da geração de NO, a saber: L-NIO (L^δ-iminoetil-L-ornitina), L-NA (N^ω-nitro-L-arginina) e seu metil-éster L-NAME (N^ω-nitro-L-arginina metil éster), sendo este último ativo por via oral (Gardiner et al., 1990).

No modelo de artrite por adjuvante, o tratamento com L-NAME inibiu, de forma dose-dependente, a perda de peso corporal, a proliferação de células T e os níveis de nitrito/nitrato no lavado articular (Ialenti et al., 1993). Nesse mesmo modelo, L-NAME (30 mg/kg; ip) apresentou efeitos antiinflamatórios semelhantes ao diclofenaco sódico, sugerindo que esse composto pode ser considerado um agente antiinflamatório (Oyanagui, 1994). Nesse sentido, foi sugerido que os inibidores da NOS, administrados sistemicamente, inibem a NOS₁ (endotelial), resultando em vasoconstrição, seguido por redução do fluxo sanguíneo para os sítios inflamatórios.

Essa seqüência de eventos pode resultar na redução da migração celular, sendo essa última observação interpretada como efeito antiinflamatório dos inibidores da NOS (Paul-Clark et al., 2001).

Embora os análogos estruturais da L-arginina sejam potentes inibidores da NOS, em geral mostram pouca seletividade para as isoformas da NOS (Rees et al., 1990b). Entretanto, foi demonstrado que L-NA e L-NAME inibem preferencialmente as isoformas constitutivas (Gross et al., 1990).

Além dos inibidores pouco seletivos das NOS, existem ainda compostos como o N-(3-(Aminometil) benzil) acetamidina (1400W) e o 7-nitroindazole (7-NIL), que foram demonstrados como capazes de inibir de forma seletiva a NOSi (Garvey et al., 1997) e a NOS3 (Ayajiki et al., 1993).

De fato, o tratamento com 1400W reduziu, de forma dose-dependente, o dano vascular induzido por LPS associado com indução da NOSi em vários tecidos de ratos (Garvey et al., 1997). Foi demonstrado que todos os inibidores da NOSi, considerados seletivos, incluindo aminoguanidina, L-NIO e isotiouréias, são cerca de 30 vezes mais potentes sobre a NOSi, quando comparado com a NOS1 (Wolff e Lubeskie, 1995; Connor et al., 1995; Nakane et al., 1995), enquanto que o 1400W é cerca de 5000 vezes mais potente contra a NOSi humana, quando comparado com a NOS1 (Garvey et al., 1997). De fato, o 1400W é um inibidor relativamente ineficiente e reversível da NOS1 e 3.

O 7-NIL tem sido considerado um inibidor seletivo da NOS3 e a sua utilização no tratamento de ratos com artrite por adjuvante reduziu a inflamação articular, sugerindo um papel da NOS3 nesse modelo de artrite (Pozza et al., 1998). Ademais, o 7-NIL apresenta ações anti-nociceptivas e reduz os distúrbios do comportamento associado com o fenômeno de retirada dos opióides (Babbedge et al., 1993). Além disso, os derivados imidazol (trimetilfenilfluoroimidazol), outra categoria de inibidores da NOS, possuem potente atividade anti-NOS3, semelhante ao observado com o 7-NIL.

Em resumo, o desenvolvimento de novos compostos que apresentem ação seletiva para NOSi ou NOSc pode representar uma importante ferramenta para o estudo das ações fisiológicas e patológicas do NO nos vários tecidos, permitindo

distinguir a participação de cada uma das isoformas nos diferentes eventos estudados.

Além disso, recentes estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que citocinas pró-inflamatórias, particularmente TNF- α , induzem a expressão da NOSi, levando a formação de grandes quantidades de NO durante eventos fisiopatológicos (Adams et al., 2002; Sugamori et al., 2002; Howe et al., 2002; Cho e Chae, 2002). De fato, em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, observou-se uma relação positiva entre as concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato e as concentrações de TNF- α (Sugamori et al., 2002). Esses autores também demonstraram que TNF- α participa na produção local e sistêmica de NO. Ainda, foi sugerido que TNF- α contribui para a sinovite na AR, uma vez que a inflamação sinovial foi exacerbada pela administração de TNF- α (Matsuno et al., 2002). Estudos anteriores também detectaram TNF no soro e líquido sinovial de pacientes com AR (Tetta et al., 1990; Barrera et al., 1993). Desta forma, considerando-se o envolvimento de TNF- α na fisiopatologia de várias doenças inflamatórias, tem sido sugerido, atualmente, o uso de agentes anti-TNF- α para o tratamento de artropatias inflamatórias (Moreland e Mischia, 2002; Maini e Feldmann, 2002; Kalden, 2002; Lorenz e Kalden, 2002). Dentre os antagonistas de TNF- α , uma versão dimerizada do receptor solúvel do TNF (Etanercept) e um anticorpo monoclonal anti-TNF- α (Infliximab) foram aprovados para o tratamento da AR, a partir de resultados obtidos em ensaios clínicos (Criscione e Clair, 2002; Keating e Perry, 2002). Alguns autores demonstraram que o uso desses agentes em pacientes com AR reduziu os sinais e sintomas da doença, melhorou a função física e retardou a progressão da lesão estrutural (Keating e Perry, 2002). Também foi demonstrado o efeito protetor do tratamento com anticorpo anti-TNF ou com o receptor solúvel recombinante de TNF (que bloqueia a ação do TNF) sobre a artrite induzida por colágeno em camundongos (Piguet et al., 1992; Williams et al., 1992). Além disso, também foram mostrados os efeitos antiinflamatórios de um inibidor da enzima conversora de TNF- α em modelos experimentais de artrite (Tsuji et al., 2002). Desta forma, a descoberta desses agentes (anti-TNF- α) representa uma nova era da terapêutica da AR e o estudo dos mecanismos desta citocina em artropatias inflamatórias pode contribuir

para melhor compreensão da fisiopatologia da AR e busca de alternativas terapêuticas que possam alterar o curso evolutivo dessa doença.

2.3.1 Óxido nítrico e artrite

Tem sido largamente demonstrado que o NO participa dos eventos fisiopatológicos da artrite através da detecção de nitrito/nitrato no líquido sinovial de pacientes com AR (Farrel et al., 1992; Stichtenoth et al., 1995; Ueki et al., 1996). Entretanto, a importância do NO nesse processo ainda carece de estudos mais aprofundados, uma vez que diferentes tipos celulares que estão presentes na sinovite, incluindo macrófagos, neutrófilos, sinoviócitos, fibroblastos e células endoteliais, podem liberar NO (Stuehr e Marletta, 1987, McCall et al., 1991, Stefanovi-Racic et al., 1994; Stichtenoth et al., 1995).

No modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos, foi observada elevada geração de nitrito por macrófagos coletados da cavidade peritoneal (Ialenti et al., 1993) e que a excreção urinária de nitrato aumentou com a progressão da doença (Stichtenoth e Frolich, 1998). O tratamento desses animais com L-NAME reduziu a excreção urinária de nitrato na mesma extensão que a dexametasona (Ialenti et al., 1993). O envolvimento da via L-arginina-NO nesse modelo foi sugerido pela observação de que L-arginina exacerba o edema de pata e a perda de peso, enquanto que L-NAME inibe essas alterações e D-arginina não afeta a doença (Ialenti et al., 1993). Ademais, a aminoguanidina ou o L-NIL reduziu os níveis plasmáticos de nitrito nesse modelo de artrite (Connor et al., 1995). Na artrite induzida por parede de *Streptococcus*, foi demonstrado aumento da expressão da NOS_i e produção de NO no tecido sinovial dos animais submetidos à artrite. A administração de L-NMMA inibiu a liberação de NO, o edema e o infiltrado celular inflamatório que se observa nas articulações desses animais (McCartney-Francis et al., 1993). Na artrite induzida por colágeno em ratos, observou-se produção aumentada de NO, através do aumento da excreção urinária de nitrato e da expressão da NOS_i nos tecidos sinoviais (Cannon et al., 1996). O tratamento com aminoguanidina ou L-NIL inibiu a produção de NO nesse modelo de artrite (Vermeire et al., 2000). Além da importância das interações do NO com os diferentes

mediadores inflamatórios que estão envolvidos em doenças reumáticas, o NO pode interferir com os mecanismos de reabsorção óssea em artropatias inflamatórias como a AR e osteoporose. Foi sugerido que a reabsorção óssea observada nesses processos pode ser associada à liberação de NO por osteoclastos induzida por citocinas. De fato, foi demonstrado que citocinas (IL-1 e TNF) estimulam a reabsorção e suprimem a formação óssea (Ralston et al., 1995; Van't Hof e Ralston, 1997) e que a produção aumentada de NO, mediada por essas citocinas, potencia os efeitos de IL-1 e TNF sobre a atividade de osteoclastos e osteoblastos *in vitro* (Ralston et al., 1995; MacPherson et al., 1999). Por outro lado, foi demonstrado que o NO é capaz de inibir a função de osteoclastos por um mecanismo independente de GMPc e diferente do efeito da calcitonina (MacIntyre et al., 1991). Ademais, no modelo de osteoporose inflamatória em ratos, L-NMMA reduziu a perda óssea e as anormalidades observadas no turnover ósseo, sugerindo que os inibidores da NOS podem ter um papel terapêutico na prevenção da perda óssea associada com doenças inflamatórias como a AR (Armour et al., 1999). Curiosamente, outros autores mostraram que L-NAME inibiu a formação óssea sob condições de sobrecarga mecânica, não associada à inflamação. Esse achado sugere que grandes quantidades de NO, como se observa durante a resposta inflamatória, potencializam a perda óssea, enquanto que a produção constitutiva de NO parece proteger da perda óssea (Turner et al., 1996).

Ainda não está claro se a participação do NO na artrite é de natureza pró ou antiinflamatória. Os possíveis efeitos pró-inflamatórios do NO incluem aumento da permeabilidade vascular nos sítios inflamatórios, geração de radicais livres associados com dano tissular, como peroxinitrito e radicais hidroxil (Lander et al., 1993), indução da ciclooxigenase, geração de citocinas inflamatórias (McInnes et al., 1996; Lander et al., 1993), ativação de metaloproteinases de matriz e indução de apoptose em condrócitos (Blanco et al., 1995). Esses achados estabelecem um papel crucial do NO como um potente mediador inflamatório. Por outro lado, o NO inibe a síntese de DNA nas células T, associada com o acúmulo intracelular de GMPc, o que pode explicar a supressão da função das células T em pacientes com AR (Merryman et al., 1993). Nesse aspecto, tem-se apontado que o NO também pode exercer efeitos antiinflamatórios que contribuem para modificar o curso da AR (Murrel et al., 1996).

Uma conseqüência da liberação dos mediadores inflamatórios durante o curso da inflamação é a modulação do limiar e sensibilidade dos nociceptores, levando à dor inflamatória. O NO parece estar envolvido neste processo, embora ainda não esteja claro se o mesmo aumenta ou diminui o limiar da dor. Certos agentes que estimulam a formação de GMPc através da ativação da guanilato ciclase, como os nitrovasodilatadores, diminuem a atividade funcional dos nociceptores (Duarte et al., 1992). Foi demonstrado que o efeito antinociceptivo periférico da morfina em ratos pode se dar via ativação de GMPc (Ferreira et al., 1996). No modelo de hiperalgesia por formalina na pata de camundongos, a administração de L-arginina, mas não D-arginina, aumentou a resposta nociceptiva a este agente nocivo. Ainda, L-NAME, mas não D-NAME, causou um efeito antinociceptivo dose-dependente no mesmo modelo (Kawabata et al., 1994). De forma semelhante, a nocicepção induzida pela injeção de formalina na pata de ratos é potencializada pela administração intraventricular de doadores do NO (Haley et al., 1992). Esses achados sugerem a participação do NO na mediação dos fenômenos álgicos da inflamação, sugerindo um possível papel dos inibidores da NOS na redução da dor inflamatória. Entretanto, a confirmação do efeito analgésico ou nociceptor do NO ainda carece de investigações adicionais.

Estudos eletrofisiológicos, por exemplo, demonstraram que a administração intravenosa (i.v) de L-NAME reduz a resposta motora reflexa ao estímulo nociceptivo térmico de forma semelhante em patas normais e inflamadas com óleo de mostarda e reverte a resposta motora reflexa em patas inflamadas por carragenina, mas não em patas normais (Semos e Headley, 1994). Ainda, o inibidor da NOS, N^G-monometil - L-arginina (LN^{MMA}), impediu tanto a indução quanto a manutenção da hiperalgesia mecânica induzida pela administração intradérmica (i.d) de prostaglandina E₂ (PGE₂) (Alley et al., 1998).

Foi também observado que a administração i.d. de L-arginina ou de 3-4-morphino-sydnonimina (SIN-1), um doador de NO, produzem hiperalgesia mecânica (Alley et al., 1998). Outros relatos demonstram que a injeção i.p de peroxinitrito, metabólito do NO, não altera a resposta a estímulos mecânicos (Ridger et al., 1997) e que a administração i.t. de L-NAME não reverte a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina (Meller et al., 1994). Esses resultados demonstram que o papel do NO na nocicepção ainda carece de maiores investigações.

De fato, a importância do NO na resposta inflamatória em diferentes modelos de artrite tem sido amplamente relatada. No entanto há, ainda, uma grande diversidade de resultados controversos. Foi demonstrado, por exemplo, que o tratamento diário com L-NMMA i.v inibiu o desenvolvimento da inflamação da pata nas fases aguda e crônica da poliartrite induzida por peptídeoglicano/polissacarídeo, bem como a produção de nitrato por células mononucleares do sangue periférico (McCartney-Francis et al., 1993). Outros têm demonstrado que L-NMMA (Stefanovic-Racic et al., 1995), além de inibir seletivamente a NOS indutiva (NOSi), expressa durante a inflamação, atenua o desenvolvimento da inflamação da pata quando administrado de forma profilática (Connor et al., 1995), mas não de forma terapêutica (Fletcher et al., 1998; McCartney-Francis et al., 2001) em modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos.

Na artrite induzida por zymosan em ratos, foi observado que o tratamento profilático, mas não o terapêutico, com L-NAME ou aminoguanidina, inibiu a incapacitação articular presente no modelo quando administrados de forma sistêmica ou local. O mesmo foi observado com o tratamento profilático com 1400W, inibidor seletivo da NOSi, quando administrado por via i.a (Rocha et al., 2002). Neste mesmo modelo, foi ainda observado que o tratamento i.a com doadores de NO, SIN-1 ou nitroprussiato de sódio (NPS), inibiu a incapacitação articular quando administrados terapêuticamente. (Rocha et al., 2002).

No modelo de dor neuropática induzida pela ligadura crônica do nervo ciático em ratos, por exemplo, a administração intratecal (i.t) de baixas doses de SIN-1 reduziu alodinia mecânica, enquanto que altas doses não apresentaram efeito ou aumentaram a resposta nociceptiva. Nesse estudo, foi também observado que a administração i.t. de 1H-[1, 2,3]oxadiazolo[4,3- α]quinoxalin-1-one (ODQ), inibidor da guanilato solúvel, ou de hemoglobina, "scavenger" de NO, reverteu o efeito antinociceptivo de baixas doses de SIN-1, além de ter reduzido seu efeito nociceptivo em altas doses (Sousa e Prado, 2001). Ainda nesse estudo, foi observado que o uso de um análogo da guanilato ciclase, 8-Bromo-GMP, ou de inibidores da NOS, L-NOARG ou L-NMMA, reduziu a alodinia mecânica nos ratos com dor neuropática. Esses efeitos foram inibidos pelo tratamento prévio com ODQ. Tais resultados sugerem que SIN-1 e inibidores da NOS reduzem a dor no modelo

utilizado através de um mecanismo espinhal que envolve a ativação da guanilato ciclase. Além disso, os possíveis efeitos do SIN-1 dependem da dose utilizada e do modelo estudado (Sousa e Prado, 2001).

Há ainda estudos que relatam o envolvimento dos receptores NMDA nos mecanismos espinhais que modulam a hiperálgia térmica. Acredita-se que a participação desses receptores é mediada através da produção de NO, havendo, portanto, uma relação próxima entre o NO e os receptores NMDA na modulação da sensação dolorosa (Meller e Gebhart, 1993).

Estudos sugerem que o uso de diferentes antagonistas do receptor de NMDA suprime a sensibilização central em modelos animais e há várias demonstrações de sua eficácia também em humanos (Eide et al., 1994; Eisenberg e Pud, 1994). Algumas das drogas capazes de inibir o receptor de NMDA, como a ketamina, têm seu uso limitado devido a seus efeitos psicomiméticos, enquanto outros fármacos, como o dextrometorfano, apresentam bons resultados (Bennett, 2000).

Estudos experimentais também revelam que a hiperálgia associada com tolerância narcótica pode ser revertida pelo tratamento com MK-801, outro antagonista do receptor de NMDA, indicando que os receptores de NMDA são importantes também para a expressão da hiperálgia térmica em ratos tolerantes a morfina (Mao et al., 1994). Dessa forma, ficou então determinado que os mecanismos que envolvem este tipo de tolerância interagem diretamente com a sensibilidade dolorosa, incluindo a ativação dos receptores de NMDA mediada por glutamato, auxiliando no estabelecimento de novas terapias utilizando analgésicos opióides com a administração adjuvante de antagonistas dos receptores de NMDA (Bennett, 2000; Price et al., 2000).

Embora exista uma grande quantidade de estudos avaliando os mecanismos e mediadores envolvidos nos diferentes modelos de dor, ainda há muito que se esclarecer no que se refere ao envolvimento de componentes do sistema nervoso central na modulação da dor periférica. Este fato se torna particularmente importante no papel do NO na modulação da dor inflamatória.

3 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Com base no exposto, embora existam controvérsias sobre o efeito do NO na modulação de hiperalgesia, como agente pró ou anti-nociceptivo, está definido que esse mediador modula esse fenômeno. No entanto, a repercussão ao nível do sistema nervoso central da hiperalgesia inflamatória ainda carece de investigações. Usando o modelo de artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos, nossos objetivos são:

1) Investigar a repercussão em nível central da dor inflamatória articular na fase aguda da AZy;

2) Analisar o efeito da modulação dos níveis de NO no SNC sobre a hipernocicepção na fase aguda da AZy, por meio da administração de doadores de NO e inibidores da NO sintase;

3) Analisar o efeito da modulação central da guanilato ciclase solúvel sobre a hipernocicepção na fase aguda da AZy, por meio da administração intratecal de análogos ou de inibidores da GMPc;

4) Analisar o efeito da administração intratecal de um antagonista de NMDA na fase aguda da AZy.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 234 ratos Wistar machos (*Ratus norvegicus*), pesando entre 200 e 230 gramas, fornecidos pelo biotério central do Campus do Pici-UFC que permaneceram no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em condições controladas de temperatura (21°C), sob um ciclo de claro/escuro de 12/12 horas, com livre acesso à água e alimentação, até serem utilizados nos experimentos. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. Além disso, todos os procedimentos foram realizados seguindo as diretrizes preconizadas pelo Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (National Research Council, 2003) e as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto científico deste trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Ceará, recebendo o nº 05/03.

4.2 Soluções, drogas e reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza e propriedades analíticas adequadas e as drogas utilizadas foram: **Cloral Hidratado** (REAGEN - Brasil); N^o-nitro-L-arginina-metil éster (**L-NAME**), 1H -[1,2,4] Oxadiazol [4,3-a] quinoxalin - 1 - um (**ODQ**), **Zymosan A**, 3-Morfolinossidnonimina (**SIN-1**), 7-Nitroindazole (**7-NIL**) (SIGMA St. Louis, MO., USA); maleato de dizocilpina (**MK-801**), N - [[3 - (aminoetil) fenil] metil] - etanimidamida dihidroclorida (**1400 W**), 8-Bromo - Guanosina 3',5' - Monofosfato cíclica (**8-Bromo-GMPc**) (CAYMAN CHEMICAL Co., USA).

4.3 Protocolo experimental

Seguindo o desenho experimental ilustrado na figura 3, grupos de animais eram submetidos à indução da artrite por zymosan (AZy) e ao procedimento cirúrgico (detalhado a seguir), para colocação de uma cânula no espaço subaracnóideo, para administração de compostos por via intratecal.

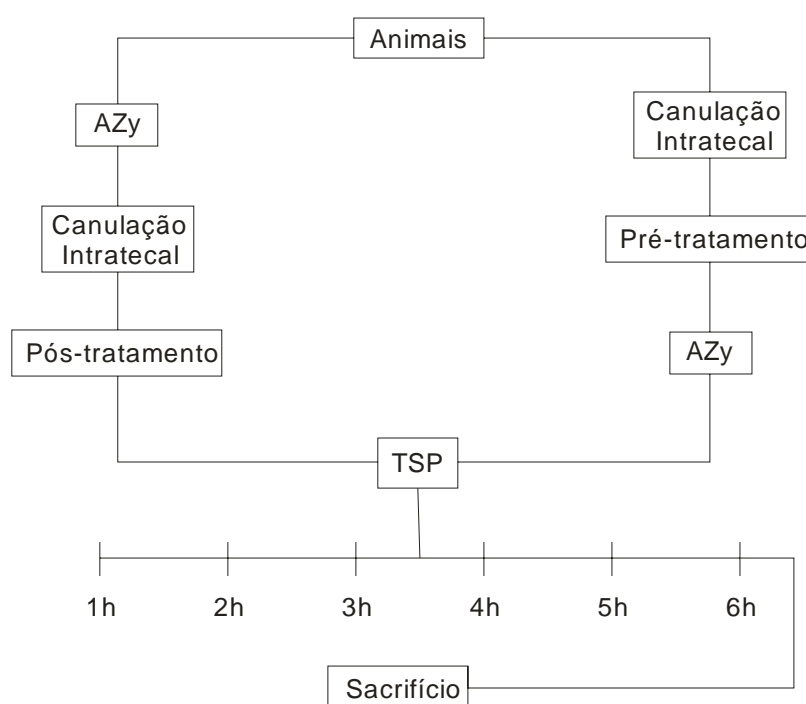


Figura 3 - Esquema ilustrativo do protocolo experimental utilizado no estudo da modulação central na artrite induzida por zymosan em ratos.

4.4 Indução da artrite por zymosan (AZy)

Os ratos eram submetidos, sob leve anestesia com éter etílico, à indução da AZy através da injeção intra-articular, no joelho direito, de 1 mg de zymosan diluído em 50 μ L de solução salina estéril, apirogênica (Keystone et al., 1977). Os animais eram sacrificados, sob anestesia (cloral hidratado 400mg/kg; i.p), por exsanguinação, em diferentes intervalos de tempo. O grupo controle recebia apenas injeção intra-articular de solução salina no joelho direito.

4.5 Administração de fármacos

A técnica para administração intratecal foi realizada como descrito anteriormente (Sousa e Prado, 2001), com pequenas modificações, descritas a seguir: era realizada, sob anestesia, uma incisão cutânea, longitudinal, ao longo da linha intervertebral, ao nível da região lombar dos animais, deixando o plano muscular intacto. Em seguida, uma agulha de 7 cm, de ponta curva e romba (1 mm de diâmetro externo) era inserida perpendicularmente à coluna vertebral, entre os processos espinhosos das vértebras L5 e L6, posicionando-se o bisel na direção rostral do animal (**Figura 4**). A localização correta da agulha no espaço subaracnóideo era confirmada pelo aparecimento de um movimento reflexo lateral da cauda do animal. Posteriormente, um cateter de polietileno (PE-10 – Becton-Dickinson®) de 10 cm de comprimento, contendo um mandril de aço de 100 µm de diâmetro, era inserido por 2 cm, lentamente, através da agulha, na direção rostral, a partir do seu extremo. Após esse procedimento, o mandril e, em seguida, a agulha, eram retirados. O cateter remanescente era então prontamente fixado à musculatura por sutura. As substâncias eram administradas em um volume total de 10 µL, através de uma microseringa Hamilton® acoplada ao cateter intratecal por meio de um conector também de polietileno (PE-50 – Becton-Dickinson®). Após a administração das drogas, o cateter era retirado e a síntese da pele era feita com fio de nylon (3-0). Todas as etapas eram realizadas sob leve anestesia com éter.



Figura 4 - Esquema ilustrativo do sítio de inserção da agulha através do espaço intervertebral entre L5 e L6 e da localização do cateter de polietileno para administração intratecal.

4.6 Avaliação da incapacitação articular (IA)

O teste de incapacitação articular foi padronizado por Tonussi e Ferreira (1992) e modificado em nosso laboratório. Os animais eram postos para deambular em um cilindro metálico (30 cm x 50 cm) que gira a 3 rpm. Sapatilhas metálicas eram adaptadas, 30 min antes do início do teste, em ambas as patas traseiras dos animais. A sapatilha da pata direita, local da injeção de Zy, era conectada a um circuito de aquisição de dados. O Tempo de Suspensão da Pata (TSP) era tomado como o tempo que o animal deambula sem tocar o cilindro, durante um período de 60 segundos, o qual é diretamente proporcional à IA. Os animais eram submetidos a medidas horárias sucessivas, durante 6 horas (Figura 5).

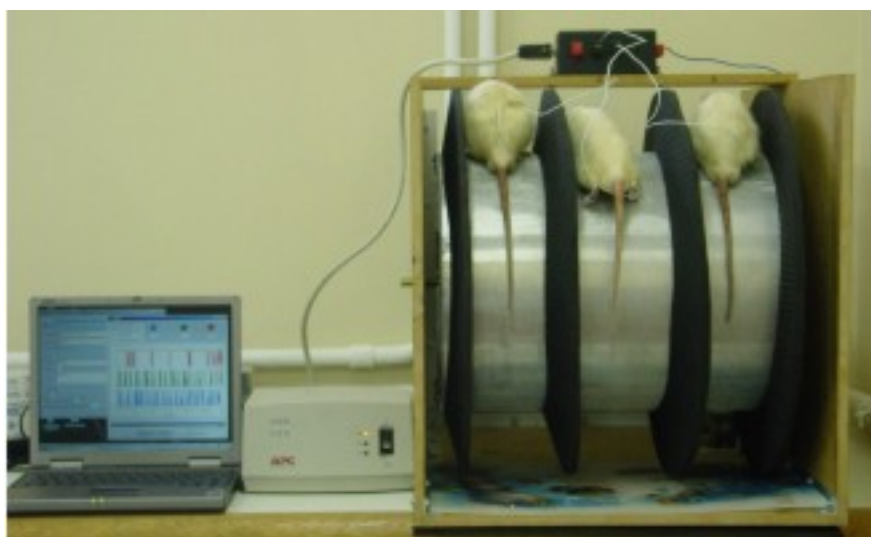


Figura 5 - Fotografia do sistema utilizado para o teste de incapacitação articular do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias - Departamento de Medicina Clínica - Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará.

4.7 Coleta do líquido

Os animais eram anestesiados (Cloral Hidratado – 400 mg/kg, i.p), fixados em um aparelho para esterotaxia e posicionados com a cabeça flexionada, permitindo a exposição da protuberância occipital. Em seguida, era realizada uma incisão na pele, no sentido longitudinal, caudal à referida protuberância. O plano muscular era divulsionado e a membrana atlanto-occipital exposta. A coleta de líquido era então

realizada por punção aspirativa da cisterna magna, utilizando-se uma agulha hipodérmica (25 x 7 mm) acoplada a uma cânula de polietileno (PE-50 – Becton-Dickinson®).

4.8 Coleta do lavado articular

Os animais eram sacrificados, sob anestesia (Cloral Hidrato – 400 mg/kg, i.p), por exsanguinação. A seguir, a lavagem das articulações era realizada fazendo-se duas injeções de 0,2 mL de salina estéril apirogênica, contendo 5UI/mL de heparina, na cavidade articular. O lavado sinovial era então coletado por aspiração e mantido em banho de gelo para posterior processamento.

4.9 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO no lavado articular e no líquido foi determinada através da quantificação dos níveis de nitrato e nitrito, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, utilizando-se o método de Griess (Granger et al., 1996). Os níveis totais de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ eram determinados com o NO_3^- nas amostras (0,08 mL) convertido a NO_2^- pela incubação de 0,01 mL de nitrato redutase de espécies de *Aspergillus* (1 unidade/mL) e 0,01 mL de NADPH (1 mM) por 30 minutos à 37°C. Os níveis de NO_2^- eram determinados por espectrofotômetro (540 nm), comparando a absorbância de 0,1 mL da amostra após a adição de 0,1 mL do reagente de Griess (ácido sulfanílico a 1%, N-1-naftil-etilenodiamino 0,1% e ácido fosfórico a 5%) àquela dos padrões de nitrito (1-100 μM). Todos os testes eram realizados em duplicata e os resultados expressos em média \pm e.p.m. das concentrações em μM .

4.10 Cinética dos níveis endógenos de nitrato/nitrito

Para se investigar os níveis endógenos de nitrato/nitrito, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, ao nível central e periférico na AZy, grupos de animais receberam inicialmente uma injeção

intra-articular de zymosan no joelho direito, conforme item 5.4. Em seguida, os animais eram sacrificados por exsanguinação, sob anestesia (Hidrato de Cloral – 400 mg/kg, i.p), em diferentes intervalos de tempo (1h, 3h, 6h, 12h, ou 24h). O líquido e o lavado articular foram coletados nesses intervalos de tempo para a detecção dos níveis de nitrato/nitrito através do método de Griess, conforme descrito no item 4.9.

4.11 Modulação farmacológica

A modulação farmacológica da dor periférica no modelo de artrite induzida por zymosan em ratos foi realizada através da utilização de compostos capazes de agir sobre a via do óxido nítrico. Para tanto, foram utilizadas duas estratégias de tratamento: uma intervenção 30 min antes da indução da artrite, chamada de intervenção profilática, e outra realizada 2 h após a indução da artrite, chamada de intervenção terapêutica, conforme descrito no item 4.3. Grupos de animais receberam tratamento com os veículos utilizados para diferentes diluições e não houve comprometimento na capacidade de deambulação dos mesmos.

Assim, o protocolo experimental foi desenvolvido através da administração intratecal de diferentes fármacos, descrito a seguir:

4.11.1 Doador de óxido nítrico

i. **SIN-1**: diluído em solução estéril apirogênica nas doses de 10, 20 40 µg/10µL (i.t), 2 h após (pós-tratamento) a indução da AZy.

4.11.2 Inibidores da óxido nítrico sintase

i. **L-NAME**: diluído em solução salina estéril apirogênica na dose de 3 mg/10µL (i.t), 30 min antes (pré-tratamento) ou 2 h após (pós-tratamento) a indução da AZy.

ii. **1400W**: diluído em solução salina estéril apirogênica na dose de 0,1 µmol/10µL (i.t), 30 min antes (pré-tratamento) ou 2 h após (pós-tratamento) a indução da AZy.

iii. **7-NIL**: diluído em cremofor (3%) na dose de 1,1 $\mu\text{mol}/10\mu\text{L}$ (i.t), 30 min antes (pré-tratamento) da indução da AZy.

4.11.3 Inibidor da guanilato ciclase solúvel

i. **ODQ**: diluído em DMSO (1%) na dose de 4 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ (i.t), 30 min antes (pré-tratamento) ou 2 h após (pós-tratamento) e a indução da AZy.

ii. **ODQ**: diluído em DMSO (1%) na dose de 4 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ (i.t), 30 min após o tratamento com SIN-1 na dose de 40 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ i.t o qual foi administrado 2 h após (pós-tratamento) a indução da AZy.

iii. **ODQ**: diluído em DMSO (1%) na dose de 4 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ (i.a), 30 min após o tratamento com SIN-1 na dose de 40 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ i.t, o qual foi administrado 2 h após (pós-tratamento) a indução da AZy.

4.11.4 Análogo da guanosina 3',5' monofostasfo cíclica (GMP_c)

i. **8-BROMO-GMP_c**: diluído em solução salina estéril apirogênica na dose de 10 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ (i.t), 2 h após (pós-tratamento) a indução da AZy.

4.11.5 Antagonista do receptor de NMDA

i. **MK-801**: diluído em solução salina estéril apirogênica na dose de 4 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ (i.t), 30 min antes (pré-tratamento) ou 2 h após (pós-tratamento) a indução da AZy.

ii. **MK-801**: diluído em solução salina estéril apirogênica na dose de 4 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ (i.t), 30 min após o tratamento com SIN-1 na dose de 40 $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ i.t, o qual foi administrado 2 h após (pós-tratamento) a indução da AZy.

4.12 Análise estatística

Para comparações múltiplas entre médias foi usada a análise de variância univariada (ANOVA), seguido de teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados eram expressos como média \pm e.p.m.

5 RESULTADOS

5.1. Efeito da canulação intratecal sobre a medida da hipernocicepção na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos

5.1.1. Incapacitação articular (IA) na AZy – efeito da canulação intratecal.

A injeção intra-articular (i.a.) de zymosan (Zy) (1mg) produziu aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo (s) de suspensão da pata (TSP) ($23,93 \pm 0,67$) (grupo não-tratado-NT), em relação ao grupo controle (C) ($7,73 \pm 0,41$), sendo máximo entre a 3^a e 4^a hora da AZy. Ainda, os animais que foram submetidos à colocação da cânula, seguido de administração intratecal (i.t) de salina e injeção i.a. de Zy, não apresentaram diferença ($p > 0,05$) no TSP ($23,82 \pm 0,67$) quando comparados com o grupo NT. O TSP dos animais do grupo sham ($10,84 \pm 1,14$) foi semelhante ao do grupo controle (C) (Fig.6).

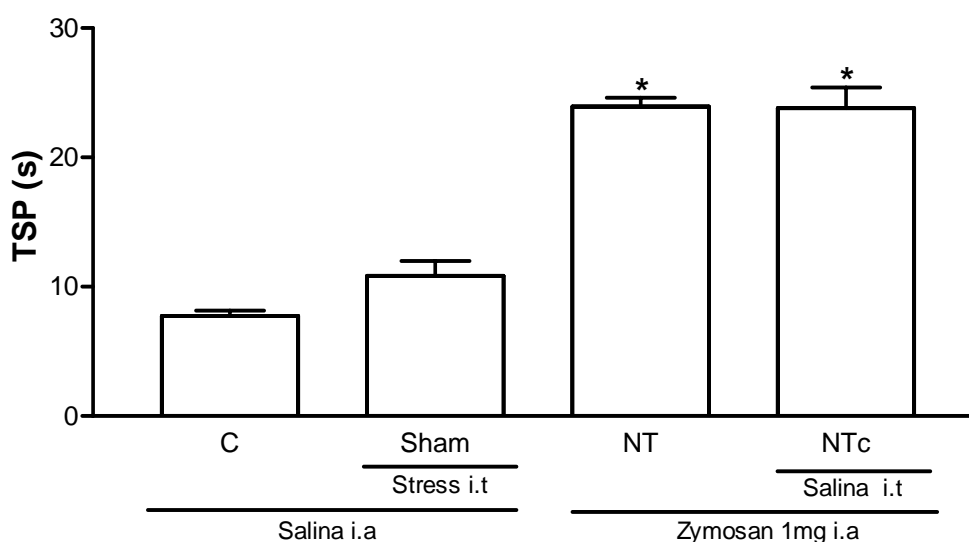


Figura 6 - Tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à AZy e à cirurgia para canulação intratecal. A primeira coluna representa o grupo controle (C) que recebeu salina i.a. Os animais do grupo Sham receberam salina i.a e foram submetidos ao stress cirúrgico. O grupo NT recebeu Zy i.a. O grupo NTc recebeu Zy i.a e salina i.t. Os dados representam a média \pm EPM do TSP/segundo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

5.1.2 Cinética das concentrações de nitrito no líquido e no lavado articular de ratos na AZy.

a. A figura 7 mostra que os níveis de nitrito obtidos no líquido dos animais, após a indução da AZy, apresentam queda significativa na 1ª e 3ª horas após a injeção do zymosan. Os valores de nitrito foram $14,2 \pm 2,4$; $8,7 \pm 0,9^*$; $8,9 \pm 0,8^*$; $11,7 \pm 0,8$; $11,4 \pm 1,3$ e $13,9 \pm 0,8$ para basal, 1, 3, 6, 12 e 24h, respectivamente, após a injeção do Zy (asterico representa $p < 0,05$).

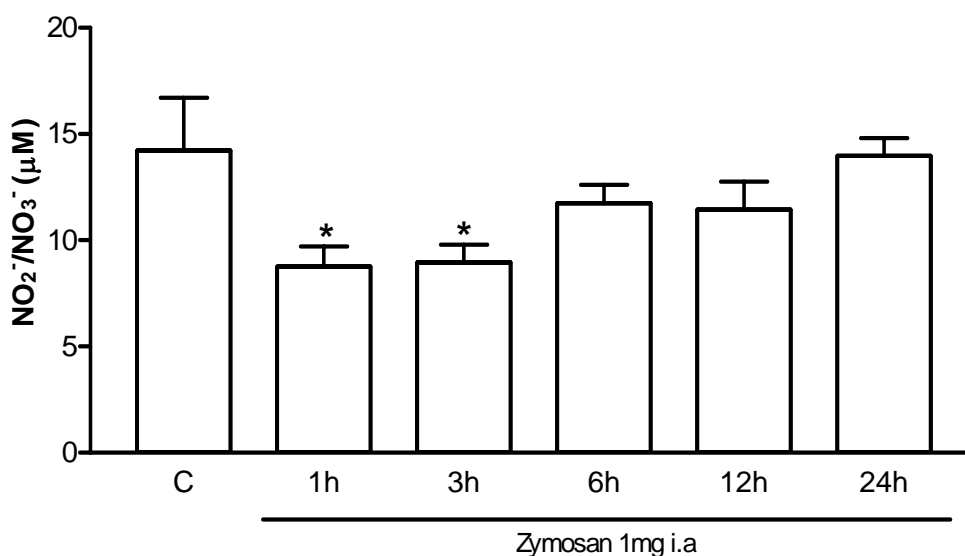


Figura 7 - Concentração de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (μM) no líquido de ratos submetidos à AZy. A primeira coluna representa o grupo controle (C) e as demais colunas representam a cinética em diferentes intervalos de tempo (1, 3, 6, 12 e 24h) da concentração de nitrato/nitrito no líquido dos animais. Os dados representam a média \pm EPM dos níveis de nitrito ($\mu\text{moles/l}$) de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

b. A figura 8 representa os níveis de nitrito no lavado articular desses animais, sendo de $6,02 \pm 0,75$; $29,0 \pm 3,0^*$; $54,0 \pm 7,5^*$; $61,5 \pm 3,75^*$; $12,62 \pm 1,78$ e $15,66 \pm 4,99$ para basal, 1, 3, 6, 12 e 24h, respectivamente, após a injeção do Zy. Observa-se aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis às 3 e 6 horas de artrite, em contraste com a queda observada ao nível do SNC (Fig. 7).

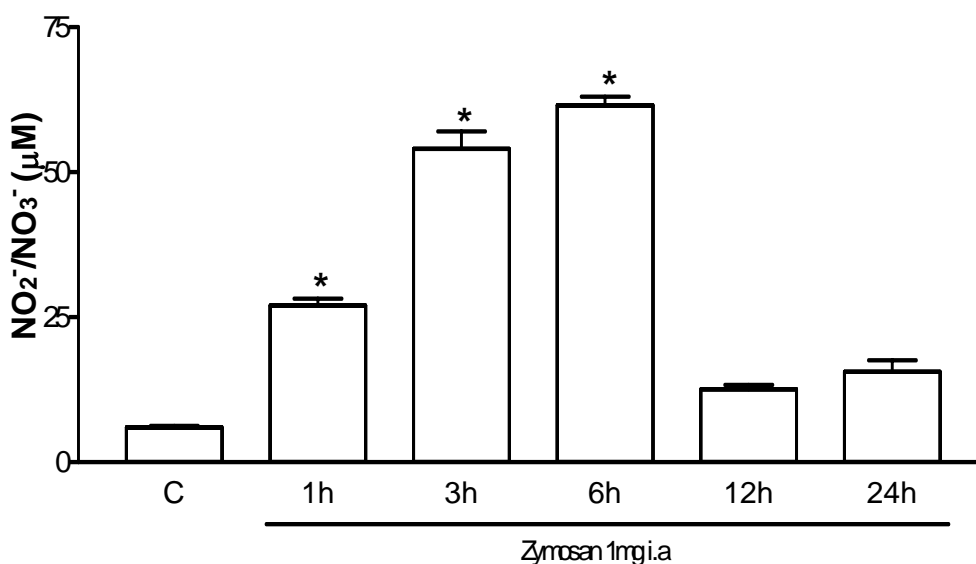


Figura 8 - Concentração de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (μM) no lavado articular de ratos submetidos à AZy. A primeira coluna representa o grupo controle (C) e as demais colunas representam a cinética em diferentes intervalos de tempo (1, 3, 6, 12 e 24h) da concentração de nitrato/nitrito no lavado articular dos animais. Os dados representam a média \pm EPM dos níveis de nitrito ($\mu\text{moles/l}$) de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

5.1.3 Cinética do tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos na AZy.

A figura 9 mostra que o TSP dos animais, após a indução da AZy, aumenta com o desenvolvimento da artrite, ocorrendo pico de incapacitação articular, que representa a dor no modelo, às 3 h e queda progressiva às 6 h da artrite. Os valores do TSP foram $6,2 \pm 0,6$; $11,1 \pm 0,6^*$; $27,6 \pm 0,8^*$; $16,1 \pm 0,7^*$; $9,5 \pm 0,7$ e $7,5 \pm 0,7$ para basal, 1, 3, 6, 12 e 24h, respectivamente, após a injeção do Zy (asterico representa $p < 0,05$).

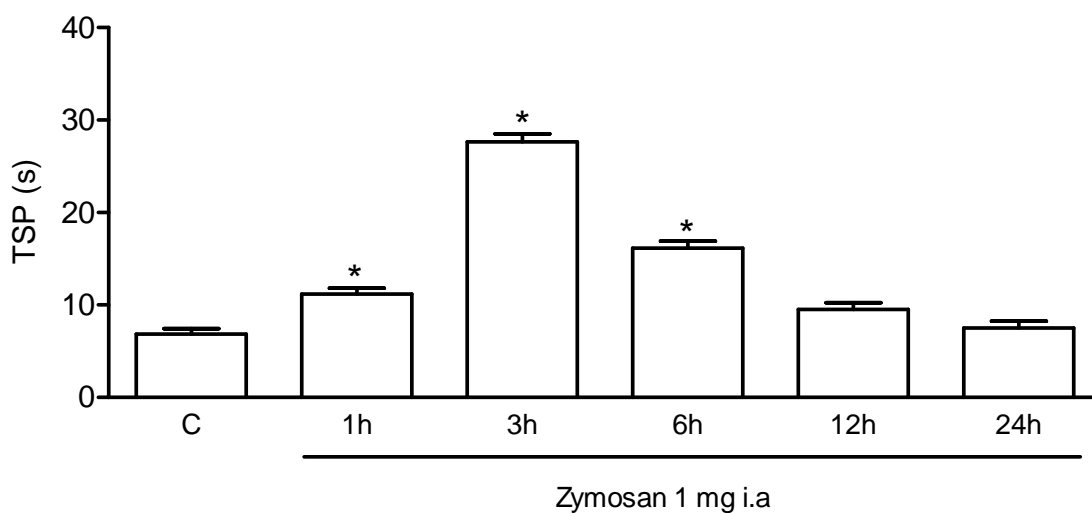


Figura 9 – Cinética no tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à AZy. Os animais do grupo C receberam salina i.a. Os demais grupos receberam 50 μ L de zymosan i.a. Os dados representam a média \pm EPM do TSP em segundo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

5.2. Modulação farmacológica

5.2.1 Efeito da administração de um doador de óxido nítrico (SIN-1) na hipernocicepção da AZy.

A figura 10 mostra que a administração intratecal de 10 μg de SIN-1, feita 2 horas após a injeção do zymosan, inibiu de forma significativa a IA ($p < 0,05$). Curiosamente, a administração de doses maiores (20 ou 40 μg) de SIN-1 aumentou a IA, alcançando significância estatística na dose de 40 μg ($p < 0,05$).

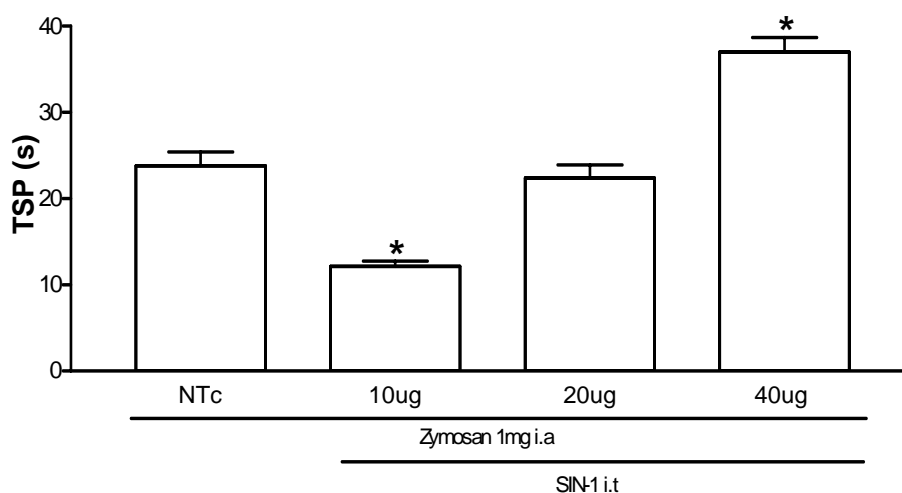


Figura 10 - Tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à AZy e tratados com um doador de NO (SIN-1). Os animais do grupo NTc receberam Zy i.a e salina i.t. Os demais grupos receberam, respectivamente, 2 horas após a AZy, SIN-1 10 μg , 20 μg ou 40 μg i.t. Os dados representam a média \pm EPM do TSP em segundo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

5.2.2 Efeito da administração de inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS) sobre a hipernociceção da AZy.

A administração intratecal do L-NAME quer realizada previamente (30 min) ou 2 horas após a injeção do zymosan, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) a hipernociceção, quando comparado a animais que receberam o veículo. De maneira similar, a administração intratecal do composto 1400W, um inibidor seletivo da iNOS, tanto quando dado de forma profilática (30 min antes) ou terapêutica (2 horas após) à injeção do zymosan, inibiu de forma significativa ($p < 0,05$) a hipernociceção. Curiosamente, a administração profilática (30 min antes da injeção de zymosan) de 7-NIL por via intratecal, um inibidor seletivo da NOSn, induziu um quadro convulsivo agudo nos animais que impediu a conclusão deste experimento (dados não apresentados) (Figuras 11 e 12).

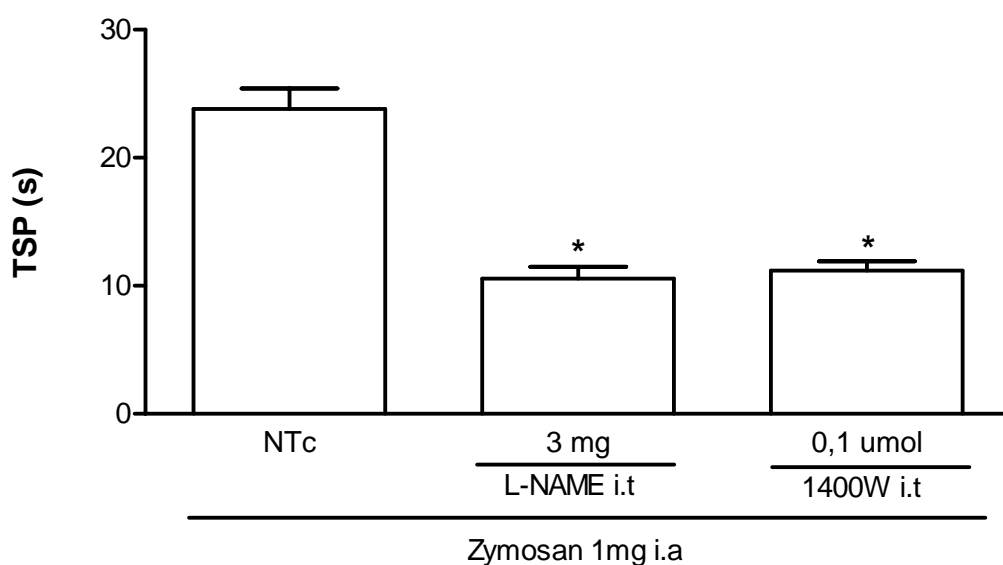


Figura 11 - Tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à AZy e tratados, profilaticamente, com inibidores da NOS. Os animais do grupo NTC receberam Zy i.a e salina i.t. Os demais grupos receberam, respectivamente, 30 minutos antes da AZy, L-NAME 3mg i.t ou 1400W 0,1 μ mol i.t. Os dados representam a média \pm EPM do TSP em segundo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

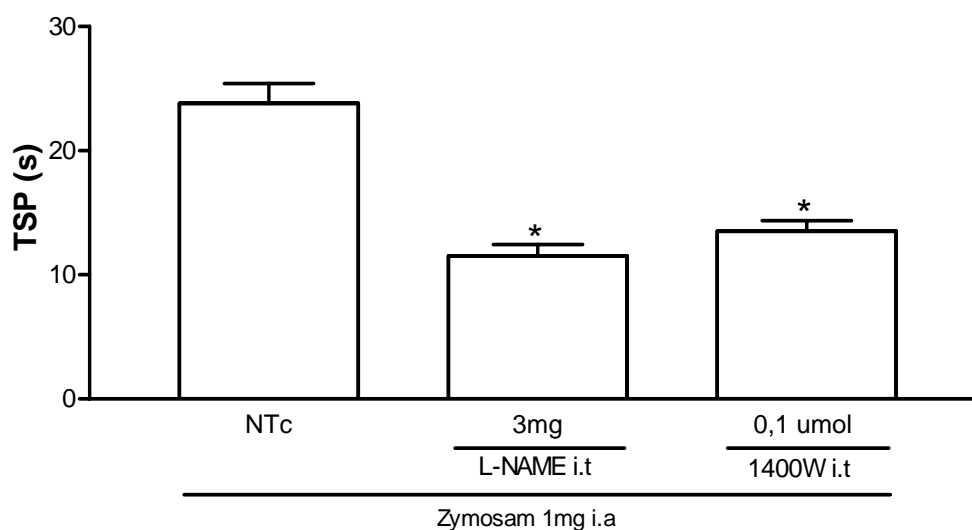


Figura 12 - Tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à AZy e tratados, terapeuticamente, com inibidores da NOS. Os animais do grupo NTc receberam Zy i.a e salina i.t. Os demais grupos receberam, respectivamente, 2 horas após a AZy, L-NAME 3mg ou 1400W 0,1 μ mol i.t. Os dados representam a média \pm EPM do TSP em segundo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

5.2.3. Efeito da administração de um inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, na hipernocicepção da AZy.

A administração intratecal profilática de 4 μ g de ODQ reduziu significativamente ($p < 0,05$) a IA. Entretanto, quando administrado após a injeção do zymosan (intervenção terapêutica), o ODQ levou ao aumento da IA, embora sem alcançar significância estatística (Fig.13).

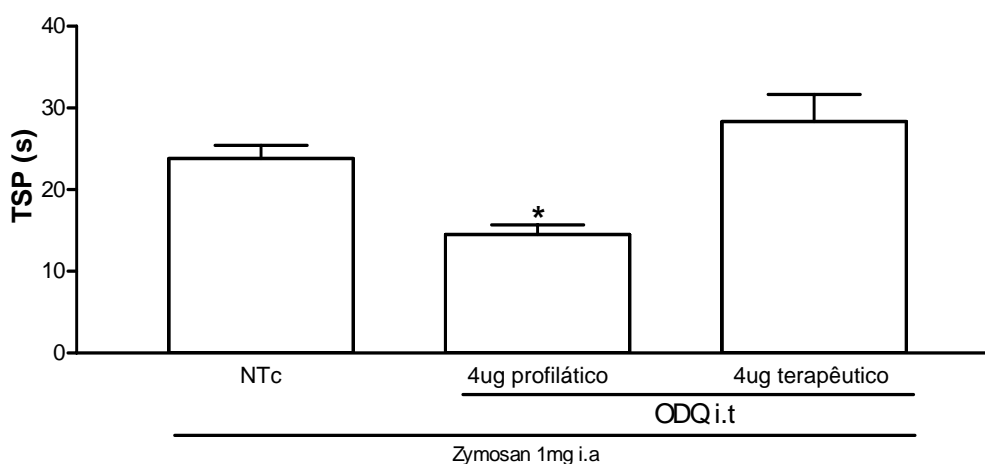


Figura 13 - Tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à AZy e tratados com um inibidor da guanilato ciclase (ODQ). Os animais do grupo NTc receberam Zy i.a e salina i.t. Os demais grupos receberam ODQ 4 μ g/10 μ l i.t, 30 minutos antes da AZy ou 2 horas após a AZy. Os dados representam a média \pm EPM do TSP em segundo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

5.2.4 Efeito do bloqueio da guanilato ciclase solúvel sobre a ação do SIN-1 na hipernocicepção da AZy.

A administração ao nível central (intratecal) de 4µg do ODQ, 30 minutos após a injeção intratecal de 40 µg do SIN-1 (doador de NO), em ratos submetidos à artrite por zymosan, inibiu significativamente ($p < 0,05$) a IA (Fig.14). De maneira semelhante, a administração ao nível periférico (intra-articular) de 4µg do ODQ, 30 minutos após a injeção intratecal de 40 µg do SIN-1, em ratos submetidos à artrite por zymosan, também inibiu a IA, de forma significativa ($p < 0,05$). Esses resultados estão ilustrados na figura 15.

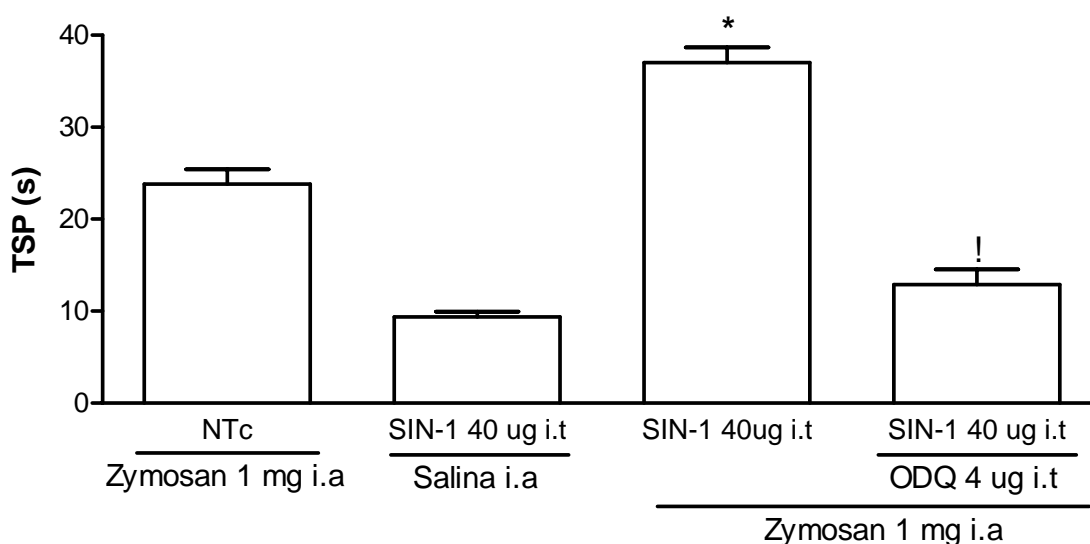


Figura 14 - Tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à AZy e tratados com um inibidor da guanilato ciclase (ODQ) associado ao tratamento terapêutico com SIN-1. Os animais do grupo NTc receberam Zy i.a e salina i.t. Um grupo de animais recebeu SIN-1 i.t e salina i.a. Um grupo recebeu apenas ODQ 4µg/10ul i.t, 2 horas após a AZy; outro grupo foi previamente tratado, 1 hora e 30 minutos depois da AZy, com SIN-1 40µg i.t, e em seguida, 2 horas após a AZy recebeu, também por via intratecal, ODQ 4µg/10µl. Os dados representam a média ± EPM do TSP em segundo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

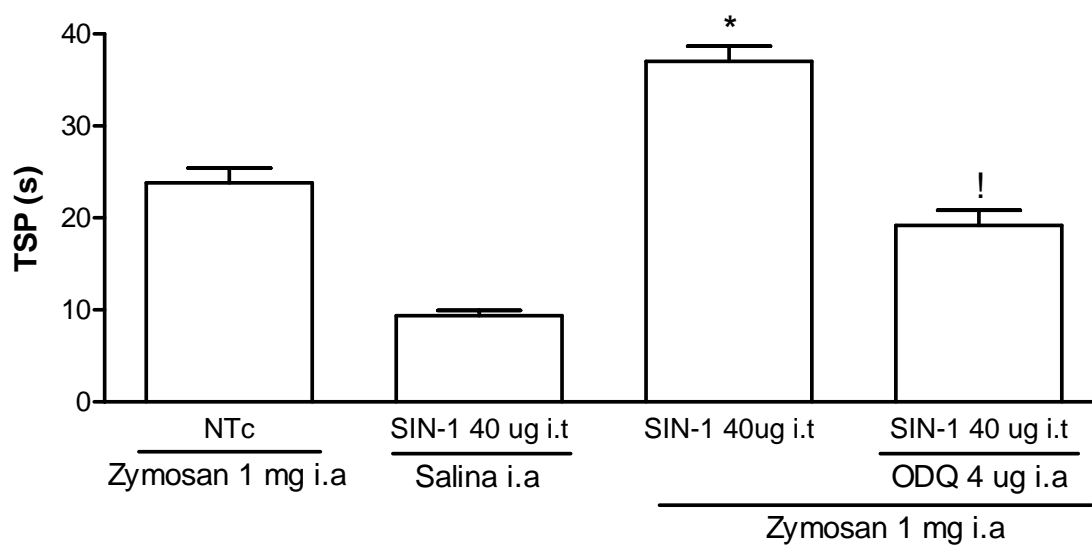


Figura 15 - Tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à AZy e tratados com um inibidor da guanilato ciclase (ODQ) associado ao tratamento terapêutico com SIN-1. Os animais do grupo NTc receberam Zy i.a e salina i.t. Um grupo recebeu apenas ODQ 4 μ g/10 μ l i.t, 2 horas após a AZy; outro grupo foi previamente tratado, 1 hora e 30 minutos depois da AZy, com SIN-1 40 μ g i.t, e em seguida, 2 horas após a AZy, recebeu por via intra-articular ODQ 4 μ g/50 μ l. Os dados representam a média \pm EPM do TSP em segundo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

5.2.5 Efeito da administração de um análogo da guanosina 3',5' monofostasfo cíclica (GMP_c), 8-Bromo-GMP_c, na hipernocicepção da AZy.

A administração intratecal de 10µg de 8-Bromo-GMP_c, efetuada 2 h após a injeção intra-articular do zymosan, inibiu significativamente ($p < 0,05$) a IA (Fig. 16).

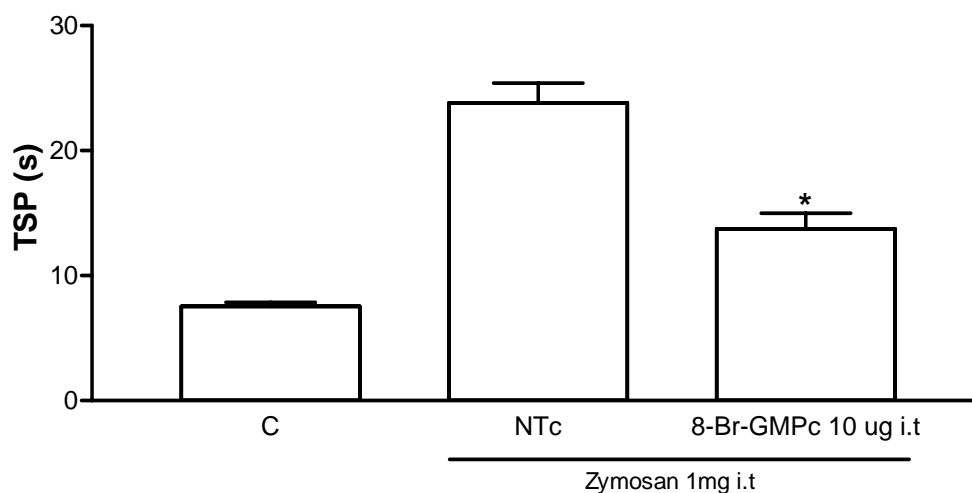


Figura 16 - Tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à AZy e tratados com um análogo da guanilato ciclase (8-Bromo-GMP_c). O grupo controle (C) representa animais que receberam salina i.a. Os animais do grupo NTc receberam Zy i.a e salina i.t. Um grupo recebeu 8-Bromo-GMP_c 10µg/10µl i.t, 2 horas após a AZy. Os dados representam a média ± EPM do TSP em segundo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

5.2.6 Efeito da administração de um antagonista do receptor de NMDA, MK-801, na hipernociceção da AZy.

A administração intratecal de 10 nmol do composto MK-801, quer efetuada de forma profilática (30 min antes), quer terapêutica (2 h após) à injeção intra-articular do zymosan, inibiu, de forma significativa ($p < 0,05$), a IA (Fig.17).

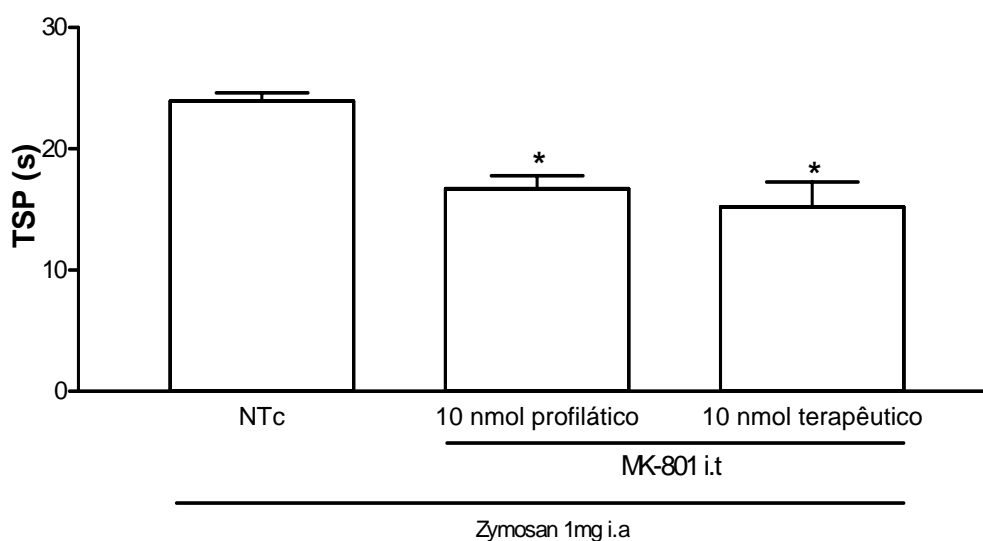


Figura 17 - Tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à AZy e tratados com um antagonista do receptor do NMDA (MK-801). O grupo controle (C) representa animais que receberam salina i.a. Os animais do grupo NTc receberam Zy i.a e salina i.t. Um grupo recebeu MK-801 10nmol/10 μ l i.t, 30 minutos antes da AZy (Profilático) e outro grupo recebeu MK-801 10nmol/10 μ l i.t, 2 horas após a AZy (Terapêutico). Os dados representam a média \pm EPM do TSP em segundo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

5.2.7 Efeito da administração do MK-801 sobre a ação do SIN-1 na hipernocicepção da AZy.

A administração intratecal de 10 nmol do composto MK-801, efetuada 30 min após a injeção intratecal de 40 μ g do SIN-1 em ratos submetidos à artrite por zymosan, reverteu, de forma significativa ($p < 0,05$), a hipernocicepção promovida pela administração intratecal isolada de 40 μ g do SIN-1 (Fig.18).

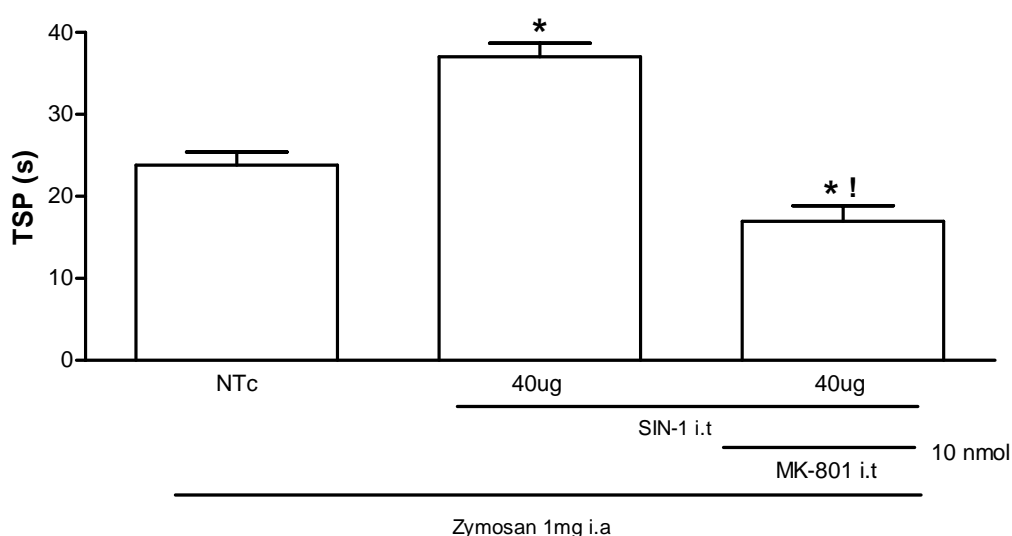


Figura 18 - Tempo de suspensão da pata (TSP) de ratos submetidos à AZy e tratados com um antagonista do receptor do NMDA (MK-801) associado ao tratamento terapêutico com SIN-1. O grupo controle (C) representa animais que receberam salina i.a. Os animais do grupo NTc receberam Zy i.a e salina i.t. Um grupo recebeu apenas SIN-1 40 μ g/10 μ l i.t, 2 horas após a AZy; outro grupo foi previamente tratado, 1 hora e 30 minutos depois da AZy, com SIN-1 40 μ g i.t, e em seguida, 2 horas após a AZy recebeu, também por via intratecal, MK-801 10nmol/10 μ l. Os dados representam a média \pm EPM do TSP em segundo de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e ! $p < 0,05$ em relação ao grupo SIN-1 4ug (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

6 DISCUSSÃO

A dor é um problema médico importante e tem sido intensamente estudada nos últimos anos. No entanto, ainda não compreendemos todos os detalhes envolvidos na fisiopatologia da dor e nos mecanismos analgésicos. Esse entendimento ainda carece de informações que possam contribuir para elucidar os fenômenos envolvidos na sensação dolorosa, para então viabilizar o desenvolvimento de drogas mais precisas e seguras para os pacientes.

A utilização de modelos experimentais, em animais, ainda é uma das melhores opções para a realização de estudos que possam contribuir para o esclarecimento dos eventos envolvidos no desencadeamento e desenvolvimento da dor. Esses modelos experimentais devem ser realizados segundo princípios éticos para utilização de animais em pesquisa, além de seguir uma metodologia capaz de reproduzir, de forma mais fiel possível, o objeto do estudo, causando o mínimo de sofrimento à espécie utilizada.

Nesse trabalho, investigamos a participação do sistema NO-GMPc ao nível do SNC na modulação da dor inflamatória periférica na artrite por zymosan (AZy) em ratos.

Inicialmente, buscamos padronizar o procedimento cirúrgico para permitir a administração de drogas por via intratecal (i.t). Em seguida, realizamos a administração i.t de diferentes substâncias para modular a via arginina/NO/GMPc.

Em estudos preliminares, em que mantivemos a cânula por 6 horas (durante todo o protocolo), observamos que alguns animais apresentavam incremento da hiperalgesia, quando comparados a animais apenas submetidos à AZy e ao procedimento cirúrgico, sem a permanência da cânula. Ainda, outros animais canulados também apresentaram sinais de lesão medular, com comprometimento locomotor, parestesia do trem posterior e sinais de hiperreflexia (dados não apresentados). Por conta dessas alterações, decidimos modificar o procedimento, mantendo a cânula apenas até o momento da administração i.t das substâncias, reduzindo o seu tempo de permanência para no máximo 2 horas após a sua implantação. Dessa forma, os animais em que realizamos a canulação i.t. e que

foram submetidos à indução da AZy apresentaram hiperalgesia semelhante àquela observada no grupo de animais submetidos à AZy, independente da presença da sonda intratecal. Ademais, o *stress* cirúrgico *per se* não alterou a hiperalgesia promovida pela injeção do zymosan, uma vez que não houve diferença significativa entre os animais do grupo falso operado (grupo Sham) e aqueles do grupo controle.

Essa nossa precaução com a canulação encontra respaldo na literatura, uma vez que há relatos mostrando que a implantação crônica de uma cânula i.t. incrementa a hiperalgesia periférica induzida pela injeção intraplantar de carragenina ou prostaglandina E₂ (PGE₂) (Almeida et al., 2000). Ainda, há relatos mostrando presença de infiltração mononuclear na região da medula espinhal próximo ao local onde se implantou a cânula, infiltração de neutrófilos na medula e sinais de trauma medular associado a canulação i.t. (Serpell et al., 1993; Almeida et al., 2000; Perkins e Tracey, 2000;). Assim, é possível que a persistência da cânula, induzindo modificações teciduais inflamatórias, seja responsável pelas alterações que observamos no início do presente estudo. A estratégia de redução do tempo de implantação teria minimizado esse processo, a ponto de não provocar alterações mensuráveis da hiperalgesia nem distúrbios neurológicos clinicamente detectáveis.

A cinética dos níveis de nitrito no LCR mostrou que, no tempo de 1 e 3 horas após a injeção do zymosan, ocorre queda significativa desses níveis, em relação aos valores basais. É relevante destacar que, anteriormente, demonstramos que os níveis de nitrito no lavado articular na AZy se elevam à medida que se desenvolve a artrite, na sua fase aguda, de tal sorte que ocorrem picos às 3 e 6 horas após a injeção do zymosan, o que se associa positivamente com o desenvolvimento da hiperalgesia articular (Rocha et al., 1999; Rocha et al., 2002). Os resultados do presente estudo revelam, de forma inédita, uma associação negativa entre os níveis de NO no SNC e a hiperalgesia na AZy, sugerindo uma modulação antinociceptiva endógena do NO ao nível central na regulação da dor aguda em artrites.

Não é do nosso conhecimento que essa associação tenha sido demonstrada anteriormente. Ao contrário, há evidências de uma ação pró-nociceptiva do NO ao nível do SNC, em outros modelos de dor, como descreveremos a seguir.

As características do NO, por não ser um mediador convencional, tornam-no um importante neuromediador ao nível local. A rigor, a difusibilidade do NO ocorre em uma área de 30-400µm de diâmetro (Esplugues, 2002). Também de forma

diversa dos mediadores convencionais, a inativação do NO se faz por sua reação com outros substratos, levando à produção, por exemplo, de espécies reativas. Assim, apesar de sua relativa restrita difusão, o que lhe conferiria ação parácrina e autócrina, pela capacidade de levar à formação de agentes reativos, o NO pode ter sua área de ação ampliada.

Evidências sugerem a participação de aminoácidos excitatórios, como o glutamato e o aspartato, na transmissão da dor ao nível espinhal. A concentração de aminoácidos no LCR em pacientes com fibromialgia, uma doença em que os pacientes apresentam dor crônica difusa, revelou associação positiva entre o aumento nas concentrações de citrulina e glicina, aminoácidos envolvidos na via arginina/NO/GMPc, ativação de receptores do tipo NMDA e a dor nesses pacientes (Larson et al., 2000), sugerindo não apenas o envolvimento do NO endógeno na sensibilização dolorosa via SNC, como também uma interação com receptores tipo NMDA nesse processo (Okano et al., 1993).

Dentre os possíveis mecanismos para explicar a redução dos níveis de NO no SNC, observada no presente estudo, estaria a liberação de inibidores endógenos que pudessem agir sobre a produção do NO a partir de suas vias constitutivas.

Uma possibilidade envolveria o aumento da liberação de glicocorticóides endógenos. Isso poderia decorrer do *stress* provocado tanto pelo procedimento cirúrgico para colocação da cânula intratecal, quanto pela inflamação decorrente da administração do zymosan intra-articular. Considerando que corticosteróides inibem a expressão de enzimas envolvidas no processo inflamatório, entre elas a NOS (Korhonen et al., 2002), associado a precocidade (1 e 3 horas após injeção do zymosan) em que observamos a redução dos níveis de NO no líquido, essa possibilidade deve ser considerada. Por outro lado, foi observado que células das leptomeninges estão envolvidas na liberação de citocinas pró-inflamatórias que são capazes de ativar, durante uma inflamação sistêmica, células da micróglia e astrócitos (Wu et al., 2005). A atividade dessas citocinas, por sua vez, poderia ser contraposta pela liberação de IL-10, uma citocina considerada antiinflamatória, com efeitos anti-nociceptivos (Vale et al., 2004). *In vitro*, foi demonstrado que IL-10 reduz a expressão a nível protéico de NOSi em oligodendrócitos (Molina-Holgado et al., 2001). *In vivo*, a administração de IL-10 reduziu a lesão medular induzida em ratos pela administração intramedular do ácido quisquálico, uma substância que produz

lesão medular similar ao trauma raquimedular (Plunkett et al., 2001). Assim, considerando o espaço de tempo necessário para observarmos a redução dos níveis de NO endógeno no SNC no presente estudo, é possível que mediadores com ação dita antiinflamatória, entre eles os glicocorticóides e citocinas como a IL-10, estejam envolvidos nesse fenômeno.

A participação do NO na modulação periférica da dor, seja analgésica ou pró-algésica, é motivo de controvérsia. O uso do L-NMMA, um inibidor de NOS, bloqueou a analgesia periférica induzida por acetilcolina (Duarte et al., 1990). Além disso, foi demonstrado que a hiperalgesia induzida por PGE₂ em ratos é revertida por morfina e mediada pela liberação de NO, levando à ativação de GMPc (Ferreira et al., 1991). Entretanto, a injeção intradérmica de NO em humanos produziu dor (Holthudsen e Arndt, 1994). Ainda, a administração intra-articular de L-NAME, inibidor não seletivo de NOS, ou 7-NIL, inibidor seletivo da NOS neuronal, apresentou efeito antinociceptivo em camundongos e reverteu a hiperalgesia térmica em ratos submetidos à indução de artrite por carragenina (Lawand et al., 1997).

Em ratos, demonstrou-se que o SIN-1, um doador de NO, é capaz de induzir analgesia ou nocicepção, dependendo da dose e do modelo utilizado (Sousa e Prado, 2001). Nesses mesmos animais, o uso tópico de outro doador de NO, S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), na concentração de 1 a 10%, reduziu a alodinia, ao passo que aumentou a dor quando usado na concentração de 30% (Prado et al., 2002). Na AZy, demonstramos que a redução dos níveis de NO no lavado articular dos animais, através da administração de inibidores de NOS, promoveu analgesia apenas quando feita de forma profilática. Por outro lado, a administração de doadores de NO, de forma terapêutica, teve efeito analgésico (Rocha et al., 2002).

Analisando nossos dados em conjunto com a literatura, é possível que a injeção periférica do zymosan, ao mesmo tempo em que induz aumento nos níveis locais de NO, promova, via efeito direto ou indireto no SNC, queda nos níveis endógenos de NO central. Dessa forma, além da demonstração de um possível efeito analgésico *per se* para o NO endógeno produzido por vias constitutivas no SNC, esse resultado sugere, de forma inédita, uma via de comunicação periférico-central na modulação da dor articular aguda. Vale ressaltar que várias publicações relatam a modulação do NO em trauma raquimedular e encefálico, meningites e em

doenças crônico-degenerativas do SNC como esclerose múltipla e Doença de Parkinson. Entretanto, acreditamos que a demonstração dessa via de modulação seja inédita e tenha implicações, tanto na compreensão da fisiopatologia da dor em artrites agudas, como no desenvolvimento de novos analgésicos.

Considerando que o papel exato do NO no desenvolvimento da dor, bem como os mediadores que estão envolvidos nos mecanismos responsáveis pelas artropatias inflamatórias, ainda não estão totalmente esclarecidos, buscamos modular farmacologicamente os níveis do NO diretamente no SNC.

A administração i.t de SIN-1 (10 μg), à semelhança do que foi obtido pela administração de SIN-1 de forma intra-articular (Rocha et al., 2002), promoveu anti-nocicepção. No entanto, em doses maiores, 20 e 40 μg , a administração i.t de SIN-1 induziu um aumento na hiperalgesia, alcançando significância estatística na dose de 40 μg . De forma semelhante, Prado e Sousa (2001) demonstraram que baixas doses de SIN-1 (i.t.) (0,1-2,0 μg) reduziram, enquanto que doses maiores não apresentaram efeito (5 ou 100 μg) ou aumentaram (10 e 20 μg) a alodinia mecânica induzida pela ligadura do nervo ciático em ratos. No presente estudo, não conseguimos demonstrar nenhum efeito lesivo clinicamente aparente nos animais tratados com SIN-1.

A possibilidade de toxicidade própria do NO foi demonstrada em modelos de isquemia cerebral. Esse mecanismo envolveria a liberação de glutamato, com aumento dos níveis de cálcio intracelular, ativando a NOSn, com superprodução de NO (Stagliano et al., 1997). Por outro lado, um papel protetor foi demonstrado para o NO produzido a partir da NOSe, reduzindo a isquemia tecidual (Wilderman e Armstead, 1997). Assim, a ação do NO pode variar, a depender do estímulo, da via de produção e da quantidade de NO liberada. Uma outra possibilidade para explicar a toxicidade do NO seria pela formação de espécies reativas, como veremos a seguir.

Além de ser um doador exógeno de NO, o SIN-1 também libera o ânion superóxido. Estudando osteoblastos humanos *in vitro*, foi demonstrado que o SIN-1, por promover a liberação de ambos NO e O_2^- , leva à formação do ânion peroxinitrito por essas células, com conseqüente comprometimento de sua proliferação e diferenciação (Da Rocha e De Brum-Fernandes, 2002). Reforçando esses

resultados, nosso grupo demonstrou que o bloqueio da formação de peroxinitrito na AZy, através da elevação dos níveis de ácido úrico dos animais, agindo como um “scavenger” de peroxinitrito, protegeu-os da lesão da cartilagem articular, ao passo que o uso de inibidores de NOS piorava a lesão, a despeito de ter ação antiinflamatória (Bezerra et al, 2004).

Considerando o potencial de nitrosilação do peroxinitrito, podemos especular que doses elevadas do SIN-1, via produção de espécies reativas de nitrogênio, p. ex. o peroxinitrito, poderiam estar associadas ao desenvolvimento da hiperalgisia associada à injeção do SIN-1 no nosso estudo. A exemplo do que foi observado na AZy e em osteoblastos humanos, a geração de peroxinitrito está associada a lesão neuronal em isquemia (Esplugues, 2002). Estudos *in vitro* demonstraram que um excesso de formação de NO pós-estimulação de receptores tipo NMDA está associado a fenômenos lesivos no SNC (Pepicelli et al., 2004).

Prosseguindo na modulação, obtivemos que a administração i.t de inibidores não-seletivo de NOS – L-NAME – ou seletivo para a NOSi – 1400W –, seja de forma profilática ou terapêutica, apresentaram claro efeito antinociceptivo. No entanto, a administração de um inibidor seletivo para NOS neuronal – 7-NIL – induziu um quadro de grave alodinia, quando administrado de forma profilática, além de promover alteração de comportamento nos animais, tornando-os aparentemente agressivos, levando a quadro convulsivo seis horas após a AZy, sendo necessária a realização do sacrifício desses animais, sob anestesia, para minimizar seu sofrimento. Esse resultado, que poderia ser atribuído à toxicidade do composto, nos impediu-nos, por razões éticas, de continuar os estudos com o 7-NIL. Entretanto, a possibilidade de que o 7-NIL, agindo sobre a NOS neuronal, tenha bloqueado um efeito modulador antinociceptivo endógeno do NO produzido por células locais, atuando no SNC, não pode ser excluída.

Vários estudos relatam efeito protetor de inibidores de NOS em modelos de isquemia e trauma no SNC (Esplugues, 2002). Não é do nosso conhecimento que se tenha demonstrado um efeito antinociceptivo de inibidores de NOS administrados por via central sobre a hiperalgisia em artrite aguda. Entretanto, já foi relatado que o composto 1400W reduz a hiperalgisia térmica provocada pela administração de interleucina 1- β i.t. (Sung et al., 2004). Em outro estudo, foi descrita a atividade antinociceptiva do L-NAME ou de azul de metileno administrados i.t. em ratos

submetidos à estimulação repetitiva do nervo sural para induzir o “*wind-up reflex*”. Nesse caso, ambos L-NAME e azul de metileno suprimiram esse reflexo apenas no grupo de animais em que também foi induzido uma artrite, sugerindo um papel modulador para a via NO/GMPc em dor neuropática crônica (Laurido et al., 2003). Assim, os nossos dados revelam, de forma inédita, um efeito antinociceptivo de inibidores de NOS dados ao nível do SNC na dor inflamatória articular aguda.

Em conjunto, esses resultados sugerem que a inibição da NOSi no SNC promove efeito antinociceptivo na AZy. Esse resultado pode ser decorrente de uma interação cruzada entre as vias nociceptivas periféricas e centrais. Como citamos acima, um estudo recente demonstrou que a administração i.t de IL-1 β induz hiperalgesia térmica, ocorrendo aumento da expressão de NOSi na medula espinhal 4 h após a sua administração, bem como aumento na concentração de NO no LCR. Nesse mesmo estudo, o pré-tratamento i.t. com o composto 1400W bloqueou o efeito da IL-1 β . (Sung et al., 2004).

Assim, à semelhança do demonstrado na periferia, a participação de mediadores inflamatórios diversos, envolvendo autacóides, prostanóides, NO e citocinas, participam na modulação central da nocicepção em vários modelos de dor, incluindo artrite, como aqui demonstramos. Poderíamos propor, preliminarmente, que a via NO/GMPc seja final nesse mecanismo. Em um ponto abaixo dessa via – *downstream* – a participação de aminoácidos excitatórios, como mencionamos acima, parece ser importante.

Um dos mecanismos pelos quais o NO poderia mediar a dor no SNC seria via ativação do GMPc. Foi demonstrado que o NO formado leva ao aumento dos níveis de GMPc, através da ativação da guanilato ciclase solúvel (Meller e Gebhart, 1993). Outros pesquisadores já apontaram para o papel analgésico do GMPc em um modelo de dor periférica (Ferreira e Nakamura, 1979) e que modificações nas concentrações intracelulares de AMPc ou GMPc modulam a hiperalgesia, sendo os níveis elevados de AMPc associados a hiperalgesia e os níveis elevados de GMPc associados com a inibição da hiperalgesia (Cunha et al., 1999). De fato, há estudos mostrando que baixos níveis de NO participariam da hiperalgesia induzida por PGE₂ dependente de AMPc, enquanto que níveis elevados de NO produziram hiperalgesia dependente de GMPc (Alley et al., 1998).

Buscando esclarecer a participação do GMPc na modulação central da dor periférica articular, estudamos o efeito da administração i.t de um inibidor específico de GMPc – ODQ – de forma profilática ou terapêutica na AZy. A inibição central do GMPc pelo ODQ promoveu analgesia, quando efetuada previamente à injeção do zymosan. Quando dado 2h após o zymosan, o ODQ não teve efeito sobre a dor. Ainda, a administração do ODQ, quer realizada de forma i.t, quer efetuada de forma periférica – intra-articular –, reverteu a hiperalgesia promovida pela dose mais elevada de SIN-1 (40 µg i.t.) – vide acima. Apesar desses resultados demonstrarem que o NO participa na modulação central da hiperalgesia aguda na AZy por ativação do sistema NO/GMPc, o fato de o ODQ ter agido apenas quando administrado de forma profilática não permite supor aplicação terapêutica, pelo menos imediata, para inibidores de GMPc nesse modelo.

Vale destacar que a administração intra-articular do ODQ inibiu de maneira significativa a hiperalgesia induzida pela administração i.t. de 40 µg de SIN-1. Em conjunto, esses resultados permitem propor duas interessantes vias de modulação, a saber: i) o NO modula a hiperalgesia aguda na AZy via ativação do sistema NO/GMPc; ii) existe uma conexão entre os sistemas periférico e central na modulação da dor aguda em artrite. Essa segunda via, ao nosso conhecimento, é demonstrada de forma inédita por nossos resultados e permite supor que a modulação ao nível do SNC é responsável, pelo menos em parte, pelo efeito analgésico da inibição do GMPc na dor articular.

Dados da literatura têm demonstrado um efeito pró ou antinociceptivo da via arginina/NO/GMPc em diferentes modelos de dor, como placa quente, contorção abdominal por ácido acético e “imersão da cauda” (Morgan et al., 1992; Malmenberg e Yaksh, 1993; Kawabata et al., 1994). É possível que essas aparentes contradições se devam às variações no papel da via arginina/NO/GMPc entre os grupos de neurônios sensoriais primários que são ativados por diferentes tipos de estímulos nociceptivos (Cunha et al., 1999).

No presente estudo, a administração i.t. de um análogo do GMPc, 8-Bromo-GMPc, promoveu analgesia. Foi demonstrado que o 8-Bromo-GMPc (125-500 µg i.t.) reduz a alodinia mecânica em ratos com dor neuropática, embora o ODQ (4 µg i.t.) tenha reduzido o efeito hipernociceptivo de altas doses de SIN-1 naquele modelo de dor central (Sousa e Prado, 2001). Dessa forma, nossos resultados sugerem que

o NO exógeno modula a dor articular através de um mecanismo espinhal que envolve a ativação da guanilato ciclase. Esse efeito parece depender da dose e do modelo experimental utilizado.

Um possível mecanismo para a modulação do sistema NO/GMPc seria por ativação de receptores NMDA no SNC. Foi observado que a atividade excitatória do NMDA é modulada pelo NO (Iravani et al., 2004). Estudos mostram também que receptores para NMDA e o NO, presentes na medula rostral ventromedial, modulam a transmissão dos sinais dos opióides da região periaqueductal, inibindo a dor (Javanmardi et al., 2005). Observou-se ainda a expressão de receptores NMDA em condrócitos humanos, sugerindo que esses receptores podem apresentar um efeito modulador na transdução da resposta dolorosa após estímulo mecânico, além de inibição da plasticidade sináptica por um antagonista dos receptores NMDA em modelo de dor articular (Salter et al., 2004; Bird et al., 2005). Estudos têm demonstrado a participação dos receptores NMDA em várias formas de plasticidade e em diferentes desordens, bem como o seu envolvimento nos mecanismos de dor periférica e central (Dingledine et al., 1999; Fisher et al., 2000; Carlton, 2001).

De fato, durante a resposta inflamatória, os nociceptores são sensibilizados, liberando mediadores espontaneamente que contribuem para a continuidade da dor. Durante a ativação prolongada dos nociceptores de fibras-C, ocorre liberação de glutamato que age sobre os receptores NMDA na medula espinhal. A ativação desses receptores tornaria os neurônios da medula espinhal mais responsivos aos estímulos, resultando em sensibilização central. É importante ressaltar que a ativação dos receptores não apenas aumenta a resposta celular aos estímulos, como também diminui a sensibilidade neuronal aos agonistas dos receptores opióides (Gary, 2000).

Com base no exposto, procuramos estudar ainda a participação dos receptores NMDA na dor inflamatória no modelo de AZy. A administração i.t de um antagonista do receptor de NMDA, MK-801, de forma profilática, 30 min antes da indução da artrite, ou de forma terapêutica, 2 h após a AZy, promoveu analgesia na AZy, demonstrando de forma inequívoca o envolvimento de receptores NMDA ao nível central na dor aguda da AZy.

Com o objetivo de se verificar uma possível relação entre os receptores NMDA e o NO na AZy, animais que foram tratados por via intratecal com SIN-1(40

μg), 90 min após a administração i.a de Zy, receberam também MK-801 (10 nmol) i.t, 30 min após terem recebido o tratamento com o doador de NO, havendo inibição da hiperalgesia induzida por Zy e, ainda, reversão da hiperalgesia promovida pelo SIN-1. Os resultados sugerem a ativação de receptores NMDA no SNC, na dor periférica aguda na AZy. Além disso, a atividade hipernociceptiva do SIN-1 i.t nesse modelo, que envolve a ativação do GMPc, também se dá por ativação de receptores NMDA, o que revela um ponto comum nessas vias de ativação, que pode ser um interessante alvo farmacológico para o desenvolvimento de analgésicos mais eficazes em dor articular.

Em resumo, nossos resultados demonstraram que o NO endógeno, presente no sistema nervoso central, desempenha um papel essencial na modulação da dor periférica articular.

Além disso, o NO exógeno administrado centralmente apresenta um comportamento dual, podendo produzir antinocicepção quando em baixas concentrações, enquanto que em concentrações mais elevadas promoveria hipernocicepção.

A ação do NO na modulação da dor articular inflamatória aguda no SNC envolve a participação de mediadores, como GMPc, e neurotransmissores, como o NMDA. A interferência com esse mecanismo pode se constituir em novas alternativas de abordagem terapêutica de fenômenos inflamatórios articulares.

Finalmente, de forma inédita, nossos resultados sugerem a existência de uma conexão periférico–central, na modulação da dor aguda em artrites. A repercussão dessa via para a compreensão da fisiopatologia de dores articulares merece ser investigada.

7 CONCLUSÕES

Na fase aguda da artrite induzida por zymosan em ratos demonstramos que:

1) Ocorre liberação de óxido nítrico no sistema nervoso central e nas articulações inflamadas.

2) Existe uma associação entre a redução dos níveis de NO ao nível do sistema nervoso central e o desenvolvimento de hiperalgesia periférica neste modelo.

3) O NO, a depender da dose e do local de ação, pode apresentar um efeito pró ou anti-nociceptivo na AZy.

4) O seu efeito se dá via ativação de GMPc e receptores NMDA.

5) Existe uma via de ativação periférico-central modulando a hiperalgesia articular na fase aguda da AZy.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, V.; NEHRHOFF, B.; SPATE, U.; LINKE, A.; SCHULZE, P.C.; BAUR, A.; GIELEN, S.; HAMBRECHT, R.; SCHULER, G. Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1beta and NF KappaB activation: an in vitro and in vivo study. **Cardiovasc. Res.**, v. 54, p. 95-104, 2002.

ACAR, G.; IDIMAN, F.; IDIMAN, E.; KIRKALI, G.; CAKMAKCI, H.; OZAKBAS, S. Nitric oxide as an activity marker in multiple sclerosis. **J. Neurol.**; v. 250, p. 588-592, 2003.

AJUEBOR, M. N.; DAS, M.N.; VIRAG, L.; FLOWER, R.J.; SZABO, C.; PERRETTI, M. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. **Immunol.**, v. 95, p. 625-630, 1998.

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

ALMEIDA, F. R. C.; SCHIVO, I. R. S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Chronic intrathecal cannulation enhances nociceptive response in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 949-956, 2000.

AMIN, A. R.; CESARE, P. E. D.; VYAS, P.; ATTUR, M.; TZENG, E.; BILLIAR, T. R.; STUCHIN, S. A.; ABRAMSON, S. B. The expression and regulation of nitric oxide synthase in the human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 2097-2102, 1995.

ANDRADE FILHO, A. C. C. **Dor: diagnóstico e tratamento**. 1. ed. São Paulo: Roco, 2001.

ARMOUR, K. E., Van't HOF, R. J.; GRABOWSKI, P. S.; REID, D.M.; RALSTON, S.H. Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammatory-induced osteoporosis. **J. Bone. Miner. Res.**, v. 14, p. 2137-2142, 1999.

ARNETT, F. C. The American Rheumatism Association - Revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 31, p. 315-322, 1988.

AYAJIKI, K.; OKAMURA, T.; TODA, N. Nitric oxide mediates and acetylcholine modulates neurally induced relaxation of bovine cerebral arteries. **Neuroscience**, v. 54, p. 819-825, 1993.

BABBEDGE, R. C.; BLAND WARD, P. A.; HART, S. L.; MOORE, P. K. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro-indazole and related substituted indazoles. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 225-228, 1993.

BARRERA, P.; BOERBOOMS, A. M.; JANSSEN, E. M.; SAUERWEIN, R.W.; GALLATI, H.; MULDER, J.; DE BOO, T.; DEMACKER, P.N.; VAN DE PUTTE, L.B.; VAN DER MEER, J.W. Circulating soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-2 receptors, tumor necrosis factor α and interleukin-6 levels in rheumatoid arthritis. Longitudinal evaluation during methotrexate and azathioprine therapy. **Arthritis Rheum.**, v. 36, p. 1070-1078, 1993.

BEAUBIEN, B.C.; COLLINS, P.D.; JOSE, P.J.; TOTTY, N.F.; HSUAN, J.; WATERFIELD, M.D.; WILLIAMS, T.J. A novel neutrophil chemoattractant generated during an inflammatory reaction in the rabbit peritoneal cavity in vivo. Purification, partial amino acid sequence and structural relationship to interleukin 8. **Biochem. J.**, v. 271, n. 3, p. 797-801, 1990.

BECKER, E. L. The short and happy life of neutrophil activation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 47, p. 378-389, 1990.

BENNETT, G. J. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on NMDA-receptor. **J. Pain Symptom Management**, v. 19, p. S2-S6, 2000.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.

BEZERRA, M. M.; BRAIN, S. D.; GREENACRE, S.; JERÔNIMO, S. M. B.; MELO, L. B.; KEEBLE, J.; ROCHA, F. A. C. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, p. 172-182, 2004.

BIRD, G. C.; LASH, L. L.; HAN, J. S.; ZOU, X.; WILLIS, W. D.; NEUGEBAUER, V. Protein kinase A-dependent enhanced NMDA receptor function in pain-related synaptic plasticity in rat amygdala neurones. **J. Physiol.**, v. 564, p. 907-921, 2005.

BLANCO, F. J.; OCHS, R. L.; SCHWARZ, H.; LOTZ, M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. **Am. J. Pathol.**, v. 146, p. 75-85, 1995.

BOTTING R. COX-1 and COX-3 inhibitors. **Thromb. Res.** v. 15, p. 269-272. 2003.

BRAHN, E. Animals models of rheumatoid arthritis: clues to etiology and treatment. **Clin. Orthop.**, v. 265, p. 42-53, 1991.

CANNON, G. W.; OPENSHAW, S. J.; HIBBS, J. B. Jr.;HOIDAL, J.R.; HUECKSTEADT, T.P.; GRIFFITHS, M.M. Nitric oxide production during adjuvant induced and collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 39, p. 1677-1684, 1996.

CARLTON, S. M. Peripheral excitatory amino acids. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 1, p. 52-56, 2001.

CARR, D. B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. **The Lancet**, v. 353, p. 2051-2058, 1999.

CEDERQVIST, B.; PERSSON, M. G.; GUSTAFSSON, L. E. Direct demonstration of NO formation in vivo from organic nitrites and nitrates and correlation to effects on blood pressure and to in vitro effects. **Biochem. Pharmacol.**, v. 47, p. 1047-1053, 1994.

CERVERO, F.; MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N. A psychophysical study of secondary hyperalgesia: evidence for increased pain to input from nociceptors. **Pain**, v. 1, p. 21-28, 1994.

CESARE, P.; McNAUGHTON, P. Peripheral pain mechanisms. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 7, p. 493-495, 1977.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 15, p. 13926-13931. 2002.

CHANG, Y. H.; PEARSON, C. M.; ABE, C. Adjuvant polyarthritis IV: induction by a synthetic adjuvant: immunologic, histopathologic and other studies. **Arthritis Rheum.**, v. 23, p. 62-71, 1980.

CHO, W. S. ; CHAE, C. Expression of nitric oxide synthase 2 and tumor necrosis factor alpha in swine naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Vet. Pathol.**, v. 39, p. 27-32, 2002.

COATES, N. J.; McCOLL, S. R. Production of chemokines in vivo response to microbial stimulation. **J. Immunol.**, v. 166, p. 5176-5182, 2001.

CONNOR, J. R.; MANNING, P. T.; SETTLE, S. L.; MOORE, W. M.; JEROME, G. M.; WEBBER, R. K.; TJOENG, F. S.; CURRIE, M. G. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 273, p. 15-24, 1995.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C. J. Pain: molecular mechanisms. **The J. of Pain**, v. 3, p. 35-44, 2000.

CRISCIONE, L. G.; CLAIR, E. W. Tumor necrosis factor-alpha antagonists for the treatment of rheumatic diseases. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 14, p. 204-211, 2002.

CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 104, p. 765-769, 1991.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumor necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 660-665, 1992.

CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems- cyclic AMP and cyclic GMP-on inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127, p. 671-678, 1999.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; SAUTEBIN, L.; RIZZO, A.; CRISAFULLI, C.; CAMPO, G.M.; COSTANTINO, G.; CALAPAI, G.; NAVA, F.; Di ROSA, M.; CAPUTI, A.P. Multiple organ failure following zymosan-induced peritonitis is mediated by nitric oxide. **Shock**, v. 8, p. 268-275, 1997.

Da ROCHA, F. A.; De BRUM-FERNANDES, A. J. Evidence that peroxynitrite affects human osteoblast proliferation and differentiation. **J. Bone Miner. Res.** v. 17, p. 434-442. 2002.

DAVIS, K. L.; MARTIN, E.; TURKO, I. V.; MURAD, F. Novel effects of nitric oxide. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 41, p. 203-236, 2001.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN, A. F. Differential effects of excitatory amino acid antagonists on dorsal horn nociceptive neurons in the rat. **Brain Research**, v. 506, p. 31-39, 1990.

DICKENSON, A. H. Spinal cord pharmacology of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 75, p. 193-200, 1995.

DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. F. The glutamate receptor ion channels. [Pharmacol. Rev.](#), v. 51, p. 7-61, 1999.

DOHERTY, N. S.; POUBELLE, P.; BORGEAT, P.; BEAVER, T.H.; WESTRICH, G.L.; SCHRADER, N.L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, n. 5, p. 769-789, 1985.

DOLAN, S.; FIELD, L. C.; NOLAN, A. M. The role of nitric oxide and prostaglandin signaling pathways in spinal nociceptive processing in chronic inflammation. **Pain**, v. 86, p. 311-320, 2000.

DRAY, A.; RANG, H. The how and why of chronic pain states and the what a new analgesic therapies. **TINS**, v. 21, p. 315-317, 1998.

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

DUARTE, I. D.; SANTOS, I. R.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 217, p. 225-227, 1992.

DUBNER, R.; BENNETT, G. J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annu. Rev. Neurosc.**, v. 6, p. 381-418, 1983.

DUBNER, R.; GOLD, M. The neurobiology of pain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p.7627-7630, 1999.

DUBNER, R.; REN, K. Endogenous mechanisms of sensory modulation. **Pain**, v. 6, p.S45-S53, 1999.

DUMONDE, D. C.; GLYNN, L. E. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 43, p. 373-382, 1962.

EIDE, P. K.; JORUM, E.; STUBHAUG, A.; BREMNES, J.; BREIVIK, H. Relief of post-herpetic neuralgia with the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist ketamine: a double-blind, cross-over comparison with morphine and placebo. **Pain**, v. 58, p. 347-354, 1994.

EISENBERG, E.; PUD, D. Can patients with chronic neurophatic pain be cured by acute administration of the NMDA- receptor antagonist amantadine? **Pain**, v. 74, p. 34-39, 1994.

ESPLUGUES, J.V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **Br. J. Pharmacol.** , v., 135, p. 1079-1095. 2002.

FARREL, A. J.; BLKE, D. R.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Increased concentrations of nitrite in the synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 51, p. 1219-1222, 1992.

FLETCHER, D. S.; WIDMER, W. R.; LUELL, S.; CHRISTEN, A.; OREVILLO, C.; SHAH, S.; VISCO, D.. Therapeutic administration of a selective inhibitor of nitric oxide synthase does not ameliorate the chronic inflammation and tissue damage associated with adjuvant-arthritis in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 284, p. 714-721, 1998

FERNANDEZ, H. N.; HENSON, P. M.; OTANI, A.; HUGLI, T. E. Chemotatic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. **J. Immunol.**, v. 120, p. 109-115, 1978.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺-dependent process. **Prostaglandins**, v. 18, p. 179-190, 1979.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 201, p. 121-122, 1991.

FERREIRA, H. H. A.; MEDEIROS, M. V.; LIMA, C. S.; FLORES, C.A.; SANNOMIYA, P.; AUTUNES, E.; DE NUCCI, G.. Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 55, p. 1-7, 1996.

FISHER, K.; CODERRE, T. J.; HAGEN, N. A. Targeting the N-methyl-D-aspartate receptor for chronic pain management. Preclinical animal studies, recent clinical experience and future research directions. **J. Pain Symptom. Manage.**, v. 20, p. 358-373, 2000.

FLETCHER, D. S.; WINDMER, W. R.; LUELL, S.; CHRISTEN, A.; OREVILLO, C.; SHAH, S.; VISCO, D. Therapeutic administration of a selective inhibitor of nitric oxide synthase dose not ameliorate the chronic inflammation and tissue damage associated with adjuvant-induced arthritis in rats. **J. Pharmacol Exp. Ther.**, v. 284, p. 714-721, 1998.

FUKUTO, J. M.; CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potencil selective inhibition. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 35, p. 165-194, 1995.

GACIONG, Z. The real dimension of analgesic activity of aspirin. **Thromb. Res.** v. 15, p. 361-364. 2003.

GADO, K. I.; GIGLER, G. Zymosan inflammation: A new method suitable for evaluating new inflammatory drugs. **Agents Actions**, v. 32, p. 119-121, 1991.

GARDINER, S. M.; COMPTON, A. M.; BENNETT, T.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleoro rats. **Br. J. Pharmacol.**,v. 101, p. 10-12, 1990.

GARVEY, E. P.; OPLINGER, J. A.; FURFINE, E. S.;KIFF, R.J.; LASZLO, F.; WHITTLE, B.J.; KNOWLES, R.G. 1400W is a slow, tight binding and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 4959-4963, 1997.

GARY, J. B. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on the NMDA-receptor. **J. Pain Symp. Maneg.**, v. 19. p. S2-S6, 2000.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D.; GUINGAMP, C.; TERLAIN, B.; NETTER, P.; Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sci.**, v. 55, p. 321-326, 1994.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; TERLAIN, B.; NETTER, P. Zymosan-induced arthritis in rats. II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life Sci.**, v. 56, p. 389-394, 1995.

GIOVENGO, S. L.; RUSSEL, I. J.; LARSON, A. A. Increased concentrations of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of patients with fibromyalgia. **J. Rheumathol.**, v. 26, p. 1564-1569, 1999.

GREENACRE, S.; BEZERRA, M. M.; ROCHA, F. A. C.; BRAIN, S. Correlation between neutrophil accumulation and protein nitration in zymosan-induced inflammation in the rat. **J. Physiol.**, London, v. 531, p. S222. 2001.

GRABOWSKI, P. S.; ENGLAND, A. J.; DYKHUIZEN, R.; COPLAND, M.; BENJAMIN, N.; REID, D.M.; RALSTON, S.H. Elevated nitric oxide production in rheumatoid

arthritis. Detection using fasting urinary nitrate:creatinine ratio. **Arthritis Rheum.**, v. 39, p. 643-647, 1996.

GRANGER, D.L., TAINTOR, R.R., BOOCKVAR, K.S., et al. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. **Methods Enzymol.** v.268, p. 142-151, 1996.

GROSS, S. S.; STUEHR, D. J.; AISAKA, K.; JAFFE, E.A.; LEVI, R.; GRIFFITH, O.W. Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by N^G-aminoarginine, N^G-nitroarginine and N^G-methylarginine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 170, p. 96-103, 1990.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997.

HARRIS Jr, E. D. Rheumatoid arthritis. Patophysiology and implications for therapy. **Engl. J. Med.**, v. 322, p. 1277-1289, 1990.

HALEY, J. E.; DICKENSON, A. H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 251-258, 1992.

HAYASHIDA, K.; KANEKO, T.; TAKEUCHI, T.; SHIMIZU, H.; ANDO, K.; HARADA, E. Oral administration of lactoferrin inhibits inflammation and nociception in rat adjuvant-induced arthritis. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 66, p. 149-154, 2004.

HEYMER, B.; SPANEL, R.; HFERKAMP, O. Experimental models of arthritis. **Curr. Top. Pathol.**, v. 71, p. 123-152, 1982.

HOBBS, A. J; HIGGS, A.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 39, p. 191-220, 1999.

HOCHBERG, M. C.; SILMAN, A. J.; SMOLEN, J. S.; WEINBLATT, M. E.; WEISMAN, M. H. **Rheumatology.** 3rd ed. Edinburgh: Mosby, 2003. v. 1.

HOLTHUSEN, H.; ARNDT, J. O. Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. **Neurosci. Lett.**, v. 165, p. 71-74, 1994.

HOWE, D.; BARROWS, L. F.; LINDSTROM, N. M.; HEINZEN, R. A. Nitric oxide inhibits coxiella burnetti replication and parasitophorus vacuole maturation. **Infec. Immun.**, v. 70, p. 5140-5147, 2002.

IALENTI, A.; MONCADA, S.; Di ROSA, M. Modulation of adjuvant arthritis by endogenous nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 701-706, 1993.

IGNARRO, L. J. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. **Blood Vessels**, v. 28, p. 67-73, 1991.

IRAVANI, M.M.; LIU, L.; ROSE, S.; JENNER, P. Role of inducible nitric oxide synthase in N-methyl-d-aspartic acid-induced strio-nigral degeneration. **Brain Res.** v. 1029, p. 103-113. 2004

JACOBSON, L.; LINDGARDE, F.; MANTHORPE, R. The commonest rheumatic complaints of over six week duration in a twelve-month period in a defined Swedish population. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 18, p. 353-360, 1989.

JAMES, F. R.; LARGE, R. G.; BUSHNELL, J. A.; WELLS, J. E. Epidemiology of pain in New Zealand. **Pain.** v. 44, p. 279-283, 1991.

JASIN, H. E.; ZIFF, M. Immunoglobulin and specific antibody synthesis in a chronic inflammatory foccus: antigen-induced synovitis. **J. Immunol.**, v. 102, p. 355-367, 1969.

JAVANMARDI, K.; PARVIZ, M.; SADR, S. S.; KESHAVARZ, M.; MINAI, B.; DEHPOUR, A. R. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide in the rostral ventromedial medulla in modulating morphine pain-inhibitory signals from the periaqueductal grey matter in rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 32, p. 585-589, 2005.

JENNER, P.; OLANOW, C. W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 47, p. S161-170, 1996.

JOHNSON, A. R.; HUGLI, T. E.; MULLER-EBERHARD, H. I. Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5. **Immunology**, v. 28, n. 6 p. 1067-1073, 1975.

KALDEN, J. R. Emerging role of anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatic diseases. **Arthritis Res.**, v. 4, p. S34-40, 2002.

KAWABATA, A.; MANABE, S.; TAKAGI, H. Comparison of antinociception induced by supraspinally administered L-arginine and kyotorphin. **Br. J. Pharmacol.**, v. 112, p. 817-822. 1994.

KEATING, G. M.; PERRY, C. M. Infliximab: an updated review of its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis. **BioDrugs**, v. 16, p. 111-148, 2002.

KENGATHARAN, K. M.; De KIMPE, S. J.; THIEMERMANN, C. Role of nitric oxide in the circulation failure and organ injury in a rodent model of Gram-positive shock. **Br. J. Pharmacol.**, v. 119, p. 1411-1421, 1996.

KEYSTONE, E. C.; SCHORLEMMER, H. U.; POPE, C.; ALLISON, A. C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis Rheum.**, v. 20, p. 1396-1401, 1989.

KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 86, p. 5159-5162. 1989.

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; HAMALAINEN, M.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages. **Mol. Pharmacol.** v. 62, p. 698-704. 2002.

KREICBERGS, A. Alteration in endogenous opioid system due to chronic inflammatory pain conditions. **Euro. J. Pharmacol.**, v. 435, p. 245-252, 2002.

LANDER, H. M.; SEHAJPAL, P.; LEVINE, D. M.; NOVOGRODSKY, A. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. **J. Immunol.**, v. 150, p. 1509-1516, 1993.

LARSON, A. A.; GIOVENGO, S. L.; RUSSEL, I. J.; MICKALEK, J. E. Changes in the concentration of amino acids in the cerebrospinal fluid that correlate with pain in patients with fibromyalgia: implications for nitric oxide pathways. **Pain**, v. 87, p. 201-211, 2000.

LAURIDO, C.; HERNÁNDEZ, A.; CONSTANDIL, L.; PELISSIER, T. Nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase are involved in spinal cord wind-up activity of monoarthritic, but not of normal rats. **Neuroscience Letters**, v. 352, p. 64-66. 2003.

LAWAND, N. B.; WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N.; Blockage of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. **Neuroreport.**, v. 8, p. 895-899, 1997.

LEVINE, J. D.; FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **J. Neurosci.**, v. 13, p. 2273-2286, 1993.

LORENZ, H. M.; KALDEN, J. R. Perspectives for TNF-alpha-targeting therapies. **Arthritis Res.**, v. 4, p. S17-S24, 2002.

MAINI, R. N.; FELDMANN, M. How does infliximab work in rheumatoid arthritis? **Arthritis Res.**, v. 4, p. S22-S28, 2002.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science**, v. 257, p. 1276-1279, 1992.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. **Pain**, v. 54, p. 291-300, 1993.

MAO, J.; PRICE, D. D.; MAYER, D. J.; Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. **J. Neurosci.**, v. 14, p. 2301-2312, 1994.

MATSUNO, H.; YUDOH, K.; KATAYAMA, R.; NAKAZAWA, F.; UZUKI, M.; SAWAI, T.; YONEZAWA, T.; SAEKI, Y.; PANAYI, G.S.; PITZALIS, C.; KIMURA, T. The role of TNF-alpha in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. **Rheumatology**, v. 41, p. 329-337, 2002.

McCALL, T. B.; FEELISCH, M.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. **Br. J. Pharmacol.**, v. 102, p. 234-238, 1991.

McCARTNEY-FRANCIS, N. L. ; ALLEN, J. B.; MIZEL, D. E.; ALGINA, J. E.; XIE, Q.-W.; NATHAN, C. F.; WAHL, S. M. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 749-754, 1993.

McCARTNEY-FRANCIS, N. L.; SONG, X. Y.; MIZEL, D. E.; WAHL, C. L.; WAHL, S. M. Hemoglobin protects from streptococcal cell wall-induced arthritis. **Arthritis Rheumatol.**, v. 43, p. 1119-1127, 1999.

McCARTNEY-FRANCIS, N. L. ; SONG, X.-Y.; MIZEL, D. E.; WAHL, S. M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates eosinophilic joint disease. **J. Immunol.**, v. 166, p. 2734-2740, 2001.

MACINTYRE, I.; ZAIDI, M.; ALAM, A.S.; DATTA, H.K.; MOONGA, B.S.; LIDBURY, P.S.; HECKER, M.; VANE, J.R. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 88, p. 2936-2940. 1991.

MACPHERSON, H.; NOBLE, B.S.; RALSTON, S.H. Expression and functional role of nitric oxide synthase isoforms in human osteoblast-like cells. **Bone**. v. 24, p. 179-185. 1999.

MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. NO and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, v. 52, p. 127-136, 1993.

MELLER, S. T.; CUMMINGS, C. P.; GRAUB, R. J.; GEBHART, G. F. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenin in the rat. **Neuroscience**, v. 60, p. 367-374, 1994.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanism: a new theory. **Science**, v. 150, p. 971-979, 1965.

MERRYMAN, P. F.; CLANCY, R. M.; HE, X. Y.; ABRAMSON, S. B. Modulation of human T cell response by nitric oxide and its derivative, S-nitrosoglutathione. **Arthritis Rheumatol**, v. 36, p. 1414-1422, 1993.

MERSKEY, H.; TRIMBLE, M. Personality, sexual adjustment, and brain lesions in patients with conversion symptoms. **Am. J. Psychiatry**, v. 136, p. 179-182, 1979.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 1-169, 1999.

MOLINA-HOLGADO, E.; VELA, J. M.; AREVALO-MARTIN, A.; GUAZA, C. LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. **Eur. J. Neurosci.**, v. 13, p. 493-502, 2001.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem. Pharmacol.**, v. 38, p. 1709-1715, 1989.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Relationship between prostacyclin and nitric oxide in the thrombotic process. **Throm. Res.**, Suppl. 11, p. 3-13, 1990.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MORELAND, L. W.; MISISCHIA, R. J. Rheumatoid arthritis: developing pharmacological therapies. **Expert. Opin. Investig. Drugs.**, v. 11, p. 927-935, 2002.

MORGAN, C. V.; BABBEDGE, R. C.; GAFFEN, Z.; WALLACE, P.; HART, S. L.; MOORE, P. K. Synergistic anti-nociceptive effect of L-NG-nitro arginine methyl ester (L-NAME) and flurbiprofen in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 106, p. 493-497, 1992.

MURAD, F.; ISHII, K.; FORSTERMANN, U.; GORSKY, L.; KERWIN, J.F.JR.; POLLOCK, J.; HELLER, M.. EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. **Adv. Sec. Mess. Phosph. Res.**, v. 24, p. 441-448, 1990.

MURRELL, G. A.; DOLAN, M. M.; JANG, D.; SZABO, C.; WARREN, R.F.; HANNAFIN, J.A. Nitric oxide: an important articular free radical. **J. Bone Joint Surgery.**, v. 78, p. 265-274, 1996.

NAKANE, M.; KLINGHOFER, V.; KUK, J. E.; DONNELLY, J.L.; BUDZIK, G.P.; POLLOCK, J.S.; BASHA, F.; CARTER, G.W. Novel potent and selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase. **Mol. Pharmacol.**, v. 47, p. 831-834, 1995.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Manual sobre cuidados e uso de animais de laboratório.** [S.I.], 2003.

OKANO, K.; KURAISHI, Y.; SATOH, M. Pharmacological evidence for involvement of excitatory amino acids in aversive response induced by intrathecal substance P in rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 16, p. 861-865, 1993.

OKESON, J. P. **Dores bucofaciais.** São Paulo: Quintessence, 1998.

OSBORNE, M. G.; CODERRE, T. J.; Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 102, p.198-202, 1991.

OSBORNE, M. G.; CODERRE, T. J. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.** v. 126, p. 1840-1846, 1999.

OSWALD, I. P.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A.; JAMES, S. L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. **J. Immunol.**, v. 148, p. 3578-3582, 1992.

OYANAGUI, Y. Nitric oxide and superoxide radical are involved in both initiation and development of adjuvant arthritis in rats. **Life Sci.**, v. 54, p. 285-289, 1994.

PALMER, R. M.; HICKERY, M. S.; CHARLES, I. G.; MONCADA, S.; BAYLISS, M.T.; Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 193, p. 398-405, 1993.

PALMER, R. M. J.; REES, D. D.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 153, p. 1251-1256, 1988.

PAUL-CLARK, M. J.; GILROY, D. W.; WILLIS, D.; WILLOUGHBY D.A.; TOMLINSON, A. Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. **J. Immunol.**, v. 166, p. 1169-1177, 2001.

PAYA, M.; PASTOR, P. G.; COLOMA, J.; ALCARAZ, M. J. Nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase pathways in the inflammatory response induced by zymosan in the rat air pouch. **Br. J. Pharmacol.**, v. 120, p. 1445-1452, 1997.

PELLETIER, J. P.; JOVANOVIĆ, D. V.; LASCAU-COMAN, V.; FERNANDES, J.C.; MANNING, P.T.; CONNOR, J.R.; CURRIE, M.G.; MARTEL-PELLETIER, J. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. **Arthritis Rheumatol.**, v. 43, p. 1290-1299, 2000.

PEPICELLI, O.; RAITERI, M.; FEDELE, E. The NOS/sGC pathway in the rat central nervous system: a microdialysis overview. **Neurochem. Int.** v. 45, p. 787-797. 2004.

PERKINS, N. M.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neuroscience**, v. 101, p. 745-757, 2000.

PETERS, R. R.; BAIER, K. P.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. M.; da SILVA ROCHA, J. C.; MARQUES BEZERRA, M.; de ALBUQUERQUE RIBEIRO, R.; de BRUM-FERNANDES, A. J.; ROCHA FARIAS, M.; CASTRO DA ROCHA, F. A.; RIBEIRO-do-VALE, R. M. Nitric oxide and cyclooxygenase may participate in the analgesic and anti-inflammatory effect of the cucurbitacins fraction from *Wilbrandia ebracteata*. **Life Sci.**, v. 73, p. 2185-2197, 2003.

PIGUET, P. F.; GRAU, G. E.; VESIN, C.; LOETSCHER, H.; GENTZ, R.; LESSLAUER, W.. Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumor necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. **Immunology**, v. 77, p. 510-514, 1992.

PLUNKETT, J. A.; YU, C. G.; EASTON, J. M.; BETHEA, J. R.; YEZIERSKI, R. P. Effects of interleukin-10 (IL-10) on pain behavior and gene expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. **Exp. Neurol.**, v. 168, p. 144-154, 2001.

POZZA, M.; BETTELLI, C.; MAGNANI, F.; MASCIA, M.T.; MANZINI, E.; CALZA, L. Is neuronal nitric oxide involved in adjuvant-induced joint inflammation? **Eur. J. Pharmacol.**, v. 359, p. 87-90, 1998.

PRADO, W. A.; SCHIAVON, V. F.; CUNHA, F. Q. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 441, p. 57-65, 2002.

PRICE, D. D.; MAYER, D. J.; MAO, J.; CARUSO, F. S. NMDA-receptor antagonists and opioid receptor interactions as related to analgesia and tolerance. **J. Pain Symptom Management.**, v. 19, p. S7- S11, 2000.

RALSTON, S. H.; HO, L. P.; HELFRICH, M. H.; GRABOWSKI, P.S.; JOHNSTON, P.W.; BENJAMIN, N.. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. **J. Bone Miner. Res.**, v. 10, p. 1040-1049, 1995.

REES, D. D.; CELLEK, S.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Dexamethsone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone. An insight into endotoxin shock. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 173, p. 541-547, 1990.

REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; SCHULZ, R.; HODSON, H.F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, v. 101, p. 746-752, 1990.

REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, p. 444-445. 1969.

RIDGER, V. C.; GREENACRE, S. A. B.; HANDY, R. L. C.; HALLIWELL, B.; MOORE, P. K.; WHITE-MAN, M.; BRAIN, S. D. Effect of peroxynitrite on plasma extravasation, microvascular blood flow and nociception in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 122, p. 1083-1088, 1997.

ROCHA, F. A.; ANDRADE, L. E.; RUSSO, M.; JANCAR, S. PAF modulates eicosanoid and TNF release in immune-complex arthritis in rats. **J. Lipid. Mediat. Cell Signal.**, v. 16, p. 1-10, 1997.

ROCHA, F. A. C.; ARAGÃO Jr., A. G. M.; OLIVEIRA, R. C.; VALE, M. R.; RIBEIRO, R. A. Periarthritis promotes articular incapacitation in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflam. Res.**, v. 48, p. 485-489, 1999.

ROCHA, J. C. S.; PEIXOTO, M. E. B.; JANCAR, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 136, p. 588-596, 2002.

ROCHA, F. A.; TEIXEIRA, M. M.; ROCHA, J. C.; GIRÃO, V. C.; BEZERRA, M. M.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q. Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 497, p. 81-86. 2004.

SALTER, D. M.; WRIGHT, M. O.; MILLWARD-SADLER, S. J. NMDA receptor expression and roles in human articular chondrocyte mechanotransduction. **Biorheology**, v. 41, p. 273-281, 2004.

SCHAIBLE, H.; GRUBB, B. D. Afferent and spinal mechanism of joint pain. **Pain**, v. 55, p. 5-54, 1993.

SCHWAB, J.M.; BEITER, T.; LINDER, J.U.; LAUFER, S.; SCHULZ, J.E.; MEYERMANN, R.; SCHLUESENER, H.J. COX-3--a virtual pain target in humans? **FASEB J.** v. 17, p. 2174-2175. 2003

SEKIGUCHI, F.; MITA, Y.; KAMANAKA, Y.; KAWAO, N.; MATSUYA, H.; TAGA, C.; KAWABATA, A. The potent inducible nitric oxide synthase inhibitor ONO-1714 inhibits neuronal NOS and exerts antinociception in rats. **Neuroscience Letters**, v. 365, p. 111-115, 2004.

SEMOS, M. L.; HEADLEY, P. M.; The role of nitric oxide in spinal nociceptive reflexes in rats with neurogenic and non-neurogenic peripheral inflammation. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1487-1497, 1994.

SESSLE, B. J.; HU, J. W. Mechanisms of pain arising from articular tissues. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 69, p. 617-626, 1991.

SERPELL, M. G.; DELEO, J. A.; COOMBS, D. W.; COLBURN, R. W.; TWITCHELL, B. B.; WILLENBRING, S.; FROMM, C. Intrathecal catheterization alone reduces autotomy after sciatic cryoneurolysis in the rat. **Life Sci.**, v. 53, p. 1887-1892, 1993.
STICHTENOTH, D. O.; FAULER, J.; ZEIDLER, H.; FRÖLICH, J. C. Urinary nitrate excretion is increased in patients with rheumatoid arthritis and reduced by prednisolone. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 54, p. 820-824, 1995.

STICHTENOTH, D. O.; FRÖLICH, J. C. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. **Br. J. Rheumatol.**, v. 37, p. 246-257, 1998.

SETOQUCHI, K.; TAKEYA, M.; AKAIKE, T.; SUGA, M.; HATTORI, R.; MAEDA, H.; ANDO, M.; TAKAHASHI, K. Expression of inducible nitric oxide synthase and its involvement in pulmonary granulomatous inflammation in rats. **Am. J. Pathol.**, v. 149, p. 2005-2022, 1996.

SNYDERMAN, S. E.; HOLT, L. E.; NORTON, P. M.; PHANSALKAR, S. V. Protein requirement of the premature infant. II. Influence of protein intake on free amino acid content of plasma and red blood cells. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 23, p. 890-895, 1970.

SOUSA, A. M.; PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Res.**, v. 897, p. 9-19, 2001.

SPETEA, M.; RYDELIUS, G.; NYLANDER, I.; AHMED, M.; BILEVICIUTE-LJUNGAR, I.; LUNDEBERG, T.; SVENSSON, S.; KREICBERGS, A. Alteration in endogenous opioid systems due to chronic inflammatory pain conditions. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 435, p. 245-252, 2002.

STAGLIANO, N. E.; DIETRICH, W. D.; PRADO, R.; GREEN, E. J.; BUSTO, R. The role of nitric oxide in the pathophysiology of thromboembolic stroke in the rat. **Brain Res.**, v. 759, p. 32-40. 1997.

STEFANOVIC-RACIC, M.; STADLER, J.; EVANS, C. H. Nitric oxide and arthritis. **Arthritis Rheumatol.**, v. 36, p. 1038-1044, 1993.

STEFANOVIC-RACIC, M.; MEYERS, K.; MESCHTER, C.; COFFEY, J.W.; HOFFMAN, R.A.; EVANS, C.H. N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. **Arthritis Rheum.**, v. 37, p. 1062-1069, 1994.

STEFANOVIC-RACIC, M.; MEYERS, K.; MESCHTER, C.; COFFEY, J. W.; HOFFMAN, R. A.; EVANS, C. H. Comparison of the nitric oxide synthase inhibitors methylarginine and aminoguanidine as prophylactic and therapeutic agents in rat adjuvant arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 22, p. 1922-1928, 1995.

STEFANOVIC-RACIC, M.; MEYERS, K.; MESCHTER, C.; COFFEY, J.W.; HOFFMAN, R.A.; EVANS, C.H. Comparison of the nitric oxide synthase inhibitors methylarginine and aminoguanidine as prophylactic and therapeutic agents in rat adjuvant arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 22, p. 1922-1928, 1995.

STICHTENOTH, D. O.; OSTHAUS, W. A.; FRÖLICH, J. C. Inhibition of nitric oxide synthesis is as effective as dexamethasone in treatment of adjuvant arthritis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 116, p. 90-96, 1995

STICHTENOTH, D.O.; FROLICH, J.C. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. **Br. J. Rheumatol.** v. 37, p. 246-257. 1998.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. **Cancer Res.**, v. 47, p. 5590-5594, 1987

SUGAMORI, T.; ISHIBASHI, Y.; SHIMADA, T.; TAKAHASHI, N.; SAKANE, T.; OHATA, S.; KUNIZAWA, Y.; INOUE, S.; NAKAMURA, K.; OHTA, Y.; SHIMIZU, H.; KATOH, H.; OYAKE, N.; MURAKAMI, Y.; HASHIMOTO, M. Increased nitric oxide in proportion to the severity of heart failure in patients with dilated cardiomyopathy: close correlation of tumor necrosis factor-alpha with systemic and local production of nitric oxide. **Circ. J.**, v. 66, p. 627-632, 2002.

SUNG, C. S.; WEN, Z. H.; CHANG, W. K.; HO, S. T.; TSAI, S. K.; CHANG, Y. C.; WONG, C. S. Intrathecal interleukin-1beta administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. **Brain Res.**, v. 1015, p. 145-153, 2004.

TEDESCO, L. S.; FUSELER, J.; MATTHEW, G.; WOLF, R.; ROERIG, S. C. Therapeutic administration of nitric oxide synthase inhibitors reverses hyperalgesia but not inflammation in a rat model of polyarthritis. **Pain**, v. 95, p. 215-223, 2002.

TEIXEIRA, M.J. ; CORREIA, C. F.; PIMENTA, C. A. M. **Dor:** conceitos gerais. São Paulo: Limay, 1994. 61 p.

TEIXEIRA, M.J.; FIGUERÓ, J. A. B. **Dor:** epidemiologia. Fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001. 406 p.

TETTA, C.; CAMUSSI, G.; MODENA, V.; TETTA, C.; CAMUSSI, G.; MODENA, V.; DI VITTORIO, C.; BAGLIONI, C. Tumor necrosis factor in serum and synovial fluid of patients with severe and active rheumatoid arthritis. **Ann. Rheumatol. Dis.**, v. 49, p. 665-667, 1990.

THIEMERMANN, C.; VANE, J. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 182, p. 591-595, 1990.

TSUJI, F.; OKI, K.; OKAHARA, A.; SUHARA, H.; YAMANOUCHI, T.; SASANO, M.; MITA, S.; HORIUCHI, M. Differential effects between marimastat, a TNF-alpha converting enzyme inhibitor and anti-TNF-alpha antibody on murine models for sepsis and arthritis. **Cytokine**, v. 17, p. 294-300, 2002.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Rat knee-join carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48, p. 4221-4427, 1992.

TURNER, C. H.; TAKANO, Y.; OWAN, I.; MURRELL, G. A. Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced one formation in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. E634-E639, 1996.

UEKI, Y.; MIYAKE, S.; TOMINAGA, Y.; EGUCHI, K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 23, p. 230-236, 1996.

URBAN, M. O.; COUTINHO, S. V.; GEBHART, G. F. Involvement of excitatory amino acid receptors and nitric oxide in the rostral ventromedial medulla in modulating secondary hyperalgesia produced by mustard oil. **Pain**, v. 81, p. 45-55, 1999.

VALE, M.L.; BENEVIDES, V.M.; SACHS, D.; BRITO, G.A.; DA ROCHA, F.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. **Br. J. Pharmacol.** v. 143, p. 833-844. 2004.

VAN DE LOO, F. A. J.; ARNTZ, O. J.; VAN ENCKEVORT, F. H. J.; VAN LENT, P.L.; VAN DEN BERG, W.B. Reduced cartilage proteoglycan loss during zymosan-induced gonarthrosis in NOS2-deficient mice and in anti-interleukin-1-treated wild-type mice with unabated joint inflammation. **Arthritis Rheum.**, v. 41, p. 634-646, 1998.

VAN'T HOF, R. J.; RALSTON, S. H. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. **J. Bone Miner. Res.**, v. 12, p. 1797-1804, 1997.

VERMEIRE, K.; THIELEMANS, L.; MATTHYS, P.; BILLIAU, A. The effects of NO synthase inhibitors on murine collagen-induced arthritis do not support a role of NO in the protective effect of IFN-gamma. **J. Leukoc. Biol.**, v. 68, p. 119-124, 2000.

VON ASMUTH, E. J.; MAESSEN, J. G.; VAN DER LINDEN, C. J.; BUURMAN, W.A. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 6 in zymosan-induced shock model. **Scand. J. Immunol.**, v. 32, p. 313-319, 1990.

VON KORFF, A.; DWORKIN, S. F.; LE RESCHE, L.; KRUGER, A. An epidemiologic comparison of pain complaints. **Pain**, v. 32, p. 173-183, 1988.

WALL, P. D. The gate control theory of pain mechanisms: A re-examination and re-statement. **Brain**, v. 101, p. 1-18, 1978.

WARFIELD, C. A.; BAJWA, Z. H. **Principles and practice of pain medicine**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 2004.

WILDERMAN, M. J.; ARMSTEAD, W. M. Role of neuronal NO synthase in relationship between NO and opioids in hypoxia-induced pial artery dilation. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. H1807-1815. 1997.

WILLIAMS, R. O.; FELDMANN, M.; MAINI, R. N. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 9784-9788, 1992.

WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J. Clin. Neurophysiol.**, v. 14, p. 2-31, 1997.

WOLFF, D. J.; LUBESKIE, A. Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 316, n. 1, p. 290-301, 1995a.

WOOD, J. N.; HEATH, M. J. S. Molecules that specify modality: mechanism of nociception. **The J. of Pain**, v. 3, p. 19-25, 2000.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neurophatic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and manegement. **Lancet**, v. 353, p. 1959-1964, 1999.

WOOLF, C. J.; THOMPSON, S. W. N. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D- aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of postinjury pain hypersensitivity states. **Pain**, v. 44, p. 293-299, 1991.

WOOLF, C. J.; DECOSTERD, I. Implications of recent advances in the understanding of pain pathophysiology for the assessment of pain in patients. **Pain**, v. 6, p. S141-S147, 1999.

WU, Z.; ZHANG, J.; NAKANISHI, H. Leptomeningeal cells activate microglia and astrocytes to induce IL-10 production by releasing pro-inflammatory cytokines during systemic inflammation. **J. Neuroimmunol.**, v. 167, p. 90-98, 2005.

YONEHARA, N.; TAKEMURA, M.; YOSHIMURA, M.; IWASE, K.; SEO, H. G.; TANIGUCHI, N.; SHIGENAGA, Y. Nitric oxide in the rat spinal cord in Freund's adjuvant induced hyperalgsia. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 75, p. 327-335, 1997.

ANEXOS

Blockade of leukotriene B₄ prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis

Francisco Airton Castro da Rocha^{a,*}, Mauro Martins Teixeira^b,
José Carlos da Silva Rocha^c, Virgínia Cláudia Carneiro Girão^c, Mirna Marques Bezerra^d,
Ronaldo de Albuquerque Ribeiro^c, Fernando de Queiroz Cunha^e

^aDepartment of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Tiburcio Cavalcante, 2100/1201, Dionisio Torres, Fortaleza, Ceará Cep 60125-101, Brazil

^bDepartment of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^cDepartment of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^dFaculty of Medicine of Sobral, Federal University of Ceará, Brazil

^eDepartment of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Received 19 January 2004; received in revised form 1 June 2004; accepted 17 June 2004

Available online 21 July 2004

Abstract

We investigated whether leukotrienes mediate cell influx and articular incapacitation in zymosan-induced arthritis. Rats received 1 mg zymosan intra-articularly (i.a.). The hyperalgesia was measured using the rat articular incapacitation test. Cell influx, leukotriene B₄ and prostaglandin E₂ levels were assessed in the joint exudate, at 6 h. Groups received either the leukotriene B₄ synthesis inhibitor MK 886 (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-*t*-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid 30 min before or 2 h after the zymosan; 0.3–3 mg kg⁻¹ i.p.), the leukotrienes synthesis inhibitor BWA₄C (*N*-(3-phenoxybenzyl)-acetohydroxamic acid—2 h after the zymosan; 10 µg i.a.) or the peptido-leukotrienes antagonist sodium montelukast (30 min before and 2 h after the zymosan; 10 mg kg⁻¹ per os). MK 886 inhibited the articular incapacitation and cell influx, while reducing leukotriene B₄, but not prostaglandin E₂ levels. BWA₄C inhibited the articular incapacitation. Sodium montelukast did not affect either of the parameters. The data suggest that leukotriene B₄ is involved in cell influx and articular incapacitation in zymosan arthritis.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Leukotrienes; Arthritis; Zymosan; Neutrophils; Hyperalgesia; Pain

1. Introduction

Limitation of movement secondary to joint hyperalgesia is a serious burden to patients presenting with inflammatory arthropathies. The rat knee-joint incapacitation test was designed to study articular incapacitation, defined as the inability of a rat with experimentally induced arthritis to walk normally (Tonussi and Ferreira, 1992). In the present study, we assumed that articular incapacitation reflects joint hyperalgesia following an inflammatory insult to the joint.

Zymosan, a polysaccharide from yeast cell walls, produces a severe and erosive synovitis (Keystone et al., 1989) associated with acute increases in vascular permeability and cell migration followed by a progressive synovitis (Gegout et al., 1994). We have used the zymosan-induced arthritis model as a tool to investigate the effect of inflammatory mediators in the synovial oedema, cell influx and also in the inflammatory hyperalgesia that happens in this model in the rat (Rocha et al., 1999).

The participation of neutrophils in the pathogenesis of tissue lesions in arthritis has long been recognized. These cells are predominant in the synovial exudates of a variety of inflammatory arthropathies, including gout, Reiter's disease

* Corresponding author. Tel.: +55 85 288 8342; fax: +55 85 244 6215.
E-mail address: arocha@ufc.br (F.A.C. da Rocha).

and rheumatoid arthritis (Harris, 1990). With respect to rheumatoid arthritis, although neutrophils do not seem to be responsible for the perpetuation of the chronic synovitis, these cells are important sources of substances that promote cartilage breakdown as well as bone resorption, such as reactive oxygen and nitrogen species, lysosomal enzymes and metalloproteases (Hampton et al., 1998). Indeed, the efficacy of the so-called disease modifying anti-rheumatic drugs in rheumatoid arthritis is usually associated with their ability to decrease neutrophil influx into the inflamed joints (Kraan et al., 2000; Tak and Bresnihan, 2000). Therefore, strategies to limit neutrophil trafficking and/or activation have received attention as potential alternatives to treat arthritis.

Amongst the substances involved in neutrophil recruitment to inflammatory foci, leukotrienes appear to be very relevant. Leukotriene B₄ is a very potent chemotactic agent for neutrophils both in vitro and in vivo (Crooks and Stockley, 1998). The nonsteroidal anti-inflammatory drugs currently used in clinical practice act through inhibiting the cyclooxygenases, thereby limiting prostanooids production, without blocking lipoxygenases and the subsequent leukotrienes production. Therefore, it was postulated that a dual inhibitor could be more efficacious as an anti-inflammatory compound (Unangst et al., 1994). The pharmacological strategies to block leukotrienes include either 5-lipoxygenase inhibition, which is a rate-limiting step in leukotrienes synthesis or the use of selective leukotrienes receptor antagonists. The compounds BWA₄C and MK 886 block the production of all leukotrienes, the latter through binding to the 5-lipoxygenase activating peptide (FLAP) (Depre et al., 1993; Tateson et al., 1988). On the other hand, the compound sodium montelukast, which is currently used as a treatment for asthma, selectively binds to cysteinyl receptors, functioning as a receptor antagonist for cysteinyl leukotrienes (Vianna and Martin, 1998).

Though leukotrienes, mainly leukotriene B₄, are considered to be important mediators of neutrophil migration, they have also been linked to pain mechanisms, apparently as a secondary phenomena resulting from their activity as neutrophil chemoattractants (Levine et al., 1984). In the present study, we investigated the effect of MK 886, BWA₄C and sodium montelukast in the zymosan-induced arthritis in rats, focusing on the possible correlation between the hyperalgesic effect of leukotrienes and cell migration.

2. Materials and methods

2.1. Induction of the zymosan arthritis

Male Wistar rats (180–220 g) from our own animal facilities were used throughout the experiments. All experiments were designed to minimize animal suffering and to use the minimum number of animals associated with valid statistical evaluation. Surgical procedures and animal treat-

ments were conducted in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (DHEW Publication, Bethesda, MD, USA).

2.2. Evaluation of articular incapacitation

After light ether anesthesia, rats were subjected to the intra-articular (i.a.) injection of 1mg zymosan (50 µl total volume), dissolved in sterile saline, into their right knee joints. Control animals received saline. We used the rat knee-joint incapacitation test, as described previously, as a measure of the inflammatory joint hyperalgesia (Tonussi and Ferreira, 1992). Briefly, after zymosan injection, animals were put to walk on a steel rotary drum (30 cm wide×50 cm diameter), covered with a fine-mesh non-oxidizable wire screen, which rotates at 3 rpm. Specially designed metal gaiters were wrapped around both hind paws. After placement of the gaiters, the animals were allowed to walk for habituation. The right paw was then connected via a simple circuit to a microcomputer data input/output port. The paw elevation time is the time the animal walks failing to touch the cylinder with the injected hind paw, during a 60-s period, which is directly proportional to the articular incapacitation. The paw elevation time was measured at baseline and then hourly, until sacrifice, at 6 h after injection of the zymosan, irrespective of the drug treatments. Animals that received the compounds prior to or 2 h after the zymosan were regarded as pertaining to the prophylactic and therapeutic groups, respectively.

2.3. Evaluation of cell influx, leukotriene B₄ and prostaglandin E₂ release

Six hours after injection of the zymosan, the animals were anaesthetized (chloral hydrate 400 mg kg⁻¹ i.p.), killed by cervical dislocation and ex-sanguinated. The synovial cavity of the knee joints was then washed with 0.4 ml saline containing 5 U/ml heparin. The synovial exudates were collected by aspiration. Total and differential cell counts were then performed using a Neubauer chamber and Diff-Quick™ staining, respectively. After centrifugation (500 g/10 min), the supernatant was stored at -70 °C and used for determination of leukotriene B₄ and prostaglandin E₂ concentrations using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits.

2.4. Drug treatments

In order to analyze the prophylactic and the therapeutic effect of the compounds, MK 886 (0.3 or 3 mg kg⁻¹ i.p.) was injected 30 min prior to or 2 h after injection of zymosan, respectively; sodium montelukast (10 mg kg⁻¹ per os) was administered 30 min before and 2 h after injection of zymosan. Non-treated groups consisted of rats that received just 1 mg zymosan i.a., followed by 0.9% w/v sterile NaCl i.p. A group that received 10% carboxymethylcellulose in saline, per os, was used as a vehicle control for

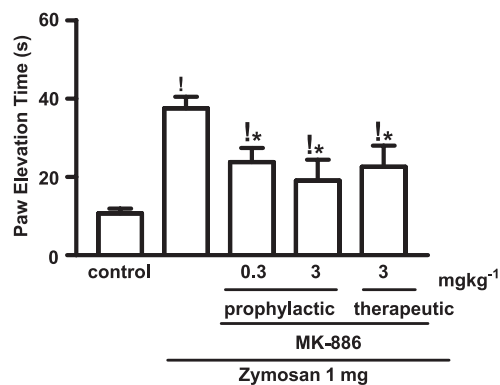


Fig. 1. Effect of the prophylactic or therapeutic administration of MK 886 on articular incapacitation in zymosan arthritis. The articular incapacitation was measured hourly, as the increase in the paw elevation time, over 6 h after injection of 1 mg zymosan (i.a.). MK 886 (0.3 or 3 mg kg⁻¹ i.p.) was injected 30 min prior to or 2 h after the zymosan. All groups but the control animals received zymosan i.a. The non-treated group was given saline i.p. followed by the zymosan. MK 886 significantly ($P<0.05$) reduced the articular incapacitation regardless of the injection strategy. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. of maximal paw elevation time; $n=6$ animals for each group. [!] $P<0.05$ compared to control; ^{*} $P<0.05$ compared to zymosan.

the orally administered compounds. In order to study the effect of the local administration of a lipoxygenase inhibitor, a group received the compound BWA₄C (10 μ g in 50 μ l of saline, i.a.) dissolved in 2% dimethylsulfoxide (DMSO) either 30 min before or 2 h after injection of the zymosan. The control for this group received 50 μ l of a 2% DMSO solution i.a. 30 min before or 2 h after the zymosan. There were six animals for each group.

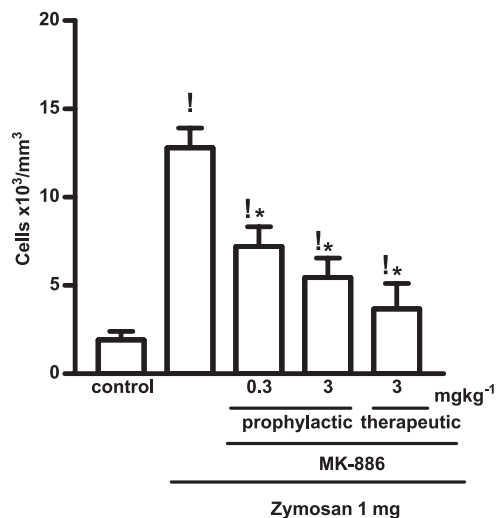


Fig. 2. Effect of the prophylactic or therapeutic administration of MK 886 on the cell influx into the joints measured at 6 h after injection of 1 mg zymosan (i.a.). MK 886 (0.3 or 3 mg kg⁻¹ i.p.) was injected 30 min prior to or 2 h after the zymosan. All groups but the control animals received zymosan. The control group was given saline (i.a.). The non-treated group was given saline i.p. followed by the zymosan. MK 886 significantly ($P<0.05$) reduced the cell influx regardless of the injection strategy. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. of total leukocytes at 6 h of zymosan arthritis; $n=6$ animals for each group. [!] $P<0.05$ compared to control; ^{*} $P<0.05$ compared to zymosan i.a.

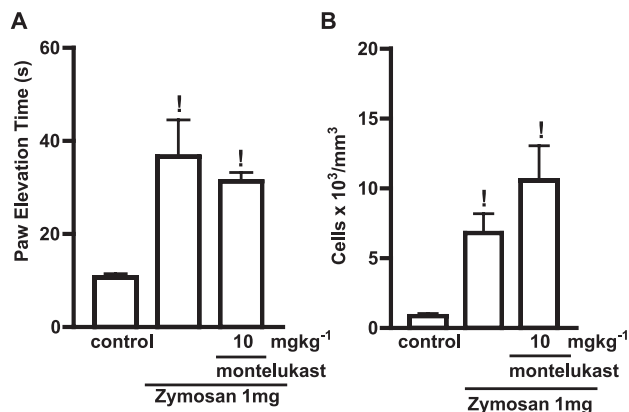


Fig. 3. (A) Effect of the administration of sodium montelukast on the articular incapacitation in zymosan arthritis. Sodium montelukast (10 mg kg⁻¹ per os) was injected 30 min prior to and 2 h after injection of 1 mg zymosan (i.a.). The articular incapacitation was measured hourly, as the increase in the paw elevation time, over 6 h after injection of 1 mg zymosan (i.a.). All groups but the control animals received zymosan. The control group was given saline (i.a.). The non-treated group was given saline i.p. followed by the zymosan. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. of maximal paw elevation time; $n=6$ animals for each group. [!] $P<0.05$ compared to control. (B) Effect of sodium montelukast on the cell influx into the joints measured at 6 h after injection of 1 mg zymosan (i.a.). Sodium montelukast (10 mg kg⁻¹ per os) was injected 30 min prior to and 2 h after the zymosan. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. of total leukocytes; $n=6$ animals for each group. [!] $P<0.05$ compared to control.

2.5. Drugs and reagents

Zymosan and MK 886 were purchased from Sigma, St. Louis, USA; BWA₄C was a kind donation of Wellcome,

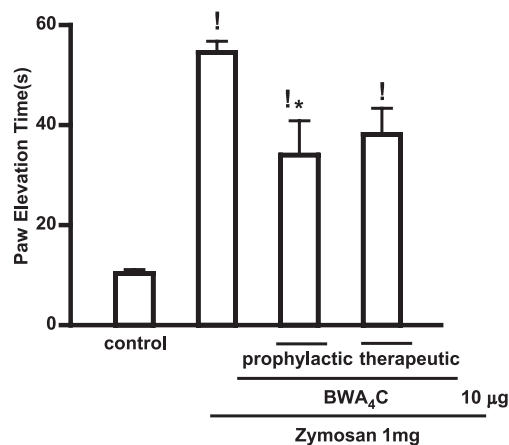


Fig. 4. Effect of the prophylactic or therapeutic administration of BWA₄C on the articular incapacitation in zymosan arthritis. The articular incapacitation was measured hourly, as the increase in the paw elevation time, over 6 h after injection of 1 mg zymosan (i.a.). BWA₄C (10 μ g i.a.) was injected 30 min prior to or 2 h after the zymosan. All groups but the control animals received zymosan. The control group was given saline (i.a.). The non-treated group was given saline i.a. 30 min before the zymosan. BWA₄C significantly ($P<0.05$) reduced the articular incapacitation when given prophylactically. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. of maximal paw elevation time; $n=6$ animals for each group. [!] $P<0.05$ compared to control; ^{*} $P<0.05$ compared to zymosan.

London, UK. Sodium montelukast was purchased from Merck Sharp Dohme, São Paulo, Brazil. The leukotriene B₄ and prostaglandin E₂ ELISA kits were purchased from Cayman Chem., USA.

2.6. Statistics

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). Statistically significant differences between groups were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Effect of systemic leukotriene blockade

The effect of the administration of MK 886 and sodium montelukast on the articular incapacitation of rats subjected to the zymosan arthritis is shown in Figs. 1 and 3, respectively. MK 886 significantly ($P < 0.05$) inhibited the articular incapacitation both when given prophylactically and therapeutically. Sodium montelukast had no effect on the articular incapacitation.

The effect of the prophylactic or therapeutic administration of MK 886 or sodium montelukast on the cell influx into the joint exudates of rats subjected to the zymosan arthritis is shown in Figs. 2 and 3, respectively. Whereas MK 886 significantly inhibited the cell influx, sodium montelukast did not modify the cell influx.

3.2. Effect of local leukotrienes synthesis blockade

Fig. 4 illustrates the effect of the administration of BWA₄C i.a. showing that this compound provoked a significant reduction of the articular incapacitation when injected prophylactically ($P < 0.05$). Though there was a 30% reduction of the articular incapacitation when BWA₄C was injected therapeutically, it did not reach statistical significance.

Table 1
Effect of MK 886 on leukotriene B₄ and prostaglandin E₂ levels released into the joint exudates in zymosan-induced arthritis

	Leukotriene B ₄ (pg/ml)	Prostaglandin E ₂ (ng/ml)
Zymosan	200 ± 14.7	1656 ± 43
Zymosan+ MK 886	158 ± 7.75*	1758 ± 21

Rats were given 1 mg zymosan (i.a.). Leukotriene B₄ and prostaglandin E₂ levels released into the joint exudates at 6 h of arthritis were measured using ELISA. MK 886 (3 mg kg⁻¹ i.p.) was given 30 min prior to the zymosan. Data represent mean ± S.E.M.; $n = 6$ animals for each group.

* $P < 0.05$ compared to zymosan.

3.3. Effect of MK 886 on leukotriene levels

Table 1 shows that the administration of MK 886 significantly reduced the levels of leukotriene B₄, but not of prostaglandin E₂, obtained in the synovial exudates of rats, 6 h after the injection of zymosan, as compared to the non-treated group ($P > 0.05$).

4. Discussion

The present study demonstrates, for the first time, that both local and systemic blockade of leukotrienes synthesis, but not the antagonism of cysteinyl leukotrienes receptors, inhibit articular incapacitation in an experimental arthritis model. Articular incapacitation, as measured in the present study, was shown to be inhibitable by classic analgesic and anti-inflammatory compounds using carrageenin as the inciting agent (Tonussi and Ferreira, 1992). Though oedema could be responsible for the articular incapacitation, previous data argue against this premise. Actually, intra-articular injection of dextran, despite eliciting joint oedema, does not lead to articular incapacitation (Tonussi and Ferreira, 1992). Moreover, the administration of nitric oxide synthase inhibitors prior to zymosan inhibits the articular incapacitation, while not altering joint oedema (Rocha et al., 2002). Apparently, local release of inflammatory mediators and cell infiltration would account for the articular incapacitation. In the present study, we used this parameter as a measure of hyperalgesia happening in the inflamed joint.

We observed that the leukotrienes synthesis inhibitor MK 886 reduced the hyperalgesia in zymosan-induced arthritis regardless of being administered prophylactically or therapeutically. The fact that MK 886 significantly reduced leukotriene B₄ levels in the joint exudates, while not altering prostaglandin E₂ release, point to a specific pharmacological activity of MK 886 as a 5-lipoxygenase inhibitor in this model. Using an immunocomplex arthritis model in rats, we have shown that leukotriene B₄ is released as early as 5 min after induction of arthritis (Rocha et al., 1997). In the zymosan-induced arthritis model in rats, we have obtained a significant release of leukotriene B₄ as early as 1 h after injection of the zymosan (our unpublished data). Since the cell influx into the joints in zymosan-induced arthritis starts at least 2 h after injection of the zymosan, it is clear that the production of leukotriene B₄ precedes the influx of the cells. Although neutrophils may be involved in the production of leukotrienes in this model, other cells, such as the resident synoviocytes, might also account for the almost immediate release of leukotriene B₄ after injection of the zymosan. Moreover, as MK 886 could prevent the inflammatory hyperalgesia and neutrophil influx when given after the administration of zymosan, it is reasonable to suppose that there is a sustained production of leukotriene B₄ that is preventable by the therapeutic administration of MK 886.

Similarly to what was observed with MK886, the intra-articular injection of the leukotriene synthesis inhibitor BWA₄C also significantly reduced the hyperalgesia. However, this effect reached statistical significance only when the compound was given prophylactically. BWA₄C is an acetohydroxamic acid which activity probably derives from the direct inhibition of the 5-lipoxygenase enzyme that is a rate-limiting enzyme in the leukotriene synthesis (Tateson et al., 1988). After oral administration, BWA₄C was shown to be more potent in inhibiting leukotriene B₄ synthesis rather than neutrophil influx after the subplantar injection of carrageenin in rats (Higgs et al., 1988). The dose of BWA₄C (10 µg/joint) used in the present study was shown to be able to inhibit eosinophil chemotaxis in an antigen-induced pleuritis (e Silva et al., 1992). Taken together, these results strongly argue for a participation of leukotrienes, mainly leukotriene B₄, in the inflammatory hyperalgesia in zymosan-induced arthritis.

As alluded to above, it has been proposed that the hyperalgesic activity of leukotriene B₄ is linked to its ability to promote neutrophil trafficking (Levine et al., 1984). Based on the well-known chemotactic activity of leukotriene B₄, we evaluated the cell influx into the joints. Our data have shown that the compound MK 886 significantly inhibited the cell influx in zymosan arthritis both when injected prophylactically and therapeutically. In the immunocomplex arthritis model in rats, we have shown that MK 886 also inhibited neutrophil migration, an effect that was associated with decreased release of leukotriene B₄ into the joint exudates (Rocha et al., 1997). Previous data obtained by our group suggest that joint hyperalgesia and neutrophil influx may be independent phenomena in zymosan arthritis. In this model, neutrophil influx is maximal at 6 h of arthritis, whereas the articular incapacitation, assumed as reflecting joint hyperalgesia, peaks between 3 and 4 h after injection of the zymosan (Rocha et al., 1999). Moreover, in the immunocomplex arthritis model, there is no demonstrable articular incapacitation, despite the neutrophil influx being similar to what is observed in zymosan arthritis (Rocha et al., 1999). However, based on the inhibitory effects of MK 886 on both neutrophil influx and hyperalgesia, our present data suggest that the analgesic effect obtained after leukotriene synthesis blockade is associated with and may be secondary to a reduction in neutrophil trafficking into the joints. The fact that the compound MK 886 reversed the inflammatory hyperalgesia and the leukotriene B₄ release into the joint exudates, without altering prostaglandin E₂ levels, argues for a major role of leukotrienes in the pain development in this model.

A previous study has shown that the selective leukotriene B₄ receptor antagonist LY293111Na inhibited the oedema and the neutrophil influx as well as cartilage and bone destruction in an antigen-induced arthritis model in guinea pigs. However, in that same study, LY293111Na showed only a slight inhibitory effect in the paw oedema

of the antigen-induced arthritis model in rats (Kuwabara et al., 2002). Our data showing that leukotriene B₄ is involved in the articular incapacitation and neutrophil influx, however, argue for an important role for this mediator in rat arthritis. The different compounds and stimuli used might explain this apparent discrepancy between the two studies.

The ability of cysteinyl leukotrienes to promote increase in vascular permeability and to contract the inferior airways in hypersensitivity reactions has prompted the use of these compounds as a treatment option in asthmatic patients. Zafirlukast, a selective cysteinyl receptor antagonist, was recently shown to inhibit the inflammatory nociception after injection of carrageenin into the rat paw, a peripherally mediated pain model (Jain et al., 2001). However, in that same study, zafirlukast did not inhibit the centrally mediated pain evoked in the tail-flick and the acetic acid writhings test in mice. To our knowledge, there are no studies on the antinociceptive effect of cysteinyl receptor antagonists using arthritis models. Our data have shown that sodium montelukast did not inhibit either the inflammatory hyperalgesia or the cell migration into the joint exudates in zymosan arthritis. Montelukast and zafirlukast are considered equipotent in antagonizing cysteinyl leukotrienes (Coreno et al., 2000; Ravasi et al., 2002). In the above-mentioned study, the administration of either 2.5 or 5.0 mg/kg of zafirlukast significantly inhibited the hyperalgesia after carrageenin injection into the rat paw (Jain et al., 2001). Thus, the possibility of insufficient dose of sodium montelukast to explain our present results seems unlikely. Overall, these results reinforce the idea that leukotriene B₄, rather than cysteinyl leukotrienes, is the main product of 5-lipoxygenase responsible for cell influx and hyperalgesia in the model.

The importance of leukotriene B₄ in arthritis cannot be overemphasized. A very recent clinical study has shown that an orally active leukotriene B₄ antagonist provided almost complete inhibition of the expression of the adhesion molecule CD11B/CD18 in the peripheral leukocytes from patients with rheumatoid arthritis, thus prompting the need for clinical studies to evaluate the possible clinical benefit of such compounds to these patients (Alten et al., 2004).

In summary, this study presents evidence that leukotriene B₄ is involved in both the influx of polymorphonuclear neutrophils into the joints and in the development of inflammatory hyperalgesia in the zymosan-induced arthritis in rats. Taking into account the well-known analgesic effect of the cyclooxygenase inhibitors, the designing of compounds able to inhibit both cyclooxygenase and lipoxygenase metabolites, mainly leukotriene B₄, may provide better analgesia in inflammatory arthropathies.

Acknowledgements

The authors thank FUNCAP, CNPq and FAPESP, Brazil.

References

- Alten, R., Gromnica-Ihle, E., Pohl, C., Emmerich, J., Steffgen, J., Roscher, R., Sigmund, R., Schmolke, B., Steinmann, G., 2004. Inhibition of leukotriene B₄-induced CD11B/CD18 (Mac-1) expression by BIL 284, a new long acting LTB₄ receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 63, 170–176.
- Coreno, A., Skowronski, M., Kotaru, C., McFadden Jr., E.R., 2000. Comparative effects of long-acting β_2 -agonists, leukotriene receptor antagonists, and a 5-lipoxygenase inhibitor on exercise-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 501–505.
- Crooks, S.W., Stockley, R.A., 1998. Leukotriene B₄. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 173–178.
- Depre, M., Friedman, B., Tanaka, W., van Hecken, A., Buntinx, A., DesSchepper, P.J., 1993. Biochemical activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor, in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 53, 602–607.
- e Silva, P.M., Martins, M.A., Lima, M.C., Alves, A.C., Diaz, B.L., Cordeiro, R.S., 1992. Pharmacological modulation of the late eosinophilia induced by antigen in actively sensitized rats. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 98, 355–360.
- Gegout, P., Gillet, P., Chevrier, D., Guingamp, C., Terlain, B., Netter, P., 1994. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Sci.* 55, PL321–PL326.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* 92, 300–317.
- Harris, R.R., 1990. Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy. *N. Eng. J. Med.* 322, 1277–1289.
- Higgs, G.A., Follenfant, R.L., Garland, L.G., 1988. Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: effects on acute inflammatory responses. *Br. J. Pharmacol.* 94, 547–551.
- Jain, N.K., Kulkarni, S.K., Singh, A., 2001. Role of cysteinyl leukotrienes in nociceptive and inflammatory conditions in experimental animals. *Eur. J. Pharmacol.* 423, 85–92.
- Keystone, E.C., Schorlemmer, H.U., Pope, C., Alisson, A.C., 1989. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum.* 20, 1396–1401.
- Kraan, M.C., de Koster, B.M., Elferink, J.G., Post, W.J., Breedveld, F.C., Tak, P.P., 2000. Inhibition of neutrophil migration soon after initiation of treatment with leflunomide or methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: findings in a prospective, randomized, double-blind trial in fifteen patients. *Arthritis Rheum.* 43, 188–1495.
- Kuwabara, K., Jyoyama, H., Fleisch, J.H., Hori, Y., 2002. Inhibition of antigen-induced arthritis in guinea pigs by a selective LTB₄ receptor antagonist LY293111Na. *Inflamm. Res.* 51, 541–550.
- Levine, J.D., Lau, W., Kwiat, G., Goetzl, E.J., 1984. Leukotriene B₄ produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. *Science* 225, 743–745.
- Ravasi, S., Capra, V., Panigalli, T., Rovati, E., Nicosia, S., 2002. Pharmacological differences among CysLT₁ receptor antagonists with respect to LTC₄ and LTD₄ in human lung parenchyma. *Biochem. Pharmacol.* 63, 1537–1546.
- Rocha, F.A.C., Andrade, L.E., Russo, M., Jancar, S., 1997. PAF modulates eicosanoids and TNF release in immune-complex arthritis in rats. *J. Lipid Mediators Cell Signal.* 16, 1–10.
- Rocha, F.A.C., Aragão Jr., A.G.M., Oliveira, R.C., Pompeu, M.M.L., Vale, M.R., Ribeiro, R.A., 1999. Periartthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflamm. Res.* 48, 485–490.
- Rocha, J.C.S., Peixoto, M.E.B., Jancar, S., Cunha, F.Q., Ribeiro, R.A., Rocha, F.A.C., 2002. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *Br. J. Pharmacol.* 136, 588–596.
- Tak, P.P., Bresnihan, B., 2000. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheum.* 43, 2619–2633.
- Tateson, J.E., Randall, R.W., Reynolds, C.H., Jackson, W.P., Bhattacharjee, P., Salmon, J.A., Garland, L.G., 1988. Selective inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase by novel acetohydroxamic acids: biochemical assessment in vitro and ex-vivo. *Br. J. Pharmacol.* 94, 528–539.
- Tonussi, C.R., Ferreira, S.H., 1992. Rat knee-joint incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain* 48, 421–427.
- Unangst, P.C., Wright, C.D., Schrier, D.J., Dyer, R.D., 1994. Synthesis and biological evaluation of anti-inflammatory activity 5-(3,5-bis-(1,1-dimethyl-ethyl)-4-hydroxy phenyl(methylene(oxazoles,-thiazoles, and imidazoles): a novel dual 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor with anti-inflammatory activity. *J. Med. Chem.* 37, 322–328.
- Vianna, E.O., Martin, R.J., 1998. Recent innovation in asthma in children with special reference to leukotriene receptor antagonists. *Pediatr. Pulmonol.* 29, 46–61.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)