

MIRLANE GUIMARÃES DE MELO CARDOSO

**EFEITO POTENCIALIZADOR DO ANTINEOPLÁSICO
PACLITAXEL (TAXOL[®]) NA HIPERALGESIA
INFLAMATÓRIA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR
ZYMOSAN**

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

Orientador: Prof. Doutor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

FORTALEZA

2003

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**EFEITO POTENCIALIZADOR DO ANTINEOPLÁSICO
PACLITAXEL (TAXOL[®]) NA HIPERALGESIA
INFLAMATÓRIA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR
ZYMOSAN**

**Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação
e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e
Farmacologia da Universidade Federal do Ceará**

MIRLANE GUIMARÃES DE MELO CARDOSO

**EFEITO POTENCIALIZADOR DO ANTINEOPLÁSICO
PACLITAXEL (TAXOL[®]) NA HIPERALGESIA
INFLAMATÓRIA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR
ZYMOSAN**

APROVADA EM 03 DE OUTUBRO DE 2003

BANCA EXAMINADORA

Prof. Doutor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (Orientador)

Universidade Federal do Ceará

Prof. Doutor Francisco Airton Castro da Rocha

Universidade Federal do Ceará

Prof. Doutor Carlos Maurício de Castro Costa

Universidade Federal do Ceará

dedicatórias de amor....

Aos meus filhos Bárbara, Caio e Victória, partes de mim, de quem fui e serei antes de tudo e para sempre uma orgulhosa mãe.

Ao meu esposo Stênio, pelo apoio às minhas iniciativas e inquietudes, provando que seu próprio bem é o bem do outro, o bem a dois .

Aos meus pais Orestes e Marina por me ajudarem com sua história de vida exemplar. Hoje meus verdadeiros amigos.

Aos meus irmãos Marly, Orestes Filho, Mirlei e Orlens por serem pessoas que sempre pude contar.

AGRADECIMENTOS

A deus pela companhia esperada e inesperada.

Indistintamente agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho. De modo muito especial:

- ❑ Ao Prof. Doutor Ronaldo Albuquerque Ribeiro pela postura construtiva e competência na orientação deste trabalho.
- ❑ Aos professores Airton e Gerly Anne pela gentil disponibilidade neste período de convivência no laboratório.
- ❑ Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pela postura acadêmica e dedicação durante o aprendizado.
- ❑ Aos professores e funcionários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, em especial ao meus pares do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela fácil convivência e amizade.
- ❑ Aos amigos e funcionários do Serviço de terapia da Dor e cuidados paliativos da Fundação CECON, pelo apóio singular .
- ❑ Aos amigos do laboratório que, pelo alegre e carinhoso convívio, me ajudaram a superar a saudade da minha família em Manaus e a entender o significado da expressão “lembranças para sempre”, Silvia Bonna, vilma, Adriana, Mariana Vale, Carlos Rocha, Cristina Loyola, Virginia, Rondinelle e Márcio Uetti.
- ❑ As simpáticas bolsistas Emmanuelle e Dellany pela ajuda e comprometimento na realização da parte experimental.

- A Vandinha pelos auxílios técnicos no laboratório e pela presteza em sempre ajudar .
- As funcionárias Silvia e Aura da secretaria da Pós-Graduação pelas orientações acadêmicas e extrema compreensão as minhas solicitações.
- À dra Artemísia pela colaboração e pronto atendimento as minhas solicitações de animais no biotério.
- Aos grandes amigos Licânia, Rebeca, Thiago e Túlio, que tornaram minha permanência em Fortaleza bem mais calorosa e familiar .
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científica e Tecnológico (CNPQ), pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Efeito potencializador do antineoplásico paclitaxel (Taxol®) na hiperalgesia inflamatória experimental induzida por zymosan. MIRLANE GUIMARÃES DE MELO CARDOSO. Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia. Orientador: Prof Dr Ronaldo Albuquerque Ribeiro.

Paclitaxel(Taxol®), foi o 1º antineoplásico efetivo no tratamento de cânceres refratários a quimioterapia convencional. Clinicamente, induz mielossupressão e neuropatia periférica sensorial dose-limitante e cumulativa, já bem documentada na literatura. Menos freqüentemente os pacientes tratados apresentam mialgias e artralguas. No que diz respeito à dor inflamatória, nada foi descrito até o momento, visando correlacionar o envolvimento das citocinas pró-inflamatórias, com a gênese da hiperalgesia associada ao PCX, já que a droga induz a expressão do gene TNF- α . Experimentalmente já foi demonstrado por vários autores, o papel fundamental do TNF- α desencadeando uma cascata de citocinas que ativam os dois componentes da dor inflamatória (eicosanóide e simpático). Dados do nosso laboratório registram que o zymosan (ZY) administrado ip em camundongos, induz a liberação dessas citocinas por macrófagos residentes no modelo de contorção abdominal (CA), e que sua injeção intra-articular em joelhos de ratos produz uma periartrite característica tida como sinal de hiperalgesia no modelo de incapacitação articular (IA). Com base nestes achados, constituiu-se objetivo do presente trabalho, avaliar o efeito do PCX na modulação da resposta nociceptiva induzida pelo ZY em dois modelos animais de dor inflamatória. Para tanto, injetou-se via ip PCX (8mg/kg/an) 2h antes do ZY (1mg/cav;ip) em camundongos no teste CA. Ratos foram tratados ip com PCX 4 e 8mg/kg/an) 1 h após da administração intra-articular ZY (250 μ g/an) no teste IA. Em ambos os testes os animais foram pré-tratados via Sc com inibidores de COX-1 e COX-2, bloqueador simpático e inibidores de citocinas. Ficou demonstrado que PCX na dose de 8mg/kg potencializa a hiperalgesia inflamatória no modelo de CA, aumentando de maneira significativa ($p < 0.001$) o n° de CA em 183%, em relação ao controle. Tal efeito foi inibido de maneira significativa ($p < 0.001$) e dose-dependente pela indometacina (ED₅₀ 0,05mg/kg), celecoxib (ED₅₀ 13,68mg/kg), atenolol (ED₅₀ 0,13mg/kg), talidomida (ED₅₀ 23,36mg/kg), pentoxifilina (ED₅₀ 8,40mg/kg) e dexametasona (ED₅₀ 0,71mg/kg). No teste de IA, esse efeito potencializador foi ratificado pelo aumento significativo do tempo de suspensão da pata ($p < 0.001$) na 3ª e 4ªh de artrite em relação ao controle, na dose 4mg/kg de PCX. Da mesma forma houve inibição significativa ($p < 0.001$) dessa amplificação nos ratos pré-tratados. Por fim, o PCX (Taxol®) amplifica significativamente a hiperalgesia inflamatória induzida pelo ZY no modelo de CA e IA, o que justifica em parte as mialgias e artralguas dos pacientes em uso de PCX e indiretamente sugere a participação de citocinas hiperalgésicas (TNF- α), prostanóides e mediadores simpáticos na gênese deste efeito hipernociceptivo.

Palavras-chave: Paclitaxel(Taxol®), antineoplásico, dor inflamatória.

ABSTRACT

Potential effect of the antineoplastic Paclitaxel (Taxol®) in the experimental inflammatory hyperalgesia induced by zymosan. MIRLANE GUIMARÃES DE MELO CARDOSO. Essay presented to Physiology and Pharmacology Department of Ceará Federal University, as prerequisite for obtaining the degree of Master of Science in Pharmacology. Orientation by Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro.

Paclitaxel (Taxol®) was the first effective antineoplastic in the management of refractory neoplasias to the conventional chemotherapy. It induces clinically to myelosuppression and sensory peripheral neuropathy boundary and cumulative dose, well documented at literature already. Less often the patients exhibited myalgias and arthralgias. As to concern to the inflammatory pain, there is nothing described do date, aiming to correlate the involvement from pro-inflammatory cytokines with the hyperalgesia genesis associated to PCX since the drug induces the α -TNF expression gene. It has already been demonstrated, experimentally by several authors, the essential role of α -TNF triggering a set of cytokines which active two components of the inflammatory pain (eicosanoid and sympathetic). Findings of our group showed that zymosan (ZY) administrated intraperitoneal (ip) in mice, induces the release of these cytokines by resident macrophages at the wriggling abdominal model (CA) and that their injection intra-articular rat knees produces a feature periarthritis as a sign of hyperalgesia at articular incapacitation model (IA). Based on these findings, the aim of the present work was to evaluate PCX effect at the modulation of nociceptive response induced by zymosan in two animal models of the inflammatory pain. Then, was injected via ip PCX (8mg/kg/an) before two hours of ZY (1mg/cav;ip) in mice on the CA test. Rats were treated with ip PCX (4,8 mg/kg/an) after one hour ZY intra-articular (250 μ g/animal;i-art) for IA test. Both tests, the animals were pre-treated subcutaneous via with COX-1 and COX-2 inhibitors, sympathetic blockade and cytokines inhibitors. It was demonstrated that PCX (8mg/kg/an) dose potentiates the inflammatory hyperalgesia at CA model, increasing in 183%, being statistical significant at the level $p < 0.001$, versus experimental group. Such effect was inhibited at level of significance, $p < 0.001$ and dependent-dose by indomethacin (ED_{50} 0.05mg/kg), celoxib (ED_{50} 13.68mg/kg), atenolol (ED_{50} 0.13mg/kg), talidomide (ED_{50} 23.36mg/kg), pentoxifylin (ED_{50} 8.40mg/kg) and dexamethasone (ED_{50} 0,71mg/kg). This potential effect of at the IA test was justified at IA model in dose 4mg/kg ($p < 0,001$) by significant increase of time of suspension the paws through arthritis at third and fourth hours versus experimental group. By same way there was significant inhibition at the level $p < 0.001$ of this magnification of the pre-treated rats. Latter, PCX (Taxol®) magnified significantly the inflammatory hyperalgesia induced by ZY at CA and IA models, justifying one sided myalgias and arthralgias of the patients by using PCX, suggesting the involvement of the hyperalgesic cytokines - α -TNF, prostanoids and sympathetic mediators of the genesis of this hyper-nociceptive effect.

Key words: Paclitaxel(Taxol®), antineoplastic, inflammatory pain.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

- ILUSTRAÇÃO 1.** Esquema simplificado hipotético mostrando o envolvimento de células residentes e citocinas hiperalgésicas e analgésicas na modulação da nocicepção induzida por ácido acético e zymosan21
- ILUSTRAÇÃO 2.** Estrutura química do paclitaxel (Taxol[®]).....29
- ILUSTRAÇÃO 3.** Metodologia da modulação farmacológica no teste de contorções abdominais em camundongos tratados com paclitaxel (Taxol[®]) e zymosan.....45
- ILUSTRAÇÃO 4 .** Metodologia da modulação farmacológica no teste de incapacitação articular.....47
- ILUSTRAÇÃO 5 .** Esquema simplificado hipotético mostrando o envolvimento de células residentes, citocinas hiperalgésicas e prostanóides na hiperalgesia inflamatória experimental induzida por zymosan e potencializada pelo antineoplásico paclitaxel (Taxol[®]).....88

FIGURA 1. Curva dose-resposta do PCX (Taxol[®]) intraperitoneal na atividade nociceptiva do zymosan no modelo de contorções abdominais em camundongos.....55

FIGURA 2. Curso temporal das contorções abdominais induzidas por zymosan, em camundongos tratados com injeção intraperitoneal de Taxol[®] e Cremophor EL.....56

FIGURA 3. Efeito dose-resposta da dexametasona (DEXA) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.....58

FIGURA 4. Efeito dose-resposta da talidomida (TLD) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.....59

FIGURA 5. Efeito dose-resposta da pentoxifilina (PTX) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.....61

FIGURA 6. Efeito dose-resposta da indometacina (INDO) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.....62

FIGURA 7. Efeito dose-resposta do celecoxib (CEL) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.....64

FIGURA 8. Efeito dose-resposta do atenolol (ATL) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.....65

FIGURA 9. Efeito do PCX (Taxol[®]) sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em joelho de ratos..... 70

FIGURA 10. Efeito do pré-tratamento (Sc) com inibidores de citocinas sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos tratados dos com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.....67

FIGURA 11. Efeito do pré-tratamento (Sc) com inibidores de COX-1 e COX-2 sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos tratadosdos com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS

AAc	Ácido acético
AMP-c	Adenosina monofosfato cíclico
AINH	Antiinflamatório
ATN	Atenolol
ATP	Adenosina trifosfato
BK	Bradicinina
C	Controle
Ca ⁺⁺	Íon cálcio
CEL	Celecoxib
COX-1	Cicloxygenase constitutiva-1
COX-3	Cicloxygenase constitutiva-3
COX-2	Cicloxygenase induzida-2
DEXA	Dexametasona
ED ₅₀	Dose eficaz
EPM	Erro padrão da média
g	grama (s)
GMP-c	Guanosina monofosfato cíclico
h	Hora (s)
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2

IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
INDO	Indometacina
“ip”	Intraperitoneal
kg.	Quilograma
LPS	Lipolissacarídeo
l.	Litro
M	Molar
mg.	Miligrama (s)
min.	Minuto (s)
ml.	Mililitro (s)
NMDA	N-metil D- aspartato
NO	Óxido nítrico
n°	Número
ng	Nanograma (s)
PTX	Pentoxifilina
PCX	Paclitaxel
PAF	Fator ativador de plaquetas
PGI	Prostaciclina

PGE-2	Prostaglandina E-2
PKc	Proteína-quinase C
PM	Peso molecular
PMN	Polimorfonucleares
p/v	Peso por volume
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
RBK ₁	Receptor de bradicinina 1
RBK ₂	Receptor de bradicinina 2
SAL	Salina
Sc	Subcutâneo
TLD	Talidomida
TNF	Fator de necrose tumoral
v/v	Volume por volume
ZY	Zymosan
α	Alfa
β	Beta
±	Mais ou menos
%	Porcentagem
μg	micrograma (s)
μl	microlitro (s)

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
I INTRODUÇÃO	1
1 DOR- ASPECTOS GERAIS	2
1.1 Dor- modelos animais.....	4
1.2 Dor inflamatória.....	7
1.3 Fator de Necrose tumoral alfa (TNF- α).....	11
1.3.1 Biossíntese.....	12
1.3.2 Receptores solúveis do TNF- α	13
1.3.3 Efeitos biológicos do TNF- α	14
1.4 Mediadores da dor inflamatória.....	16
1.5 Modulação periférica da dor inflamatória.....	22
1.5.1 Analgésicos periféricos anti-hiperalgésicos indiretos (AP-AHI).....	22
1.5.2 Analgésicos periféricos anti-hiperalgésicos diretos (AP-AHD).....	27
2 PACLITAXEL	28
2.1 Estrutura química.....	29
2.2 Mecanismo de ação.....	30
2.3 Paclitaxel versus Fator de Necrose Tumoral- alfa.....	32
2.4 Farmacocinética.....	33
2.5 Citotoxicidade	35
3 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	37

II	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
1.	Animais.....	41
2.	Aparelhos e instrumentos laboratoriais.....	42
3.	Drogas e soluções utilizadas.....	43
4.	Testes nociceptivos.....	44
5.	Curva dose-resposta do PCX (Taxol [®]) intraperitoneal na atividade nociceptiva do zymosan no modelo de contorções abdominais em camundongos.....	48
6.	Curso temporal das contorções abdominais induzidas por zymosan, em camundongos tratados com injeção intraperitoneal de Taxol [®] e Cr-EL.	48
7	Efeito dose-resposta do pré-tratamento (Sc) com inibidores de citocinas sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol [®]) intraperitoneal.....	49
8.	Efeito dose-resposta do pré-tratamento (Sc) dos inibidores de COX-1 e COX-2, e bloqueadores simpáticos sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol [®]) intraperitoneal.....	49
9.	Efeito do PCX (Taxol [®]) sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em joelho de ratos.....	50
10.	Efeito do pré-tratamento (Sc) com inibidores de citocinas sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos tratados dos com PCX (Taxol [®]) intraperitoneal.....	50
11.	Efeito do pré-tratamento (Sc) com inibidores de COX-1 e COX-2 sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos tratados dos com PCX (Taxol [®]) intraperitoneal.....	51
12.	Análise estatística dos dados.....	51

III RESULTADOS.....52

1. Curva dose-resposta do PCX (Taxol[®]) intraperitoneal na atividade nociceptiva do zymosan no modelo de contorções abdominais em camundongos.54
2. Curso temporal das contorções abdominais induzidas por zymosan, em camundongos tratados com injeção intraperitoneal de Taxol[®] e Cr-EL.54
3. Efeito dose-resposta da dexametasona (DEXA) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.....57
4. Efeito dose-resposta da talidomida (TLD) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.....57
5. Efeito dose-resposta da pentoxifilina (PTX) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.....60
6. Efeito dose-resposta da indometacina (INDO) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.....60
7. Efeito dose-resposta do celecoxib (CEL) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.....63
8. Efeito dose-resposta do atenolol (ATL) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.....63
9. Efeito do PCX (Taxol[®]) sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em joelho de ratos.....66

10. Efeito do pré-tratamento (Sc) com inibidores de citocinas sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos tratados dos com PCX (Taxol®) intraperitoneal.....	66
11. Efeito do pré-tratamento (Sc) com bloqueadores prostaglandínicos sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos tratados dos com PCX (Taxol®) intraperitoneal.....	69
IV DISCUSSÃO.....	72
V CONCLUSÕES.....	89
VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

I INTRODUÇÃO

1 DOR- ASPECTOS GERAIS

A dor é um dos maiores flagelos que acometem a humanidade. Os conceitos e as justificativas sobre as razões de sua ocorrência sofreram marcantes modificações ao longo do tempo em função de aquisições científicas e dos aspectos culturais de cada povo. O comitê de taxonomia da International Association for the Study of Pain - IASP conceitua a dor como “experiência sensorial e emocional desagradável, que é associada à lesão tecidual presente ou em potencial”. Independente da aceitação dessa definição, a dor é considerada como uma experiência genuinamente subjetiva e pessoal (MERSKEY, 1979).

Quanto aos mecanismos neurofisiológicos a dor pode ser classificada em dor nociceptiva quando as vias nociceptivas se encontram preservadas, sendo ativadas pelos nociceptores de tecidos cutâneos (dor somática) ou profundos (dor visceral). Dor não nociceptiva ou neuropática, quando as vias nociceptivas apresentam alterações na estrutura e ou função, resultante de lesão seletiva do trato neo-espinotalâmico (dor central) ou resultante de lesões no sistema nervoso periférico (dor periférica). Temos ainda a dor psicogênica resultante de distúrbios psíquicos (TURK & RUDE, 1992).

As síndromes álgicas que se manifestam nos doentes oncológicos são freqüentes e mais incapacitantes que as que se manifestam em outras condições patológicas. Freqüentemente decorrem de fatores relacionados direta ou indiretamente com o tumor primário e suas metástases. Menos frequentemente, essa dor é decorrente dos procedimentos diagnósticos ou de terapias anticâncer, como:

mucosites, mialgias, artralgias, neuropatias (DAUT R L, CLEELAND R L, 1982; TWYXCROSS R G, 1982; PIMENTA C A, 1995; BONICA J, 2001).

Foley (1982) admitem que a dor é resultante do próprio câncer em 62% a 78% dos casos, é decorrente do tratamento em 19% a 28% e não é relacionada à neoplasia em 3% a 10% dos casos.

Os antineoplásicos possuem atividade biológica antiproliferativa que, na maioria das vezes, envolve alta citotoxicidade e baixa seletividade, que limitam seu uso no tratamento de doenças neoplásicas.

Os taxanes são uma classe importante de agentes antineoplásicos que estão representados por duas drogas clinicamente disponíveis. O primeiro identificado foi o paclitaxel (PCX) extraído, no final da década de 60, da casca do teixo do pacífico, *Taxus brevifolia*. Em 1986, foi sintetizada a segunda droga deste grupo, o docetaxel (PEREIRA J R, 2000).

O paclitaxel (Taxol[®]) vem sendo utilizado em grande escala no tratamento de linfomas (WILSON et al., 1995; YOUNES et al., 1995), como primeira linha na abordagem do câncer de pulmão (MURPHY et al., 1993; CHANG et al., 1993; ETTINGER et al., 199; KIRSCHLING et al., 1994) e como segunda linha para o tratamento do câncer de mama e ovário (REICHMAN et al., 1993; KOHN et al., 1994)

Os efeitos adversos, que podem ser graves e limitante do seu uso, incluem mielossupressão e uma neurotoxicidade cumulativa que se manifesta como uma polineuropatia periférica, muitas vezes acompanhada de mialgias e artralgias. Com relação aos eventos alérgicos inflamatórios relacionados com o PCX, não existe na

literatura nenhuma citação, ao contrário da dor neuropática que já está bem estabelecida e documentada (KAPLAN, 1993; ROWINSKY, 1993B; CHAUDHRY, 1994; HILKENS AND VAN DEN BENT, 1997; PACE & HELSING, 1999; AUTHIER, 2000; POLOMANO, 1998).

1.1 Dor- modelos animais

A percepção da dor é caracterizada como uma experiência multidimensional diversificando na qualidade e na intensidade sensorial, que é afetada por variáveis afetivo-motivacionais no homem.

De uma forma geral nos estudos experimentais de dor, inadequadamente nós humanizamos os animais quando referimos que eles sentem dor, já que essas variáveis citadas anteriormente, não são passíveis de serem aferidas durante os experimentos com animais, pois os testes nociceptivos se baseiam em respostas comportamentais ou reflexos inatos, que não sabemos se reflete um estado doloroso do animal. Essa subjetividade com que a dor se expressa é que torna vulneráveis os procedimentos destinados a avaliação dos resultados (TEIXEIRA & FIQUEIRÓ, 2001).

Inicialmente existe base fisiopatológica para que nós façamos uma diferenciação entre hiperalgesia e alodínia, em se tratando de dor experimental. Devemos lembrar que a sensibilização dos nociceptores é uma característica comum dos processos inflamatórios. Alodínia e hiperalgesia são os termos usados para

descrever esta sensibilização. Porém a idéia é que alodínia e hiperalgesia descrevem fenômenos diferentes. A alodínia é um termo destinado a sensação dolorosa a um estímulo que não causava dor e passou a produzi-la em presença de sensibilização dos nociceptores, cuja qualidade e intensidade não poderia ser evocada por estímulos idênticos (allo significa em grego “outro”). Por exemplo, um estímulo térmico seria percebido como doloroso e um estímulo de pequeníssima intensidade (avaliado em um tecido normal) produziria dor excruciante ou de longa duração. A presença de alodínia indicaria lesão neuropática, portanto um sintoma importante para definir um diagnóstico de comprometimento do tecido nervoso, que necessariamente devem ter, suas influências isoladas quando se avalia um modelo de dor inflamatória (FERREIRA, 2003).

Em estudos com animais visando avaliar a hiperalgesia inflamatória devemos identificar testes, onde o estímulo comportamental decorre diretamente da indução de um processo inflamatório, pois o estímulo é lesivo ao tecido, como observamos no teste da formalina na pata de ratos e no teste de contorções por injeção de substâncias flogogênicas na cavidade abdominal de camundongos. Portanto, em estudos experimentais aplicamos testes nociceptivos, que se caracterizam por terem perfeitamente definidos: um estímulo não injuriante; a utilização de um comportamento padrão; a produção de uma lesão inflamatória ou a administração de mediadores inflamatórios, os quais causam sensibilização do neurônio primário nociceptivo, e finalmente ,a capacidade do teste de detectar o efeito de drogas, que no homem causam analgesia (FERREIRA, 2003).

Além disto, segundo Ferreira (2003), nestes testes dever-se-ia utilizar o termo hipernocicepção na quantificação do aumento da sensibilidade do neurônio nociceptivo primário, abolindo os termos hiperalgesia e alodínia nesses casos, pois são termos usados para referir sintomas humanos, com os quais o teste experimental com animais pode não ter nenhuma relação.

Tem sido reconhecido que estímulos como ácido acético e o zymosan são capazes de provocar nocicepção em animais experimentais como camundongos e ratos, com uma resposta padrão característica (COLLIER, 1968; DOHERTY, 1985).

O zymosan é um polissacarídeo constituinte da parede de fungos que causa uma resposta inflamatória quando injetado intradérmico (RIDGER, 1997), intraperitoneal (RAO, 1994; BOUGHTON-SMITH & GHELANI, 1995; AJUEBOR, 1998), ou intra-articularmente (GEGOUT et al., 1995; COMERFORD & ETWEBI, 1995; PETTIRPHER & SALTER, 1996).

Como estímulo flogogênico o zymosan induz extravasamento de proteínas plasmáticas e infiltrado de células inflamatórias, resultando numa cascata de eventos incluindo ativação do sistema do complemento, degranulação de mastócitos e geração dos produtos do metabolismo do ácido araquidônico (GRIFFITHS, 1991).

Quando injetado na cavidade peritoneal de camundongos induz a um comportamento característico, denominado contorções abdominais (COLLIER, 1968). A administração ip de zymosan estimula a liberação de mediadores inflamatórios prostaglandínicos e simpáticos por células residentes, conforme demonstrado pelo nosso laboratório no modelo de contorções abdominais, inclusive com a clássica

demonstração dos dois componentes (prostaglandínico e simpático), através de pré-tratamentos isolado ou associado, com inibidores de COX e agentes simpatolíticos (THOMAZZI, 1996; RIBEIRO, 2000).

A injeção intra-articular de zymosan produz uma periartrite característica que é tida como sinal de hiperalgesia no modelo de incapacitação articular, descrito inicialmente por Tonussi e Ferreira em 1992.

Dados do nosso laboratório mostraram que a incapacitação articular induzida por zymosan (1mg/animal), depende do sítio de injeção do estímulo, que leva a sensibilização de nociceptores localizados nos tecidos periarticulares. A incapacitação articular ocorre de maneira significativa e dose-dependente com pico de incapacitação situando-se entre a 3^a e 4^a hora da artrite (ROCHA, 1999; VIANA, 1998). A incapacitação articular neste modelo independe da migração de polimorfonucleares neutrófilos que, só inicia na 3^a hora do estímulo e atinge o máximo na 6^a hora de artrite. Isso sugere a importância da liberação de mediadores no local da injeção por células residentes e não por células recrutadas. (VIANA, 1998 ; ROCHA, 1999).

1.2 Dor inflamatória

O processo inflamatório ocorre como uma resposta do tecido a injúria celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo, dinâmico e multimediado, podendo se manifestar a partir de qualquer agente lesivo, seja físico, biológico ou químico. Este processo envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, que

incluem extravasamento de fluidos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo (BECKER, 1983; PIPER, 1983).

O primeiro passo na seqüência dos eventos que originam o fenômeno sensitivo-doloroso é a conversão da estimulação mecânica, elétrica ou química de intensidade e duração características, em potencial de ação pelas terminações nervosas livres das fibras finas não mielinizadas (C), ou finamente mielinizadas (A-Delta) do sistema nervoso periférico (BESSON, 1969).

Estes estímulos nos estados inflamatórios estão geralmente associados à presença de uma série de mediadores químicos chamados em seu conjunto de citocinas, que são liberados tanto pelas células residentes, como pelas células neuronais no local da injúria, ativando diretamente o nociceptor, diminuindo seu limiar de excitabilidade para estímulos térmicos e mecânicos. No entanto, mais recentemente foi descrito na literatura a descoberta de receptores que não podem ser ativados em situações normais, mas apenas em estados inflamatórios que são responsivos a estímulos químicos oriundos de áreas inflamadas, denominados de “nociceptores dormentes” ou “aferentes silenciosos”. Tais nociceptores já foram identificados em vários tecidos como na pele, articulações e vísceras em várias espécies de animais como rato, gato, cão e macaco (GRIGG, 1986; MCMAHON & KOLTZENBURG, 1986; 1990; SHAIBLE & SCHMIDT, 1984; 1985; MEYER & CAMPBELL, 1989; HABLER, 1990).

Essa sensibilização dos “nociceptores dormentes” ou “aferentes silenciosos” vem sendo denominada de hiperalgesia. Clinicamente a hiperalgesia é

conceituada como uma resposta aumentada a um estímulo que normalmente é doloroso (LINDBLOM, 1986). Essa hiperalgesia que se segue a inflamação tecidual baseia-se, ao menos em parte, na sensibilização dos nociceptores por mediadores químicos, especificamente prostaglandinas (FERREIRA, LORENZETTI & CORREA; 1978) e por mediadores simpaticomiméticos (LEVINE, 1986; NAKAMURA & FERREIRA, 1987).

Em 1972 Ferreira demonstrou que a injeção de prostaglandinas causa hiperalgesia e que drogas inibidoras da ciclooxigenase inibem esse efeito. Da mesma forma, foi demonstrado que a injeção de agonistas adrenérgicos (dopa, adrenalina, isoprenalina) causava hiperalgesia em pata de rato e que o pré-tratamento com bloqueadores adrenérgicos era capaz de inibir essa hiperalgesia. Posteriormente à identificação de duas vias distintas (eicosanóide e simpatomimética) envolvidas na hiperalgesia inflamatória (HUMES, 1982) foi demonstrado que a liberação de produtos da ciclooxigenase e de aminas simpatomiméticas é subsequente à liberação de IL-1 β (FREEIRE, 1988) e de IL-8 (CUNHA, 1991) respectivamente (ver ilustração 1).

Sabendo-se da capacidade das citocinas, em induzir sua própria produção e a de outras citocinas, foi demonstrado por alguns autores que o TNF- α induz a produção de IL-1 β (DINARELLO, 1986), que IL-1 induz a sua própria produção, a de IL-6 (VAN DAMME, 1987), e IL-8 (STREITER, 1989).

Isso foi confirmado através da demonstração de que a injeção de TNF- α foi capaz de mimetizar a capacidade da carragenina em induzir a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-8 e também pelo fato de que uma única injeção com anticorpo anti-TNF- α aboliu esse efeito (CUNHA, 1992).

As mesmas evidências foram demonstradas no modelo de contorções abdominais por outros autores (DUARTE, 1988; THOMAZZI, 1996). Estes últimos autores demonstraram que estímulos como zymosan, ácido acético, carragenina e LPS foram capazes de induzir de forma dose-dependente, resposta nociceptiva quando injetadas em cavidades abdominais de camundongos, embora as respostas individuais tenham apresentado características peculiares a cada um desses estímulos. Ressaltando ainda, que as curvas dose-respostas do zymosan, carragenina e LPS apresentaram uma típica forma “em sino”, indicando que doses acima de um determinado valor passam provavelmente a provocar respostas inibitórias (THOMAZZI, 1996).

Recentemente foi demonstrado, que a depleção de células residentes da cavidade peritoneal, por lavagem previa diminui significativamente a atividade nociceptiva do ácido acético e do zymosan mais não a do iloprost (análogo estável da PGI-2). Da mesma forma quando a população de macrófagos foi aumentada, através de pré-tratamento dos animais com tioglicolato, observou-se um aumento no número das contorções induzidas por esses estímulos (THOMAZZI.,1996; RIBEIRO ., 2000).

Adicionalmente, foi comprovado a existência de um outro sistema regulador negativo dos nociceptores durante a inflamação, que aumenta o limiar de excitabilidade desses receptores. O bloqueio direto da hiperalgesia, já instalada , induzida por prostaglandinas E-2 foi observado após a administração local de diburil guanosina monofosfato cíclico (FERREIRA & NAKAMURA, 1979) ou de substâncias que estimulam a guanilato ciclase neuronal como os geradores de óxido nítrico (DUARTE et al, 1992; ROCHA , 1999).

Todos esses achados sugerem que eventos bioquímicos finais responsáveis pela regulação funcional, positiva ou negativa, dos nociceptores na dor inflamatória parece ser dependente de um balanço nas concentrações de AMPc/GMPc, no nociceptor.

1.3 Fator de necrose tumoral –alfa (TNF- α , caquectina)

O TNF- α foi inicialmente descrito como um componente do soro induzido por endotoxina bacteriana e caracterizado pela propriedade de provocar necrose hemorrágica em certos tumores implantados chamado de caquectina (CARSWELL, 1975).

Entretanto, alguns autores do século XIX já haviam registrado que um processo infeccioso poderia, na maioria das vezes, ocasionar necrose hemorrágica em pacientes com câncer e infecção (COLEY, 1983; OLD, 1985). Na verdade era o LPS (lipopolissacarídeo); um componente da membrana de bactérias Gram-negativas; isolado por SHEAR (1943) citado por CARWELL (1975), o responsável pela indução da necrose tumoral.

Seguiram-se muitos experimentos semelhantes, agora inoculando soro de animais sensibilizados por bactérias em animais com tumores implantados. Estes soros apresentavam in vitro, igual capacidade de induzir lise e morte de células tumorais, o que possibilitou um ensaio biológico em cultura de células, usado para caracterização e

purificação bioquímica do chamado TNF- α , produzido por macrófagos e monócitos (GREEN, DOBRJANSKY & CHIASSON, 1982; KULL & CUATRECASAS, 1983; AGARWAL, 1984).

Experimentalmente já foi demonstrado por vários autores, o papel fundamental do TNF- α na hiperalgesia inflamatória, desencadeando uma cascata de citocinas que culminam com a ativação dos 2 componentes da dor inflamatória, citados anteriormente (CUNHA, 1992 A; THOMAZZI, 1996).

1.3.1 Biossíntese

O TNF- α é sintetizado como um pró-hormônio que contém 233 resíduos de aminoácidos e seu gene está localizado no cromossomo 6 próximo ao locus do HLA-B, intimamente ligado ao gene para TNF- β (WANG, 1985; SPIES, 1986; DAVIES, 1987; MULLER et al., 1987).

O grau de homologia entre TNF- α e TNF- β é de 46%, quanto aos nucleotídeos e de 28% quanto aos aminoácidos. Antes ou durante a secreção 79 aminoácidos da porção N terminal são enzimaticamente removidos da pró-forma, originando a forma madura e solúvel de TNF- α , com PM de 17.400. Embora o TNF- α e o TNF- β de PM de 20.000 não apresentem reação imunológica cruzada e se ligam satisfatoriamente aos mesmos receptores (BEUTLER & CERAMI, 1986; BEUTLER, 1986; PAUL, 1988).

Existe ainda, uma forma transmembrana do TNF- α (mTNF- α) produzido por macrófagos e células T ativadas, envolvido nas interações diretas contato-dependentes entre células citotóxicas e alvos relevantes (AGOSTINE, 1995; BRONTE, 1995).

Análise da estrutura do TNF- α sob sua forma cristalizada ou em solução, indicam que é uma proteína homotrimérica que se dissocia lentamente e existe em concentrações picomolares (SMITH, 1987; CORTI, 1992).

A biossíntese de TNF- α é suprimida por alguns fatores, entre eles PGE-2, cAMP, ativadores de proteína-quinase C, dexametasona, pentoxifilina, ciclosporina (LEUDKE & CERAMI, 1990) e talidomida (RIBEIRO et al, 2000). Já LPS, Vírus Sendai, células tumorais, mycoplasma ou BCG, IFN- γ , IL-1, enterotoxinas, fator corda de micobactérias, C5a, vírus, antígenos fúngicos ou parasitários e o próprio TNF- α , são considerados estímulos para produção de TNF- α por monócitos/macrófagos residentes.

1.3.2 Receptores solúveis do TNF- α (TNFRI e TNFRII)

Em todas as células somáticas humanas, exceto em eritrócitos, existem duas formas de receptores para TNF- α (TNFRI e TNFRII), que diferem em tamanho e afinidade de ligação. Os domínios extracelulares de TNF- α e de TNF- β (182 resíduos para TNFRI e 235 para TNFRII) contêm 4 porções ricas em cistina, com significativa homologia, o que não ocorre com seus domínios intracelulares (citoplasmático),

sugerindo que os mesmos sinalizam diferentes vias. Assim como potentes hormônios, a atividade biológica máxima do TNF- α é observada com 5% ou menos de ocupação dos receptores. Depois de ligado o TNF- α é internalizado, mas o sinal de transdução pode ocorrer na ausência de internalização ou após a ligação aos receptores de um agonista (ENGELMANN, 1990).

Estudos recentes sugerem que a função do TNFRI parece ser predominantemente como mediador da citotoxicidade celular (TARTAGLIA et al., 1991, 1993) e toxicidade por LPS (PFEFFER, 1993). Enquanto a do TNFRII, menos conhecidos, são implicados com a proliferação celular (TARTAGLIA, 1991).

1.3.3 Efeitos biológicos TNF- α

Em baixas concentrações (10^{-10} M) o TNF- α atua como regulador da função de leucócitos e células endoteliais de forma parácrina e autócrina, influenciando os eventos da resposta inflamatória aguda e o reparo tecidual, entre eles: ativação de neutrófilos, produção de IL-1 e IL-6 por células endoteliais e por macrófagos aumento da citotoxicidade para certos patógenos e aumento da atividade fagocítica (KLEBANOFF, 1986; TSUJIMOTO, 1986) e da quimiotaxia de neutrófilos e monócitos; aumento da adesão de neutrófilos ao endotélio; estimulação da produção de PGE₂ e collagenase por células sinoviais e condrócitos; proliferação de fibroblastos; aumento da reabsorção óssea por osteoclastos; diminuição da síntese óssea por osteoblastos;

indução de proteínas da fase aguda no fígado; produção de GM-CSF e G-CSF por células endoteliais (BEUTLER & CERAMI, 1988; LARRICK & KUNKEL, 1988).

O TNF- α em altas concentrações (10^{-8} M) excede o número de receptores em um dado tecido e, como resultado, ele entra na circulação onde pode atuar como hormônio endócrino e levar a caquexia, coagulação microvascular potencialmente letal e hipotensão (LEVINE, 1990).

Adicionalmente, em linfócitos T a elevada concentração induz liberação de interferon gama, aumenta a expressão de receptores para IL-2 e potencializa a resposta proliferativa à antígenos e mitógenos. (SCHEURICH, 1987; YAKOTA, GEPPERT & LIPSKY, 1988).

A indução de proteínas com atividade pró-coagulante, inibição da síntese da trombospondina de células endoteliais e indução e expressão gênica da síntese de IL-1 em células endoteliais são outras propriedades atribuídas ao TNF- α (LIBBY, 1986; NAWROTH, 1986).

Vários dos efeitos acima podem ser decorrentes de estímulo direto do TNF- α sobre os tecidos ou células alvo. Entretanto, ele pode exercer esses efeitos indiretamente semelhante a IL-1, ocasionando uma resposta inflamatória intensa e multifocal, envolvendo a participação de mediadores secundários como leucotrienos, PAF além de outras citocinas pró-inflamatórias (BEUTLER & CERAMI, 1986, 1988).

1.4 Mediadores da dor inflamatória

Geralmente os eventos nos estados inflamatórios estão associados à presença de citocinas de natureza protéica (interleucinas, TNF- α) e lipídica (prostaglandinas, PAF), que aumentam ou mantêm a resposta inflamatória.

Citocinas são polipeptídeos simples, ou glicopeptídeos de PM maior que 5 KDa, produzidas por estímulos indutores, portanto não são produzidas de forma contínua, e não existem de forma constitutiva. As interleucinas, fatores do crescimento, fatores estimuladores de colônia estão incluídos nesta definição. Neste contexto, destacamos as interleucinas 1, 6, 8, e o fator de necrose tumoral como importantes citocinas dos eventos inflamatórios. Possuem propriedades pleiotrópicas e regulatórias locais, regionais e sistêmicas. Uma citocina tende a ter múltiplas células alvo e funções, no entanto, diferentes citocinas, podem ter ações similares. Podem induzir a própria produção e a de outras citocinas, pois modulam a expressão de seus receptores (HENDERSON & POOLE, 1994).

De forma geral, os mediadores envolvidos na dor inflamatória estão enquadrados em dois grupos: mediadores hiperalgésicos que causam a sensibilização do nociceptor e aqueles que causam a ativação direta dos nociceptores, provocando a dor declarada em humanos, ou um comportamento característico em animais experimentais.

Os mediadores hiperalgésicos clássicos induzem fenômenos moleculares importantes que preparam o nociceptor a responder aos estímulos ativadores. Estes fenômenos começam com a ativação de uma Proteína G na membrana do nociceptor, a

qual desencadeia uma ou duas cascatas enzimáticas paralelas, a da fosfoquinase A/AMP cíclico e a fosfoquinase C/diacilglicero I (FERREIRA & NAKAMURA, 1979).

A ativação destes sistemas conduzem a um aumento de Ca^{+2} citosólico através do seu recrutamento das reservas ou por aumento da sua condutância, fosforilação ou modulação de seus canais pelo glutamato atuando em receptores NMDA (N-metil D-aspartato). A ativação dos canais de glutamato situados nas terminações pré-sinápticas na medula são responsáveis pela duração prolongada da hiperalgesia. Concomitantemente ao aumento do Ca^{+2} citosólico, ocorre o fechamento de canais de Na^{+} ATP dependentes, dificultando a saída. Nestas condições há a facilitação da ativação do nociceptor e da condução pelo incremento do número de canais de Na^{+} e abaixamento do limiar neuronal (Ca^{+2}), gerando assim o aparecimento de minipotenciais de ação espontâneos nas terminações pré-sinápticas, que levam a liberação contínua de glutamato. O glutamato, atuando em receptores NMDA, causa a denominada hipersensibilização retrógrada. Este fenômeno é responsável pela manutenção da hiperalgesia, pois o receptor NMDA, quando ativado, facilita a entrada de Ca^{+2} , mantendo a diminuição do limiar de ativação do nociceptor (FERREIRA & NAKAMURA, 1979).

Há evidências de que o aumento de níveis intracelulares de AMPc e de Ca^{+2} , estão associados a regulação positiva dos nociceptores e que a administração de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (dopa e noradrenalina), conhecidos estimuladores da síntese neuronal de AMPc, também são capazes de induzir hiperalgesia, que pode ser prevenida experimentalmente com pré-tratamento com

antagonista de Ca^{+2} (FERREIRA & NAKAMURA, 1979; MURAD, 1986; TAIWO, 1989; FOLLENFANT, 1990).

Prostaglandinas e aminas simpatomiméticas são mediadores conhecidos por estimular a síntese de AMPc neuronal e já foram comprovados como substâncias que causam sensibilização de nociceptores (WIESENFELD-HALLIN & HALLIN, 1984; NAKAMURA & FERREIRA, 1987). Conseqüentemente mediadores capazes de estimular a síntese de prostaglandinas ou de aminas simpatomiméticas, como IL-1, TNF- α e IL-8 são também chamados de hiperalgésicos.

Experimentalmente foi demonstrado que citocinas como, TNF- α , IL-1 β e IL-8 quando injetadas juntas, induzem contorções abdominais em camundongos, enquanto que o pré-tratamento com anti-soros específicos bloqueia a atividade nociceptiva desses dois estímulos no modelo de contorções abdominais em camundongos (RIBEIRO, 2000). Portanto, mediadores que estimulam a síntese dessas citocinas hiperalgésicas como é o caso da bradicinina, também podem ser enquadrados como hiperalgésico (STERANKA, 1988; COSTELLO & HARGREVES, 1989; CHAU, 1991).

Foi demonstrado que um antagonista específico dos receptores BK₂ da bradicinina, HOE 140, foi capaz de inibir o efeito hiperalgésico tardio da bradicinina. Além disto, o HOE 140 produziu analgesia em modelos experimentais de dor inflamatória, particularmente a hiperalgesia provocada por carragenina (BERESFORD & BIRCH, 1992).

Mais tarde registrou-se que a cascata de citocinas promovida por TNF- α na hiperalgesia inflamatória, em alguns casos era subsequente à ação da bradicinina.

Conseqüentemente, a bradicinina parece possuir um duplo papel na modulação da dor inflamatória, desde que sensibiliza os nociceptores via RBK_1 e também ativa diretamente o nociceptor via RBK_2 (DRAY & PERKINS, 1993).

A histamina, serotonina, substância P, adenosina trifosfato (ATP) e protons, também são classificados como mediadores capazes de ativar diretamente o nociceptor, porém de forma menos destacada que a bradicinina (RANG, 2001). Portanto, dependendo da magnitude do estímulo a bradicinina pode não só iniciar a cascata de mediadores, mas também contribuir para manutenção dessa cascata e da injúria através de seu receptor RBK_1 , pois eles são ativados por $IL-1\beta$ mas não são por $TNF-\alpha$ (FERREIRA, 1993).

A ativação da via metabólica arginina/NO/GMPc/ K^+ parece contrapor a hipersensibilização inflamatória em algumas famílias de nociceptores. Substâncias que abrem os canais de K^+ bloqueiam a hiperalgesia. A ativação deste sistema promoveria a abertura destes canais de potássio ATP-dependentes, permitindo a saída deste íon que contrabalançaria o limiar aumentado pelo acúmulo de Ca^{+2} citosólico. Esse sistema regulador negativo do nociceptor sensibilizado, está relacionado com o aumento de GMPc ou de substâncias que estimulam a guanilato ciclase neuronal como o carbacol ou geradores de óxido nítrico (MONCADA, 1991; MOORE, 1991; DUARTE, 1992).

Recentemente a importância desse sistema regulador, foi demonstrado na dor inflamatória articular, utilizando o modelo experimental de incapacitação articular induzida por zymosan (ROCHA, 1999).

Outro mecanismo importante no extenso mundo de ações das citocinas é a inibição de citocinas que participam da resposta e da dor inflamatória, servindo como um freio secundário para o desenvolvimento de ambas. Na lista de citocinas que possuem essas propriedades inibitórias estão: IL-4, IL-10, IL-13, IFN - α e TGF- β . Esses dados foram demonstrados no nosso laboratório com a interleucina-4, interleucina-10, interleucina-13 no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético ou zymosan e no modelo de incapacitação articular induzido por zymosan (VALE, 2003).

ESTÍMULO INFLAMATÓRIO- ZYMOZAN/ ÁC ACÉTICO

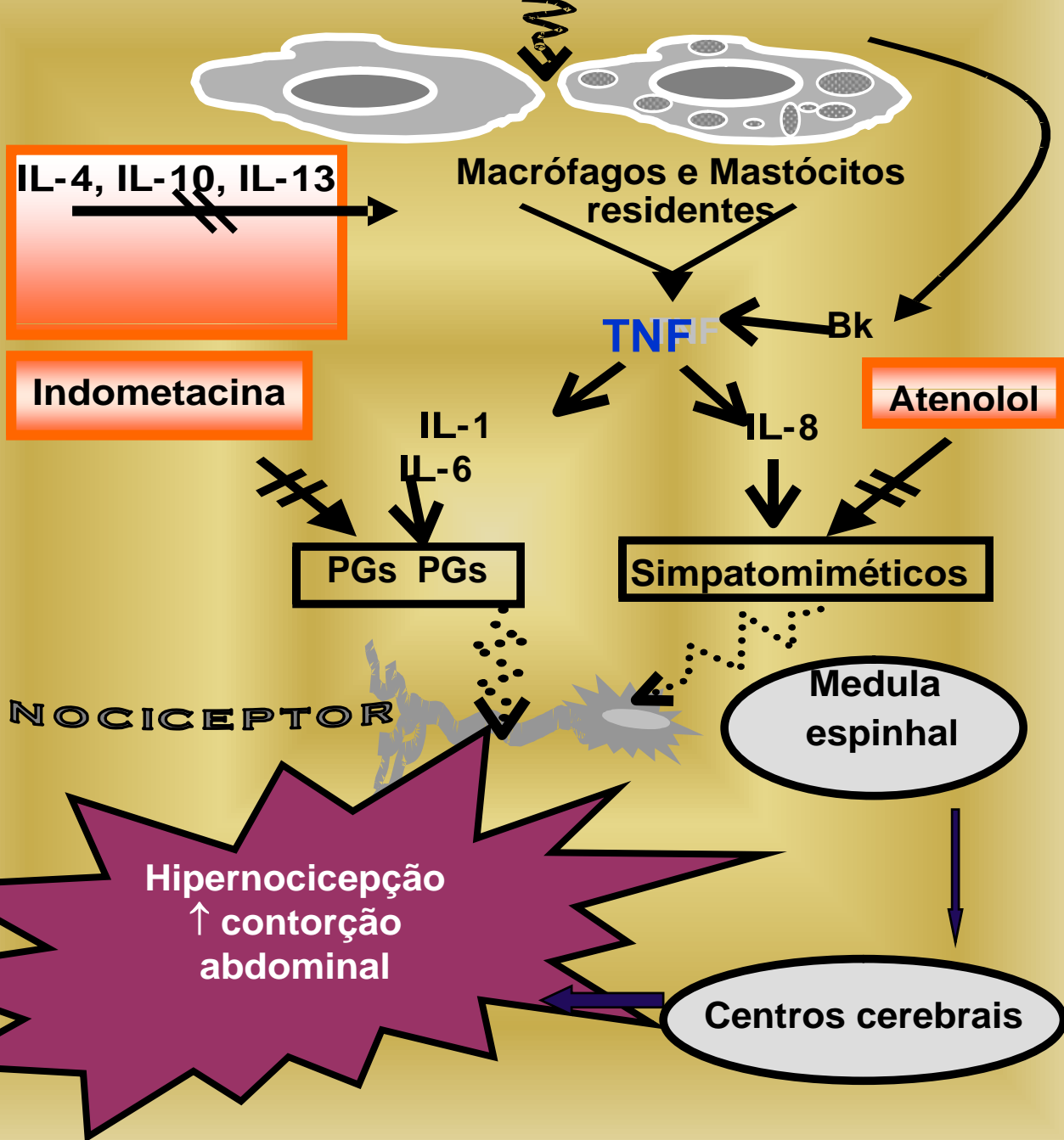


ILUSTRAÇÃO 1. Esquema simplificado hipotético mostrando o envolvimento de células residentes e citocinas hiperalgésicas e analgésicas na modulação da nocicepção induzida por ácido acético e zymosan.

1.4 Modulação periférica da dor inflamatória

Atualmente aceita-se que o bloqueio da hiperalgisia inflamatória pode decorrer principalmente de dois processos básicos:

1.5.1 Analgésicos periféricos anti-hiperalgésicos indiretos (AP-AHI)

Os AP-AHI são drogas que previnem a liberação ou ação de mediadores hiperalgésicos clássicos como, a histamina, as aminas simpatomiméticas, as endotelinas e leucotrienos. Este seria o caso, por exemplo, dos anti-histamínicos, bloqueadores do sistema simpático, os inibidores de prostaglandinas e os inibidores de citocinas.

Os anti-histamínicos são enquadrados neste grupo por antagonizar os efeitos da histamina nos receptores H_1 que estão associados a uma especial classe de nociceptores específicos da sensação de prurido (FERREIRA, 1972) e nos receptores de H_2 por bloquear a hiper secreção de ácido clorídrico, responsável pela dor de queimação na úlcera gástrica (MASINI E, 1991).

Bloqueadores do sistema simpático também podem ser encaixados neste grupo. Já está descrito que o bloqueio regional com antagonistas α -adrenérgicos (fentolamina) é efetivo no alívio da dor declarada em humanos (CODERRE, 1984). Este achado foi

confirmado no modelo de contorções abdominais, utilizando atenolol e guanetidina isolados ou associados (THOMAZZI, 1996).

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) inibem a síntese de PGs por bloquearem a cicloxigenase (COX) . Inicialmente registrou-se que a COX era expressa constitutivamente em todos os tecidos. No entanto, Needleman e seu grupo descreveram que um lipopolissacarídeo bacteriano era capaz de aumentar a síntese de PGs em monócitos humanos “in vitro” (FU, 1990) e em macrófagos murinos peritoneais “in vivo” (MASFERRE, 1990). Esse aumento foi associado com a síntese de uma nova proteína para COX. Um ano depois, uma forma induzida de COX foi identificada e denominada de COX-2, sendo codificada por um gene diferente da enzima constitutiva, COX-1 (XIE, 1991; O'BANION , 1991; KUJUBU, 1992; SIROIS, 1992). A COX-2 normalmente é detectável na maioria dos tecidos na presença de processo inflamatório, podendo ser induzida por citocinas inflamatórias como IL-1 β e TNF- α em células residentes e naquelas recrutadas para o foco inflamatório (SEIBERT, 1994; BAKLE, 1996).

O envolvimento da COX-2 na hiperalgesia inflamatória já foi demonstrado por Ferreira (1999).

Em estudos recentes com cães e camundongos, pesquisadores detectaram duas isoformas diferentes de COX-1. A variação da COX-1 encontrada principalmente em extratos de tecido foi denominada de COX-3. Em humanos, a COX-3 foi encontrada abundantemente em amostras de tecido encefálico e cardíaco. Diferentemente do que ocorre com COX-1 e COX-2, o acetaminofeno e principalmente

a dipirona inibiu intensamente a atividade da enzima recém descoberta. Esta inibição seletiva pode representar o mecanismo central primário com que essas drogas diminuem a dor e possivelmente a febre de forma peculiar (CHANDRASEKHARAN, 2002).

O fato de efeitos colaterais dos AINEs serem devidos à inibição da COX-1 que participa da síntese de prostaglandinas envolvidas em várias atividades biológicas normais (função renal, proteção da mucosa gástrica, função plaquetária) levou à síntese de novos fármacos inibidores preferenciais (meloxicam, nimesulida) ou seletivos (celecoxib, rofecoxib) da COX-2.

A importância das citocinas hiperalgésicas no desencadeamento da dor inflamatória e a existência de uma hierarquização funcional na cascata de liberação dessas citocinas, cujo papel central, cabe ao TNF- α (TNF- α » IL-6 » IL-1 » prostaglandinas), levou a compreender outro mecanismo indireto básico da analgesia periférica, que é representado pelas drogas inibidoras da liberação de citocinas, como: corticóides, talidomida e pentoxiflina.

Drogas como os corticóides, associam-se a receptores citosólicos desencadeando o bloqueio da indução de citocinas hiperalgésicas, como já foi demonstrado no modelo de contorções abdominais pelo nosso laboratório (THOMAZZI, 1997).

Este mecanismo pode ser direto e inicia com a passagem através das membranas plasmáticas e a ligação dessas drogas com receptores citoplasmáticos específicos. Este complexo corticóide-receptor ativado é translocado para o núcleo onde

se liga a elementos promotores. O efeito consiste em reprimir a transcrição de vários fatores de transcrição, como AP-1 e NF- κ B que normalmente liberam os genes da COX-2, da forma indutível da sintetase do óxido nítrico e de várias citocinas.

Indiretamente atuam promovendo a formação de mRNA específico e liberação de um peptídeo (lipocortina), que bloqueia a indução da COX-2, conseqüentemente inibindo a síntese de prostaglandinas e leucotrienos, já que as lipocortinas inibem a fosfolipase A2, enzima que libera o ácido araquidônico livre dos fosfolípedes da membrana (FLOWERS, 1989; BARANIUK, 1996).

A Talidomida (TLD/ α -N-Fitalimidoglutarimida) além de ter sido utilizada como agente hipnótico, e ter tido sua comercialização proibida pelo surgimento de teratogênese na década de 60, atualmente é considerada droga de escolha, no tratamento de algumas patologias inflamatórias, como o eritema nodoso da lepra, por reduzir sintomas como a febre, artralgia, dor e anorexia. Estudos demonstram elevação nos níveis séricos de IL-1 β e TNF- α nesta condição e a sua diminuição após terapêutica com talidomida (SARNO, 1990).

Sampaio e colaboradores (1991) observaram que a TLD bloqueava seletivamente a produção de TNF- α , por monócitos humanos estimulados com LPS in vitro, enquanto a produção de outras citocinas como IL-1 β e IL-6 não era afetada por essa droga. O mecanismo de ação sugerido é que a TLD inibe a produção de TNF- α , aumentando a degradação do RNA mensageiro para síntese desta citocina (MOREIRA, 1993). A downregulation do TNF- α pela talidomida tanto in vitro quanto in vivo mostra que essa droga deve atuar como agente imunomodulador em diversas situações

clínicas ou experimentais (KLAUSNER, 1996). Recentemente estudos de Ribeiro (2000) demonstraram que a TLD foi capaz de inibir a hiperalgesia inflamatória em ratos e a resposta nociceptiva no modelo de contorção abdominal em camundongos, sugerindo que esse efeito analgésico seja consequente a inibição da produção de TNF- α .

Utilizando drogas como a pentoxifilina e clopromazina demonstrou-se uma inibição da produção de TNF α “in vitro” e “in vivo” (OHTSUKA, 1997) e a redução da dor em humanos (DUBOST, 1997) e em animais (GORIZONTOVA & MIRONOVA, 1995).

A pentoxifilina é uma metilxantina derivada do teobromo (AVIADO, 1986) clinicamente usada na terapêutica da insuficiência vascular periférica e central, que reduz a transcrição do gene do TNF- α (LENOBLE, 1989). Flores (1989) demonstram a redução da síntese e liberação de TNF- α , IL-2 e IL-6 tanto “in vivo” quanto “in vitro” pela pentoxifilina. Estudos posteriores têm demonstrados que a PTX é capaz de prevenir o aumento sérico de TNF- α em camundongos, ratos e humanos, quando tratados com endotoxina (SCHADE, 1990; NOEL, 1990; ZABEL, 1990). Isto é importante neste contexto pois, a pentoxifilina inibe a produção de outra citocina hiperalgésica, a IL-1 (WEINBERG et al., 1992).

Atualmente é considerado um inibidor do segundo mensageiro sinalizado através do ácido fosfatídico, sobre a liberação de mediadores importantes na resposta inflamatória sistêmica (RICE, 1994), e que provoca down-regulation da produção de TNF- α por certos tipos celulares (BERGERE, 1995; YANG, 1995).

Este papel de limitar a duração da hiperalgesia é também realizado pela liberação no foco inflamatório de citocinas analgésicas como:IL-4 IL-10, IL-13. Sem a liberação destas citocinas inibidoras, a liberação de citocinas hiperalgésicas persistiriam por um longo tempo (VALE, 2003).

1.5.2 Analgésicos periféricos anti-hiperalgésicos diretos (AP-AHD)

O segundo processo de modulação, seria com a administração de drogas que atuam diretamente, bloqueando o curso da hiperalgesia já estabelecida, denominados de analgésicos periféricos anti-hiperalgésicos diretos, uma classe de drogas funcionalmente diferente dos AINEs. Seria o caso da dipirona, diclofenaco e morfina periférica. Por bloquearem diretamente a hiperalgesia estabelecida, estas drogas propiciam uma analgesia mais precoce do que os analgésicos do tipo da aspirina (AP-AHI). A analgesia decorreria em parte da estimulação direta da via metabólica arginina/NO/GMPc/K⁺ por essas drogas (FERREIRA & NAKAMURA, 1979; FERREIRA, 1991; TONUSSI & FERREIRA, 1994; LORENZETTI & FERREIRA, 1996).

Um terceiro tipo de analgesia periférica seria aquela que bloqueia a ativação direta dos nociceptores hipersensibilizados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos. Este seria o caso de drogas que estabilizam a membrana dos nociceptores, como os anestésicos locais. Hoje estão sendo desenvolvidas drogas que bloqueariam os canais de sódio tetrodotoxina (TTX) resistentes, característicos dos neurônios nociceptivos periféricos associados à dor periférica (FERREIRA, 2003).

2. PACLITAXEL (TAXOL®)

O paclitaxel (Taxol®) foi o primeiro dos taxanes a ser usado em ensaios clínicos, com atividade contra uma variedade de cânceres refratários a quimioterapia convencional. Após a sua introdução em experiência clínica, a droga foi aprovada para o tratamento de câncer ovariano refratário à cisplatina em 1992, com perspectivas de uma atividade promissora contra cânceres mama, pulmão, esôfago e cabeça e pescoço (ROWINSKY, 1993; ROWINSKY & DONEWOHER, 1995).

Em 1963, através de um programa do National Cancer Institute um extrato bruto da casca de um raro teixo do Pacífico *Taxus brevifolia*, foi descoberto e em estudos pre-clínicos demonstrou ter atividade citotóxicas contra muitos tumores. O paclitaxel foi isolado como sendo constituinte desse extrato em 1971 (WANI, 1971).

Embora tivesse uma nova estrutura química e ampla atividade pré-clínica, seu desenvolvimento foi lento ,pois não apresentava uma maior efetividade contra tumores experimentais, quando comparados com os agentes desenvolvidos até aquele momento . Adicionalmente, a dificuldade de obtenção e preparação natural da droga em larga escala, contribuíram também para este retardo nos estudos (SCHIFF et al., 1979; SCHIFF, 1980; ROWINSKY et al., 1990).

Somente em 1979 foi identificado o mecanismo de ação exclusivo do paclitaxel como droga antitumoral, que difere dos alcalóides da pervinca e derivados da colchicina, porque induz uma hiperpolarização destes ao invés de inibir a formação de

microtúbulos, e este achado representou o estímulo necessário, para que se intensificassem os estudos com a droga pelo National Cancer Institute (SCHIFF et al., 1979; SCHIFF, 1980; ROWINSKY et al., 1990) .

2.1 Estrutura química

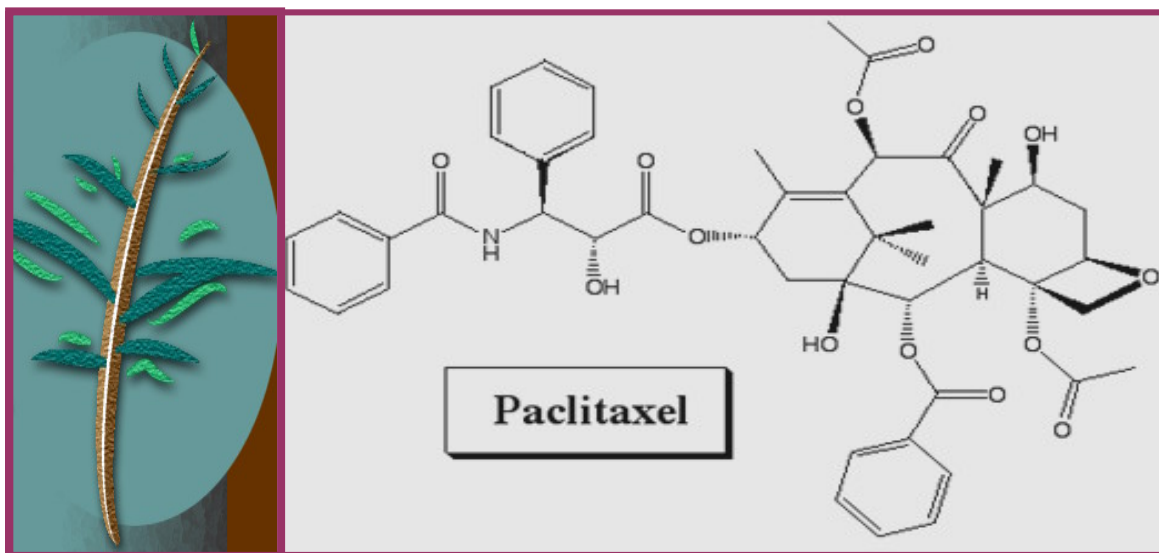


ILUSTRAÇÃO 4. Fórmula química do paclitaxel

É um composto diterpenóide que contém um anel taxano complexo como o seu núcleo (ver ilustração 4).

A cadeia lateral ligada ao anel taxano no carbono 13 é essencial para a sua ação antitumoral. A modificação da mesma levou à identificação de um análogo mais potente o docetaxel, que possui atividade clínica contra cânceres de mama e ovário. Originalmente purificado (molécula-mãe) da casca do teixo, o paclitaxel pode

ser agora, obtido por processo semi-sintético a partir da 10-desacetilbacatina, um precursor encontrado nas folhas do teixo (NICOLAU, 1994).

A molécula tem solubilidade muito limitada e deve ser diluída em veículo de etanol 50% e óleo de rícino polietoxilado 50% (Cremophor EL), uma formação provavelmente responsável por uma alta frequência de reações de hipersensibilidade em pacientes não protegidos, com inibidores de receptores H₁ de histamina (difenidramina), inibidores de H₂ de histamina (cimetidina) e corticosteróides (LASSUS, 1985; WEISS, 1990).

2.2 Mecanismo de ação

O paclitaxel (Taxol[®]) apresenta um mecanismo de ação exclusivo que o diferencia dos demais inibidores mitóticos. A droga promove a fusão e estabilização dos microtúbulos, tornando a célula prisioneira da sua própria divisão (ROWINSKY et al., 1990).

Os microtúbulos são polímeros rígidos de tubulina que normalmente apresentam uma das extremidades ancorada ao lado do núcleo da célula (centrossoma) e a outra livre no citoplasma. Embora sua principal função seja a formação do fuso mitótico durante a divisão celular, os microtúbulos também estão envolvidos em muitas funções vitais da interfase, como: manutenção da forma, motilidade, transmissão de sinais e transporte intracelular (DUSTIN, 1980; WILSON, 1975; CROSSIN et al., 1981).

Contrariamente a outras drogas antimicrotúbulos, tais como os alcalóides da vinca, que induzem a despolimerização dos microtúbulos, o paclitaxel promove a polimerização da tubulina (PARNES & HORWITZ, 1981; KUMAR, 1981; WILSON et al., 1985; HAMEL, 1981; JORDAN, 1993).

Os sítios de ligação para o paclitaxel são diferentes dos sítios de ligação para guanosina trifosfato, colchicina, vimblastina (ROWINSKY, 1990; PARNES & HORWITZ, 1981; KUMAR, 1981; WILSON et al., 1985; HAMEL, 1981; JORDAN, 1993; BURKHART, 1994).

Em concentrações subnanomolar o PCX, liga-se especificamente ao N-terminal 31 aminoácidos das subunidades β -tubulina do microtúbulos, mais do que nos dímeros de tubulina, modificando a dinâmica de equilíbrio entre ambos, necessário para a polimerização, bloqueando assim a despolimerização dos microtúbulos. Essa estabilização excessiva se opõe a desmontagem dessa proteína-chave citoesquelética, através do aumento de sua massa. Tal fato torna os microtúbulos extraordinariamente estáveis e sem função, além de causar morte celular por ruptura da dinâmica normal, seguida da parada da mitose (PARNES, 1981; MANFREDI, 1982; RAO *et. al.*, 1992; 1994)

Apesar dessas alterações morfológicas bastante visíveis, o mecanismo pelo qual esses agentes induzem a morte celular não é completamente conhecido. Existem evidências morfológicas sugestivas de apoptose nas células tratadas com esses agentes. A morte celular vai depender das concentrações da droga e do tempo de exposição das células.

Como mecanismo complementar, mas igualmente relevante, o paclitaxel induz a expressão do gene do fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Estudos indicam que essa atividade não está relacionada ao efeito da droga na estabilização dos microtúbulos, levando a crer que parte dessas citocinas tem atividade antitumoral (ALLEN, 1992; BURKHART, 1994).

2.3 Paclitaxel (taxol[®]) versus TNF- α

O PCX, por ser um diterpenóide de ocorrência natural, que induz a uma polimerização e estabilização anormal dos microtúbulos através da ligação a β -tubulina, chamou a atenção de um grupo de pesquisadores durante uma investigação sobre o potencial citotóxico do LPS. Mais tarde, esse potencial foi finalmente comprovado, com

a demonstração de que o LPS e PCX tinham o mesmo sítio de ligação, a subunidade β -tubulina dos microtúbulos (DING, SANCHEZ, TANCINCO & NATHAN, 1989; 1990; 1992).

Esses mesmos autores através de experimentos de competição pelo receptor demonstraram que o PCX, semelhante ao LPS causa down-regulation dos receptores de TNF- α , além de ambos apresentarem efeitos semelhantes sobre os macrófagos. Como LPS é um potente indutor da produção de citocinas por macrófagos, passou-se a investigar se um efeito similar era também exercido pelo PCX. Nestes estudos ficou demonstrado que de maneira dose-dependente, o LPS-livre de PCX induziu o aumento de TNF- α biologicamente ativo em macrófagos murinos. PCX induziu a produção de TNF- α e inibiu a de IL-10.

Através do método de Northern blot, o PCX (10 a 1 μ M) induziu a expressão do gene RNAm de TNF- α , semelhante ao LPS.

A indução do RNAm de TNF- α por 10 μ M de PCX foi detectada com 45 min da estimulação, atingiu o pico com 90 min e ficou evidente por 8 horas após a estimulação. As baixas concentrações de PCX também induziram a expressão de mRNA de IL-1 α e β . Desta forma, comprovou-se “in vitro” que o PCX estimula macrófagos para produção de TNF- α e IL-1. Esse efeito do PCX semelhante ao LPS, talvez contribua para sua atividade antitumoral (BOGDAN, DING, 1992).

2.4 Farmacocinética

A droga foi avaliada em uma série de doses, até $300\text{mg}/\text{m}^2$ e em esquemas de infusão, variando de 3 a 24 h e demonstrou não ser linear e saturável com um aumento desproporcionalmente grande dos valores de concentração máxima, e a área sob a curva com o aumento da dose, acompanhado por uma diminuição aparente, relacionado à dose do “clearance” corpóreo total. Após administração intravenosa, mostra um declínio bifásico das concentrações plasmáticas. O PCX desaparece do compartimento plasmático com meias-vidas de aproximadamente 0,2, 2 e 20 horas. A concentração plasmática crítica para inibir os elementos de medula óssea depende da duração da exposição, mas provavelmente fica na faixa de 0,01 a $0,1\ \mu\text{M}$ (HUIZING, 1993).

Em pacientes tratados com doses de 135 e $175\text{mg}/\text{m}^2$ administrados por infusões de 3 a 24 horas, a meia-vida final média variou de 13,1 a 52,7 horas e o “clearance” corpóreo total variou de 12,2 a $23,8\ \text{l}/\text{h}/\text{m}^3$.

Achados de revisão demonstram que o veículo utilizado para administração endovenosa, o Cremophor EL (Cr-EL), contribui para esse perfil farmacocinético não linear da droga. Importante ressaltar, que esse perfil registrado se reproduz em camundongos, conforme estudos comparativos realizados por Sparreboom (1996).

Em média, 89% da droga encontra-se ligada às proteínas séricas. Estudo realizado com 65 pacientes com câncer de ovário mostrou que a formulação do veículo (CrEL) causa acúmulo de PCX em eritrócitos levando a importante redução da fração

livre no compartimento celular, quando comparado com outros veículos (SPARREBOMM, 1999).

O paclitaxel sofre intenso metabolismo hepático mediado pelo sistema do Citocromo P450 (isoenzima CYP3A e CYP2C) e menos de 10% de uma dose são excretados intactos na urina. O principal metabólito até agora identificado é o 6-OH paclitaxel, mais múltiplos produtos adicionais são encontrados no plasma e na urina (MONSSARRAT, 1990,1993; CRESTEIL, 1994; HARRIS, 1994).

Infusões prolongadas (96h) forneceram altas taxas de resposta em pacientes com câncer de mama nas experiências preliminares (WILSON, 1994).

2.5 Citotoxicidade

O paclitaxel exerce seus efeitos tóxicos principais na medula óssea. Neutropenia geralmente ocorre 8 a 11 dias após administração de uma dose, revertendo ou recuperando-se rapidamente entre o 15º e o 21º dia. Reações de hipersensibilidade ocorrem em pacientes que receberam infusões de paclitaxel de curta duração (1 a 6h), mas em grande parte evitadas pelo pré-tratamento com difenidramina, cimetidina e dexametasona. Bradicardia e taquicardia ventricular silenciosa também ocorrem, mas resolvem-se espontaneamente durante as infusões de 3 a 24 horas. A mucosite é proeminente em esquemas de infusões prolongadas.

Clinicamente o paclitaxel induz a uma neurotoxicidade representada por uma neuropatia sensorial periférica caracterizada por sintomas frequentemente simétricos como formigamento, tremores e parestesia distal, que se iniciam 24 a 72 horas após o tratamento tanto com doses altas (acima de 250mg/m²) como com doses convencionais (135 a 250mg/m²) únicas ou múltiplas. Os sintomas podem desaparecer após a suspensão do uso ou evoluir para uma dor crônica tipicamente neurogênica (ROWINSKY, 1993b; CHAUDHRY, 1994; GORDON, 1997; VAN DEN BENT, 1997).

A incidência (22-100%) e severidade desta neuropatia dependem da intensidade da dose, duração de infusão, doses cumulativas, tratamento prévio ou concomitante com cisplatina e patologias associadas como diabetes e alcoolismo (CAVALETTI, 1995^a; FORSTH, 1997).

Um significativo número de pacientes experimentam a dor neuropática, característica da neuropatia induzida pelo paclitaxel (KAPLAN, 1993; ROWINSKY, 1993b; CHAUDHRY, 1994; VAN GERVEN, 1994; HILKENS AND VAN DEN BENT, 1997; PACE, HELSING, 1999).

Por exemplo, em 37 pacientes com câncer avançado de mama, tratados com doses de 200-250mg/m², 81% apresentaram disestesias e 22% apresentaram dor neuropática que foi classificada como severa em 11% dos casos (FORSYTH, 1997).

É registrado ainda na literatura, artralguas e mialgias que consistem em dor nas grandes articulações de braços e pernas, geralmente associadas à neuropatia sensitiva. Os sintomas aparecem 24 a 48 horas depois da administração do PCX e se resolvem em alguns dias. A incidência e a severidade são caracteristicamente dose-dependente, sendo mais frequente em esquemas terapêuticos com altas doses de PCX administradas por 3 horas em comparação com esquemas de infusão prolongada (SCHILLER, 1994). Podem ainda, estar mais relacionada com pacientes que receberam G-CSF e adequadamente prevenida com glutamina oral (60mg/dia) (SAVARESE, 1998).

Ozols em 1994 publicou uma relevante revisão bibliográfica dos efeitos secundários mais frequentes registrados nas histórias clínicas de pacientes em uso de PCX e ou carboplatina para câncer avançado de ovário, identificando 36.7% de parestesias, 16% reações de hipersensibilidade, 10.9% mialgias e 6.9% de caimbras.

A eficácia e toxicidade do PCX (200mg/m² em infusão contínua por 3 horas) associado a gencitabina como esquema de primeira linha para pacientes com

adenocarcinoma de pulmão metastático, foram demonstradas recentemente, obtendo-se uma taxa de resposta global de 38.2%. Os pacientes desenvolveram neuropatia periférica em 47.2% e artralgia e mialgias em 56.6% (DOUILLARD, 2001).

3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Sabe-se que a ocorrência de dores associadas em pacientes oncológicos na vigência ou não de tratamento antitumoral , constitui-se em fator importante do sofrimento relacionado à doença, mesmo quando comparado à expectativa de morte.

Algumas vezes, essa ocorrência de dor está relacionada ao próprio tratamento quimioterápico. Portanto, faz-se necessário a elucidação dos mecanismos envolvidos na gênese deste tipo dor , através de modelos experimentais que reproduzam fidedignamente os sintomas observados nos pacientes, para futuramente se tornarem consenso nos centros envolvidos na pesquisa e no tratamento da dor. Neste contexto enquadramos o paclitaxel (Taxol[®]), antineoplásico em evidência neste trabalho, que representou nas últimas décadas, um grande avanço no tratamento do câncer de ovário, mama metastático e pulmão avançado, com taxas de respostas em pacientes recidivados que variam de 20 a 50%.

Os pacientes em uso do paclitaxel (Taxol[®]) apresentam uma mielossupressão e uma neuropatia periférica sensorial dose-limitante e cumulativa já

bem documentada na literatura. Menos frequentemente observa-se nestes pacientes sintomas como artralguas e mialgias.

No que diz respeito, a esses eventos de dor inflamatória, nada foi descrito até o momento, visando correlacionar o envolvimento das citocinas pró-inflamatórias, na gênese da hiperalgisia induzida pelo paclitaxel (Taxol[®]), já que a droga é capaz induzir a expressão do gene de TNF- α .

Em trabalhos desenvolvidos anteriormente no nosso laboratório, demonstrou-se que as contorções abdominais em camundongos, induzidas pelo zymosan são conseqüentes à liberação de mediadores inflamatórios prostaglandínico e simpáticos por células residentes (RIBEIRO, 2000) e que, a injeção intra-articular de zymosan em joelho de ratos produz uma periartrite característica, que é tida como sinal de hiperalgisia no modelo de incapacitação articular (TONUSSI & FERREIRA, 1992).

Desta forma, constitui-se objetivos deste trabalho avaliar experimentalmente o efeito do paclitaxel (Taxol[®]) na hiperalgisia inflamatória induzida pelo zymosan, a partir das seguintes investigações:

1. Avaliar o efeito do paclitaxel (Taxol[®]) na modulação da resposta nociceptiva induzida pelo zymosan em dois modelos experimentais de dor inflamatória, que são: modelo de contorções abdominais em camundongos e o modelo de incapacitação articular em ratos;

2. Avaliar o envolvimento de mediadores hiperalgésicos como prostaglandinas, aminas simpatomiméticas e citocinas (TNF- α), através da utilização de ferramentas farmacológicas adequadas a esta demonstração, tais como: indometacina, celecoxib, atenolol, dexametasona, talidomida, pentoxifilina.

II MATERIAL E MÉTODOS

1 II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

1.1. Camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos pesando entre 20 e 30 gramas; provenientes do Biotério Central do Campus do Pici e do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina/UFC, onde foram mantidos em gaiolas apropriadas. Todos receberam ração comercial balanceada e água ad libitum, e foram mantidos nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. Após o término dos experimentos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ou na câmara de éter.

1.2. Ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) machos, pesando entre 180 e 200g provenientes do Biotério Central do Campus do Pici e do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina/UFC, onde foram mantidos em gaiolas apropriadas. Todos receberam ração comercial balanceada e água ad libitum, e foram mantidos nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. Após o término dos experimentos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ou na câmara de éter.

2. Aparelho e instrumentos laboratoriais

Durante o decorrer dos experimentos foram utilizados diversos aparelhos e instrumentos, discriminados a seguir:

- Agitador magnético
- Agulhas descartáveis
- Alicates para deslocamento cervical
- Aparelho para medir a incapacitação articular
- Balança analítica mod. AL200 e Ohaus, mod. AS260D (MARTE)
- Balança para pesagem de animais, mod. ID-1500 (Filizola)
- Beckers (SIMAX)
- Câmara anestésica (confeccionada no laboratório)
- Cronômetro
- Capela de fluxo laminar, vertical (modelo VLFS-12, Veco do Brasil Ind. Com. Equip. Ltda, Campinas-SP/Brasil).
- Esparadrapo
- Funis de vidro grandes
- Luvas descartáveis
- Micropipetas automáticas (GILSON)
- Pincel para marcação dos animais
- Ponteiros para pipetas automáticas (SIGMA)
- Sapatilhas metálicas
- Seringas descartáveis 1, 5, 10 e 20 ml (BD Plastipak).
- Sonicador (Sonics & Materials Inc. Danbury- Connecticut-USA)
- Tubos de plástico de 15 e 45 ml (FALCON)

3. Drogas e soluções

3.1. Paclitaxel (Taxol[®]) da Bistol-Myers-Squibb, Paris/França. (Fr.- 5ml/30mg)

3.2. Veículo :Cremophor EL da Sigma, L'Isle d' Abeau, France

Etanol absoluto da Merck, Darmstadt- Germany

3.3. Indometacina (Merck, Sharp and Dohme-MSD,USA) - diluída em solução de bicarbonato de sódio a 5%.

3.4. Acatado de Dexametasona- Decadron (Merck, Sharp and Dohme-MSD,USA), frasco ampola de 2,5ml/10mg – diluída em salina

3.5. Atenolol (Sigma Chemical Co., USA)- diluída em salina.

3.6. Talidomida (CEME) – diluída em salina

3.7. Pentoxifilina- Trental (Hoechst) amp=4ml (100mg/ml)– diluída em salina

3.8. Celecoxib- Celebra – diluído em salina

3.9. Zymosan (Saccharamyces cerevisiae)-Sigma Chemical Co. (St. Louis,USA)

– diluído em salina.

3.10. Solução salina estéril (NaCl 0.9%)

3.11. DMSO (Dimetil sulfóxido/ Sigma)

3.12. Solução de Bicarbonato de Sódio (Merck, Sharp and Dohme- MSD, USA)

utilizado a 5% (p/v) dissolvido em água destilada

3.13. Água destilada

4. Testes nociceptivos

4.1 Teste de contorção abdominal (CA) induzido por zymosan.

O modelo foi descrito por COLLIER et al. (1968). Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 20 a 25g (8 animais/grupo). O estímulo nociceptivo (zymosan 1mg/animal) foi administrado via intraperitoneal.

Duas horas antes do estímulo (ZY), os animais foram tratados com paclitaxel na dose de 8mg/kg intraperitoneal e três horas antes do zymosan os animais foram pré-tratados.

A intensidade da nocicepção foi quantificada pela contagem total do número de contorções abdominais apresentadas até 30 min após a injeção do estímulo. Uma contorção foi padronizada como extensão das pata traseiras acompanhadas de constrição abdominal. Ilustração 3.

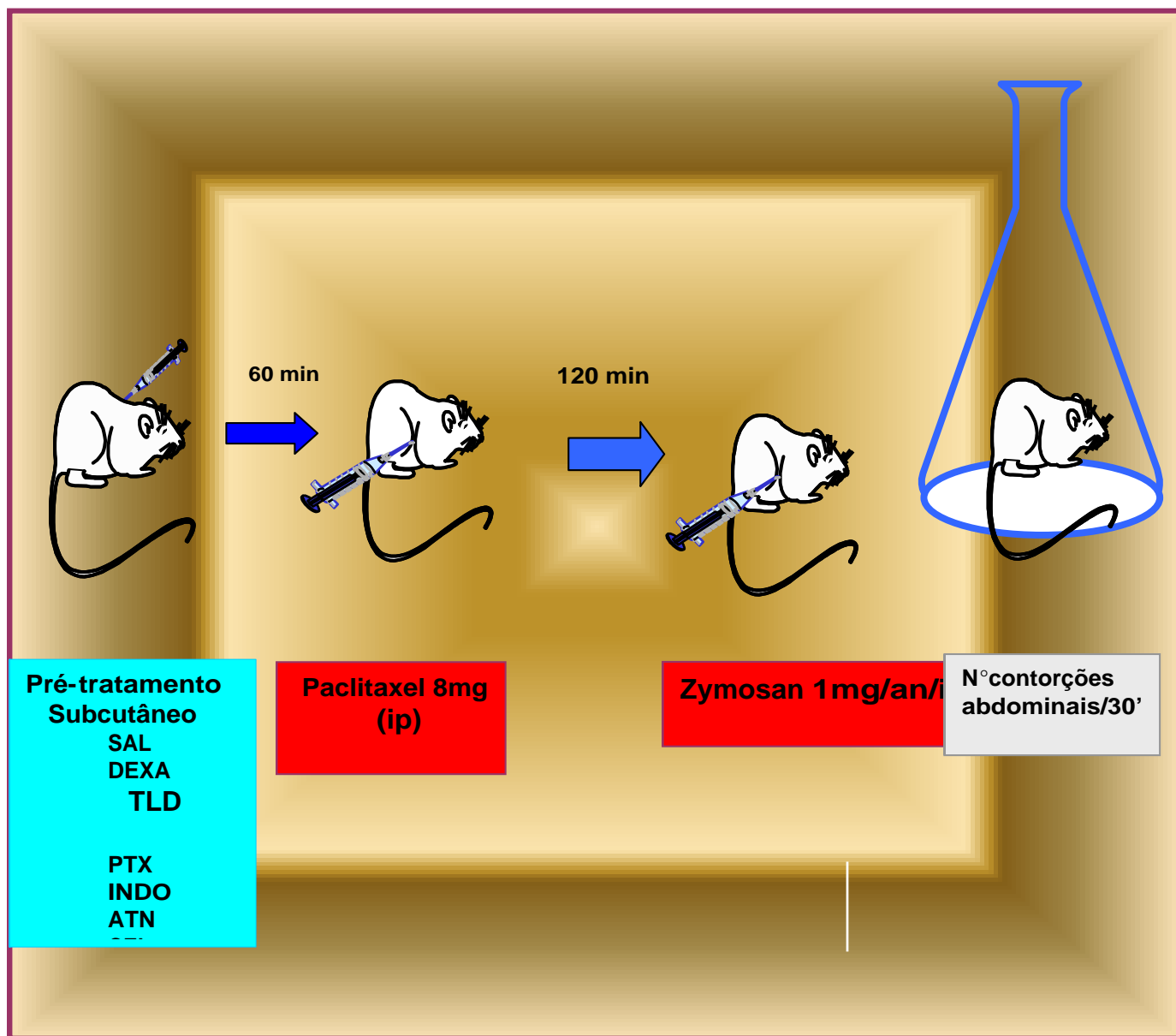


ILUSTRAÇÃO 3. Metodologia da modulação farmacológica no teste de contorção abdominal em camundongos tratados com paclitaxel e zymosan.

4.2 Teste de incapacitação articular (IA) induzido por zymosan

O modelo foi descrito anteriormente por TONUSSI & FERREIRA (1992), modificado posteriormente (MAGALHÃES et al., 1997; VIANA et al. 1998) e adaptado para o nosso laboratório. Ratos Wistar machos (6 animais/grupo), pesando entre 170-200 g receberam 250 μ g/animal em 50 μ l de ZY intrarticular no joelho direito posterior. Os animais eram calçados com sapatilhas metálicas, onde a direita está conectada ao computador. Ao tocar com a sapatilha no piso metálico fecha-se um circuito e ao final de 1 minuto o computador registra o tempo de suspensão da pata (TSP), isto é, o tempo em que o animal permaneceu com a pata levantada sem encosta-la no piso. Após uma hora da injeção do estímulo, os animais foram postos para deambular forçosamente a uma velocidade de 3 RPM, em um carrossel de piso metálico giratório (cilindro de 30cm de diâmetro x 50cm de largura, coberto por uma tela de alumínio). Na seqüência receberam PCX (Taxol[®]) na dose de 4 e 8mg/kg intraperitoneal. O TSP é medido antes da injeção do estímulo (tempo zero) e de hora em hora até a sexta hora. Calcula-se o Δ TSP que é a diferença entre a medida do TSP de cada hora e a do tempo zero. Desta forma, um aumento do TSP indica hipernocicepção, isto é, a incapacidade do animal de deambular normalmente nos carrossel. Importante registrar a necessidade de um treinamento e adaptação dos animais ao ambiente, 24 horas antes do experimento. ILUSTRAÇÃO 4.

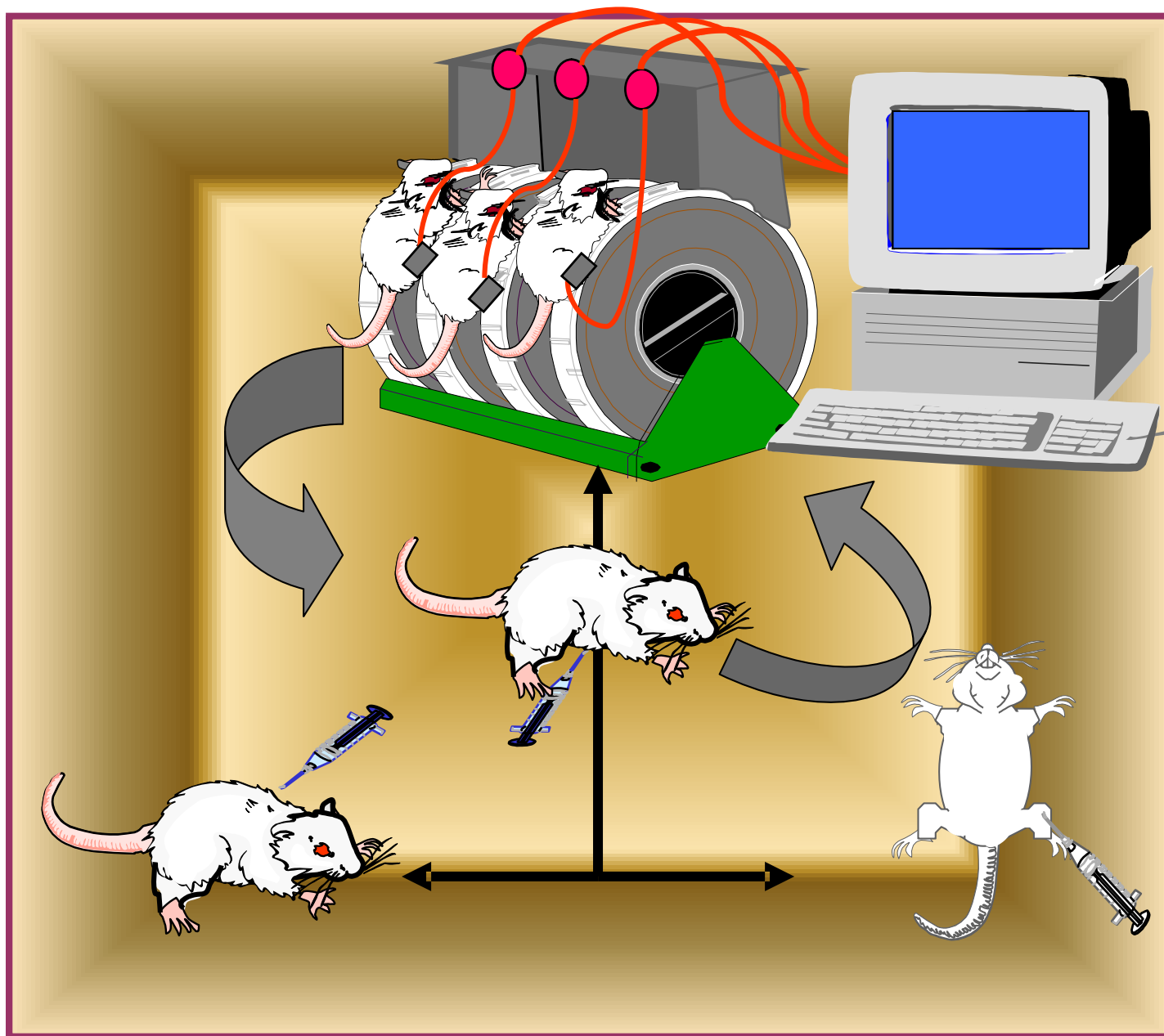


ILUSTRAÇÃO 4. Metodologia da modulação farmacológica no teste de incapacitação articular. Onde o Δ TSP é registrado na:

- ❑ **HORA ZERO: Pré-tratamento (Sc) e estímulo (ZY, i-art);**
- ❑ **1ª HORA DE RODA: Tratamento (PCX, ip);**
- ❑ **2ª, 3ª, 4ª, 5ª e 6ª HORA DE RODA .**

5. Curva dose-resposta do PCX (Taxol[®]) intraperitoneal na atividade nociceptiva do zymosan no modelo de contorções abdominais em camundongos.

O efeito da administração ip do PCX (Taxol[®]) em diferentes doses (4, 8, 16 e 32mg/kg) duas horas antes da injeção ip do Zymosan (1mg/cavidade), foi testado no modelo de contorções abdominais em camundongos. A intensidade da nocicepção foi quantificada pela contagem total do número de contorções abdominais apresentadas em 30 minutos após administração do estímulo nociceptivo (Zy).

6. Curso temporal das contorções abdominais induzidas por zymosan, em camundongos tratados com injeção intraperitoneal de PCX (Taxol[®]) e Cremophor EL .

O curso temporal da atividade nociceptiva induzida por zymosan foi testada no modelo de contorções abdominais com injeção intraperitoneal de PCX (Taxol[®]) (8mg/kg) e Cremophor EL (v/v) em camundongos 45 minutos, 2 e 6 horas antes da injeção intraperitoneal do zymosan (1mg/cavidade). A intensidade da nocicepção foi quantificada pela contagem total do número de contorções abdominais apresentadas em 30 minutos após administração do estímulo (ZY).

7. Efeito dose-resposta do pré-tratamento (Sc) com inibidores de citocinas sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol®) intraperitoneal.

Os efeitos da dexametasona (0.5, 1.0 e 2mg/kg), talidomida (5, 15 e 45mg/kg) e da pentoxifilina (5, 15 e 45mg/kg) administrados via subcutânea (0,3 ml/animal), 1 hora antes da injeção ip do PCX (Taxol®) na dose de 8 mg/kg, foram testados no modelo de contorções abdominais em camundongos. A intensidade da nocicepção foi quantificada pela contagem total do número de contorções abdominais apresentadas durante 30 minutos, após administração ip do estímulo nociceptivo (zymosan 1 mg/cavidade) , que ocorreu 2 horas após a administração do PCX (Taxol®) e 3 horas após o pré-tratamento.

8. Efeito dose-resposta do pré-tratamento (Sc) dos inibidores de COX-1, COX-2 e bloqueador simpático sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol®) intraperitoneal.

Os efeitos da indometacina (0.125, 0.5 e 2mg/kg), do celecoxib (15, 30 e 60mg/kg) e do atenolol (0.125, 0.5 e 2mg/kg) administrados via subcutânea (0,3 ml/animal) 1 hora antes da injeção intraperitoneal do PCX (Taxol®) na dose de 8 mg/kg, foram testados no modelo de contorções abdominais em camundongos. A intensidade da nocicepção foi quantificada pela contagem total do número de contorções abdominais apresentadas durante 30 minutos, após administração intraperitoneal do estímulo nociceptivo (zymosan 1 mg/cavidade) , que ocorreu 2 horas após a administração do Taxol® e 3 horas após o pré-tratamento.

9. Efeito do PCX (Taxol[®]) sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em joelho de ratos.

A amplificação da atividade nociceptiva induzida por zymosan (250µg i.art) em ratos no modelo de incapacitação articular, foi testada com injeção intraperitoneal de PCX (Taxol[®]) nas doses de 4, 8 e 16mg/kg e o Cremophor EL (v/v), 1 hora após a injeção do estímulo . O tempo de suspensão da pata foi medido durante 60 segundos, de hora em hora até a 6^a h de experimento.

10. Efeito do pré-tratamento (Sc) com inibidores de citocinas sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos tratados dos com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.

Após a tomada do tempo zero no modelo de incapacitação articular em ratos, a dexametasona (2mg/kg), talidomida (45mg/kg) e da pentoxifilina (45mg/kg) via subcutânea (1ml/animal), e zymosan (250µg i.art.) , foram administrados. Na 1^a hora de experimento o PCX (Taxol[®]) na dose de 4mg/kg foi injetado intraperitoneal . O tempo de suspensão da pata foi medido durante 60 segundos, de hora em hora até a 6^a h após a injeção do estímulo.

11. Efeito do pré-tratamento (Sc) com inibidores de COX-1 e COX-2 sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos tratados dos com PCX (Taxol[®]) intraperitoneal.

Após a tomada do tempo zero no modelo de incapacitação articular em ratos, indometacina (2mg/kg) e celecoxib (60mg/kg) por via subcutânea (1ml/animal), e zymosan (250µg i.art) , foram administrados. Na 1^a hora de experimento o PCX (Taxol[®]) na dose de 4mg/kg foi injetado intraperitoneal . O tempo de suspensão da pata foi medido durante 60 segundos, de hora em hora até a 6^ah após a injeção do estímulo .

12. Análise estatística dos dados

Os resultados foram expressos como média \pm o erro padrão da média (EPM). As médias dos vários procedimentos experimentais foram comparadas utilizando a análise de variância (one way-ANOVA) e a significância entre os grupos estabelecida pelo Teste de Bonferroni. A significância mínima aceita entre os grupos foi ao nível de $p < 0.05$. A dose eficaz cinqüenta (ED^{50}) foi calculada de acordo com o método de Litchfield & Wilcoxon (1949) modificado, usando as médias dos valores das contorções obtidas em cada grupo experimental.

III RESULTADOS

Considerando-se a necessidade metodológica de se estabelecer inicialmente parâmetros para delineamento experimental da investigação somado ao caráter relevante do ineditismo do presente trabalho, cujo objetivo primordial foi avaliar o efeito potencializador do paclitaxel (taxol[®]) na modulação da resposta nociceptiva inflamatória experimental, contribuíram para o aparecimento de muitas dificuldades nesta etapa inicial da pesquisa .

A falta de trabalhos anteriores na literatura pesquisada que se correlaciona este antineoplásico com a dor inflamatória, nos levou a buscar a dose do paclitaxel (taxol[®]) que fossem capaz de amplificar a resposta nociceptiva inflamatória e o tempo ideal para estudar esse suposto fenômeno, a partir de doses e tempo de avaliação padronizados em modelos de dor neuropática experimental com a droga em tela, encontrados em trabalhos publicados até aquele momento.

Na grande maioria dos trabalhos, eram empregadas doses que variavam de 16 a 80mg/kg de paclitaxel (Taxol[®]) em esquemas de dose única ou doses cumulativas, para observação de um fenômeno doloroso crônico (dias-semanas), que terminaram se transformando em experimentos dispendiosos.

Alguns fatores que contribuíram para esse quadro foram o elevado custo da droga, a dificuldade de obtenção do veículo e o número elevado de animais necessários em cada grupo experimental, já que o fenômeno estudado é de difícil avaliação experimental devido seu caráter subjetivo e multidimensional em que se apresenta no homem, que é a dor.

Estas dificuldades iniciais foram adequadamente superadas e os resultados relevantes do presente estudo passam a ser registrados didaticamente a seguir:

1. CURVA DOSE-RESPOSTA DO PCX (TAXOL[®]) INTRAPERITONEAL NA ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO ZYMOSAN NO MODELO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS EM CAMUNDONGOS.

A injeção intraperitoneal de PCX (Taxol[®]) somente da dose de 8mg/kg duas horas antes do estímulo nociceptivo (zymosan 1mg/cavidade ip) foi capaz de aumentar de forma significativa o número de contorções abdominais nos animais observados durante 30 minutos ($p < 0.001$) quando comparados com grupo controle . Figura 1.

Interessante observar que administração de doses crescentes de PCX (Taxol[®]) não levaram a uma atividade nociceptiva estatisticamente significativa, seus respectivos efeitos máximos, mostraram respostas da mesma magnitude daquelas observadas com doses pouco efetivas, o que caracteriza típicas curvas “em sino”.

2. CURSO TEMPORAL DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ZYMOSAN, EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE PCX (TAXOL®) E CREMOPHOR EL .

A injeção intraperitoneal de PCX (Taxol®) na dose de 8mg/kg foi capaz de aumentar de forma significativa o número de contorções abdominais nos animais observados durante 30 minutos ($p < 0.001$), somente quando administrado 2 horas antes do estímulo nociceptivo (zymosan 1mg/cavidade; ip) , quando comparados com grupo controle- Cremophor. Figura 2.

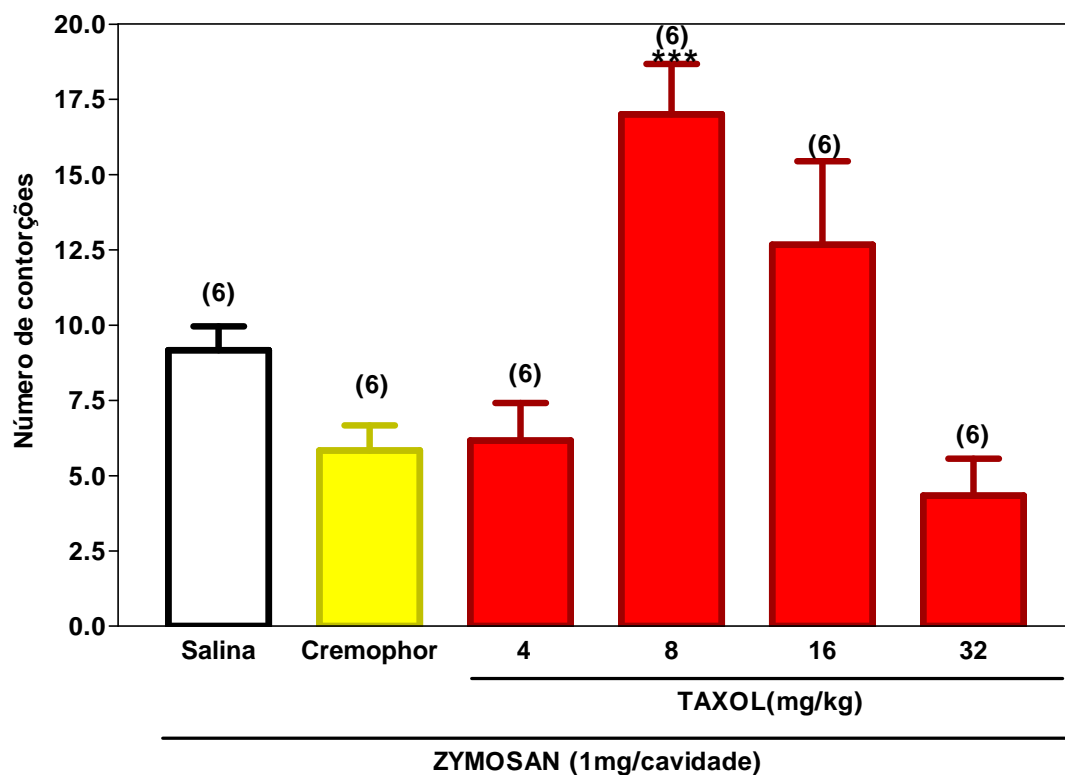


FIGURA 1. Curva dose-resposta do PCX (Taxol[®]) intraperitoneal no modelo de contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos. PCX (Taxol[®]) nas doses de 4, 8, 16, 32mg/kg foi administrado por via ip, duas horas antes do estímulo nociceptivo (zymosan 1mg/cavidade ip) em camundongos Swiss. As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas após 30 min da injeção do estímulo quando comparados com grupo controle. Os números acima das barras indicam o número de animais ensaiados de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu Cremophor EL. (***) $p < 0.001$; Bonferroni- ANOVA).

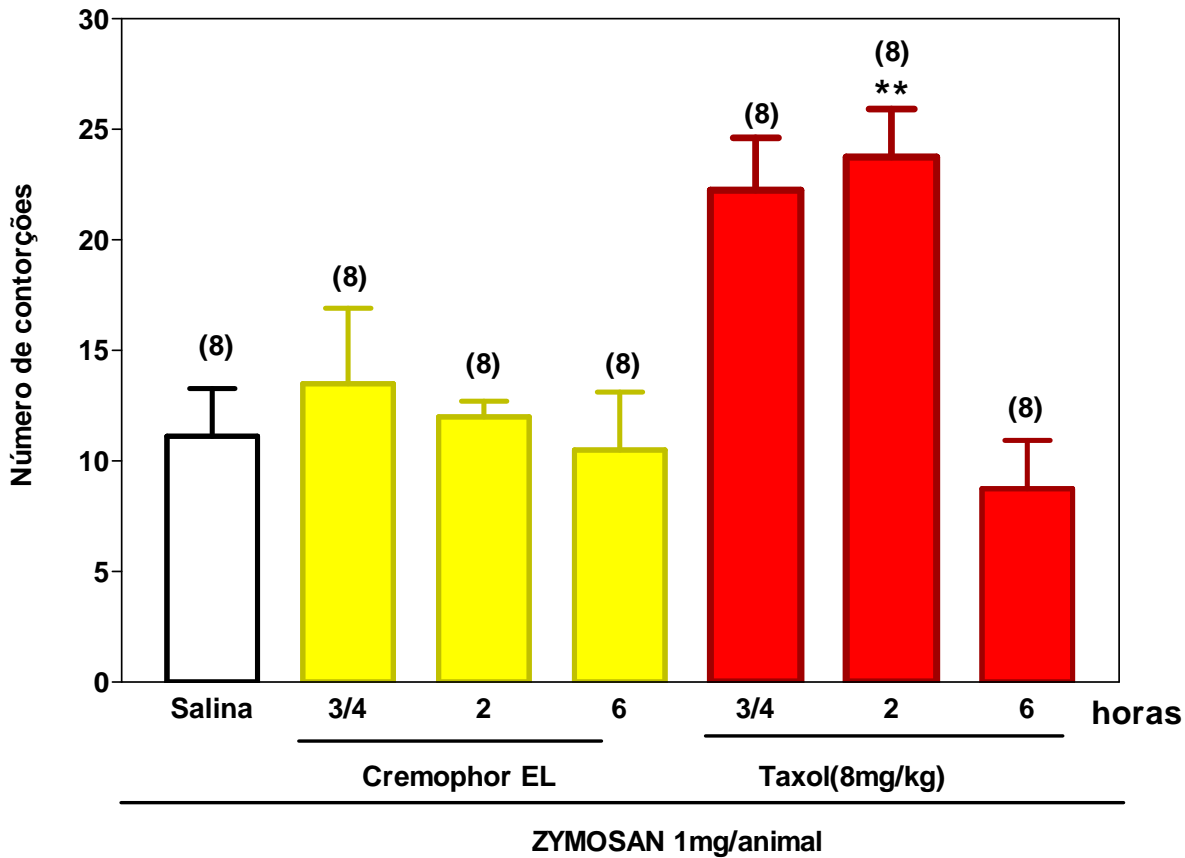


FIGURA 2. Curso temporal das contorções abdominais induzidas por zymosan, em camundongos tratados com injeção intraperitoneal de PCX (Taxol[®]) e Cremophor EL. PCX (Taxol[®]) na dose de 8mg/kg, administrado ip 45 min, 2 e 6 horas antes do estímulo nociceptivo (zymosan 1mg/cavidade ip) em camundongos Swiss, tendo como veículo de injeção, Cremophor EL (v/v), que foi usado como controle. As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas após 30 min da injeção do estímulo, quando comparados com grupo controle. Os números acima das barras indicam o número de animais ensaiados de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo que recebeu Cremophor EL.

(** $p < 0.01$; Bonferroni- ANOVA).

3. EFEITO DOSE-RESPOSTA DA DEXAMETASONA (DEXA) SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ZYMOSEAN EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM PCX (TAXOL[®]) INTRAPERITONEAL.

A injeção subcutânea de dexametasona nas doses de 0.5mg/kg ($p < 0.05$), 1mg/kg ($p < 0.001$) e 2mg/kg ($p < 0.001$) administradas 1 hora antes do PCX (Taxol[®]) na dose de 8mg/kg ip, e 3 horas do estímulo (zymosan 1mg/cavidade ip), foram capazes de diminuir o número das contorções abdominais em camundongos observados por 30 minutos, após a injeção do estímulo, quando comparadas ao grupo controle. A diminuição no número de contorções foi significativa para todas as doses de DEXA, sendo que a atividade máxima foi alcançada na dose de 2mg/kg quando comparado ao grupo controle. A ED₅₀ estimada da dexametasona foi de 0.71 mg/kg. Figura 3.

4. EFEITO DOSE-RESPOSTA DA TALIDOMIDA (TLD) SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ZYMOSEAN EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM PCX (TAXOL[®]) INTRAPERITONEAL.

A injeção subcutânea de talidomida nas doses de 5mg/kg ($p < 0.05$), 15mg/kg ($p < 0.001$) e 45mg/kg ($p < 0.001$) administradas 1 hora antes do PCX (Taxol[®]) na dose de 8mg/kg ip, e 3 horas do estímulo (zymosan 1mg/cavidade ip), foram capazes de diminuir o número das contorções abdominais em camundongos observados por 30 minutos, após a injeção do estímulo, quando comparadas ao grupo controle. A diminuição no número de contorções foi significativa para todas as doses de TLD, sendo que a atividade máxima foi alcançada na dose de 45mg/kg quando comparadas ao grupo controle. A ED₅₀ estimada da talidomida foi de 23,36 mg/kg. Figura 4.

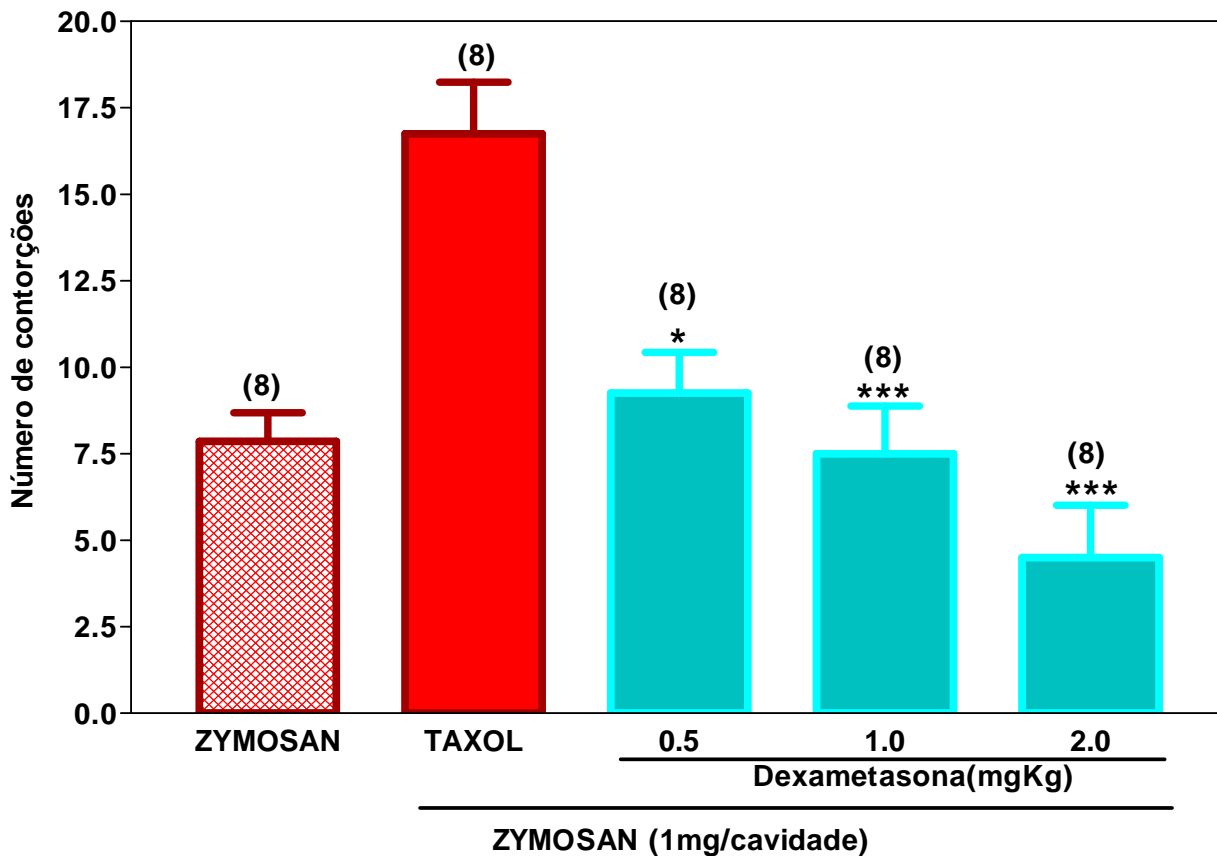


FIGURA 3. Efeito dose-resposta da dexametasona (DEXA) sobre As contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com PCX (Taxol®) intraperitoneal. Dexametasona nas doses de 0.5, 1 e 2mg/kg administradas via subcutânea 1 hora antes do PCX (Taxol®) na dose de 8mg/kg ip e três horas antes do estímulo nociceptivo (zymosan 1mg/cavidade ip) em camundongos Swiss. As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas após 30 min da injeção do estímulo quando comparados com grupo controle. Os números acima das barras indicam o número de animais ensaiados de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, Bonferroni-ANOVA).

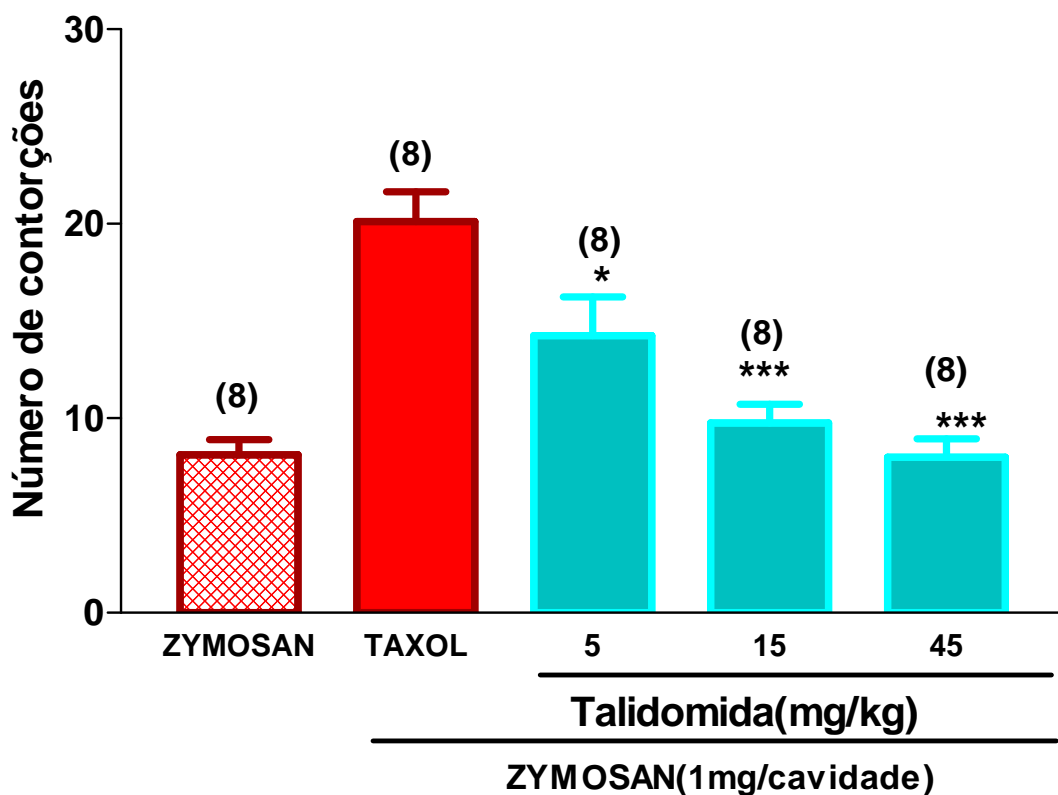


FIGURA 4 . Efeito dose-resposta da talidomida (TLD) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com Taxol[®] intraperitoneal. Talidomida nas doses de 5, 15 e 45mg/kg, administradas via subcutânea 1 hora antes do PCX (Taxol[®]) na dose de 8mg/kg ip ,e três horas antes do estímulo nociceptivo (zymosan 1mg/cavidade ip) em camundongos Swiss. As barras representam as médias ± EPM do número total de contorções ocorridas após 30 min da injeção do estímulo quando comparados com grupo controle. Os números acima das barras indicam o número de animais ensaiados de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle. (* p < 0.05; *** p < 0.001, Bonferroni- ANOVA).

5. EFEITO DOSE-RESPOSTA DA PENTOXIFILINA (PTX) SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ZYMOSAN EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM PCX (TAXOL[®]) INTRAPERITONEAL.

A injeção subcutânea de pentoxifilina nas doses de 5mg/kg ($p < 0.05$), 15mg/kg ($p < 0.001$) e 45mg/kg ($p < 0.001$) administradas 1 hora antes do PCX (Taxol[®]) na dose de 8mg/kg ip, e 3 horas do estímulo (zymosan 1mg/cavidade ip), foram capazes de diminuir o número das contorções abdominais em camundongos observados por 30 minutos, após a injeção do estímulo, quando comparadas ao grupo controle. A diminuição no número de contorções foi significativa para todas as doses de PTX, sendo que a atividade máxima foi alcançada na dose de 45mg/kg quando comparadas ao grupo controle. A ED₅₀ estimada da pentoxifilina foi de 8,40 mg/kg. Figura 5.

6. EFEITO DOSE-RESPOSTA DA INDOMETACINA (INDO) SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ZYMOBAN EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM PCX (TAXOL[®]) INTRAPERITONEAL.

A injeção subcutânea (0.3 ml/animal) de indometacina nas doses de 0.125mg/kg ($p < 0.01$), 0.5 mg/kg ($p < 0.001$) e 2mg/kg ($p < 0.001$) administradas 1 hora antes do PCX (Taxol[®]) na dose de 8mg/kg ip, e 3 horas do estímulo (zymosan 1mg/cavidade ip), foram capazes de diminuir o número das contorções abdominais em camundongos observados por 30 minutos, após a injeção do estímulo, quando comparadas ao grupo controle. A diminuição no número de contorções foi significativa para todas as doses de INDO, sendo que a atividade máxima foi alcançada na dose de 2mg/kg quando comparadas ao grupo controle. A ED₅₀ estimada da indometacina foi de 0,051 mg/kg. Figura 6.

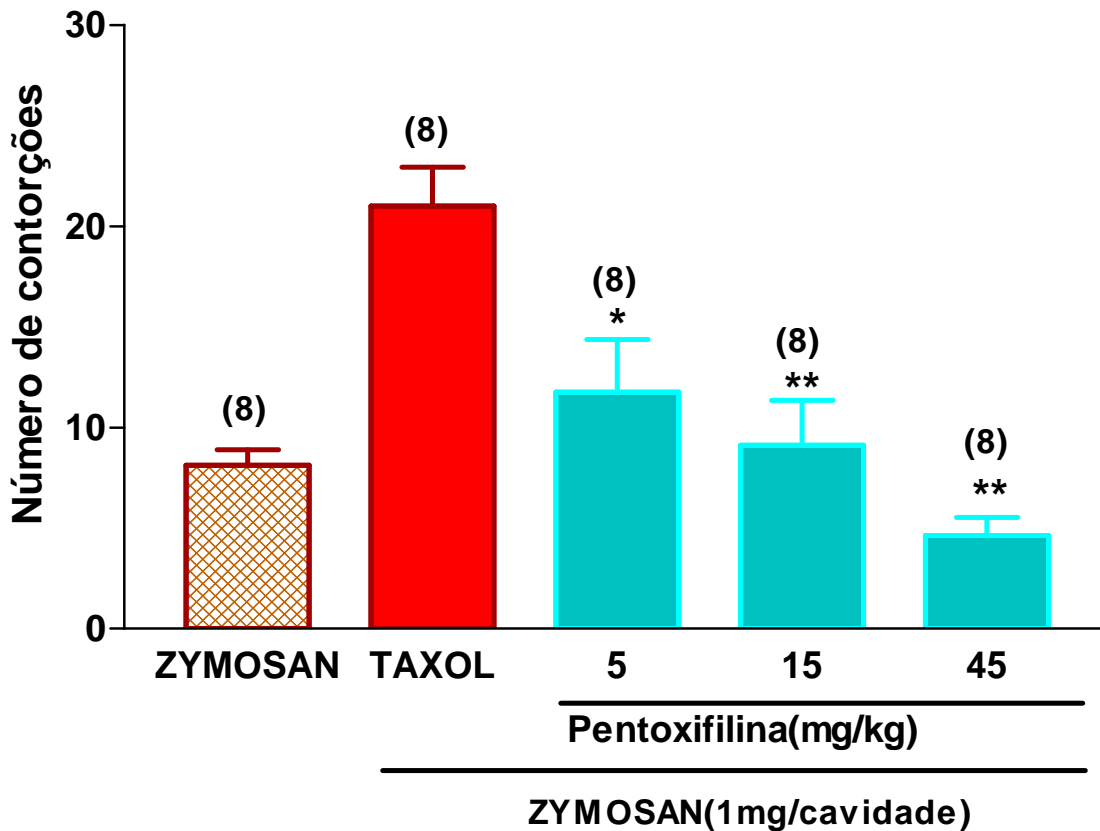


FIGURA 5. Efeito dose-resposta da pentoxifilina (PTX) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com Taxol[®] intraperitoneal. Pentoxifilina nas doses de 5, 15 e 45mg/kg, administradas via subcutânea 1 hora antes do PCX (Taxol[®]) na dose de 8mg/kg ip, e três horas antes do estímulo nociceptivo (zymosan 1mg/cavidade ip) em camundongos Swiss. As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas após 30 min da injeção do estímulo quando comparados com grupo controle. Os números acima das barras indicam o número de animais ensaiados de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, Bonferroni- ANOVA).

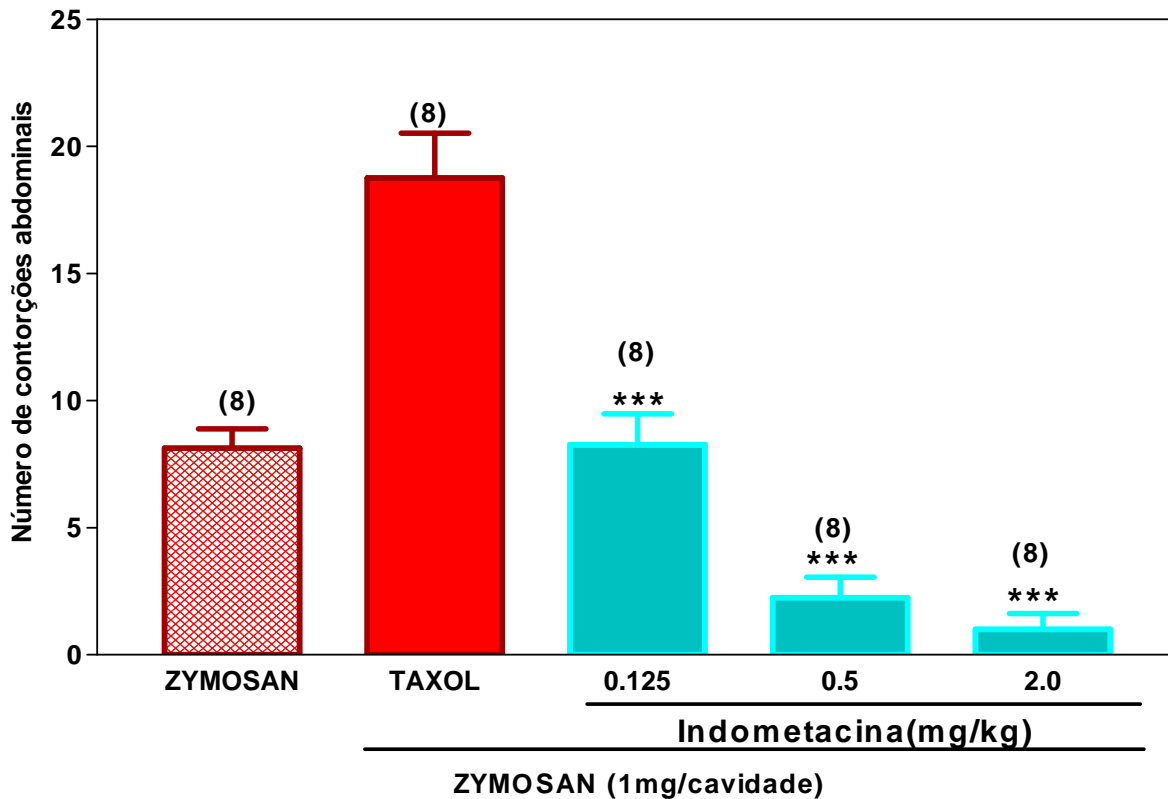


FIGURA 6 . Efeito dose-resposta da indometacina (INDO) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com Taxol® intraperitoneal. Indometacina nas doses de 0.125, 0.5 e 2mg/kg, administradas via subcutânea 1 hora antes do PCX (Taxol®) na dose de 8mg/kg ip, e três horas antes do estímulo nociceptivo (zymosan 1mg/cavidade ip) em camundongos Swiss. As barras representam as médias ± EPM do número total de contorções ocorridas após 30 min da injeção do estímulo quando comparados com grupo controle. Os números acima das barras indicam o número de animais ensaiados de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle. (***) $p < 0.001$, Bonferroni- ANOVA).

7. EFEITO DOSE-RESPOSTA DO CELECOXIB (CEL) SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ZYMOSAN EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM PCX (TAXOL[®]) INTRAPERITONEAL.

A injeção subcutânea de celecoxib nas doses de 15mg/kg ($p < 0.001$), 30mg/kg ($p < 0.001$) e 60mg/kg ($p < 0.001$), administradas 1 hora antes do PCX (Taxol[®]) na dose de 8mg/kg ip, e 3 horas do estímulo (zymosan 1mg/cavidade ip), foram capazes de diminuir o número das contorções abdominais em camundongos observados por 30 minutos, após a injeção do estímulo, quando comparadas ao grupo controle. A diminuição no número de contorções foi significativa para todas as doses de CEL, sendo que a atividade máxima foi alcançada na dose de 60mg/kg quando comparado ao grupo controle. A ED₅₀ estimada do celecoxib foi de 13,68 mg/kg. Figura 7.

8. EFEITO DOSE-RESPOSTA DO ATENOLOL (ATL) SOBRE AS CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ZYMOSAN EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM PCX (TAXOL[®]) INTRAPERITONEAL.

A injeção subcutânea de atenolol nas doses de 0.125mg/kg ($p < 0.001$), 0.5 mg/kg ($p < 0.001$) e 2mg/kg ($p < 0.001$) administradas 1 hora antes do PCX (Taxol[®]) na dose de 8mg/kg ip, e 3 horas do estímulo (zymosan 1mg/cavidade ip), foram capazes de diminuir o número das contorções abdominais em camundongos observados por 30 minutos, após a injeção do estímulo, quando comparadas ao grupo controle. A diminuição no número de contorções foi significativa para todas as doses de ATL, sendo que a atividade máxima foi alcançada na dose de 2mg/kg quando comparadas ao grupo controle. A ED₅₀ estimada do atenolol foi de 0,137mg/kg. Figura 8.

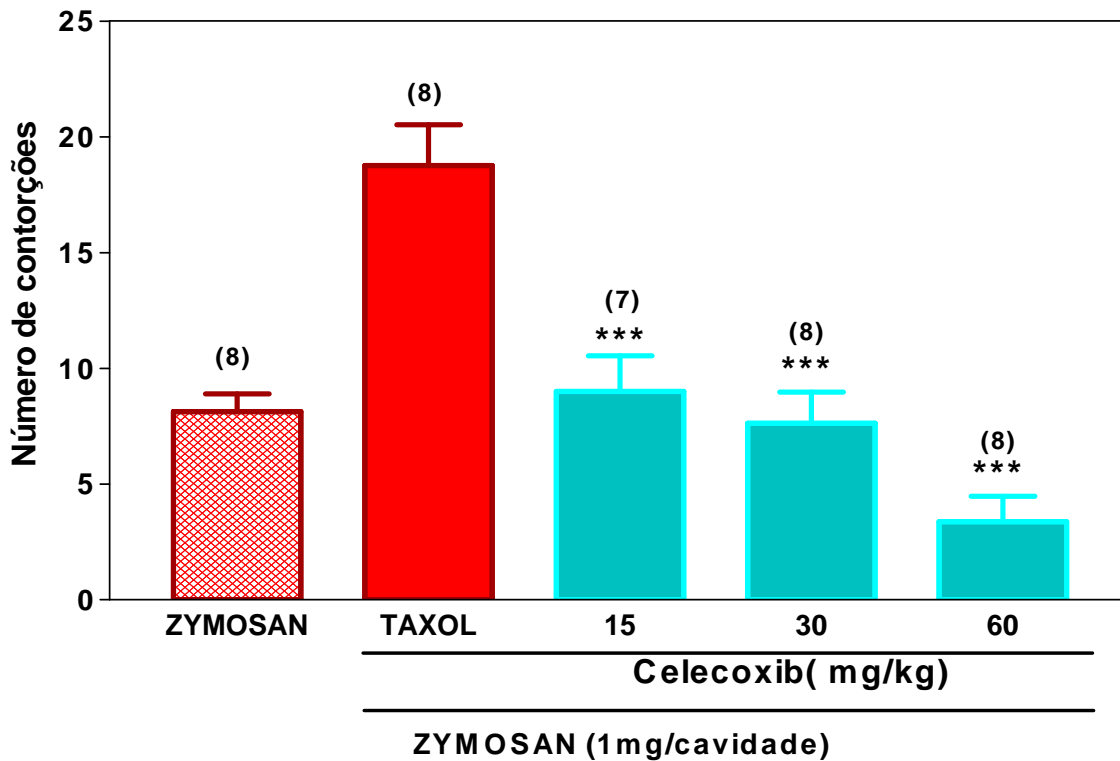


FIGURA 7. Efeito dose-resposta do celecoxib (CEL) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com Taxol® intraperitoneal. Celecoxib nas doses de 15, 30 e 60mg/kg, administradas via subcutânea 1 hora antes do PCX (Taxol®) na dose de 8mg/kg ip, e três horas antes do estímulo nociceptivo (zymosan 1mg/cavidade ip) em camundongos Swiss. As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas após 30 min da injeção do estímulo quando comparados com grupo controle. Os números acima das barras indicam o número de animais ensaiados de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, Bonferroni- ANOVA).

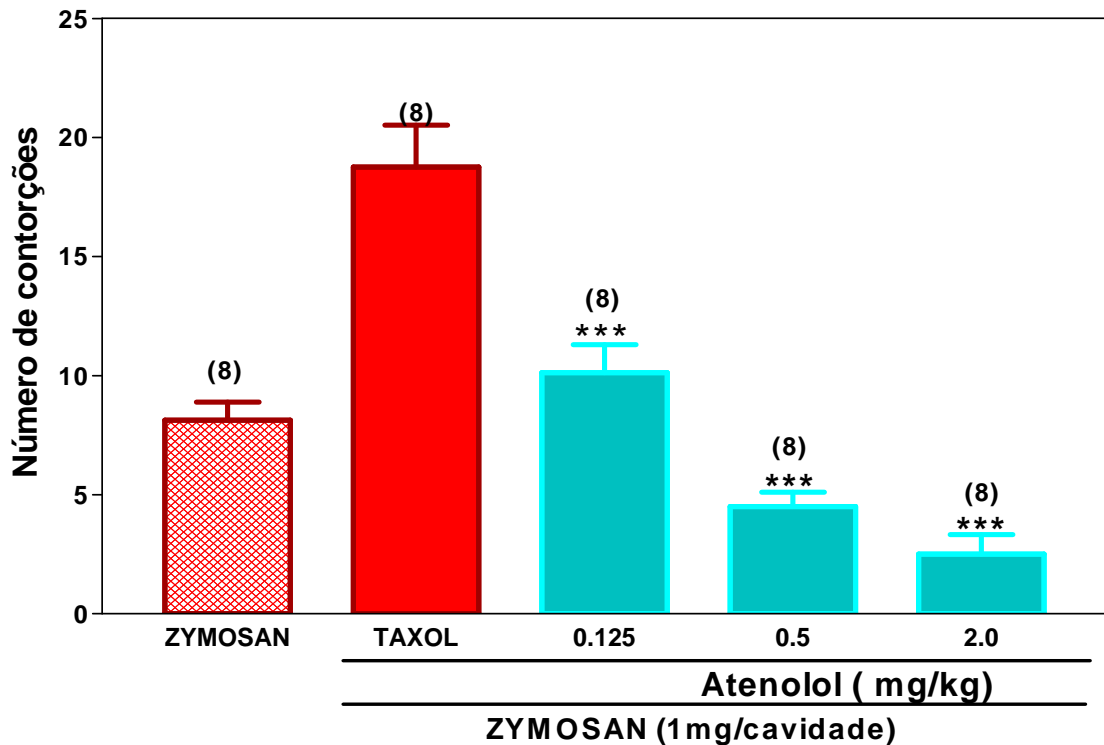


FIGURA 8. Efeito dose-resposta do atenolol (ATL) sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan em camundongos tratados com Taxol® intraperitoneal. Atenolol nas doses de 0.125, 0.5 e 2mg/kg, administradas via subcutânea 1 hora antes do PCX (Taxol®) na dose de 8mg/kg ip, e três horas antes do estímulo nociceptivo (zymosan 1mg/cavidade ip) em camundongos Swiss. As barras representam as médias \pm EPM do número total de contorções ocorridas após 30 min da injeção do estímulo quando comparados com grupo controle. Os números acima das barras indicam o número de animais ensaiados de cada grupo. Os asteriscos indicam a diferença estatística em relação ao grupo controle. (***) $p < 0.001$, Bonferroni-ANOVA).

9. EFEITO DO PCX (TAXOL®) SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZYMOSAN EM JOELHO DE RATOS.

A injeção intraperitoneal de PCX (Taxol®) na dose de 4mg/kg ($p < 0.001$) e 8mg/kg ($p < 0.05$), uma hora após o estímulo nociceptivo (ZY, 250 μ g i.art) em ratos no modelo de incapacitação articular,

aumentou de forma significativa a incapacitação articular medida entre a 3ª e 4ª hora de artrite, com o Tempo de Suspensão de Pata (TSP) de 49.7 segundos para dose de 4mg/kg e 39.3 segundos para dose de 8mg/kg, em comparação ao controle (Cr EL), cujo TSP foi de 19.8 segundos. Figura 11- painéis A e B.

10. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO (SC) COM INIBIDORES DE CITOCINAS SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS TRATADOS DOS COM PCX (TAXOL®) INTRAPERITONEAL.

As injeções subcutânea de dexametasona (2mg/kg), talidomida (45mg/kg) e da pentoxifilina (45mg/kg) uma hora antes do PCX (Taxol®) na dose de 4mg/kg administrado intraperitoneal em ratos no modelo de incapacitação articular, inibiram de modo significativo ($p < 0.001$) a incapacitação articular medida entre a 3ª e 4ª hora de artrite, com o TSP de 19.8 segundos para DEXA; 17.3 segundos para TLD; 19.6 segundos para PTX em comparação ao controle, cujo TSP foi de 46.8 segundos. Figura 9- painéis A e B.

A

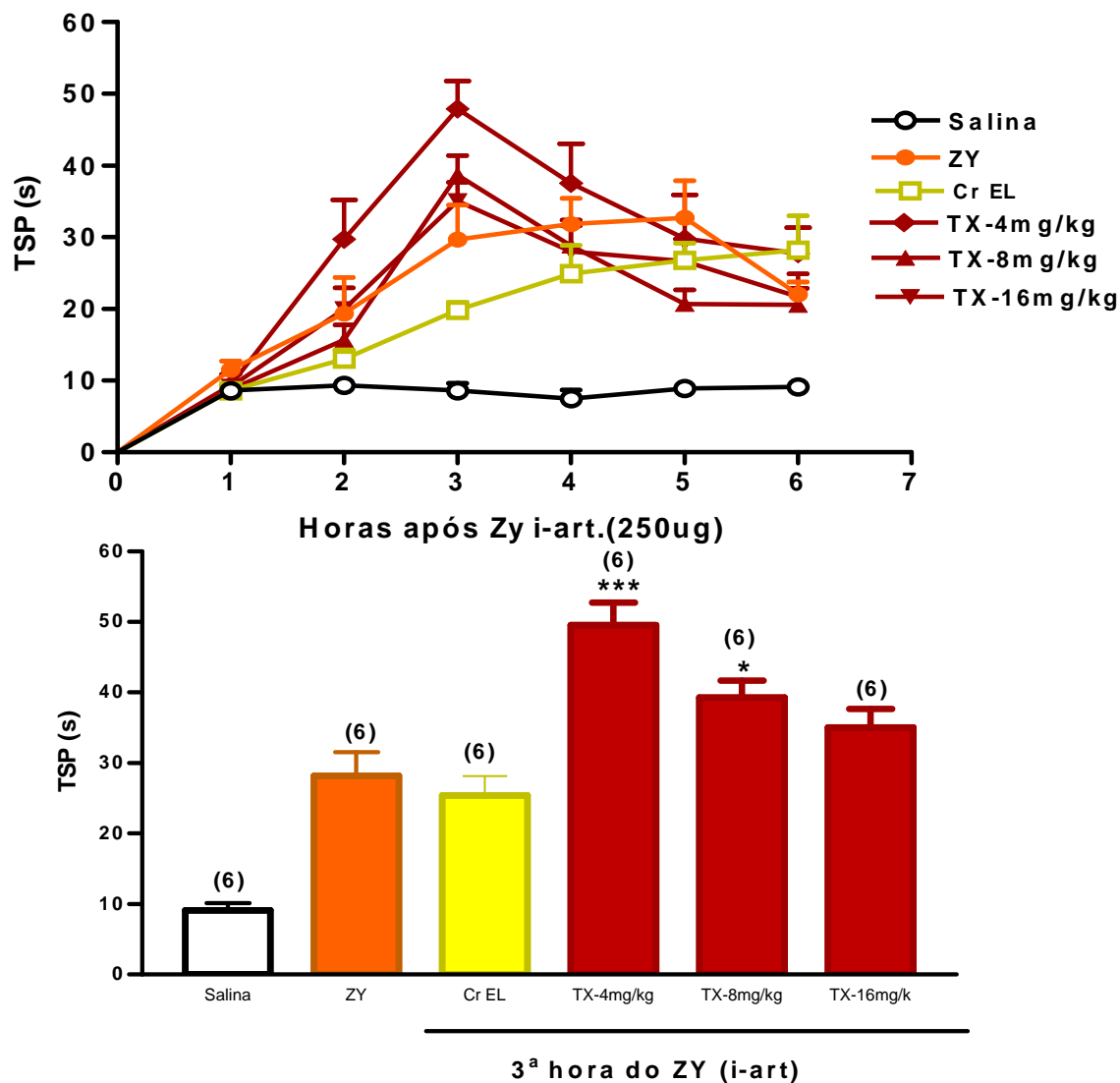
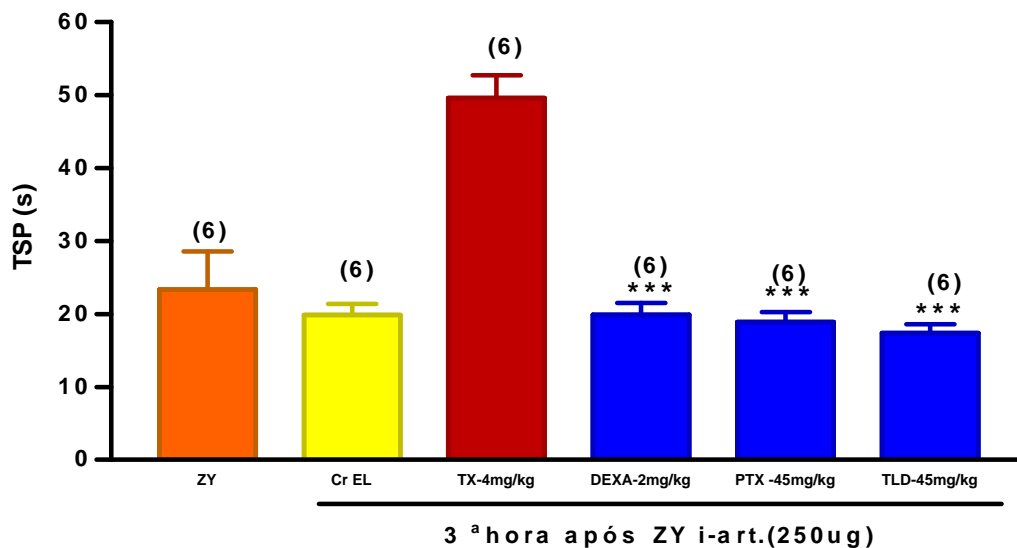
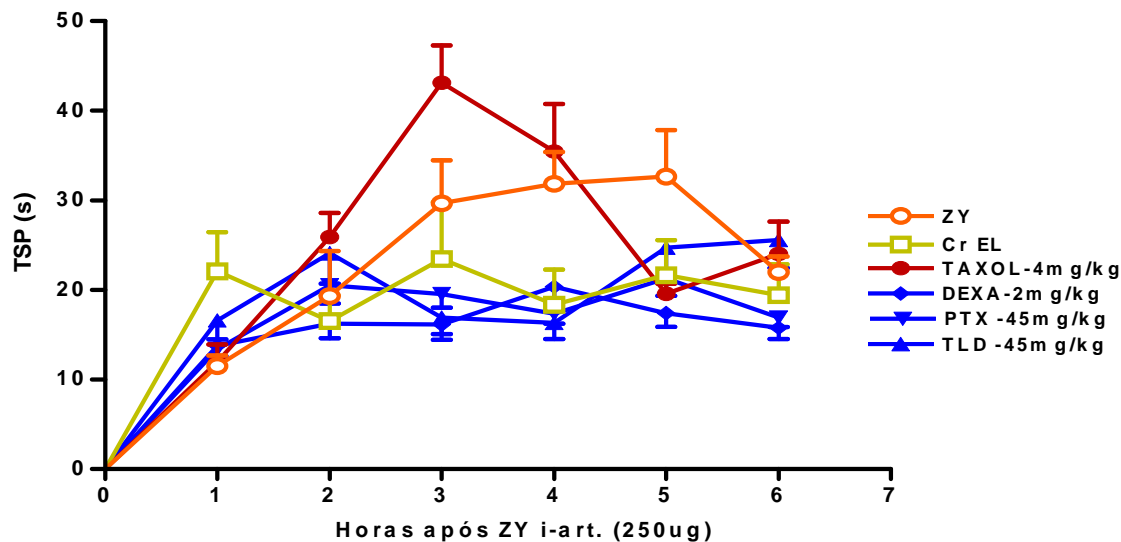


FIGURA 9. Efeito do PCX (Taxol®) sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em joelho de ratos. Zymosan (250µg/animal) foi administrado por via intrarticular em joelhos de ratos. PCX (Taxol®) nas doses de 4, 8 e 16mg/kg e o Cremophor EL(v/v), foi administrado por via intraperitoneal, uma hora depois. O tempo de suspensão da pata foi medido durante 60 segundos, de hora em hora até a 6^ah após a injeção do estímulo. **Painel A:** Os pontos representam as médias ± EPM do Δ tempo de suspensão de pata. **Painel B:** As barras representam as média ± EPM do Δ tempo de suspensão de pata na 3^a hora de incapacitação. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo controle. (* p < 0.05, *** p < 0.001; one-way ANOVA).

A



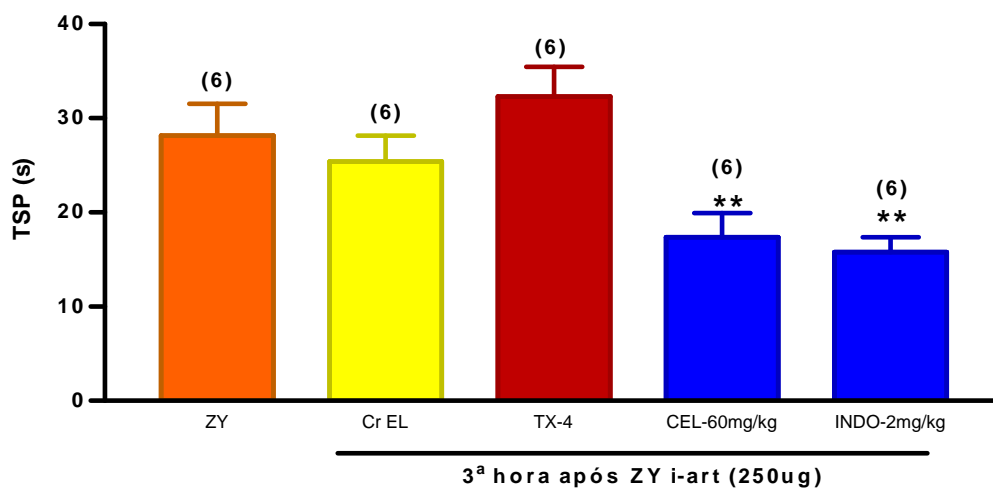
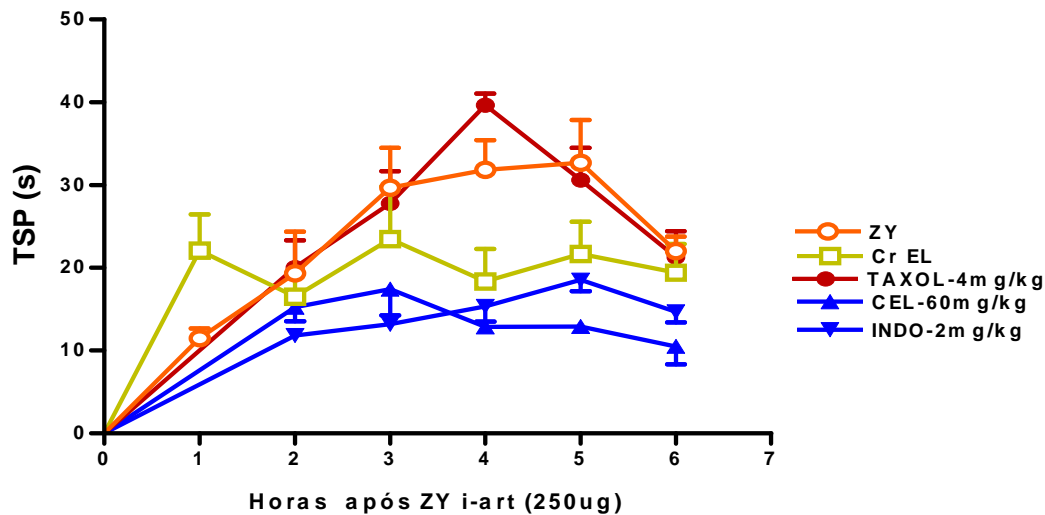
B

FIGURA 10. Efeito do pré-tratamento (Sc) com inibidores de citocinas sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos tratados dos com PCX (Taxol®) intraperitoneal. Zymosan (250µg/animal) foi administrado por via intrarticular em joelhos de ratos, ao mesmo tempo em que eram pre-tratados com salina, DEXA (2mg/kg), TLD (45mg/kg) e PTX (45mg/kg) por via subcutânea (1ml/animal). PCX (Taxol®) na dose de 4mg/kg foi injetado ip, uma hora depois. O tempo de suspensão da pata (TSP) foi medido durante 60 segundos, de hora em hora até a 6ªh após a injeção do estímulo. **Painel A:** Os pontos representam as médias ± EPM do Δ TSP. **Painel B:** As barras representam as média ± EPM do Δ TSP na 3ª hora de incapacitação. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo que não foi pre-tratados. (***) $p < 0.001$; Bonferroni- ANOVA).

11. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO (SC) COM INIBIDORES DE COX-1 E COX-2 SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR NA ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS TRATADOS DOS COM PCX (TAXOL®) INTRAPERITONEAL.

As injeções subcutânea de indometacina na dose de 2mg/kg ($p < 0.001$) e celecoxib na dose de 60mg/kg ($p < 0.01$), uma hora antes do PCX (Taxol[®]) na dose de 4mg/kg administrado intraperitoneal em ratos no modelo de incapacitação articular, inibiram de modo significativo a incapacitação articular medida entre a 3^a e 4^a hora de artrite, com o TSP de 14.9 segundos para INDO e 17.3 segundos para CEL em comparação ao controle (PCX), cujo TSP foi de 33.0 segundos. Figura 11 – painéis A e B.

A



B

FIGURA 11. Efeito do pré-tratamento (Sc) com inibidores de COX-1 e COX-2 sobre a incapacitação articular na artrite experimental induzida por zymosan em ratos tratados dos com PCX (taxol[®]) intraperitoneal. Zymosan (250µg/animal) foi administrado por via intrarticular em joelhos de ratos, ao mesmo tempo em que eram pre-tratados com salina, CEL (60mg/kg) e INDO (2mg/kg) por via subcutânea (1ml/animal). PCX (Taxol[®]) na dose de 4mg/kg foi injetado ip, uma hora depois. O tempo de suspensão da pata (TSP) foi medido durante 60 segundos, de hora em hora até a 6^ah após a injeção do estímulo. **Painel A:** Os pontos representam as médias ± EPM do Δ TSP. **Painel B:** As barras representam as média ± EPM do Δ TSP na 3^a hora de incapacitação. O asterisco indica a diferença estatística em relação ao grupo que não foi pre-tratados. (** p< 0.01, ***p< 0.001; one-way ANOVA).

IV DISCUSSÃO

Grandes avanços na abordagem terapêutica de uma variedade de neoplasias malignas ocorreram nestas últimas décadas com o surgimento de uma série de novas abordagens como manipulações genéticas e imunológicas, inibição de angiogênese, além de uma variedade de novas associações de drogas, resultando em significativas respostas terapêuticas e aumento da sobrevida dos pacientes em tratamento quimioterápico.

Infelizmente, concomitante ao aumento nas respostas terapêuticas, tem havido também um aumento de efeitos adversos e de toxicidade, alguns limitantes, causado pela ausência de seletividade dessas drogas para célula tumoral.

Embora as complicações decorrentes da administração desses agentes estejam mais ligadas aos tecidos cuja proliferação é rápida, como é o caso da medula óssea (mielossupressão), outros tecidos ou órgãos podem ser afetados. Assim é a neurotoxicidade induzida pelo antineoplásico paclitaxel (Taxol[®]), um antimicrotúbulo da classe dos taxanes utilizado em grande escala no tratamento do câncer de mama, câncer de pulmão e tumores metastático de ovário (ROWINSKY, 1993; ROWINSKY & DONEWOHER, 1995).

Contrariamente a outras drogas antimicrotúbulos, tais como os alcalóides da vinca, que induzem a despolimerização dos microtúbulos, o paclitaxel promove a polimerização da tubulina (PARNES & HORWITZ, 1981; KUMAR, 1981; WILSON et al., 1985; HAMEL, 1981; JORDAN, 1993).

O paclitaxel (Taxol[®]) clinicamente induz a mielossupressão e a uma neuropatia periférica sensorial dose-limitante e cumulativa que há mais de uma década vem sendo estudada e documentada por vários autores (KAPLAN et al., 1993; ROWINSKY et al., 1993B; CHAUDHRY et al., 1994; HILKENS AND VAN DEN BENT et al., 1997; POLOMANO C R et al., 1998; PACE et al., HELSING et al., 1999; AUTHIER N et al., 2000).

Menos freqüentemente os pacientes tratados com o paclitaxel (Taxol[®]) apresentam sintomas inflamatórios como mialgias e artralguas que consistem em dor nas grandes articulações de braços e pernas. Os sintomas aparecem 48 a 72 horas depois da administração do paclitaxel (Taxol[®]) e se resolvem em alguns dias, geralmente associados a dor neuropática. A incidência e a severidade são caracteristicamente dose-dependente, sendo mais frequente em esquemas terapêuticos com altas doses (SCHILLER, 1994., OZOLS, 1994., SAVARESE., 1998., DOUILLARD, 2001).

Na introdução deste trabalho foi registrada uma relevante revisão bibliográfica dos efeitos secundários mais freqüentes registrado nas histórias clínicas dos pacientes com câncer de ovário e pulmão metastático, em uso de paclitaxel (Taxol[®]) na dose de 200-250mg/m² em infusão contínua por 3 horas, associado ou não a outros antineoplásicos. Foi identificado nesta revisão uma incidência de dor neuropática (alodínia) em torno de 37.7% a 47.2% associada em 10.9% a 56.6% dos casos, a artralguas e mialgias(OZOLS R F., 1994; DOUILLARD J Y., 2001).

Apesar de sua prevalência, o mecanismo envolvido na gênese das artralguas e mialgias induzida por antineoplásicos não está definido e não existe nada descrito na literatura até o momento correlacionando o papel das citocinas pró-inflamatórias, com a gênese da hiperalgesia inflamatória associada aos pacientes em tratamento com o paclitaxel (Taxol[®]), mesmo tendo registros de que a droga induz “*in vitro*” a expressão do gene de TNF- α (BOGDAN C., DING A, 1992).

Rotineiramente, nas etapas iniciais da pesquisa experimental procura-se caracterizar o fenômeno que se quer evidenciar, com o objetivo de se reproduzir resultados achados na literatura pesquisada.

Particularmente neste estudo com o paclitaxel (Taxol[®]), essa reprodução experimental com conseqüente análise e comparação de resultados, foi realizada inicialmente de forma empírica e pioneira, associando o uso de modelos clássicos de dor inflamatória com doses de paclitaxel (Taxol[®]) comuns em modelos de avaliação de dor neuropática, já que nenhuma descrição da gênese dos eventos inflamatórios não foi encontrada na literatura, apesar do uso muito difundido do paclitaxel (Taxol[®]), como droga efetiva na terapia contra o câncer metastático.

Na presente investigação farmacológica, foi demonstrado que o paclitaxel (Taxol[®]); primeiro antineoplásico efetivo no tratamento de cânceres refratários a quimioterapia convencional; potencia agudamente a hiperalgesia inflamatória induzida pelo zymosan em dois modelos experimentais de dor inflamatória.

O efeito potencializador na hiperalgesia inflamatória induzida por zymosan (1mg/animal) associada ao paclitaxel (Taxol[®]), foi demonstrado com administração intraperitoneal de 8mg/kg da droga no teste de contorção abdominal e nas doses de 4 e 8mg/kg intra-articular no teste de incapacitação articular.

Inicialmente neste trabalho procurou-se caracterizar o efeito potencializador do paclitaxel (Taxol[®]) em modelos experimentais de dor inflamatória, tradicionalmente utilizados no nosso laboratório, são eles: modelo de contorções abdominais em camundongos e modelo de incapacitação articular em ratos.

Considerando-se a falta de citações na literatura que auxiliariam no delineamento experimental; através do estabelecimento da melhor dose de paclitaxel (Taxol[®]) e tempo ideal para a observação do suposto fenômeno;

dificuldades experimentais surgiram prolongando bastante essa etapa da investigação.

Secundariamente procurou-se avaliar o envolvimento de mediadores hiperalgésicos como as prostaglandinas, aminas simpatomiméticas e citocinas hiperalgésicas principalmente TNF- α , através de modulação farmacológica com drogas como indometacina, celecoxib, atenolol, dexametasona, talidomida e pentoxifilina. Dessa forma pôde-se observar, o que se segue nos parágrafos abaixo.

A demonstração do papel central desempenhado pelos macrófagos na deflagração da nocicepção induzida por zymosan e ácido acético, foi demonstrado no modelo de contorções abdominais, provavelmente via liberação de citocinas como IL-1, IL-8 e TNF- α , que ativariam os dois componentes da dor inflamatória, prostaglandínico e simpático (THOMAZZI,1996; RIBEIRO *et al.* ,2000).

Anteriormente outros autores, já tinham demonstrado experimentalmente o envolvimento crucial do TNF- α na hiperalgesia inflamatória (CUNHA *et al.* 1992), e em várias outras condições patológicas, levando-se a acreditar que seu gene tenha sido preservado nos mamíferos durante o seu processo evolutivo, dada a sua importância (TRACEY.,1989.,1992).

Com intuito de demonstrar experimentalmente o efeito amplificador do paclitaxel (Taxol[®]) na resposta nociceptiva induzida pelo zymosan, escolhemos inicialmente o modelo de contorções abdominais, com objetivo de evidenciar se essa atividade pudesse ocorrer por liberação de TNF- α por células residentes. Anteriormente já tinha sido demonstrado por vários autores, que a droga apresenta efeitos semelhantes ao LPS, no que diz respeito à ativação de macrófagos (DING A H *et al.*,1992).

Alguns autores através do método de Northern blot, comprovaram que o paclitaxel (Taxol[®]) na dose de 10 a 1 μ M era capaz de induzir a expressão do RNAm de TNF- α , semelhante ao LPS, e que essa expressão era detectada com 45 min da estimulação, atingindo o pico com 90 min, ficando evidente até 8 horas após a estimulação. (BOGDAN C., DING.,1992).

Logo nos primeiros experimentos com o teste de contorções abdominais, registrou-se uma grande variabilidade tanto quantitativa como qualitativa nas contorções dos animais testados, especificamente quando utilizávamos o ácido acético 0.3% intraperitoneal como estímulo nociceptivo, fez com que optássemos pelo zymosan (1mg/cavidade) na nossa investigação, já que os resultados obtidos foram mais regulares e o fenômeno de amplificação poderia ser mais bem avaliado no modelo escolhido.

Partindo-se de doses e tempo de avaliação, padronizados em modelos de dor neuropática pelo paclitaxel (Taxol[®]) já publicados anteriormente, iniciamos a investigação com doses que variaram de 32 a 90mg/kg ip, testadas num período de 24 a 96 horas. Nesta fase tivemos bastante perda de animais e poucos resultados, que não nos permitiam nenhuma inferência, principalmente nos experimentos de avaliação crônica, onde utilizávamos doses altas em esquema de dose única ou múltipla.

Trabalhos anteriores de avaliação de neuropatia periférica associada ao paclitaxel (Taxol[®]) utilizando ratos demonstraram que aproximadamente 8mg/kg intraperitoneal de paclitaxel (Taxol[®]) seria a dose limite para toxicidade sistêmica nesses animais (CAVALETT et al., 1995).

Portanto, os resultados por nós obtidos inicialmente, não nos permitiram avaliar a hipernocicepção inflamatória, provavelmente devido às elevadas doses padronizada nos experimentos. Porém foram concordantes com as publicações que enfatizavam a toxicidade sistêmica e particularmente a neurotoxicidade, já que houve perdas de animais decorrente dessa citotoxicidade e a caracterização de um comportamento de hipoatividade do animal alternando com um comportamento que definimos de “pseudo contorções”.

Trabalhos mais recentes com modelos de dor neuropática registraram uma correlação de alterações nos testes de avaliação comportamental dos animais com alterações histológicas relevantes. Nos ratos tratados com paclitaxel (Taxol[®]) em esquema de dose única de 32mg/kg, ip a ocorrência de alodínia (86%) e hipoalgesia térmica (80%) foi relacionada com degeneração axonal nos nervos do tecido celular subcutâneo, nervo ciático e segmento lombar da medula, chegando à degeneração axonal, mielínica e das

células de Schwann em todos os segmentos, nos ratos que foram tratados com uma injeção de paclitaxel (Taxol[®]) na dose de 16mg/kg, ip por uma semana durante cinco semanas. Essas alterações foram significativas a partir do terceiro dia de tratamento (AUTHIER N et al.,2000).

Após um período de familiarização com o modelo, a dose de melhor amplificação da resposta nociceptiva e o tempo ideal para avaliação foram estabelecidos. Para isto, foi realizada uma curva dose resposta. As doses eleitas foram 4, 8, 16 e 32mg/kg administradas intraperitonealmente, e o curso temporal foram definidos segundo a cinética de expressão do RNAm do TNF- α , já demonstrado anteriormente pelo método de Northern blot (BOGDAN C., DING.,1992).

No presente estudo, foi demonstrado que paclitaxel (Taxol[®]) na dose de 8mg/kg ip, quando administradas duas horas antes do estímulo nociceptivo (zymosan 1mg/cavidade, ip), possui efeito potencializador da hipernocicepção inflamatória nesse modelo experimental, pois foi capaz de aumentar de maneira significativa ($p < 0.001$) o número de contorções abdominais induzidas pelo zymosan em 183%, comparando com o controle (Cr EL).

Essa hipernocicepção foi bloqueada de forma dose-dependente de maneira significativa por inibidores de COX-1 (indometacina), inibidores de COX-2 (celecoxib), β -bloqueador (atenolol), inibidores de TNF- α (talidomida e

pentoxifilina) assim como dexametasona, quando administrados por via subcutânea, 1 hora antes do paclitaxel (Taxol[®]).

Os resultados aqui apresentados sugerem que a presença de derivados da cicloxigenase e de mediadores do sistema simpático parece ser essencial para deflagrar a atividade nociceptiva (ZY), que foi amplificada pelo paclitaxel (Taxol[®]), pois a indometacina e o atenolol, mesmo nas menores doses conseguiram bloquear de forma significativa ($p < 0.001$) a hipernocicepção do paclitaxel (Taxol[®]).

De fato, Duarte, Nakamura & Ferreira já haviam descrito, em 1988 a participação do sistema simpático em adição à ativação do componente prostaglandínico no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

O efeito inibitório significativo ($p < 0.001$) da dexametasona pode ser explicado pela sua habilidade em bloquear a liberação de prostaglandinas via inibição da fosfolipase A2, assim como a inibição da expressão de COX-2, ou ainda via inibição da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-8 e TNF- α (BARNES & ADCOCK.,1993).

Igualmente, talidomida e pentoxifilina bloquearam significativamente ($p < 0.001$) a hipernocicepção potencializada pelo paclitaxel (Taxol[®]).

A talidomida inibir a produção de TNF- α , aumentando a degradação do seu RNAm sem, no entanto, alterar a produção de outras citocinas (MOREIRA.,1993).

Posteriormente, esse efeito analgésico da talidomida foi ratificado pelo nosso laboratório. Em adição foi ainda demonstrado que esse efeito analgésico era devido à inibição do RNAm de TNF- α dos macrófagos peritoneais, estimulados por zymosan (RIBEIRO et al., 2000).

Já a pentoxifilina é uma metilxantina inicialmente descrita como agente hemorreólico, que pode inibir a fosfodiesterase 4 (PDE4). Sabe-se que os inibidores de PDE4 são potentes inibidores da liberação de TNF- α . Portanto a

pentoxifilina é capaz de inibir a expressão do TNF- α através da inibição da transcrição de seu gene (SCHMIDT-CHOUDHURY et al.,1996).

A utilização da pentoxifilina, nas doses de 5, 15 e 45 mg/kg, administrada via subcutânea, reduziu de forma significativa, assim como a talidomida, a hiperalgesia inflamatória nos dois modelos avaliados de dor. Alguns dados da literatura dão suporte a esse efeito antiinflamatório: já foi mostrado, por exemplo, que a pentoxifilina é capaz de reduzir a produção de TNF- α em cultura de monócitos via inibição da transcrição de seu gene (THOMPSON, P., HAN, J., BEUTLER B,1990).

Além disso, a pentoxifilina (10^3 M) inibe a produção de citocinas como IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10 em culturas de monócitos estimulados por LPS (D'HELLENCOURT C L et al.,1996)

Mais recentemente dados do nosso laboratório mostraram que o zymosan também era capaz de induzir de maneira significativa e dose-dependente, uma periartrite responsável pelo fenômeno de incapacitação articular, com efeito, máximo entre a 3^a e 4^a hora após a injeção intra-articular do zymosan (1mg/animal). Em adição, registrou-se que esse efeito máximo estava relacionado principalmente com a sensibilização dos nociceptores do tecido periarticular, não dependendo assim, da liberação de mediadores por células recrutadas (neutrófilos), que somente atingem seu pico na 6^a hora (ROCHA et al.,1999; VIANA et al.,1998).

Mediante essas observações, procuramos nesta segunda etapa, reforçar a idéia de que paclitaxel (Taxol[®]) realmente era capaz de potencializar hipernocicepção no modelo de

incapacitação articular , descrito inicialmente por TONUSSI e FERREIRA em 1992. Com objetivo de demonstrar claramente o efeito potencializador do paclitaxel (Taxol[®]) na resposta nociceptiva inflamatória induzida por zymosan; já demonstrada no modelo de contorções abdominais; definiu-se uma dose bem menor de zymosan (250µg/animal).

O modelo de artrite induzida por zymosan tem a vantagem de utilizar ratos, o que torna o modelo de fácil reprodução e de baixo custo. Adicionalmente é considerado um teste de dor inflamatória mais objetivo, que permite avaliar através de análise do lavado articular, os mediadores inflamatórios e algogênicos envolvidos no fenômeno, tornando-se assim um excelente modelo disponível para testar drogas analgésicas periféricas.

Ficou demonstrado, na presente investigação, que paclitaxel (Taxol[®]) nas doses de 4 (p< 0.001) e 8mg/kg ip (p< 0.001) , quando administrado 2 horas antes do pico de incapacitação articular, potencializava a hipernocicepção inflamatória, também neste modelo, pois foi capaz de aumentar de maneira significativa a incapacitação articular em ratos induzidas pelo (zymosan 250µg/animal, i.art), quando comparados com o controle (Cr EL).

Da mesma forma esse efeito amplificador da hipernocicepção foi bloqueado significativamente (p< 0.001) por inibidores da cicloxigenase (indometacina - celecoxib), inibidores de TNF- α (talidomida - pentoxifilina) e dexametasona, quando administrados por via subcutânea uma hora antes do paclitaxel (Taxol[®]), na dose correspondente ao seu efeito máximo, obtido no modelo de contorções abdominais.

É interessante ressaltar a elevada sensibilidade do modelo de incapacitação, pois a dose de zymosan usada é corresponde a ¼ da padronizada neste modelo, sendo administrado localmente em articulações intactas, enquanto o paclitaxel (Taxol[®]) ip foi administrado por via sistêmica, gerando uma hipernocicepção significativa no pico da incapacitação mesmo com a metade da dose que o fenômeno foi demonstrado no modelo de contorção abdominal, onde tanto o zymosan como o paclitaxel (Taxol[®]) foram administrados por via sistêmica (ip) .

Outro dado a ser destacado é a intensidade com que a hipernocicepção é demonstrada nos dois modelos, independente do momento da estimulação nociceptiva. O zymosan no

modelo de contorção abdominal foi injetado por via sistêmica 2 horas após a administração do paclitaxel (Taxol[®]), já no modelo de incapacitação a administração não foi sistêmica e 1 hora antes do paclitaxel (Taxol[®]). O que nos reporta a contabilizar, mais uma evidência do envolvimento do TNF- α na hipernocicepção associado ao paclitaxel (Taxol[®]), já que no delineamento experimental a administração da droga ocorreu prioritariamente, 30 minutos após o pico de expressão do RNAm de TNF- α , segundo CHRISTIAN BOGDAN e AIHAO DING (1992), independente da hora de estimulação.

No que diz respeito aos nossos resultados podemos apenas afirmar que através de dois modelos experimentais clássicos de dor inflamatória, se conseguiu demonstrar o efeito potencializador do paclitaxel (taxol[®]) na hipernocicepção inflamatória quando administrado na dose de 8mg/kg, ip 2 horas antes do estímulo nociceptivo (zymosan 1mg/cav, ip) no modelo de contorções abdominais; e nas doses de 4 e 8mg/kg quando administrados ip 1 hora depois do estímulo nociceptivo (zymosan 250 μ g/ i. art), coincidindo assim, com as 2 horas que antecedem o pico da incapacitação no modelo de incapacitação articular.

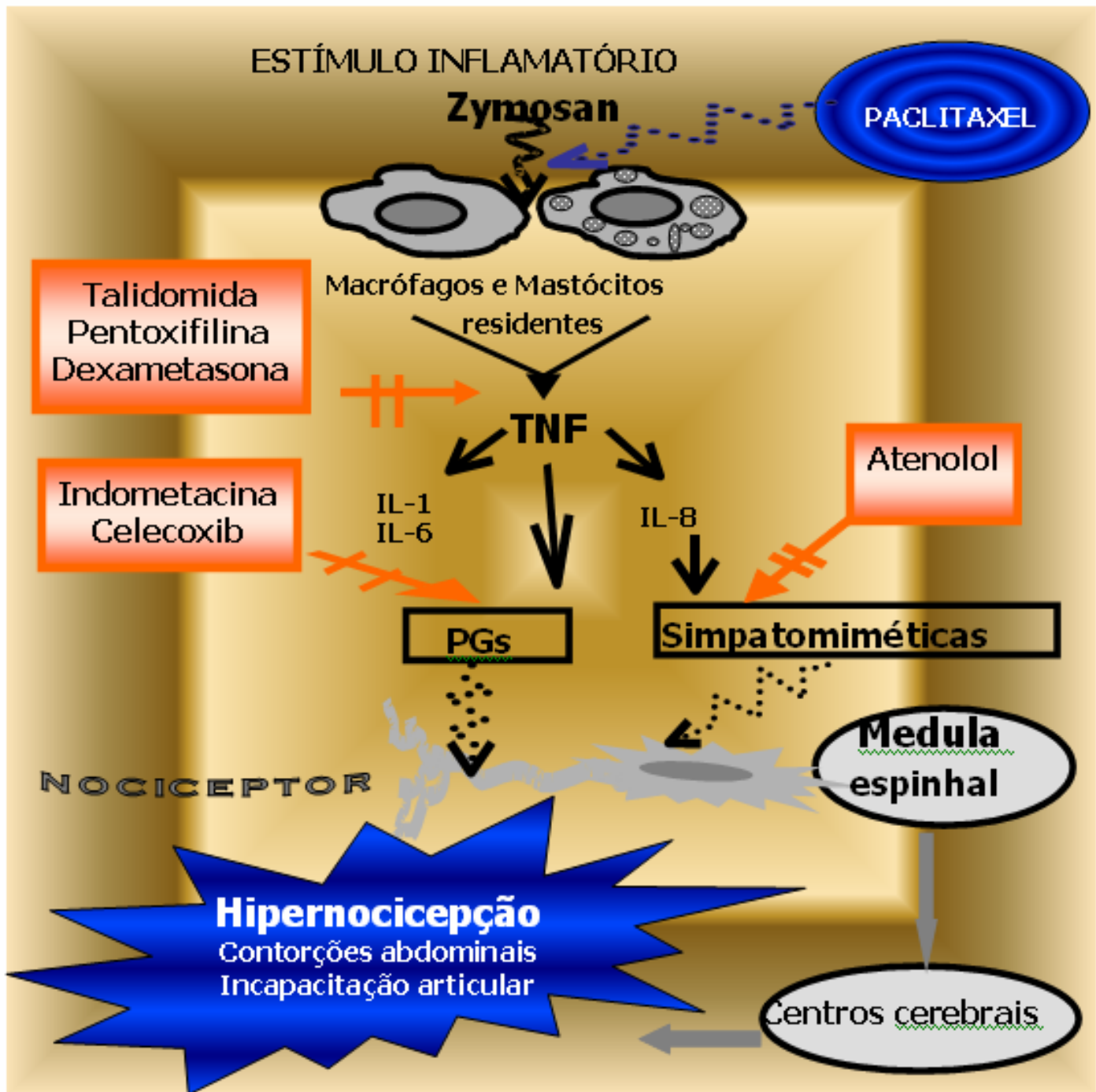
Alem disto através de modulação farmacológica com inibidores de citocinas, inibidores de prostanóides e bloqueadores simpáticos envolvidos na gênese da hiperalgisia inflamatória, demonstrou-se à inibição dose dependente de forma significativa do efeito de potencialização sobre a hipernocicepção inflamatória induzida pelo zymosan nestes dois modelos de dor inflamatória.

É possível, portanto com esses resultados, associar esse efeito do paclitaxel (Taxol[®]) a liberação de citocinas hiperalgésicas (TNF- α) por células residentes, desencadeando a partir daí os dois componentes da cascata da hiperalgisia inflamatória.

Por fim, em estudos experimentais como este, nem sempre o pensamento fundamentado em evidências clínicas associadas ao desenvolvimento de um pensamento lógico, correspondem a expectativa de pesquisadores, dos médicos que tratam a dor e dos pacientes que vivenciam essa sensação desagradável.

Particularmente, esperamos que essa investigação inicial tenha seguimento para que, futuramente contribua com este importante capítulo da arte do exercício da medicina, que é o tratamento da dor.

Na ilustração 5, encontra-se uma esquematização simplificada do suposto envolvimento de células residentes, citocinas hiperalgésicas e prostanóides na hiperalgesia inflamatória experimental induzida por zymosan e potencializada pelo antineoplásico paclitaxel (Taxol[®]), demonstrada no presente trabalho nos modelos de contorção abdominal e incapacitação articular.



ILUTRAÇÃO 5 . Esquema simplificado hipotético do envolvimento de células residentes, citocinas hiperalgésicas, prostanóides e mediadores simpáticos na hiperalgesia inflamatória experimental induzida por zymosan e potencializada pelo antineoplásico paclitaxel (Taxol®).

V CONCLUSÕES

1. O tratamento de animais com paclitaxel (Taxol[®]) foi capaz de potencializar significativamente a hipernocicepção inflamatória induzida pelo Zymosan tanto no modelo de contorções abdominais em camundongos, assim como no modelo de incapacitação articular em ratos.

2. Tal efeito potencializador do paclitaxel (Taxol[®]) foi inibido de forma significativa e dose-dependente pelo pré-tratamento dos animais com indometacina, celecoxib e atenolol, sugerindo o envolvimento de prostaglandinas via ativação de COX-1 e COX-2, e de mediadores do sistema simpático.

3. O efeito foi ainda inibido de forma significativa e dose-dependente pelo pré-tratamento dos animais com dexametasona, talidomida e pentoxifilina, o que sugere a participação de citocinas hiperalgésicas, provavelmente o TNF- α na gênese deste particular efeito hipernociceptivo do paclitaxel (Taxol[®]).

VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, BB., MOFFAT, B. & HARKINS, RN. Human lymphotoxin production by a lymphoblastoid cell line- purification and initial characterization. **J Biol Chem**, 260(4): 686-691,1984.
- AGOTINI, C., ZAMBELO, R., TRENTIN, L., CERUTTI, A., ENTHAMMER, C., FACCO, M., MILANI, A., SANCETTA, R., GARBISA, S., SEMENZATO, G., Expression of TNF receptors by T cells and Membrane TNF α by Alveolar Macrophages Suggests a Role for TNF α in the Regulation fo the local Immune Responses in the Lung of HIV-1-Infected Patients. **Journal of Immunol**, 2928-38, 1995.
- AJUEBOR, MN., VIRAG, L., FLOWER, RJ., PERRETI, M., SZABO, C. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. **Immunol**, 95:625-630,1998.
- ALLEN, JN., SHERRI, AM., MARK, DW. Taxol enhances but does not induce interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α production. **J Lab Clin Med**, 122(4): 374-381,1992.
- AUTHIER, N., GILLET, JP., FILALIP, J., ESCHALIER, A., COUDORE, F. Description of a short-term taxol-induced nociceptine neuropathy in rats. **Brain Res**, 887:236-249,2000.
- BAKLE, Y.S., BOTTING, R.M, Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. **Mediat Inflamm**, 5: 305, 1996.
- BEUTLER, B. & CERAMI, A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. **Nature**, 320:584,1986.

- BEUTLER, B. & CERAMI, A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. **Ann Rev Biochem**,57:505,1988
- BORDAN, C., DING, A. Taxol: a microtubule stabilizing antineoplastic agent, induces expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in macrophages. **J Leukocyte Biol**, 52:119-121,1992.
- BOUGHTON-SMITH, NK e GHERLANI, A. Role of induced nitric oxide synthase and increased NO levels in zymosan peritonitis in the rats. **Inflammation Res (Supplement)**,2: 149-150,1995.
- BURBHART, CA., BERMAN, JW., SWINDELL, CS., ORWITZ SB. Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor- α gene expression and cytotoxicity. **Cancer Res**,54:5779-5782,1994.
- MEYER & CAMPBELL, JN. **Peripheral neural mechanisms of nociception**. In: WALL, PD., MELZACK, R. eds Textbook of pain 2 ed. Oxford, Churchill Livingstone. 22-45,1989.
- CARSWELL, EA. OLD, LJ., KASSEL, RL., GREEN, S., FIORE, N. & WILLIAMAN, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci USA**, 72(9): 3666, 1975.
- CAVALETTI G., TREDICI G., BRAGA M., TAZZARI S. Experimental peripheral neuropathy induced in adult rats by repeated intraperitoneal administration of taxol. **Exp Neurol**, 133:64-72, 1995.
- CHANDRASEKAKHARAN, NV., DAI, H., K, LAMAR TUREPU ROOS., NATHAN, KE., TOMSIK, J., TERRY, SE AND SIMMONS, DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant

inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Pharmacology PNAS Early Edition**,1-6,2002.

CHAUDHRY, V., ROWINSKY, EK., SARTORIUS, SE., DONEHOWER, RC., CORNBLANTH, DR. Peripheral neuropathy from taxol and cisplatin combination chemotherapy: clinical and electrophysiological studies. **Ann Neurol**, 35:304-311,1994.

CODERRE, T.J., ABBOTT, F.V., MELZACK, R. Effect of peripheral antisympathetic treatments in the tail flick, formalin and autotomy tests. **Pain**, 18: 13, 1984.

COLEY, WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. **Am J Med Sci**, 105:487,1983.

COLLIER, H.O.J., DINNEEN, L.C., CHISTINE, A.JOHNSON, A., SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br J Pharmacol. Chemoter**, 32: 295,1968.

COMERFORD, FR e ETWEBI, AB. Zymosan arthritis: a model of inflammation erosive joint disease. **Ann Rheumatic Dis**, 54(6): 527-528,1995.

CORREA, R.C., CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptor in formaline induced nociceptive response in the mouse. **Br J Pharmacol**, 110: 193, 1993.

CRESTEIL, T., MONSARRAT, B., ALVINERIE, P., TRELUYER, JM., VIEIRA, I., WRIGHT, M. Taxol metabolism by human liver microsims: identification of cytochrome P450 isozymes involved in its biotransformation. **Cancer**, 54: 386-392, 1994.

CORTI, A., FASSINA, G., MARCUCCI, F. ET AL., Oligomeric tumor necrosis factor alpha slowly converts into inactive forms at bioactive levels. **Biochem J**, **284**: 905-910, 1992.

CROSSING, K.L., CARNEY. DH Microtubule stabilization to taxol inhibits initiation of DNA synthesis by thrombin and by epidermal growth factor. **Cell**, **27**:341-350. 1981.

CUNHA, F.Q., LORENZETTI, B.B., POOLE, S., et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br J Pharmacol**, **104**: 765, 1991.

CUNHA, F.Q., POOLE, S., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumor necrosis factor a in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, **107**: 660, 1992a.

DAVIS, K.D., MEYER, R.A., COHEN, R.H., Campbell, J.N. Mechanically-insensitive nociceptors in the primate. **Soc Neurosc Abst**, **15**: 440, 1989.

DAVIS, A.J., PERKINS, M.N. Induction of B1 receptors in vivo in a model of persistent inflammatory mechanical hyperalgesia in the rat. **Neuropharmacol**, **33**: 127, 1994.

D'HELLEN COURT CL., DIAW L., CORNILLET P., GUENOUNOU M. Differential regulation of TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-8, TNF- β and IL-10 by pentoxifyline. **J Immunopharmac** ,**18** (12)739-48, 1996.

DINARELLO, C.A., CANNON, J.G., WOLFF, S.M., BERNHEIM, H.A., BEUTLER, B., CERAMI, A., FIGARI, I.S., PALLADINO, M.A. AND JR OCONNOR, J.V. Tumor

necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **J Exp Med**, 163: 1433, 1986.

DING, AH., SANCHEZ, E., SRIMAL, S. AND NATHAN, CF. Macrophages rapidly internalize their tumor necrosis factor- α receptors in response to bacterial lipopolysaccharide. **J Biol Chem**, 264:3924-3929 , 1989.

DING, AH., PORTEU, F., SANCHEZ, E., AND NATHAN, CF. Shared actions of endotoxin and axol on TNF receptors and TNF release. **Science**, 248:370-372 , 1990.

DING, AH., SANCHEZ, E., TANCINCO, M. AND NATHAN, CF. Interactions of bacterial lipopolysaccharide with microtubule proteins. **J Immunol**, 148:2853-2858 , 1992.

DOHERTY, N.S., POUBELL, 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, 5: 769, 1985

DOHERTY, N.S., BEAVER, T.H., CHAN, K.Y., COUTANT, J.E., WESTRICH, G.L. The role of prostaglandins in the nociceptive response induced by intraperitoneal injection of zymosan in mice. **Br J Pharmacol**, 91: 39, 1987

DOUILLARD, J.Y., LEROUGE, D., MONNIER, A., BENNOUNA, J., HALLER, A.L., SUN, X.S., ASSOULINE, D., GRAU, B., RIVIERE, A. Combined paclitaxel and gemcitabine as first-line treatment in metastatic non-small cell lung cancer: a multicentre phase II study. **Br J Cancer**, 84: 1179-1184, 2001.

- DRAY, A. & PERKINS, MN. Bradykinin and inflammatory pain. Trends **Neurosci**, 16: 99-104,1993.
- DUARTE I.D., NAKAMURA M., FERREIRA, S.H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Braz J Med Biol Res**, 21: 341, 1988.
- DUARTE I.D., DOS SANTOS I.R., LORENZETTI B.B., et al. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur J Pharmacol**, 217(2-3): 225, 1992.
- DUBOST, JJ., SOUBRIER, M., RISTORI, JM., BEAUJUON, G., QUALID, T., BUSSIERRE, JL., SAUVEZIER, B. An open study of the anti-TNF alpha agent pentoxifyline in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rev Rhum Engl Ed**, 64:789-793, 1997.
- DUSTIN, P. Microtubules. **Sci Am**, 243:66-76, 1980.
- ENGELMANN, H., HOLTSMANN, H., BRAKEBUSH, C. et al., Antibodies to a soluble form of the tumor necrosis factor (TNF) receptor have a TNF-like activity. **J Biol Chem**, 265: 14497-14504, 1990.
- ESSNER, R., RHOADES, K., MCBRIDE, W.H., MORTON, D.L. AND ECONOMOU, J.S. IL-4 down-regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. **J Immunol**, 142: 3857, 1989.
- FERREIRA, S H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat New Bio**,. 240(102): 200,1972.

FERREIRA, S H., NAKAMURA, M.I. I- Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins**, 18:179, 1979a.

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

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**, 201: 121, 1991.

FERREIRA S H; LORENZETTI BB; POOLE S Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, 110: 1227, 1993

FERREIRA, S H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs 46 Suppl**, 1: 1, 1993.

FERREIRA, S H., CUNHA, F.Q., HYSLOP, S. Role of inducible forms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammatory pain, **Citokines and pain**, edited by Linda R. Watkins and Steven F. Maier, 1999.

FERREIRA, S H. **Entre a compressão e a confusão: alodínia e hiperalgesia.**
Disponível: Dol-Dor On Line- Editorial, 31(3),
2003.<http://www.dol.inf.br/Html/Editorial.Html>.

FOLEY, K M., ROGER, A., ROUDE, R W. Clinical assessment of cancer pain. **Acta Anestthesiol Scand (Suppl)**, 79:91-96,1982.

- FORSYTH, PA., BALMACEDA, C., PETERSON K., SEIDMAN, AD., BRASHER, P., DEANGELIS, LM. Prospective study paclitaxel-induced peropheral neuropathy with quantitative sensory testing. **J Neurooncol**, 35: 47-53,1997.
- FU, J.Y., MASFERRER, J.L., SEIBERT, K., RAZ, A., NEEDLEMAN P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. **J Biol Chem**, 265: 28, 16737, 1990.
- GEGOUT, P., GILLET, P., TERLAIN, B., NETTER, P. Zymosan-induced arthritis in rats II. Effects of anti-inflammatory drugs. **Life Sciences**, 56(20): 389-394, 1995.
- GREEN, S., DOBRJANSKY, A & CHIASSON, MA. Murine tumor necrosis inducing factor: purification and effects on myelomonocytic leukemia cells. **J Natl Cancer Inst**, 68:997,1982.
- GRIFFITHS, R.J., LI, S.W., WOOD, B.E., BLACKMAN, A. A comparison of the anti-inflammatory activity of selective 5-lipoxygenase inhibitors with dexamethasone and colchicine in a model of zymosan induced inflammation in the rat knee joint and peritoneal cavity. **Agents and actions**, 32: 312, 1991
- GRIGG, P., SCHAIBLE, H.G., SCHMIDT, R.F. Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee. **J Neurophysiol**, 55(4): 635, 1986.
- GORDON, AN., STRINGER, CA., MATTHEWS, CM., WILLIS, DL., NEMUNAITIS, L. Phase I dose escalation of paclitaxel in patients with advanced ovarian cancer receiving cisplatin: rapid development of neurotoxicity is dose-limiting. **J Clin Oncol**, 15: 1965-1973, 1997.

- HAMEL, E., DEL CAMPO AA, LOWE, MC., LIN, C. Interactions of taxol, microtubule-associated proteins, and guanine nucleotides in tubulin polymerization. **J Biol Chem**, 256: 11887-11894, 1981.
- HAN, J ., THOMPSON P., BEUTLER B. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/ TNF synthesis at separate points in the signaling pathway. *J Exp Med* 172:391-4, 1990.
- HARRIS, JW., RAHMAN, A., KIM, BR., GUENGERICH, P., COLLINS, JM. Metabolism of taxol by human hepatic microsomes and liver slices: participation of cytochrome P450 3 A4 and unknown P450 enzyme . **Cancer Research**, 15: 4026-4035, 1994.
- HELING, M., THANING, L., SEDERHOLM, C., LAMBERG, K., MARTINSSON, JF., EK L, MNSOON , T ., ANDERSSON, L., HERO, U., ANJEDANI, D., SVENSSON, G. Treatment with paclitaxel 1-h infusion and carboplatin of patients with advanced non-small-cell lung cancer: phase II multicentre trial. **Lung Cancer**, 24: 107-113, 1999.
- HENDERSON, B & POOLE, S. Modulation of cytokine function: Therapeutic applications. **Adv Pharmacol**, 25: 53-115, 1994.
- HILKENS, PHE., VAN DEN BENT, MJ. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **J Peripher Nerv Syst**, 2: 350-361, 1997.

- HART, P.H., COOPER, R.L. AND FINLAY JONES, J.J. IL-4 suppresses IL-1 beta, TNF-alpha and PGE2 production by human peritoneal macrophages. **Immunolog**, 72: 344, 1991.
- HUMES, J.L., SADOWISKI, M., GALAVAGE, M. et al., Evidence of two sources of arachidonic acid for oxidative metabolism by mouse peritoneal macrophages. **J Biol Chem**, 257:1591, 1982.
- JORDAN, MA., TOSO, RJ., THROWER, D, WILSON L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations **Proc Natl Acad Sci (USA)**, 90: 9552-9556,1993.
- KAPLAN, JG., EINZING, AL., SCHAUMBURG, HH. Taxol causes permanent large fiber peripheral nerve dysfunction: a lesson for preventative strategies. **J Neurooncol**, 16: 105-107, 1993.
- KLEBANOFF, S.J.,VADAS, M. R.,HARLAN, J. M. et al. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. **J Immunol**,139:239.1987.
- KULL, F & CUATRECASAS, P. Necrosin: purification and properties of a cytotoxin derived from a murine macrophage-like cell line. **Proc Natl Acad Sci (USA)**, 81: 7932,1984.
- KUMAR, N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin: mechanism of action. **J Biol Chem**, 256: 10435-10441,1981.

- KUJUBU, D.A., HERSCHMAN, H.R. Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. **J Biol Chem**, 267: 12, 7991, 1992.
- LARRICK, J.W. & KUNKEL, S.L. The role of tumor necrosis factor and interleukin -1 in the immunoinflammatory response. **Pharmacol Res**, 5(3): 129,1988.
- LASSUS M, SCOTT D, LEYLAND-JONES B. Allergic reactions associated with cremophor containing antineoplastics. **Proc Am Soc Clin Oncol** (abstract), 4:268,1985.
- LEUDKE, C.E., CERAMI, A., **J Clin Invest**, 86: 1234-1240, 1990.
- LIBBY, P., ORDOVAS, J M ., AUGER, K.R. et al. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cell. **Am J Pathol**,124: 17,1986.
- LINDBLON. U, et al. Pain terms. A current list with definitions and notes on usage. Apud MERSKEY, H. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain (Supplement)**, 3: 215-221,1986.
- LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrrone-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflamm Res**,45(6): 308, 1996.
- MANFREDI, JJ., PARNES, J., HORWITZ. SB. Taxol binds to cellular microtubules. **J Cell Biol**, 94: 688-696, 1982.

MASFERRE, J.L., ZWEIFEL, B.S., SEIBERT, K., NEEDLEMAN, P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. **J Clin Invest**, 86: 4, 1375, 1990.

MASINI, E. SALVEMINI, D., PISTELLI, A., et al. Rat mast cells synthesize a nitric oxide like-factor which modulates the release of histamine. **Agents Actions**, 33(1-2): 61, 1991.

MCBRIDE, W.H., ECONOMOU, J.S., NAYERSINA, R., COMORA, S. AND ESSENER, R. Influences of Interleukins 2 and 4 on tumor necrosis factor production by murine mononuclear phagocytes. **Cancer Res**, 50: 2949, 1990.

MCMAHON, S.B. AND KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends Neurosci**, 13: 199, 1990.

MEYER & CAMPBELL, JN. **Peripheral neural mechanisms of nociception**. In: WALL, PD., MELZACK, R. eds Textbook of pain 2 ed. Oxford, Churchill Livingstone. 22-45,1989.

MONCADA, S., PALMER, R.J.M., HIGGS E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology **Pharmacol Rev**, 34: 109, 1991.

MOORE PK, OLUYOMI AO, BABBEDGE RC, et al. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br J Pharmacol**, 102(1) : 198, 1991.

MONSARRAT, B., MARIEL, E., COSS, S. et al. Taxol metabolism: isolation and identification of three major metabolites in rat bile. **Drug Metab Dispos Biol Fate Chem**, 18: 895-901, 1990.

- MONSARRAT, B., ALVINERIE, P., WRIGHT, M. et al. Hepatic metabolism and biliary excretion of taxol in rats and humans. **Monogr Natl Cancer Inst**, 15: 39-45, 1993.
- MOREIRA, A.L., SAMPAIO, E.P., ZMUIDZINAS, A., FRINDT, P., SMITH, K.A., KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **J Exp Med**, 177: 1675, 1993.
- MURAD, F., WALDMAN, S., FISCUS, R.R., et al. Regulation of cyclic GMP synthesis and the interactions with calcium. **J Cardiovasc Pharmacol (Suppl)**, 8: S57, 1986
- NAKAMURA, M., FERREIRA, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**, 135(2): 145, 1987.
- NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J Clin Invest**, 79(2): 319, 1987.
- NAWROTH, P.P., BANK, I., HANDLEY, D. et al. Tumor necrosis factor-cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin-1. **J Exp Med**, 163: 1363, 1986.
- NETA, R. SAYERS, T. AND OPENHEIM, J.J. **Tumor Necrosis Factor: Structure, Function and Mechanism of Action**, (eds. BB Aggarwal and J. Vilcek), Marcel Dekker, Inc., New York, pp 499, 1992.
- O'BANION, M.K., SADOWSKI, H.B., WINN, V., YOUNG, D.A. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. **J Biol Chem**, 266:34, 23261, 1991.

- OHTSUKA, H., HIGUCHI, T. MATSUZAWA, H., SATO, H., TAKAHASHI, K., TAKAHASHI, J., YOSHINO, T. Inhibitory effect on LPS-induced tumor necrosis factor, in calves treated with chlopromazine or pentoxifyline. **J Vet Med Sci**, 59:1075-1077,1997.
- OLD, LT. Tumor necrosis factor(TNF). **Science**, 30:630,1985.
- OZOLS. RF. Carboplatin and paclitaxel of advance ovarian cancer. **Cancer (Suppl 1)**, 4: 7-13, 1994.
- PACE, A., BOVE, L., ALOE, A., NARDI, M., PIETRANGELI, A., CALABRESI, F., INNOCENTI, P., JANDOLO, B. Paclitaxel neurotoxicity: clinical and neurophysiological study of 23 patients. **Ital J Neurol Sci**, 18:73-79, 1997.
- PETTIPHER, ER. e SALTER, ED. Resident joint tissues, rather than infiltrating neutrophils and monocytes, are the predominant sources of TNF- alfa in zymosan arthritis. **Cytokine**, 8(2): 130-133,1996.
- PFEFFER, K., MATSUYAMA, T., KUNDIG, T.M. et al., Mice deficient for the 55 KD tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. **Cell**, 73: 457-467, 1993.
- PIMENTA, C A M. **Aspectos culturais, afetivos e terapêuticos relacionados a dor do câncer.** Tese Doutorado, São Paulo, Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.SP,132p,1995).
- POLOMANO, RC., MANNES, M., BENNETT, GJ. Paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in rats. **Coc Neurosci Abstr**, 24:381,1998

- RANG, H.P., BEVAN, S., DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. **Br Med Bull**, 47(3): 534, 1991.
- RAO, S., HORWITZ, SB., RINGRL I. Direct photoaffinity labeling of turbulin with taxol. **J Natl Cancer Inst**, 84:785-788, 1992.
- RAO, S., KRAUSS, NE., HEERDING, JM, ET AL. 3'-(P-Azidobenzamido)taxol photolabels the N-terminal 1 amino acids of beta-turbulin. **J Biol Chem**, 269:3132-3134, 1994.
- RAO, TS., CURRIE, J.L., SHAFFER, A.F., ISAKSON, P.C. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. **J Pharmacol Exp Ther**, 269:3, 917-25, 1994.
- RIBEIRO, R.A., DE LUCCA, F.L., FLORES, C.A., CUNHA, F.Q, FERREIRA, S.H. RNA from LPS-stimulated macrophages induces the release of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 from resident macrophages. **Mediators of Inflammation**, 2: 435, 1993.
- RIBEIRO, R.A., FLORES, C.A., CUNHA, F.Q., et al. Partial characterization of the RNA from LPS-stimulated macrophages that induces the release of chemotactic cytokines by resident macrophages. **Mol Cell Biochem**, 148(2) :105, 1995.
- RIBEIRO, R.A., VALE, M.L., THOMAZZI, S.M., et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol**, 387(1): 111, 2000a.
- RIBEIRO, R.A., VALE, M.L., FERREIRA S.H. CUNHA, F.Q. Analgesic effect of thalidomid on inflammatory pain **Eur J Pharmacol**, 391: 97, 2000b.

- RIDGER, VC., PETTIPHER, ER., BRYANT, CE., BRAIN, SD. Effect of the inducible nitric oxide synthase inhibitors aminoguanidine and L-N⁶ –(1- iminoethyl) lisine on zymosan-induced plasma extravasation in rat skin. **J Immunol**, 159:383-390, 1997.
- ROCHA, F.A., ARAGAO, A.G. JR., OLIVEIRA, R.C., et al. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm Res**, 48(9): 485, 1999.
- ROCHA, J.C.S. **Envolvimento do óxido nítrico na artrite induzida por zymosan em ratos**. Dissertação de mestrado apresentada ao departamento de pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia – UFC, Fortaleza –CE, 1999.
- ROWINSKY, EK., CAZENAVE, LA., DONEHOWER RC. Taxol: novel investigational antimicrotubule agent. **J Natl Cancer Inst**, 82:1247-1259, 1990.
- ROWINSKY, EK., DONEHOWER RC. The clinical pharmacology of paclitaxel. **Semin Oncol(Suppl)**, 3: 16-25, 1993a.
- ROWINSKY, EK., EISENHAUER, EA., CHAUDHRY, V., ARBUCK, SG., DONEHOWER, RC. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol[®]). **Semin Oncol Suppl**, 20(3): 1-15, 1993b.
- ROWINSKY E K., DONEHOWER R C. Paclitaxel(taxol). **New Engl J Med**, 332:1004-1014,1995.
- SAVARESE et al. Tratamiento con glutamina indicado para las mialgias y artralgiyas. **J Clin Oncol**, 12: 3918-3919, 1998.

SCHEURICH, P., THOMA, B. UCER, U. & PFIZENMAIER, K. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF- α): induction of TNF receptors on human T cells and TNF- α mediated enhancement of T cell responses. **J Immunol**, 138:1786,1987

SCHIFF, PB., HORWITZ, SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. **Proc Natl Acad Sci (USA)**, 77:1561-1565, 1980.

SCHIFF, PB., FANT, J., HORWITZ, SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**, 277:665-667, 1979.

SCHILLER, PB., STORER, B., TUTSCH, K et al. 3-hour infusion of paclitaxel with or leukocyte colony-stimulating factor in patients advanced cancer. **J Clin Oncol**, 1:1994

SHEAR, MJ., TURNER, FC., PERRAULT, A. & SHOVELTON. Chemical treatment of tumors.V. Isolation of hemorrhage- production fraction from *Serratia marcescens* (*Bacillus prodigiosus*) culture filtrate. **J Natl Cancer Inst**, 4: 1-97, 1943.

SEIBERT, K, ZHANG Y, LEAHY K, HAUSER S, MASFERRER J., PERKINS W., LEE I., ISAKSON P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. **Proc Natl Acad Sci (USA)**, 91: 12013, 1994.

SIROIS, J., RICHARDS, J.S. Purification and characterisation of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxid synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells in rats preovulatory follicles. **J Biol Chem**, 267: 6382, 1992.

SMITH, R.A., BAGLIONI, C., The active form of tumor necrosis factor is a trimer. **J Biol Chem**, 262: 6951-6954, 1987.

SPARREBOOM, A, TERLLINGEN, VO., NOOIJEN, WJ., BEIJNEN, JH. Nonlinear pharmacokinetics of Paclitaxel in mice results from the pharmaceutical vehicle Cremophor EL. **Cancer Res**, 56: 2112-2115, 1996.

STERANKA, L.R., MANNING, D.C., DEHAAS, C.J., FERKANY, J.W., BOROSKY, S.A., O'CONNOR, J.R., VAVREK, R.J., STEWART, J.M., SNYDER, S.H. Bradykinin as a pain mediator, receptors are localized to sensory neurons, and antagonists has analgesic actions. **Procl Natl Acad Sci (USA)** 85: 3245, 1988.

STRIETER, R., REMICK, D., WARD, P. et al. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline Biochem. Biophys. **Res Commn**, 155: 207, 1988.

STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L., SHOWELL, H.J., et al. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta. **Science**, 243(4897): 1467,1989.

TAIWO, Y.O., BJERKNES, L.K., GOETZL, E.J AND LEVINE, J.D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience**, 32: 577, 1989.

TARTAGLIA, L.A., WEBER, R.F., FIGARI, I.S. et al., The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. **Proc Natl Acad Sci (USA)**, 88: 9292-9296, 1991.

THOMAZZI, S.M. **Participação de macrófagos e citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-8) na modulação da nocicepção induzida no modelo de contorções abdominais**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Depto. de Fisiologia e Farmacologia – UFC, 1996.

THOMAZZI, S.M., RIBEIRO, R.A., CAMPOS, D.I., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S.H. Tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-8 mediate the nociceptive activity of the supernatant of LPS-stimulated macrophages, **Mediators of Inflammation**, 6:195, 1997.

TONUSSI, C.R., & FERREIRA, S.H. rat-knee joint incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, 48: 421, 1992.

TONUSSI, C.R., FERREIRA, S.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **Eur J Pharmacol**, 251(2-3): 173, 1994.

TRIETER R M., KUNKEL S L., SHOWELL H J., et al. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF- α , LPS, and IL-1 β . **Science**, 243(4897): 1467, 1989.

TSUJIMOTO. M., YOKOTA, S., VILCEK, J & WEISSMANN, G. Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. **Biochem Biophys Res Commun** 137: 1094, 1986.

TURK, D C., RUDY, T E. Classification logic and strategies in chronic pain. In TURK, D C., MELZAK, R. eds: **Handbook of Pain Assessment**. New York, The Guilford press, 1992.

VALE, M.L. (2000). **Atividade analgésica das interleucinas 4, 10 e 13 (IL-4, IL-10 e IL-13) na dor inflamatória experimental: papel das células residentes e citocinas**. Dissertação de Mestrado do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal Ceará. 131p.

VALE M. L., MARQUES J. B., MOREIRA C. A., ROCHA F. A. C., FERREIRA S. H., POOLE S., CUNHA F. Q., RIBEIRO R. A. Antinociceptive Effect of Interleukin-4,-10 and 13 on the writhing response in mice and zymosan- induced knee joint Incapacitation in rats. **J Phamacol Exp Ther**, 304:102-108, 2003.

VAN DAMME, J. DE LEY, M., VAN SNICK, J., et al. The role of interferon-beta 1 and the 26-kDa protein (interferon-beta 2) as mediators of the antiviral effect of interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J Immunol**, 139(6): 1867, 1987.

VAN DEN BENT, MJ., VAN RAAIJ-VAN AARSEN, VJ., VERWEIJ, J., DOORN, PA., SILLEVIS SMITT, PA. Progression of paclitaxel-induced neuropathy following discontinuation of treatment. **Muscle Nerve**, 20: 750-752, 1997.

VIANA, C.F.G., ARAGÃO Jr, A.G.M., RIBEIRO, R.A., MAGALHÃES, J.F.G., VALE, M.R. Effects of *ageratum conyzoides* in nociception and inflammatory response induced by zymosan. **Fitoterapia**, 4: 349, 1998.

- WANI, MC., TAYLOR, HL., WALL, ME., COGGAN, P., MCPHAIL, AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **JAM Chem Soc**, 93: 2325-2327, 1971.
- WEISS R.B., DONEHOWER R. C., WIERNIK P. H, et al. Hypersensitivity reactions from taxol. **J Clin Oncol (abstract)**, 8:1263-1268,1990.
- WIESENFELD-HALLIN, Z., HALLIN, R.G. The influence of the sympathetic system on mechanoreception and nociception. A review. **Hum Neurobiol**, 3(1): 41, 1984.
- WILSON, L. Microtubules as drug receptors: pharmacological properties of microtubule protein. *Ann N Y Acad Sci*, 253:213-251, 1975.
- WILSON, L., MILLER, HP., FARRELL, KW., SNYDER, KB., THOMPSON, WC., PURICH, DL. Taxol stabilization of microtubules in vitro: dynamics of tubulin addition and loss at opposite microtubule ends. **Biochemistry**, 24:5254-5262, 1985.
- WILSON, W H., BERG, S L., BRYANT, G., WITTES, RE., BATES, S., FOJO, A., STEINBERG, S M., GOLDSPIEL, BR., HERDT, J., O`SHAUGHNESSY, J., BALIS, FH., E CHABNER, B A. Paclitaxel in doxorubicin-refractory or mitoxantrone-refractory breast cancer: a phase I/II trial of 96 hour infusion. **J Clin Oncol**, 12:1621-1629, 1994.
- YOKOTA, S., GEPPERT, T.D. & LIPSKY, P.E., Enhancement of antigen and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis-alpha. **J Immunol**, 140: 531; 1988.

XIE, W.L., CHIPMAN, J.G., ROBERTSON, D.L., ERIKSON, R.L., SIMMONS, D.L.
Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is
regulated by mRNA splicing. **Proc Natl Acad Sci (USA)**, 88:7, 2692, 1991.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

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](#)