



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia



**ESTUDO FARMACOLÓGICO DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES
OPIÓIDES, CANABINÓIDES E DE COMPONENTES DO CITOESQUELETO NA
HIPOALGESIA INDUZIDA PELO CELECOXIBE E DROGAS CORRELATAS:
COMPARAÇÃO COM A MORFINA**

PATRÍCIA PAIVA LIMA

BELO HORIZONTE

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

PATRÍCIA PAIVA LIMA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES
OPIÓIDES, CANABINÓIDES E DE COMPONENTES DO CITOESQUELETO NA
HIPOALGESIA INDUZIDA PELO CELECOXIBE E DROGAS CORRELATAS:
COMPARAÇÃO COM A MORFINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito para obtenção do
título de doutorado em Farmacologia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Janetti Nogueira de Francischi

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
BELO HORIZONTE – 2010

“Estudo Farmacológico da Participação de Receptores Opióides, Canabinóides e de Componentes do Citoesqueleto na Hipoalgesia Induzida pelo Celecoxibe e Drogas Correlatas: Comparação com a Morfina”

PATRICIA PAIVA LIMA

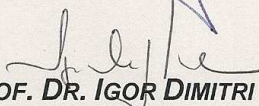
Tese de Doutorado defendida e aprovada no dia 20 de agosto de 2010, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



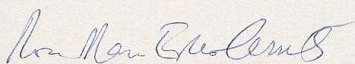
PROF^o. DR. GILES ALEXANDER RAE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA/UFSC



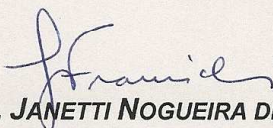
PROF^ª. DRA. YARA CURY
INSTITUTO BUTANTAN/SP



PROF. DR. IGOR DIMITRI GAMA DUARTE
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA/UFMG



PROF^ª. DRA. ROSA MARIA ESTEVES ARANTES
DEPTO DE PATOLOGIA - ICB/UFMG



PROF^ª. DRA. JANETTI NOGUEIRA DE FRANCISCHI
DEPTO DE FARMACOLOGIA
ICB/UFMG, ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, 20 de agosto de 2010

Dedico este trabalho ao caminho, à verdade e à vida

"Porque, em parte, conhecemos, e em parte profetizamos... Porque agora vemos por espelho, em enigma, mas então veremos face a face: agora conheço em parte, mas então conhecerei como também sou conhecido" (Coríntios 13; 9-12).

Divinum est opus sedare dolorem (Hipócrates)

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento, CNPq e FAPEMIG, pelo suporte financeiro;

À Profa. Dra. Janetti Nogueira de Francischi por me apresentar uma nova “paixão”, a Farmacologia;

Ao Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliri pela orientação nos estudos imuno-histoquímicos;

Ao Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte pela disponibilidade em aconselhar e contribuir;

À Profa. Dra. Rosa Arantes pelo valioso direcionamento de experimentos deste estudo;

Ao Prof. Dr. Carlos A. Parada pela orientação nos experimentos com oligonucleotídeos;

Aos queridos amigos-colegas, Rafael Machado Rezende, Celso M. Queiroz Jr e Lucas Dornelas, pelas importantes contribuições à realização deste trabalho;

Ao Dr. Webster Glaser Pimenta pelo apoio e todos os momentos de descontração no LID;

À Profa. Cristina T. Paiva, minha “Mahatma Mãe”, pelo exemplo de caráter, “sem perder a ternura” e pelo apoio sempre incondicional;

Ao meu pai, Teuler Lima, pelo exemplo de força e obstinação e pelo apoio total;

Aos meus irmãos, Rodrigo e Bruno, e às minhas cunhadas, pelo carinho e compreensão;

Às minhas “irmãs”, Vivian, Neuza, Alinne, Mariana, Iara e Luciane pela companhia e acolhimento nos momentos mais difíceis;

A todos amigos e familiares que apóiam e *quase sempre* compreendem minhas ausências;

A todos os colegas de laboratório pela convivência pacífica e leve;

Aos melhores vizinhos, LSAT, especialmente pelo assessoramento para assuntos aleatórios;

Aos funcionários do ICB e CEBIO;

A meus filhos, Margherita e Darwin, pela companhia amorosa;

Ao meu amor, Onur Keskioglu, por me fazer MAIS feliz...

MUITO OBRIGADA!!

SUMÁRIO

RESUMO	20
INTRODUÇÃO	23
1. Terapêutica antiinflamatória: AINEs e coxibes	23
2. Efeitos dos coxibes	25
3. Relações entre as ações dos coxibes e funções do citoesqueleto	27
4. Modulação da resposta nociceptiva e a participação do citoesqueleto	31
5. Estrutura e funções do citoesqueleto	33
OBJETIVO GERAL	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
MATERIAIS E MÉTODOS	39
1. Animais	39
2. Tratamentos Farmacológicos	39
3. Fonte das drogas	41
4. Administração intratecal	41
5. Estímulo hiperalgésico	42
6. Avaliação da resposta nociceptiva	42
7. Protocolos experimentais	43
a. Intensidade de efeito antinociceptivo	43

b.	Influência do tempo de administração sobre o efeito hipoalgésico do celecoxibe	44
c.	Experimentos com modificadores do citoesqueleto	44
d.	Experimentos com oligonucleotídeos <i>antisense</i>	45
e.	Caracterização do efeito da citocalasina B	46
f.	Seletividade do efeito da citocalasina B	46
g.	Efeito da administração intraplantar de diferentes fármacos sobre a nocicepção	47
h.	Avaliação farmacológica da hipoalgesia induzida periféricamente	47
8.	Ensaio imuno-histoquímico para detecção de β -endorfina	48
9.	Ensaio imuno-enzimático para detecção de β -endorfina no tecido plantar da pata de ratos	50
	DELINEAMENTO ESTATÍSTICO	51

RESULTADOS	52
 RESULTADOS PARTE I: Padronização dos efeitos do celecoxibe administrado sistemicamente nos modelos de hiperalgesia: comparação com a morfina	
1. CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA HIPOALGÉSICA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE COMPOSTOS ANALGÉSICOS	53
1.1. Padronização do estímulo hiperalgésico	53
1.2. Efeito analgésico de diferentes fármacos sobre a resposta nociceptiva	54
1.3. Efeito do celecoxibe dependente do tempo de administração nos modelos de hiperalgesia induzida por carragenina ou prostaglandina E ₂	57
2. PARTICIPAÇÃO DE COMPONENTES DO CITOESQUELETO NA RESPOSTA HIPOALGÉSICA	59
2.1. Participação de microtúbulos na resposta hipoalgésica	59
2.1.1. Prevenção da hipoalgesia por inibidores da polimerização de microtúbulos	59
2.1.2. Ausência da participação da proteína associada a microtúbulo 2c (MAP2c) na resposta hipoalgésica induzida por celecoxibe	64
2.2. Ausência da participação de filamentos intermediários na resposta hipoalgésica	66
2.3. Participação de microfilamentos na resposta hipoalgésica	68

2.4. Curva dose-efeito da participação de componentes do citoesqueleto na hipoalgesia	72
3. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE CITOCALASINA B SOBRE A HIPOALGESIA	74
3.1. Exclusão de efeito sistêmico	74
3.2. Avaliação do tempo de administração sobre o efeito da citocalasina B	75
3.3. Efeito do prétratamento com citocalasina B sobre o efeito anti-hiperalgésico induzido pela administração tardia de celecoxibe	77
3.4. Seletividade do efeito da citocalasina B sobre a resposta antinociceptiva induzida por diferentes inibidores de ciclooxigenase	78
4. EXCLUSÃO DO COMPONENTE CENTRAL DO EFEITO HIPOALGÉSICO DO CELECOXIBE	82
5. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE β -ENDORFINA NA RESPOSTA HIPOALGÉSICA INDUZIDA SISTEMICAMENTE POR CELECOXIBE	85

**RESULTADOS PARTE II: Avaliação do efeito decorrente da administração
intraplantar de diferentes fármacos**

6. HIPOALGESIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO PERIFÉRICA DE DIFERENTES COMPOSTOS ANALGÉSICOS	92
6.1. Curva dose-efeito de celecoxibe e OSU03012 sobre a hiperalgesia induzida por carragenina	92
6.2. Curva dose-efeito do agonista opióide β -endorfina sobre a resposta hiperalgésica causada pela carragenina	94
6.3. Curva dose-efeito de agonistas canabinóides sobre a resposta hiperalgésica causada pela carragenina	96
6.4. Comparação entre o efeito hipoalgésico induzido por celecoxibe, agonista opióide e canabinóide tipo CB ₂	98
7. EFEITO LOCAL DE CELECOXIBE	99
8. EFEITO DA CITOCALASINA B SOBRE A HIPOALGESIA INDUZIDA PERIFERICAMENTE POR DIVERSOS COMPOSTOS	99
9. EFEITO DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES OPIÓIDES OU CANABINÓIDE SOBRE A HIPOALGESIA INDUZIDA PERIFERICAMENTE	103

10. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA β-ENDORFINA	
NA RESPOSTA HIPOALGÉSICA INDUZIDA PERIFERICAMENTE	109
10.1. Avaliação da imuno-marcação para β-endorfina	
no tempo meia hora após a carragenina	110
10.2. Avaliação da imuno-marcação para β-endorfina	
no tempo 1 h após a carragenina	112
10.3. Avaliação da imuno-marcação para β-endorfina	
no tempo duas horas após a carragenina	114
 RESULTADOS PARTE III: Efeito hipoalgésico de um análogo do celecoxibe	
(araquidonoil-celecoxibe) desenvolvido na Faculdade de Farmácia	
11. EFEITOS DO ARAQUIDONOIL-CELECOXIBE	117
11.1. Efeito da administração intraplantar de araquidonoil-	
celecoxibe sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina	117
11.2. Comparação entre o efeito hipoalgésico induzido pela	
administração periférica de celecoxibe e do araquidonoil-celecoxibe	118
11.3. Prevenção da hipotalgesia causada por araquidonoil-	
celecoxibe após administrações intraplantares de citocalasina B,	
naltrexona ou SR144528	119

DISCUSSÃO	121
Resposta nociceptiva e citoesqueleto	124
Resposta nociceptiva e microtúbulos	125
Resposta nociceptiva e filamentos intermediários	129
Resposta nociceptiva e microfilamentos	130
Microfilamentos e compostos analgésicos	133
Queratinócitos e resposta antinociceptiva periférica	136
Estudo da hipoalgesia induzida periféricamente	139
SUMÁRIO DA DISCUSSÃO	145
CONCLUSÕES	147
ANEXO	148

ÍNDICE DOS ESQUEMAS

TÍTULO	P.
Esquema 1: Protocolo experimental geral empregado nos estudos do efeito de drogas analgésicas sobre a resposta nociceptiva.	44
Esquema 2: Protocolo experimental empregado para comparação do efeito do celecoxibe em diferentes tempos de administração.	44
Esquema 3: Protocolo experimental empregado nos experimentos com oligonucleotídeo <i>antisense</i> (AS) para MAP2c, por via intratecal (i.t.).	45
Esquema 4: Protocolo experimental realizado com diferentes tempos de administração da citocalasina B e os tempos de avaliação de resposta nociceptiva.	46
Esquema 5. Protocolo experimental empregado na caracterização do efeito hipoalгésico induzido por administrações intraplantares de diferentes fármacos.	47
Esquema 6. Protocolo experimental empregado na avaliação dos efeitos do inibidor de microfilamentos (CTB) e dos antagonistas de receptores opióides (NTX) e canabinóide CB ₂ (SR) sobre o efeito hipoalгésico induzido por administrações intraplantares de diferentes compostos analгésicos.	48

ÍNDICE DAS FIGURAS

TÍTULO	P.
Figura 1. Aspecto macroscópico das patas dos ratos tratados intraplantarmente com colchicina e carragenina, no tempo 8 horas: hiperemia, eritema e edema.	63
Figura 2. Aspecto da marcação imuno-histoquímica para β -endorfina no tecido excisado da região plantar de ratos.	90
Figura 3. Representação esquemática dos achados da tese.	146

ÍNDICE DOS GRÁFICOS

TÍTULO	P.
Gráfico 1. Efeito da administração intraplantar de diferentes doses de carragenina (CG; 100, 250 e 500 µg/pata) sobre o limiar nociceptivo em pata de ratos, avaliada em algesímetro de pressão.	54
Gráfico 2. Efeito hipoalgésico unilateral (apenas nas patas inflamadas) causado pelo pré-tratamento com celecoxibe (CX; 12 mg/kg), SC236 (12 mg/kg) ou dipirona (Dip; 360 mg/kg) no modelo de hiperalgesia induzida por carragenina em pata de ratos.	55
Gráfico 3. Efeito hipoalgésico induzido bilateralmente após administração sistêmica de morfina (MORF; 2 mg/kg) ou paracetamol (Par; 360 mg/kg) no modelo de hiperalgesia induzida por carragenina.	56
Gráfico 4. Efeito anti-hiperalgésico causado pela administração subcutânea de indometacina (Indo; 4 mg/kg) ou SC560 (5mg/kg) no modelo de hiperalgesia induzido por carragenina	56
Gráfico 5. Efeito hipoalgésico induzido por celecoxibe depende do tempo de sua administração e do modelo de indução de hiperalgesia utilizado.	58
Gráfico 6. Prevenção total da hipoalgesia causada pelo CX após administração periférica de drogas modificadoras de microtúbulos.	60
Gráfico 7. Efeito preventivo parcial da colchicina sobre o efeito analgésico induzido pela morfina.	61
Gráfico 8. Efeito da colchicina ou nocodazol sobre a hiperalgesia induzida por carragenina.	62
Gráfico 9. Ausência de efeito após administração intratecal de <i>antisense</i> anti-MAP2c ou controle (<i>mismatch</i>) sobre a resposta hipoalgésica causada por CX em ratos.	65
Gráfico 10. Inibição de MAP2c nos gânglios da raiz dorsal pelo <i>antisense</i> , avaliado pela técnica de RT-PCR (<i>real time- polymerase chain reaction</i>).	66
Gráfico 11. Ausência de efeito da administração intraplantar de acrilamida sobre a hipoalgesia induzida pelo celecoxibe (A) ou pela morfina (B).	67
Gráfico 12. Prevenção dose-dependente da hipoalgesia causada pelo celecoxibe após administração intraplantar de inibidores da polimerização de microfilamentos.	69

TÍTULO	P
Gráfico 13. Ausência de efeito da administração intraplantar de faloidina sobre a hipoalgesia induzida pelo celecoxibe.	70
Gráfico 14. Inibição parcial do efeito analgésico induzido pela morfina causada pela administração intraplantar de citocalasina B.	71
Gráfico 15. Efeito de diferentes doses de modificadores da função do citoesqueleto (MFC) sobre a hipoalgesia causada pelo celecoxibe (CX; 12 mg/kg) no tempo 2 horas.	73
Gráfico 16. Efeito local da citocalasina B (CTB; 1µg) sobre a hipoalgesia causada pelo celecoxibe (CX; 12 mg/kg, s.c.).	74
Gráfico 17. Reversão da hipoalgesia induzida pelo celecoxibe após administração intraplantar de citocalasina B.	75
Gráfico 18. Efeito preventivo da faloidina sobre a reversão da hipoalgesia causada pela citocalasina B.	76
Gráfico 19. Ausência de efeito da citocalasina B sobre a anti-hiperalgesia causada pela administração tardia de celecoxibe.	77
Gráfico 20. Prevenção total da hipoalgesia causada por SC236 após administração intraplantar de citocalasina B.	79
Gráfico 21. Ausência de efeito da citocalasina B (CTB; 1µg) sobre a hipoalgesia causada por dipirona (A) ou paracetamol (B).	80
Gráfico 22. Ausência de efeito da citocalasina B (CTB; 1µg) sobre a anti-hiperalgesia causada por SC560 (A) ou indometacina (B).	81
Gráfico 23. Prevenção parcial do efeito analgésico induzido pela morfina após administração intraplantar de naloxone metiodide, um antagonista de receptores opióides o qual não atravessa a barreira hemato-encefálica	83
Gráfico 24. Efeito da administração intraplantar de naloxone metiodide (NLXm; 50 µg) sobre a hipoalgesia (A) ou sobre a anti-hiperalgesia (B) induzidas pelo celecoxibe	84
Gráfico 25. Aumento dose-dependente da área marcada para β-endorfina em queratinócitos do epitélio circunvizinho ao sítio de administração de carragenina.	86

TÍTULO	P.
Gráfico 26. Aumento da área marcada para β -endorfina no epitélio da pele circunvizinha ao sítio de administração de prostaglandina E_2 (PGE_2 ; 2 μ g, i.pl.) ou carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.) (A) e efeito concomitante de redução da hiperalgesia (B), ao longo do tempo (1, 2, 3 e 4 h).	87
Gráfico 27. Relação entre o aumento da área imuno-marcada para β -endorfina no epitélio da pata (A) e o efeito hipoalgésico (B) induzido pela administração sistêmica de celecoxibe (CX; 12 mg/kg, s.c.).	89
Gráfico 28. Efeito hipoalgésico dose-dependente unilateral causado pela administração intraplantar de celecoxibe (A) ou OSU03012 (B).	93
Gráfico 29. Efeito hipoalgésico dose-dependente unilateral causado pela administração intraplantar β -endorfina no modelo de hiperalgesia induzida por carragenina (CG; 250 μ g).	95
Gráfico 30. Efeito hipoalgésico unilateral causado pela administração intraplantar de β -endorfina (β -end; 0,5 e 2 μ g, i.pl.) e ausência de efeito do celecoxibe (CX; 300 μ g, i.pl.) em pata não inflamadas de ratos.	95
Gráfico 31. Hipoalgesia dose-dependente decorrente da administração intraplantar de agonistas de receptores canabinóide tipo CB_1 (A) ou CB_2 (B).	97
Gráfico 32. Comparação entre o efeito hipoalgésico causado pela administração intraplantar de agonistas de receptores opióides (β -endorfina; 2 μ g), canabinóide tipo CB_1 (JWH015; 33 μ g) e celecoxibe (CX; 300 μ g).	98
Gráfico 33. Ausência de efeito da administração de celecoxibe (CX; 300 μ g) na pata esquerda (PE) não inflamada, sobre a resposta hiperalgésica da carragenina.	99
Gráfico 34. Prevenção total da hipoalgesia causada pela administração intraplantar de celecoxibe (CX; 100 μ g, i.pl.) ou OSU03012 (OSU; 100 μ g, i.pl.) após administração de citocalasina B	100
Gráfico 35. Prevenção total da hipoalgesia causada pela administração intraplantar de β -endorfina (β -end; 2 μ g) ou JWH015 (JWH; 33 μ g) após administração de citocalasina B (CTB; 1 μ g, i.pl.).	101
Gráfico 36. Ausência de efeito da administração local de citocalasina B (CTB, 1 μ g) sobre a hipoalgesia causada pela administração intraplantar de ACEA (60 μ g).	102

TÍTULO	P
Gráfico 37. Prevenção da hipoalgesia induzida por celecoxibe de maneira total pelo antagonismo de receptores opióides e parcial pelo antagonismo do receptor CB ₂ .	104
Gráfico 38. Prevenção total da hipoalgesia induzida por OSU03012 (OSU; 100 µg, i.pl.) após antagonismo de receptores opióides e receptor CB ₂ .	105
Gráfico 39. Prevenção total da hipoalgesia induzida por β-endorfina (β-end; 2 µg/50 µl) pelo antagonismo de receptores opióides e ausência de efeito do antagonista de receptor CB ₂ sobre este efeito.	106
Gráfico 40. Prevenção total da hipoalgesia induzida por JWH015 (JWH; 33 µg/50 µl) após antagonismo de receptores opióides e receptor CB ₂ .	107
Gráfico 41. Efeito parcial de antagonistas de receptores opióides e de receptor CB ₂ sobre a hipoalgesia induzida por ACEA (60 µg, i.pl.).	108
Gráfico 42. Evidência da liberação de β-endorfina no epitélio da pele da pata de ratos no tempo 30 minutos após administração de carragenina (CG; 250 µg, i.pl.).	111
Gráfico 43. Redução da área marcada imuno-histoquimicamente para β-endorfina após administração de carragenina, em animais controle ou pré-tratados com celecoxibe (CX; 300 µg) ou JWH015 (JWH; 33 µg).	113
Gráfico 44. Elevação do limiar nociceptivo nos animais tratados, por via intraplantar, com celecoxibe (CX; 300 µg) ou JWH015 (JWH; 33 µg) e reversão total deste efeito após pré-tratamento com antagonista de receptores CB ₂ (SR144528; 10 µg, i.pl.).	113
Gráfico 45. Aumento da síntese de β-endorfina nos tecidos plantares de ratos tratados com carragenina (CG; 250 µg, i.pl.).	114
Gráfico 46. Redução da área imunomarcada para β-endorfina após a administração de carragenina, em animais controle (Veic-Sal-CG) ou pré-tratados com celecoxibe (CX; 300 µg) ou JWH015 (JWH; 33 µg). T: 120 min.	115
Gráfico 47. Elevação do limiar nociceptivo nos animais tratados, por via intraplantar, com celecoxibe (CX; 300 µg) ou JWH015 (JWH; 33 µg) e efeito anti-hiperalgésico em ratos pré-tratados com antagonista de receptores CB ₂ (SR144528; 10 µg, i.pl.).	115
Gráfico 48. Efeito hipoalgésico induzido pela administração intraplantar de araquidonoil-celecoxibe (AACX; 50; 80; 100 e 300 µg), no modelo de hiperalgesia causado por carragenina (CG; 250 µg) em pata de ratos.	117

TÍTULO	P.
Gráfico 49. Comparação entre o efeito hipoalgésico induzido por injeções intraplantares de celecoxibe e araquidonoil-celecoxibe.	118
Gráfico 50. Inibição do efeito hipoalgésico induzido pela administração intraplantar de araquidonoil-celecoxibe	119
Gráfico 51. Evidência de liberação de β -endorfina pelo epitélio da pele das patas de ratos tratados intraplantarmente com araquidonoil-celecoxibe (AACX; 100 μ g/50 μ l).	120

ÍNDICE DAS ABREVIações

AINE	Antiinflamatório não esteróide
ATP	Adenosina trifosfato
CTB	Citocalasina B
CB ₁ e CB ₂	Receptor canabinóide tipo 1 e tipo 2
CCC	Colchicina
CG	Carragenina
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
COX	Ciclooxigenase
Coxibes	Inibidores de seletivos de ciclooxigenase 2
CX	Celecoxibe
Dip	Dipirona
G _i	Proteína G inibitória
i.pl.	Intraplantar
Indo	Indometacina
K ⁺	Ions de potássio
LB	Latrunculina B
MORF	Morfina
NCZ	Nocodazol
NLXm	Naloxona Metiodide
NO	Óxido nítrico
NTX	Naltrexona
Par	Paracetamol
PD	Pata direita
PE	Pata esquerda
PG	Prostaglandina
PKG	Proteína quinase G
s.c.	Subcutâneo (a)
SNC	Sistema nervoso central
TX	Tromboxana
β-end	β-endorfina

RESUMO

Em trabalhos anteriores do grupo, mostrou-se que o efeito hipoalgésico causado pelo celecoxibe, isto é, o aumento do limiar nociceptivo acima dos valores basais, estaria relacionado à liberação de opióides endógenos. No presente estudo, avaliou-se a participação de componentes do citoesqueleto e dos sistemas opióide e canabinóide endógenos na hipoalgesia induzida pelo celecoxibe (CX) ou pela morfina (MORF), administrados por diferentes vias em ratos. Para isso, análises imuno-histoquímicas e imunoenzimáticas foram conduzidas em paralelo a estudos de limiar nociceptivo e foram utilizados inibidores seletivos e não seletivos de ciclooxigenases (COX), bem como agonistas e antagonistas de receptores opióides e canabinóides. **MÉTODOS:** Ratos Holtzman machos (180-220 g) foram submetidos a diferentes protocolos experimentais. Os modificadores da função do citoesqueleto (nocodazol, colchicina, acrilamida, faloidina, latrunculina B ou citocalasina B, 10^{-9} a 10^{-11} moles/pata) ou antagonistas de receptores opióides e canabinóides foram injetados, via i.pl., $\frac{1}{2}$ h antes do CX (s.c. ou i.pl.) ou outro composto analgésico. Após outra $\frac{1}{2}$ h, os ratos receberam estímulo hiperalgésico, carragenina (CG; 250 μ g/pata). O limiar nociceptivo foi avaliado, a cada hora, até a 6 h em algesímetro de pressão. **RESULTADOS:** Os inibidores de microtúbulos e microfilamentos preveniram a hipoalgesia causada por CX de modo seletivo e dependente da dose. Além disso, β -endorfina, JWH015 (um agonista de receptor CB₂), CX e o OSU03012 (um análogo do CX desprovido de ação sobre COX-2) induziram efeito hipoalgésico semelhante, o qual foi revertido por um antagonista opióide, a naltrexona. Um antagonista de CB₂, SR144528, preveniu a hipoalgesia induzida por CX, OSU03012 e JWH015. A imunomarcagem para β -endorfina no epitélio da pele das patas foi aumentada da resposta basal após a administração de CG e reduzida nos animais pré-tratados com CX ou

JHW015. Tal efeito de CX e JWH015 sobre a imunomarcção para β -endorfina no epitélio foi prevenido pelo antagonista CB₂. A administração intraplantar de araquidonoil-celecoxibe (AACX), um análogo do CX sintetizado na Faculdade de Farmácia – UFMG, partir da complexação entre o ácido araquidônico e o CX, induziu efeito analgésico (hipoalgesia) semelhante ao observado após o CX, sendo esse efeito também revertido por antagonistas de receptores opióide e canabinóide. **CONCLUSÕES:** Em conjunto, este estudo mostrou que alterações em microtúbulos e microfilamentos, mas não em filamentos intermediários, estão envolvidas no desenvolvimento da resposta hipoalgésica ao celecoxibe e à ação local de opióides. Tais resultados mostraram também que a β -endorfina é um dos opióides endógenos liberados localmente pelo celecoxibe e parece ser o responsável final pela hipoalgesia a esse fármaco. Sugere-se que o AACX é formado localmente após administrações de CX, sugere-se, também, que, o AACX ativa receptores CB₂ em queratinócitos promovendo a liberação local de β -endorfina.

ABSTRACT

The effect of coxibs of raising the nociceptive thresholds above the normal level in rat inflamed paws (hypoalgesia) has been shown to be related to endogenous opioids release. We have here assessed the role of the cytoskeleton components and endogenous opioid/cannabinoid systems in this hypoalgesia induced by celecoxib (CX), compared to the hypoalgesia induced by morphine (MORF). Based on study of Ibrahim et al. (2005) who have shown the release of β -endorphin (β -end) through the activation of type 2 cannabinoid receptors (CB₂) on keratinocytes, an immunohistochemical and immuno-enzymatic analysis was conducted to determine the β -end content in the epithelial cells from skin of the inflammation site (rat paws) under various experimental conditions. **METHODS:** Male Holtzman rats (180-220 g) received sequential intraplantar (i.pl.) or

subcutaneous (s.c.) administrations of vehicle or test drugs. The selective inhibitors of cytoskeleton (nocodazole, colchicine, acrylamide, latrunculin B, and cytochalasin B, at range of 10^{-9} - 10^{-11} moles/paw) and antagonists of opioid or cannabinoid receptors were given 30 min before CX (s.c. or i.pl.) or other analgesic compound. After a further 30 min, rats were injected (ipl) with the inflammatory stimulus, carrageenan (CG; 250 μ g/paw). Mechanical pain threshold was hourly measured over the next 6 h, using the Randall-Sellitto method.

RESULTS: The CX-induced hypoalgesia was totally prevented by low doses of microfilaments inhibitors (round 2 nmoles range) and higher doses of microtubule inhibitors (round 20 nmoles). The same doses reversed the MORF-induced hypoalgesia only partially. β -end, JWH015 (a CB₂ agonist), CX and OSU03012 (a CX analogue that does not inhibit COX-2) induced hypoalgesia that was prevented by naltrexone a non-selective opioid antagonist. SR144528, a CB₂ cannabinoid antagonist prevented the hypoalgesia induced only by CX, OSU03012 and JWH015. The content of β -end on epithelium was increased by CG and reduced by administration of CX or JWH015, an effect prevented by previous administration of SR144528. Arachidonoyl-celecoxib (AACX), an CX analog was synthesized and then administered i.pl. AACX induced hypoalgesia similar to CX and such an effect was prevented by opioid and cannabinoid antagonists. **CONCLUSIONS:** We conclude that the local changes in (paw) cytoskeleton selectively prevents CX, and peripheral opioid-induced hypoalgesia and that actin microfilaments were the cytoskeletal components most critically involved in the hypoalgesia. This study also suggests the peripheral release of β -end after intraplantar administration of CX and JWH015. Moreover, the AACX seems to be peripherally formed after CX administration, where it activates cannabinoid CB₂ receptors and lead to release of β -end.

INTRODUÇÃO

6. Terapêutica antiinflamatória: AINEs e coxibes

O uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) é relatado em vários registros da antiguidade, como no papiro de Ebers ($\pm$ 1550 a.C.), no qual Imoteb descreve o uso de emplastos e extratos vegetais (ricos em salicilatos) com finalidades analgésica, antipirética e antirreumática (para revisão ver Hamilton & Baskett, 2000; Tracy, 2006). Hipócrates e outros grandes pensadores da antiguidade também recomendavam preparações vegetais para o tratamento de diversas enfermidades, de dores do parto a reumatismos crônicos (Vane, 2000; Hademenos, 2005; Orfanos, 2007). Porém, os relatos de efeitos indesejáveis graves com tais drogas também são frequentes desde a antiguidade, especialmente aqueles relativos ao trato gastrointestinal, à coagulação sanguínea e ao sistema renal (Stone, 1763; Ferreira, 1972; Warner & Mitchell, 2002; Whittle, 2003; Cheng & Harris, 2004; Graham *et al.*, 2005).

Apesar do histórico uso dos AINEs, apenas na década de setenta o mecanismo de ação da ácido acetilsalisílico foi atribuído à sua ação inibitória sobre enzimas endoperoxidases, conhecidas como ciclooxigenases (COX), que representam um estágio limitante para a síntese de mediadores inflamatórios a partir do ácido araquidônico em células residentes e migratórias (Vane, 1971; Ferreira, 1972). Esse mecanismo de ação postulado por Vane (1971) mantém-se aceito como modelo de atuação de diferentes AINEs. Entretanto, ainda existem alguns pontos de divergência no completo entendimento dos diferentes efeitos farmacológicos exercidos por essa classe tão heterogênea de drogas (Liles & Flecknell, 1992; Warner & Mitchell, 2002).

Na década de 90, vários experimentos demonstraram que a administração de diferentes endotoxinas e mitógenos induz a expressão celular de uma isoforma especial de COX, sem afetar a expressão da isoforma constitutiva em tecidos não inflamados (Fu *et al.*, 1990; Kujubu *et al.*, 1991 e 1993; Smith & Marnett, 1991). A isoforma induzida foi, então, denominada COX-2 e associada à síntese de mediadores necessários à manutenção e realimentação do processo inflamatório, enquanto a primeira isoforma (COX-1), seria responsável pela síntese de mediadores necessários a homeostase (Smith & Dewitt, 1996; Smith *et al.*, 1998). Mais tarde, foi descrita uma terceira isoforma (COX-3) que foi relacionada ao mecanismo de ação de AINEs no sistema nervoso central (SNC), entre eles o paracetamol e a dipirona (Chandrasekharan *et al.*, 2002; Botting, 2003; Botting & Ayoub, 2003; Simmons, 2003; Warner & Mitchell, 2005).

Seguindo esse conceito, a indústria farmacêutica se voltou para o desenvolvimento de fármacos capazes de inibir seletivamente a COX-2, pois, dessa forma, os sinais e sintomas inflamatórios seriam reduzidos, sem grandes alterações no funcionamento geral de órgãos e tecidos não inflamados. Após anos de pesquisa laboratorial e ensaios clínicos polêmicos (Silverstein *et al.*, 2000 e 2001; Bombardier *et al.*, 2000 e 2006; Malhotra *et al.*, 2004), foram aprovados para uso humano o celecoxibe e o rofecoxibe, representantes desta nova subclasse dos AINES, que ficaram genericamente conhecidos como coxibes. Rapidamente foram desenvolvidos diferentes compostos também aprovados para uso humano específico (parecoxibe, valdecoxibe, etoricoxibe, lumiracoxibe) e veterinário (deracoxibe, firocoxibe) (Bombardier *et al.*, 2000; Silverstein *et al.*, 2000; Riendeau *et al.*, 2001; Millis *et al.*, 2002; Ott *et al.*, 2003; Farkouh *et al.*, 2004; Sessions *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2006; Nussmeier *et al.*, 2006).

Os estudos clínicos demonstraram a eficiência antiinflamatória, antipirética e especialmente, um marcado efeito analgésico de diferentes coxibes (Simon *et al.*, 1998; Makarowiski *et al.*, 2002; Ott *et al.*, 2003). Em princípio, estes fármacos também mostraram mínimos efeitos indesejáveis no TGI comumente observados na terapia prolongada com AINEs inibidores não seletivos de COX (Whittle, 2003; Cheng & Harris, 2004). Entretanto, estudos contemporâneos ao lançamento dos primeiros coxibes alertavam para a possibilidade de efeitos indesejáveis, especialmente sobre o sistema cardiovascular (Mitchell & Evans, 1998; Golden & Abramson, 1999; Graham *et al.*, 2005).

7. Efeitos dos coxibes

De forma diferente do observado após o uso de AINEs tradicionais, o uso em larga escala de coxibes mostrou, além dos efeitos antiinflamatórios, alguns efeitos inesperados. Entre estes, podemos destacar os efeitos antineoplásico/antimetastático (Yamamoto & Viale, 2003; Yamashita *et al.*, 2003; Onoda *et al.*, 2004, Grösch *et al.*, 2006), inibição da migração celular (Menezes *et al.*, 2005 e 2008; Reding *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007), a indução de analgesia superior ao de outros AINEs em alguns modelos experimentais (Francischi *et al.*, 2002; França *et al.*, 2006; Rezende *et al.*, 2009; Correa *et al.*, 2010), e ainda, um controverso controle dos sintomas do mal de Alzheimer (Firuzi & Praticò, 2006; Szekely *et al.*, 2007; Nivsarkar *et al.*, 2008). Infelizmente, estudos posteriores demonstraram a correlação entre utilização prolongada de coxibes e efeitos cardiovasculares graves, o que vitimou vários usuários e culminou na retirada do rofecoxibe e do valdecoxibe do mercado mundial (Mukherjee *et al.*, 2001; Bensen *et al.*, 2002; Ray *et al.*, 2002; Whittle, 2003; Cheng & Harris, 2004; Fenton *et al.*, 2004; Lin,

2004; Grahan *et al.*, 2005), seguindo-se uma reformulação de bulas e a adoção de critérios mais rígidos em prescrições médicas relativas ao seu uso (Hsiao *et al.*, 2009).

Alguns dos efeitos indesejáveis causados pela terapia prolongada com coxibes foram atribuídos ao desequilíbrio entre a síntese de prostaciclina (PGI₂) e tromboxana A₂ (TXA₂), importantes mediadores da atividade vascular na resposta inflamatória (Armstrong, 1996). Esses mediadores são produzidos por suas respectivas sintases a partir da prostaglandina H₂ (PGH₂), o produto final da ação das COX. Ocorre que, nas células endoteliais, há predomínio da prostaciclina sintase, que transforma a PGH₂ produzida pela COX-2 (induzida pelo processo inflamatório) em PGI₂, potente vasodilatador e anti-agregante plaquetário. Estes efeitos são contrapostos pelo metabolismo do produto da COX-1 em plaquetas, principalmente em TXA₂, agente agregante de plaquetas e vasoconstritor (Bunting *et al.*, 1981; Armstrong, 1996; Krotz *et al.*, 2005). Assim, a inibição seletiva da COX-2 pelos coxibes produz um desequilíbrio vasodinâmico, promovendo os efeitos trombogênicos e vasoconstritores da TXA₂, que combinados, aumentam o risco de isquemias tromboembólicas e infartos em diversos tecidos e órgãos de pacientes predispostos ou em uso prolongado dessa terapia (Fitzgerald, 2004; Bing & Lomnika, 2002; Krotz *et al.*, 2005). A ocorrência de outros efeitos indesejáveis, como infertilidade e problemas renais, é explicada pela expressão constitutiva da COX-2 em alguns tecidos normais, entre eles o renal, neural, testicular e ovariano (Golden & Abramson, 1999; Wong *et al.*, 1999; Parente & Paretti, 2003).

Outro fator relevante é a real falta de seletividade de alguns coxibes à inibição da COX-2, ou melhor, que tal “seletividade” se refere apenas à especificidade de ação inibitória quando comparada a COX-1, e não de outras enzimas celulares com papéis

importantes em vias colaterais à cascata do ácido araquidônico. Vários estudos mostraram que a ação anticarcinogênica do celecoxibe envolve indução de apoptose e bloqueio da progressão do ciclo celular e da angiogênese (Altorki *et al.*, 2003; Ducreux *et al.*, 2003; Yamamoto & Viale, 2003; Pruthi *et al.*, 2004), devido à ação direta do celecoxibe em diversos alvos celulares como: inibição da quinase dependente de fosfoinositídeo 1 (PKD-1), da proteína quinase B (PKB/AKT), da Ca^{++} ATPase, de anidrases carbônicas, entre outros (Lin *et al.*, 2001; Kulp *et al.*, 2004; Knudsen *et al.*, 2004; Driessen *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2006). Estes trabalhos demonstraram que o efeito anticarcinogênico induzido por coxibes não depende diretamente de sua inibição sobre a COX-2, porém os efeitos indesejáveis decorrentes do uso prolongado desta terapia, sim. Neste contexto, o avanço nas pesquisas acerca dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos dos coxibes levaram ao desenvolvimento de novas drogas que são, em sua maioria, moléculas análogas a coxibes, que não apresentam efeito inibitório sobre a COX-2 (Zhu *et al.* 2004; Kardosh *et al.*, 2005; Kulp *et al.*, 2004; Pyrko *et al.*, 2007). Com o desenvolvimento destes novos fármacos, abriu-se uma nova possibilidade de reprodução do efeito anticarcinogênico dos coxibes com reações indesejáveis minimizadas.

8. Relações entre as ações dos coxibes e funções do citoesqueleto

No início da presente década, pesquisadores do nosso laboratório descreveram a ocorrência da elevação do limiar de deflagração da resposta nociceptiva acima dos valores basais (denominada hipoalgesia), após aplicação de estímulo inflamatório em uma das patas posteriores de ratos previamente tratados com coxibes. Tal efeito hipoalgésico foi observado apenas na pata inflamada (unilateral) e não foi observado em ratos tratados com inibidor seletivo de COX-1 ou inibidores não seletivos de COX (Francischi *et al.*, 2002).

Além disto, a hipoalgesia também foi observada em ratos pré-tratados com coxibes que receberam injeções intraplantares de prostaglandina E₂ (PGE₂), principal produto pró-inflamatório da cascata do ácido araquidônico, indicando a possibilidade deste efeito não estar associado à inibição da síntese de prostaglandinas, pela COX-2. Mais interessante, como a administração (por via sistêmica ou intracerebroventricular) de naltrexona, um antagonista de receptores opióides, foi capaz de prevenir seletivamente este efeito, a participação do sistema opióide endógeno foi relacionado ao efeito hipoalgésico dos coxibes (França *et al.*, 2006; Rezende *et al.*, 2009; Correa *et al.*, 2010).

Paralelamente à síntese e liberação de mediadores da resposta inflamatória ocorre o desencadeamento da resposta antinociceptiva tanto localmente quanto centralmente, através da síntese e liberação de opióides e canabinóides. Existem relatos abundantes da participação dos sistemas opióide e canabinóide endógenos na resposta antinociceptiva sistêmica ao processo inflamatório local (Planas *et al.*, 1995; Puehler *et al.*, 2004; Elmes *et al.*, 2005; Gutierrez *et al.*, 2007). Os efeitos analgésicos dos opióides e canabinóides dependem do rápido transporte e expressão de receptores específicos nas membranas celulares dos nociceptores, fenômenos regulados através de componentes do citoesqueleto (Hohmann & Herkeham, 1999; Bloch *et al.*, 2001; Puehler *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2005; Hucho & Levine, 2007). Foi descrito, também, um sinergismo entre os sistemas antinociceptivos endógenos em tecidos periféricos inflamados, como a liberação de β -endorfina por queratinócitos e células migratórias após a ativação de seus receptores canabinóides do tipo 2 (CB₂) (Ibrahim *et al.*, 2003 e 2005; Rittner *et al.*, 2007 e 2009). A cascata de reações intracelulares causada pela ativação de receptores metabotrópicos, como os receptores opióides e canabinóides, também é sinalizada através de uma complexa rede

de proteínas ligadas a componentes do citoesqueleto (Prekeris *et al.*, 1998; Malik-Hall *et al.*, 2003; Goswami *et al.*, 2004 e 2006; Woolf & Ma, 2007).

Tanto os resultados de nossas pesquisas sobre a hipoalgesia após administração de coxibes, quanto os efeitos antineoplásicos, antimigratórios e de controle de sintomas do mal de Alzheimer, relacionam-se a funções celulares, como trânsito de vesículas, plasticidade sináptica, proliferação celular e alterações na conformação de membranas. Logo, os efeitos observados com o uso dos coxibes podem estar relacionados a várias funções conhecidas dos diferentes componentes do citoesqueleto (Prekeris *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 1999; Kundu *et al.*, 2002; Minter *et al.*, 2002; Kulp *et al.*, 2004; Soltani *et al.*, 2005; Szekely *et al.*, 2007).

A modulação da transdução sensorial e da sinalização intracelular que leva à redução do limiar nociceptivo após lesão tecidual ou neural são questões fundamentais para o esclarecimento dos mecanismos nociceptivos e antinociceptivos, e se relacionam diretamente a funções do citoesqueleto. Ainda hoje existe um “lapso” na compreensão integral da interação entre as vias de sinalização de reparo tecidual e antinocicepção, não apenas na nocicepção aguda, mas também na manutenção e refinamento do estado de hipersensibilização crônica (Dina *et al.*, 2003; Gordon-Weeks, 2004). Dina *et al.* (2003) examinaram como o citoesqueleto pode modificar a cascata de sinalização intracelular ativada por uma lesão tecidual local, usando um interessante modelo de “pré-sensibilização”. Neste modelo, as patas posteriores de ratos foram inicialmente inflamadas com carragenina (CG) e após um período de recuperação, foram injetadas com PGE₂. Após tal “pré-sensibilização”, a hiperalgesia causada pela PGE₂ tornou-se prolongada e seu mecanismo de ação se converteu de ativação apenas da enzima fosfoquinase A (PKA), para

dependente da ativação de PKA, PKC ϵ , e ERK1/2, como ocorre na hiperalgesia causada pela epinefrina ou pela CG. Porém, o ponto crucial deste estudo foi a constatação que a pré-medicação com modificadores de citoesqueleto evita o prolongamento da hiperalgesia causada pela PGE₂, demonstrando que as modificações de cascatas de sinalização secundária dependem do funcionamento do citoesqueleto (Dina *et al.*, 2003).

Paralelamente aos estudos de Dina *et al.* (2003), diversos estudos já consagraram a colchicina, um inibidor de microtúbulos, como tratamento para fase aguda da gota, uma forma de artrite dolorosa. O mecanismo de ação conhecido deste tratamento é baseado no fato de a disfunção de microtúbulos causada pela colchicina inibir a quimiotaxia e a fagocitose de leucócitos, associados à redução da síntese e liberação de leucotrienos no local (revisado em Emmerson, 1996). Entretanto, após o tratamento, os escores de dor se reduzem antes dos escores clínicos relacionados à inflamação articular (Ahern *et al.*, 1987; Das *et al.*, 2002). A combinação destas informações sugere que a colchicina pode também atuar diretamente no sistema nervoso, modificando a sinalização pós-sináptica dos neurônios sensitivos e reduzindo sua resposta aos mediadores inflamatórios já produzidos nas articulações inflamadas e facilitando a ação de AINEs.

Com estes fatos, a possibilidade de modificações na sinalização secundária intracelular, via citoesqueleto, após lesão tecidual pode constituir uma conexão, na ação de coxibes e no papel preventivo de AINEs sobre a conversão de um estado de dor aguda em dor crônica (Bhave & Gereau, 2003). Atualmente, apenas os efeitos anticarcinogênicos do celecoxibe foram relacionados a mecanismos moleculares claramente independentes da sua atuação sobre a COX-2 (Grösch *et al.*, 2006). Mais recentemente, nossos estudos farmacológicos demonstraram que a ação analgésica central do celecoxibe independe de

sua ação sobre a COX-2 (Rezende *et al.*, 2009). Estes mesmos mecanismos de ação podem também estar envolvidos no efeito destes fármacos sobre a resposta inflamatória periférica, explicando o efeito hipoalgésico.

Com base nestas observações, formulou-se uma hipótese de que a hipoalgesia causada pelo celecoxibe depende da participação de componentes do citoesqueleto para a ativação da resposta antinociceptiva endógena.

9. Modulação da resposta nociceptiva e a participação do citoesqueleto

O estímulo nociceptivo periférico causa disparos do potencial de ação em neurônios sensitivos primários, levando à transmissão da informação nociceptiva até o corno dorsal da medula espinhal (Bolay & Moskowitz, 2002). Na medula, este sinal leva à ativação de neurônios secundários, os quais ascendem pela medula (formando os tratos espinotalâmico e espinoreticular) até o tálamo, onde fazem sinapse com neurônios terciários, os quais, por sua vez, conduzem o sinal nociceptivo até o córtex somatossensorial, onde, finalmente, é percebido como uma sensação (nocicepção) relacionada a estímulo inicial (Millan, 2002; Schaible, 2007).

Para que este processo se inicie é necessária a sensibilização de nociceptores através da liberação periférica aguda de vários mediadores endógenos em resposta a um estímulo lesivo (revisado em Hucho & Levine, 2002). Tais mediadores liberados no sítio inflamatório atuam sobre receptores expressos nas membranas dos nociceptores, induzindo cascatas de ativação intracelulares e modificações moleculares que modulam, por exemplo, a função de canais iônicos, através dos quais ocorre a despolarização celular e consequentemente a tradução do estímulo inicial químico em potencial elétrico a ser propagado pelos neurônios sensitivos periféricos (Aley *et al.*, 2000; Julius & Basbaum,

2001; Woolf & Ma, 2007). Entretanto, de forma paralela, o mesmo estímulo nocivo inicial determina a ativação do sistema antinociceptivo endógeno que refreia a resposta hiperalgésica aguda causada pelo estímulo inicial (Brack *et al.*, 2004a; 2004b). A resposta antinociceptiva endógena é composta pela ativação dos sistemas opioidérgico e canabinoidérgico, tanto periférica quanto centralmente (Millan, 2002; Gutierrez *et al.*, 2007; Labuz *et al.*, 2007) e demonstrou-se anteriormente sua participação no efeito analgésico de diferentes AINEs (Vanegas & Tortorici, 2004; França *et al.*; 2006; Crawley *et al.*, 2008; Rezende *et al.*, 2008). Detalhes moleculares e temporais da ativação dessas cascatas intracelulares permanecem obscuros, especialmente, no que tange suas interações após ativação concomitante de vários receptores os quais induzem respostas antagônicas (Cabot *et al.*, 1997; Kozak *et al.*, 2002; Brack *et al.*, 2004a; Cunha *et al.*, 2008).

Notadamente, a resposta antinociceptiva endógena depende de alterações estruturais de componentes do citoesqueleto que levam ao transporte e a expressão de receptores nas membranas neuronais (Triller & Choquet, 2003) e especialmente à plasticidade da membrana neuronal (Planas *et al.*, 1994; Kozak *et al.*, 2002; Puehler *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2005). Interessantemente, a administração aguda de morfina é capaz de alterar a expressão gênica de várias proteínas implicadas na transdução de sinais, como por exemplo, proteínas G acopladas a receptores opióides (Fan *et al.*, 2002, 2003; Kaewsuk *et al.*, 2001; Przewlocka *et al.*, 1994). De forma especial, Habershtock-Debic *et al.* (2003) demonstraram a supra-regulação da síntese e da expressão de receptores opióides após a administração de morfina. Entretanto, as alterações transcricionais mais marcantes induzidas pela morfina recaem sobre o grupo de proteínas relacionadas ao citoesqueleto (Loguinov *et al.*, 2001; Marie-Claire *et al.*, 2004).

10. Estrutura e funções do citoesqueleto

Todas as células eucarióticas contêm filamentos protéicos organizados em feixes, redes ortogonais ou treliças, os quais determinam aspecto citosólico similar a um gel. Estes filamentos formam o citoesqueleto, que sofre rearranjos constantes, orientando o trânsito de organelas e alterando o estado fluídico do citosol, conferindo flexibilidade e sustentação à célula, permitindo que esta assuma várias formas facilmente (revisado em Lodish *et al.*, 2003; Fletcher & Mullins, 2010).

O citoesqueleto é composto por microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos, divididos de acordo com diâmetro, arranjo e tipo de subunidade. A maioria das células possui os três tipos de filamentos, geralmente encontrados em regiões distintas e com funções complementares (revisado em Brinkley, 1997; Lodish *et al.*, 2003).

Os microfilamentos são polímeros de subunidades monoméricas de G-actina unidas por ligações não-covalentes. A união de várias subunidades forma filamentos polares helicoidais (F-actina) que estão constantemente se encurtando e alongando, formando e dissolvendo feixes e redes no citosol (Letourneau, 2009). Normalmente há uma zona estreita logo abaixo da membrana plasmática, rica em microfilamentos organizados em rede, a qual impede a permanência de organelas na periferia do citoplasma (Lauffenburger, 1996; Stricker *et al.*, 2010).

A polimerização dos microfilamentos e sua direção de formação são coordenadas por várias proteínas citoplasmáticas, sinalizadas principalmente por alterações na membrana (Letourneau, 2009). A timosina B4 inibe a polimerização da G-actina, enquanto a profilina age promovendo adição de um fosfato ao ADP do domínio de ligação da actina, tornando-a mais ávida à polimerização. A organização em filamentos simples, feixes ou

redes é determinada por proteínas de interligação da actina (como fimbrina e filamina), a ramificação dos feixes se dá pela ligação a proteínas relacionadas à actina (Arps - *Actin related proteins*), e o comprimento dos filamentos é controlado por proteínas cortadoras (gelsolina e cofilina). Outra função das redes de microfilamentos é servir de trilho para o deslocamento de vesículas carregadas pela miosina. Para que ocorra o movimento ou crescimento celular, o estado organizacional destas proteínas orienta a formação de uma extensão da membrana celular a partir da margem de direção sinalizada pela membrana (lamelipódios ou pseudópodos), que adere ao substrato e arqueia a célula para frente com a projeção do citoplasma, coordenando a locomoção da célula (revisado em Lodish *et al.*, 2004 e Dominguez, 2009).

Os filamentos intermediários são formados por agregados de uma grande família de proteínas, como por exemplo, lamininas, desminas e vimentina. Estes filamentos formam uma intrincada rede ortogonal que dá suporte mecânico à membrana nuclear e conecta células, através da formação de junções comunicantes (*gap junctions*) intercelulares (Herrmann *et al.*, 2009).

Subunidades diméricas de α - e β - tubulina se polimerizam formando protofilamentos que se organizam, concentricamente, em microtúbulos. Os microtúbulos mostram uma instabilidade dinâmica em seu comprimento e em suas interligações a outras estruturas, dependente da temperatura e da ação de proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs – *Microtubule Associated Proteins*). As MAPs constituem um grande número de proteínas que influenciam a montagem e a estabilidade dos microtúbulos, e são classificadas em dois grupos de acordo com sua função (Brinkley, 1997). As MAPs estabilizadoras têm um domínio que se liga à porção C-terminal, carregada negativamente

da tubulina, neutralizando-a e conseqüentemente estabilizando o polímero. O outro domínio destas proteínas pode se ligar a membranas, filamentos intermediários ou outros microtúbulos (Al-Bassam *et al.*, 2006). O segundo grupo de MAPs desestabilizam os polímeros diretamente, como por exemplo, a catanina, capaz de cortar o filamento por um processo ATP-dependente (Dehmelt *et al.*, 2003; Goold & Gordon-Weeks, 2005, Conde & Cárcere, 2009).

Os microtúbulos são responsáveis por alguns movimentos celulares, como transporte de vesículas no citoplasma, alinhamento e separação de cromossomos na divisão celular, orientando a extensão do cone neural de crescimento (revisado em Lodish *et al.*, 2004). A regulação destas funções é feita através de MAPs, sinalizadas por várias enzimas (MAP-quinases), mas seus mecanismos ainda não foram totalmente elucidados.

As MAP2c são as menores e mais abundantes MAPs em neurônios, e recentemente foi sugerida a possibilidade de sua ligação tanto a microtúbulos como a microfilamentos pelo mesmo domínio de ligação, após a ação de algum fator intracelular desconhecido (Roger *et al.*, 2004; Gordon-Weeks, 2004). Interessantemente, uma relação entre MAP2c e a gênese de tumores tem sido apontada, como a relatada super-expressão em células cancerígenas pré-malignas (Cunningham *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 2001). Soltani *et al.* (2005) demonstraram o potencial desta proteína em induzir defeitos mitóticos com conseqüente inibição de crescimento em células de melanoma cutâneo. Segundo estes estudos, algum fator enzimático intracelular poderia ser capaz de modular a atuação da MAP2c, fazendo com que ora se ligue a microtúbulos, ora a microfilamentos, orientando suas funções tanto em neurônios quanto em células tumorais.

Muitas das funções do citoesqueleto estão, de certa maneira, relacionadas a efeitos observados pelo uso de inibidores seletivos de COX-2. Por exemplo, a hiperalgesia depende do transporte de vesículas contendo neurotransmissores, realizado por microtúbulos nos nociceptores. A demonstrada ação inibitória de coxibes sobre a migração de leucócitos (Muscara *et al.*, 2000; Menezes *et al.*, 2005) depende da polimerização de microfilamentos de actina para a formação de lamelipódios e pseudópodos, que orientam a movimentação celular (Lodish *et al.*, 2004). Os efeitos antineoplásicos e antimetastáticos dos coxibes também estão relacionados com a formação dos “spindles” (fusos) orientada por microtúbulos durante a divisão celular, que promove a proliferação das células (Brinkley, 1997; Altorki *et al.*; 2003). Experimentos de transfecção de genes demonstraram que a polimerização filamentosa aberrante da uma MAP denominada Tau (estruturalmente muito semelhante à MAP2c) está ligada a doenças neurodegenerativas, como a demência. Pacientes com Alzheimer são beneficiados pela ação dos coxibes justamente nos sintomas de demência mental (Nivsarkar *et al.*, 2004; Soltani *et al.*, 2005).

Mais recentemente, alguns estudos mostraram uma relação entre mecanismos intracelulares neuronais regulados por componentes do citoesqueleto e a sensibilização e transdução nociceptiva envolvidas na dor inflamatória (Aley *et al.*, 2000; Dina *et al.*, 2003). Dina *et al.* (2003) mostraram que inibidores de componentes do citoesqueleto atenuaram a hiperalgesia induzida por epinefrina, mas não pela PGE₂. No mesmo trabalho, os autores demonstraram que os segundo mensageiros intracelulares: quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e proteína-quinase C *epsilon* (PKC_ε), dependem da integridade do citoesqueleto para sua atuação.

Uma relação entre citoesqueleto e dor crônica foi também estabelecida com a observação da rápida despolimerização de microtúbulos após a ativação de TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid type 1*) (Goswami *et al.*, 2006 e 2008), um canal catiônico não seletivo envolvido na cronificação de processo dolorosos (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Goswami *et al.*, 2009) Apesar disso, o envolvimento do citoesqueleto e as vias de sinalização na resposta nociceptiva periférica ainda permanece obscuro.

OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos de ação envolvidos na indução de hipoalgesia após administração de celecoxibe, verificando um possível envolvimento de componentes do citoesqueleto e dos sistemas opióide e canabinóide.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a intensidade, o tempo de administração e a dependência do modelo hiperalgésico para indução de hipoalgesia pelo celecoxibe;
2. Verificar o envolvimento periférico de componentes do citoesqueleto na hipoalgesia induzida pelo celecoxibe e pela morfina;
3. Comparar a seletividade do envolvimento de microfilamentos no efeito hipoalgésico do celecoxibe com outros inibidores ciclooxigenases;
4. Avaliar a participação da β -endorfina na hipoalgesia induzida perifericamente pelo celecoxibe; através da marcação imuno-histoquímica;
5. Comparar a intensidade do efeito analgésico causado pela administração periférica de diferentes compostos. OSU03012 (análogo do celecoxibe sem ação em COX-2), β -endorfina (agonista opióide) e agonistas de receptores canabinóides do tipo CB₁ (ACEA) e CB₂ (JWH015);

MATERIAIS E MÉTODOS

10. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman, machos, pesando entre 170 e 200 gramas provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Cebio-ICB/UFMG) e alojados em grupos de quatro ou cinco animais em caixas plásticas forradas com maravalha autoclavada. Ração comercial e água foram fornecidas *ad libitum*.

Três dias antes da realização dos experimentos, os animais foram ambientalizados na sala de experimentação do Laboratório de Inflamação e Dor (Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ICB/UFMG), em condições de temperatura (23 a 25°C) e luminosidade (12 horas de luz/dia) controladas. No dia anterior ao experimento, os animais foram submetidos ao manuseio e ao aparelho de avaliação da resposta nociceptiva de forma a mimetizar as condições do dia de experimento.

Todos os procedimentos obedeceram às normas propostas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 180/07).

11. Tratamentos Farmacológicos

Imediatamente antes da administração das drogas, suas formulações comerciais foram pesadas e as suspensões ou soluções foram preparadas com base na quantidade (peso em mg) da substância ativa descrita pelo fabricante. Aos animais dos grupos controle foi administrado veículo no mesmo volume, via e tempo dos tratamentos experimentais.

Os nomes químicos de algumas drogas utilizadas no estudo estão listados no anexo 3.

Foram utilizadas as seguintes ferramentas farmacológicas:

- Agentes hiperalgésicos: carragenina (CG; 250 µg, i.pl.) e prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg, i.pl.);
- Inibidores seletivos de COX-2: celecoxibe (CX; 12 mg/kg, s.c. ou 30, 100 e 300 µg, i.pl.) e SC236 (12 mg/kg, s.c.);
- Inibidor seletivo de COX 1: SC560 (5 mg/kg, s.c.);
- Inibidores não seletivos de COX: indometacina (Indo; 4 mg/kg, s.c.), paracetamol (Par; 360 mg/kg, s.c.) e dipirona (DIP; 360 mg/kg, s.c.);
- Agonistas opióides: morfina (MORF; 2 mg/kg, s.c.) e β-endorfina (β-end; 0,05 a 2 µg, i.pl.);
- Inibidores da função de microtúbulos: nocodazol (NDZ; 1 e 10 µg, i.pl.) e colchicina (CCC; 0.8 e 8 µg, i.pl.);
- Oligonucleotídeo antisense: anti-MAP2c (20 µg/dia, intratecal (i.t.) por 4 dias) e controle (“*Mismatch*”);
- Inibidores da função de microfilamentos: latrunculina B (LB; 0,0005 a 5 µg, i.pl.) e citocalasina B (CTB; 0,001 a 1 µg, i.pl.);
- Inibidor de filamentos intermediários: acrilamida (ACD; 0,1 a 10 µg, i.pl.);
- Antagonistas opióides: naltrexona (NTX; 50 µg, i.pl.) e naloxona metiodida (NLXm; 50 µg, i.pl.);
- Análogos do celecoxibe: OSU03012 (OSU; 30 a 100 µg, i.pl.) e araquidonoil-celecoxibe (AA-CX; 50 a 300 µg, i.pl.);

- Agonistas canabinóides CB₁: ACEA (6 a 60 µg, i.pl.); CB₂: JWH015 (JWH; 3,3 a 33 µg, i.pl.);
- Antagonista canabinóide CB₂: SR144528 (SR; 50 µg, i.pl.);

12. Fonte das drogas

As drogas SC560 e SC236 foram adquiridas da Cayman Chemical Company (EUA); o celecoxibe (Celebra[®]) da Pfizer Pharmaceuticals (Porto Rico); a morfina da Merck AG (Alemanha); os oligonucleotídeos da Bioneer (EUA); As demais drogas, citadas no item 2 desta seção, foram compradas da Sigma-Aldrich (EUA). O SR144528 foi gentilmente doado pela Sanofi-Recherche (França).

13. Administração intratecal

Os oligonucleotídeos foram administrados por via intratecal, para isso, os animais foram anestesiados com máscara de isoflurano até a imobilização. Após perda do reflexo de retirada da cauda, a porção lombar da coluna vertebral foi discretamente flexionada com auxílio de um tubo falcon (50 ml) posicionado abaixo do abdome do animal que foi mantido na posição horizontal sobre a bancada, com o dorso voltado para o experimentador. Uma agulha de 30 G acoplada a uma seringa Hamilton de 50 µl foi introduzida, em uma angulação de aproximadamente 45°, no forame entre as vértebras L4 e L5. Após a agulha atingir o espaço intratecal, 20 µl do tratamento foi cuidadosamente administrado. Os protocolos de administração dos oligonucleotídeos e de exérese dos gânglios da raiz dorsal estão descritos a seguir no item **8 d** desta seção.

14. Estímulo hiperalgésico

A carragenina λ foi esterilizada sob luz ultra-violeta por 30 min e solubilizada em solução salina estéril na concentração de 250 μg por 0,1 ml (2,5 g/ml). A solução foi armazenada sob refrigeração (aproximadamente 8°C) por no máximo 4 dias antes do uso.

Os animais tiveram a pata direita injetada, por via intraplantar, com a solução de carragenina, e a pata esquerda injetada com o mesmo volume de veículo (0,1 ml de salina). Em alguns estudos, a prostaglandina E_2 (PGE_2 ; 2 μg em 0,1 ml de salina) foi utilizada como agente hiperalgésico para comparação.

O momento de injeção do estímulo nociceptivo foi considerado como tempo zero (T_0) em todos os protocolos experimentais empregados na avaliação de respostas *in vivo*.

15. Avaliação da resposta nociceptiva

A resposta nociceptiva foi avaliada pelo método de compressão progressiva da pata proposto por Randall & Selitto (1957). Este método consiste na mensuração da força (em g) necessária à deflagração da resposta comportamental de nocicepção em ratos, geralmente reconhecida como retirada da pata do aparelho.

Para isto, o animal foi colocado em estação à frente do algesímetro¹ e uma das patas traseiras foi, então, flexionada caudalmente e apoiada sobre a base do aparelho, após acionamento do pedal a intensidade de pressão aumenta à velocidade constante de 32 g/s. Ao se observar o reflexo de retirada da pata (resposta nociceptiva), o valor da pressão que evocou a resposta (em gramas) foi anotado. Para evitar lesões por compressão, foi estabelecido um peso limite máximo de 300 g como ponto de corte em cada avaliação. A

¹ Modelo 7200, Ugo-Basile, Itália

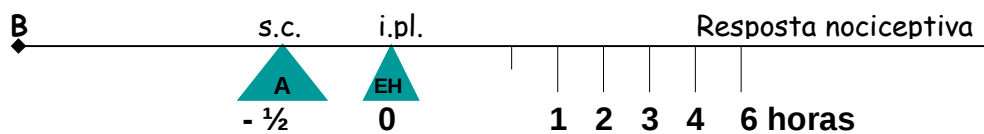
resposta nociceptiva foi avaliada antes dos tratamentos (resposta basal) e nos tempos: ½, 1, 2, 3, 4 e 6 h após a administração do estímulo hiperalgésico.

Nos animais que mostraram diferença significativa no valor da resposta nociceptiva em relação à resposta basal apenas nas patas inflamadas (efeito unilateral), a avaliação da intensidade da resposta nociceptiva (Δ limiar nociceptivo) foi expressa através da diferença entre o valor obtido (em g) em cada pata traseira, em cada tempo, pois este valor expressa melhor a real condição do animal em cada momento. Em animais apresentando respostas diferentes das iniciais em ambas as patas (efeito bilateral), a intensidade do limiar nociceptivo foi expresso separadamente (em g) em cada pata.

16. Protocolos experimentais

a. Intensidade de efeito antinociceptivo

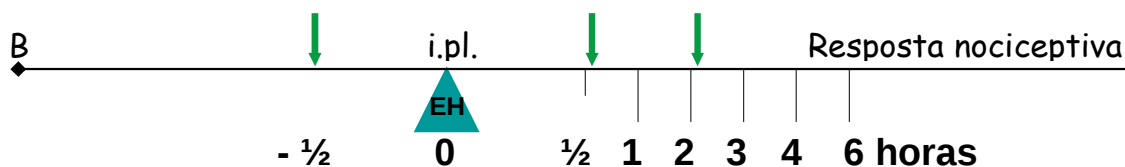
No estudo comparativo de intensidade de efeito antinociceptivo, diferentes compostos com reconhecida ação analgésica (celecoxibe, morfina, indometacina, dipirona, paracetamol, SC560, SC236) ou veículo foram administrados por via subcutânea, na região da cernelha do animal, ½ hora antes do estímulo hiperalgésico, induzido pela carragenina nas patas direitas, solubilizada em um volume constante de solução salina (0,1 ml). As patas esquerdas foram injetadas com o mesmo volume de solução salina (0,1 ml) (Esq. 1).



Esquema 1: Protocolo experimental geral empregado nos estudos do efeito de drogas analgésicas sobre a resposta nociceptiva. Após a medida basal (B), os compostos analgésicos (A) foram administrados $\frac{1}{2}$ hora antes do estímulo hiperalgésico (EH: CG na pata direita). Os animais dos grupos controle receberam o veículo do tratamento em igual volume e no mesmo momento.

b. Influência do tempo de administração sobre o efeito hipoalgésico do celecoxibe

Nos ensaios de efeito dependente do tempo de administração, os animais receberam o celecoxibe em diferentes tempos em relação ao estímulo hiperalgésico, sendo estes, $\frac{1}{2}$ hora antes, $\frac{1}{2}$ hora depois e 2 horas depois da injeção intraplantar de CG (Esq. 2).



Esquema 2: Protocolo experimental empregado para comparação do efeito do celecoxibe em diferentes tempos de administração. As setas mostram os tempos de administração subcutânea do celecoxibe. B: resposta nociceptiva basal; EH: estímulo hiperalgésico na pata direita: CG 250 μ g ou PGE₂ 2 μ g.

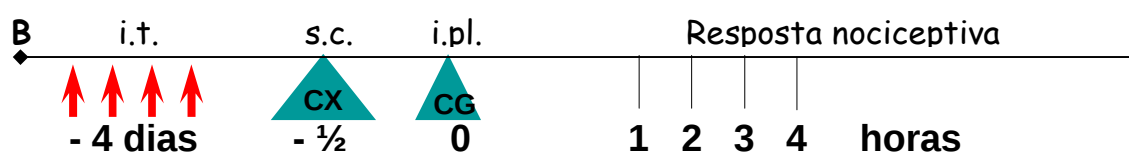
c. Experimentos com modificadores do citoesqueleto

Drogas que interferem na dinâmica de polimerização de cada componente do citoesqueleto foram administradas, por via intraplantar, $\frac{1}{2}$ hora antes do tratamento com celecoxibe ou morfina, que por sua vez foram administrados $\frac{1}{2}$ hora antes do estímulo inflamatório.

d. Experimentos com oligonucleotídeos *antisense*

O oligonucleotídeo *antisense* para MAP2c ou o controle *mismatch* foram injetados, por via intratecal, a cada 24 horas em 4 dias consecutivos. No quinto dia, as respostas nociceptivas basais foram obtidas e os animais receberam celecoxibe (12 mg/kg, s.c.) ou salina, ½ h antes da CG. A resposta nociceptiva foi obtida nos tempos 1, 2, 3 e 4 h (Esq. 3).

Após a última medida, os animais foram anestesiados com uma associação de xilazina e cetamina (2 e 100 mg/kg, respectivamente) e eutanasiados por deslocamento cervical imediatamente antes da exérese dos gânglios da raiz dorsal entre L4 e L6. O material coletado foi imediatamente exposto ao gelo seco para congelamento rápido e estocado em freezer -80°C até o processamento pela técnica de RT-PCR (*real time-polimerase chain reaction*). A avaliação da resposta nociceptiva foi realizada nos tempos 1, 2, 3 e 4 h após a CG. A técnica foi realizada no laboratório de Farmacologia da Inflamação e Dor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sob a orientação do Professor Dr. Carlos Amilcar Parada.

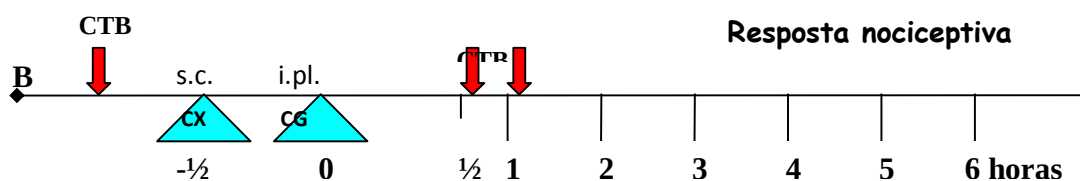


Esquema 3: Protocolo experimental empregado nos experimentos com oligonucleotídeo *antisense* (AS) para MAP2c, por via intratecal (i.t.). B: resposta nociceptiva basal; CX: celecoxibe, 12 mg/kg, s.c.; CG: carragenina, 250µg/ pata direita.

e. Caracterização do efeito da citocalasina B

Para verificação do efeito local, a CTB foi administrada na pata esquerda dos animais pré-tratados com CX os quais receberam estímulo hiperalgésico na pata direita. A resposta nociceptiva foi avaliada nos tempos 1, 2, 3, 4 e 6 horas.

Para se determinar o tempo de maior eficácia do tratamento com citocalasina, a CTB (1 µg, i.pl.) foi administrada ½ hora antes do tratamento com CX (12 mg/kg, s.c.) e após as mensurações dos tempos ½ e 1 hora após a CG (Esq. 4).



Esquema 4: Protocolo experimental realizado com diferentes tempos de administração da citocalasina B (CTB; 1 µg, i.pl.) e os tempos de avaliação de resposta nociceptiva. As setas indicam os diferentes tempos de injeção de CTB. Os animais dos grupos controle receberam o veículo do tratamento (salina ou DMSO <1%) em igual volume e no mesmo momento. B: resposta nociceptiva basal; CTB: citocalasina B, 1 µg/pata direita; CX: celecoxibe; 12 mg/kg, s.c.; CG: carragenina 250 µg/pata direita.

f. Seletividade do efeito da citocalasina B

Os animais deste grupo receberam injeções de CTB, ou salina, ½ hora antes da administração subcutânea de inibidores de COX (SC236, SC560, indometacina ou dipirona). Após outra ½ hora, foi realizada a administração de CG (250 µg, i.pl.). A resposta nociceptiva foi avaliada nos tempos 1, 2, 3, 4 e 6 horas.

g. Efeito da administração intraplantar de diferentes fármacos sobre a nocicepção

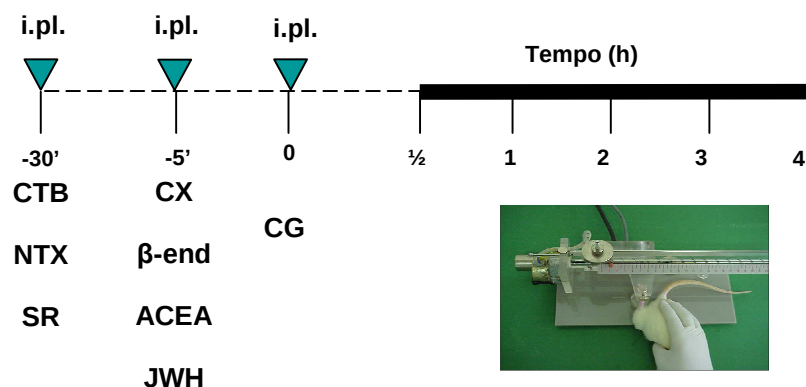
Os diferentes fármacos testados (celecoxibe, OSU03012, β -endorfina, ACEA e JWH015) tiveram suas ações analgésicas avaliadas através da administração intraplantar de diferentes doses, 5 min antes da CG e a resposta nociceptiva dos ratos assim tratados foi aferida nos tempos $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3 e 4 horas (Esq. 5).



Esquema 5. Protocolo experimental empregado na caracterização do efeito hipoalгésico induzido por administrações intraplantares de diferentes fármacos. F: fármacos. CG: carragenina.

h. Avaliação farmacológica da hipoalgesia induzida periféricamente

Para avaliação dos efeitos da citocalasina B, naltrexona e SR144582 sobre o efeito hipoalгésico induzido periféricamente, tais compostos foram administrados em volume de 50 μ l, 25 min antes dos fármacos referidos no item anterior, também injetados em volume de 50 μ l, 5 min antes da CG (Esq. 6). O volume total injetado nas patas foi de 200 μ l.



Esquema 6. Protocolo experimental empregado na avaliação dos efeitos do inibidor de microfilamentos (CTB) e dos antagonistas de receptores opióides (NTX) e canabinóide CB₂ (SR) sobre o efeito hipotalgésico induzido por administrações intraplantares de diferentes compostos analgésicos. CTB: citocalasina B; 1 µg; NTX: naltrexona, 50 µg; SR: SR144528, 50 µg; CX: celecoxibe; β-end: β-endorfina; JWH: JWH015; CG: carragenina.

17. Ensaio imuno-histoquímico para detecção de β-endorfina

Para avaliação do conteúdo de β-endorfina no citoplasma de queratinócitos do epitélio circunvizinho ao sítio de administração do estímulo hiperalgésico, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (descritos no item 8 desta seção):

- tratados com veículo ipl (Veic-Veic-Veic), carragenina ipl (Veic-Veic-CG);
- pré-tratados com CX por via sc ou ipl (Veic-CX-CG) ou com JWH ipl (Veic-JWH-CG);
- pré-tratados com SR144528 e CX (SR-CX-CG) ou CTB e CX (CTB-CX-CG);

Após a sequência de tratamentos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical nos tempos 30, 60 ou 120 minutos após a CG e, então, fragmentos dos tecidos moles da região plantar das patas direitas destes animais foram excisados. As amostras de tecido foram fixadas em solução formalina tamponada (pH 7,2) por 48 horas, lavadas em

água corrente, desidratadas, clarificadas e incluídas em blocos de parafina. Os blocos foram seccionados longitudinalmente com espessura de 4 μm , e os cortes colocados em lâminas cobertas com 2% 3-aminopropiltrietilsilana² para posterior processamento pela técnica de imuno-histoquímica, segundo protocolo modificado do descrito anteriormente por Caliari *et al.* (1997) e Pacheco *et al.* (2007).

A análise morfométrica das lâminas foi realizada com o emprego de microscópio de luz e de morfometria digital. As imagens foram obtidas em aumento de 40x, com auxílio do programa *easy-grab* por uma microcâmera JVC TK-1270/RGB³ acoplada ao microscópio. Posteriormente, a área de expressão de β -endorfina foi delimitada através da seleção da região imunomarcada e analisadas por meio do programa KS300⁴ contido no analisador de imagens Kontron Elektronik/Carl Zeiss® (Caliari *et al.*, 1997; Pacheco *et al.*, 2007).

Para cada animal foram capturadas e analisadas 16 imagens, perfazendo uma total de uma área total de 853.334,4 μm^2 de tecido analisado em cada caso. A área de marcação para β -endorfina foi calculada através da seleção dos pixels da marcação imuno-histoquímica na imagem real, com subsequente criação de uma imagem binária e processamento digital. Todas as medidas foram obtidas pelo programa KS300 do analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany). Para obtenção das médias foram utilizados de 6 a 9 animais por grupo experimental. A resposta foi avaliada de acordo com as médias e erros padrão de todos os valores assim obtidos em cada tempo. A expressão de β -endorfina foi expressa como o percentual da área imunomarcada em relação à superfície epitelial total anteriormente demarcada. A obtenção das imagens e as análises morfométricas foram

² Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA

³ Victor Company of Japan, Yokohama, Japão.

⁴ Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha.

realizadas por um experimentador que desconhecia os tratamentos aos quais os animais e amostras foram submetidos.

Todos os ensaios de morfometria digital foram realizados no Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob a orientação do professor Dr. Marcelo Vidigal Caliari.

18. Ensaio imuno-enzimático para detecção de β -endorfina no tecido plantar da pata de ratos

Para este ensaio, os animais foram divididos em grupos de 6 ou 8 animais, aos quais foram administrados diferentes fármacos (descritos em cada item).

Assim sendo, após a CG, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e tiveram suas patas lavadas com álcool 70%. O tecido plantar destes ratos foi excisado com o auxílio de um *punch* de 8 mm de diâmetro, pesado e incubado em 150 μ l de solução HBSS por 1 hora a 37°C em agitador para oxigenação das amostras. Após o período de incubação o tecido foi macerado e recolocado na solução. O material foi centrifugado e uma amostra de 50 μ l do sobrenadante foi separada e imediatamente usada para detecção dos níveis de β -endorfina utilizando um Kit comercial. Os resultados foram obtidos pelo método de EIA (*Peptide Enzyme Immunoassay*), e as amostras processadas de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (Península Laboratories, LLC - Bachem Group). Ao fim da reação imuno-enzimática, a concentração de β -endorfina foi determinada em leitor de ELISA (EL800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) a 450 nm. Os dados obtidos foram divididos pelo peso inicial da amostra de tecido plantar excisado e analisados nos programas Microsoft Office Excel 2003 e Prisma 4.

DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Os experimentos foram analisados pelo método de parcelas subdivididas, no qual as parcelas são os grupos de animais e sub-parcelas os tempos. As médias obtidas neste estudo foram comparadas entre os grupos experimentais e/ou entre os tempos pela análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas médias diferentes quando os valores de P foram menores que 0,05 ($P < 0,05$).

Como padrão de diferenciação entre médias foi usado os seguintes ícones:

*: diferente de hiperalgesia, isto é; diferente de Veic-CG ou Veic-PGE₂;

#: hipoalgesia, maior que zero (efeito unilateral) ou maior que resposta basal (bilateral);

**: diferente de hipoalgesia, isto é; diferente de CX-CG, MORF-CG, Par-CX, Dip-CG etc.

x: diferente de controle Salina ou Naive (não tratado);

RESULTADOS

RESULTADOS PARTE I

**Padronização dos efeitos do celecoxibe administrado sistemicamente nos modelos de
hiperalgesia - comparação com a morfina**

12. CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA HIPOALGÉSICA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE COMPOSTOS ANALGÉSICOS

Após experimentos de relação dose-efeito, a dose de 250 µg de carragenina foi escolhida como agente pró-nociceptivo padrão, pois, esta dose foi eficiente em induzir efeito hiperalgésico significativo nos tempos mensurados neste modelo (Gráf. 1). A escolha do celecoxibe (CX) como coxibe-padrão, e da dose a ser utilizada (12 mg/kg) no presente estudo foi orientada por trabalhos anteriores publicados pelo mesmo grupo de pesquisa (Francischi *et al.*, 2002; França *et al.*, 2006).

12.1. Padronização do estímulo hiperalgésico

A avaliação das respostas nociceptiva mostrou intensidades máximas entre 2 e 3 horas e seu caráter dose-dependente foi evidenciado. Os animais que receberam a menor dose (100 µg) mostraram redução no limiar de deflagração da resposta nociceptiva (em relação do grupo salina) nos tempos 2 e 3 horas. Os grupos que receberam 250 e 500 µg mostraram médias superiores às do grupo salina, e equivalentes entre si em todos os tempos mensurados na avaliação da resposta nociceptiva (Gráf. 1).

A dose de 250 µg de carragenina foi escolhida como padrão pró-nociceptivo para os experimentos subseqüentes por ter induzido efeito hiperalgésico significativo nos tempos mensurados neste modelo.

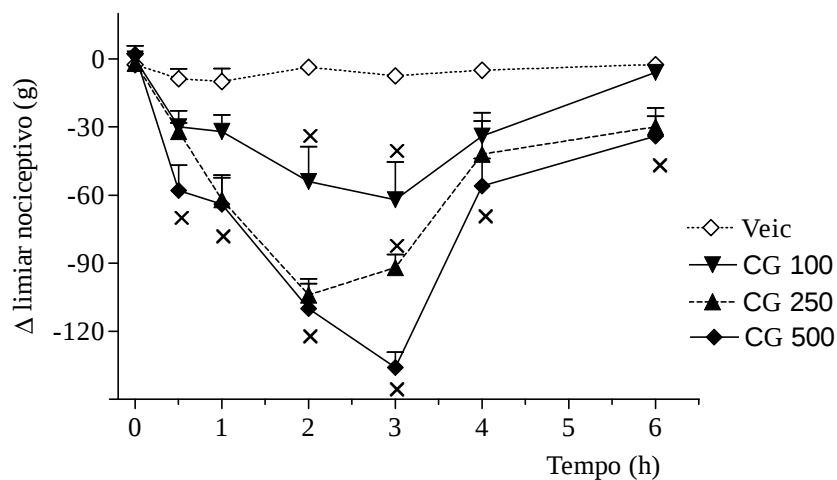


Gráfico 1. Efeito da administração intraplantar de diferentes doses de carragenina (CG; 100, 250 e 500 µg/pata) sobre o limiar nociceptivo em pata de ratos, avaliada em algesímetro de pressão. Veic: veículo salina. x: diferente de controle veículo (N= 7 a 9; $P < 0,05$).

12.2. Efeito analgésico de diferentes fármacos sobre a resposta nociceptiva

Para fim de reprodução de efeitos sobre a resposta nociceptiva anteriormente descritos em literatura, avaliou-se a influência do tratamento por via subcutânea com celecoxibe (CX; 12 mg/kg), SC236 (5 mg/kg), dipirona (Dip; 360 mg/kg), paracetamol (Par; 360 mg/kg) ou morfina (MORF; 2 mg/kg) sobre o limiar nociceptivo de ratos, no modelo de hiperalgesia induzida pela carragenina (CG; 250 µg, i.pl.). Todos os compostos elevaram o limiar de deflagração da resposta nociceptiva acima dos valores basais, causando hipoalgesia nas primeiras três ou quatro horas. Entretanto, animais tratados com CX, SC236 e Dip mostraram efeito hipoalgésico (Gráf. 2) apenas na pata inflamada, enquanto animais tratados com Par e MORF, mostraram efeito nas patas inflamada e não inflamada (Gráf. 3).

De forma diferente, no mesmo modelo, os grupos pré-tratados com indometacina (Indo; 4 mg/kg) ou SC560 (5 mg/kg) mostraram apenas efeito de restabelecimento do limiar nociceptivo aos níveis basais, isto é; equivalentes ao controle veículo (Veic-Veic), caracterizando o efeito anti-hiperalgésico causado por inibidores não seletivos de COX ou seletivos para COX 1 (Gráf. 4).

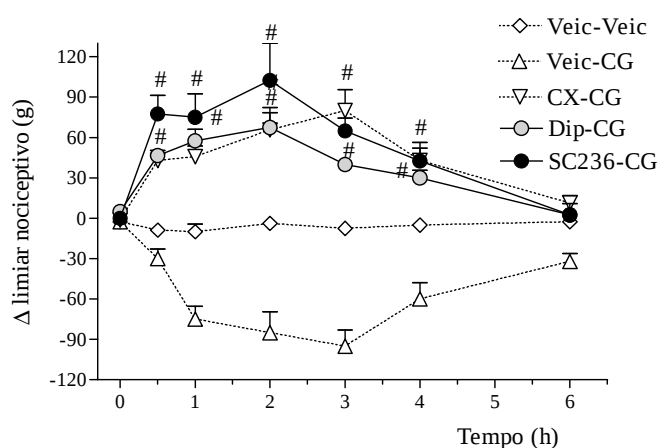


Gráfico 2. Efeito hipoalgésico unilateral (apenas nas patas inflamadas) causado pelo pré-tratamento com celecoxibe (CX; 12 mg/kg), SC236 (12 mg/kg) ou dipirona (Dip; 360 mg/kg) no modelo de hiperalgesia induzida por carragenina em pata de ratos. Os compostos analgésicos foram administrados, por via subcutânea, ½ h antes da carragenina (CG; 250 µg, i.pl.). Veic: salina. #: maior que zero (hipoalgesia) (N= 5-8; P < 0,05).

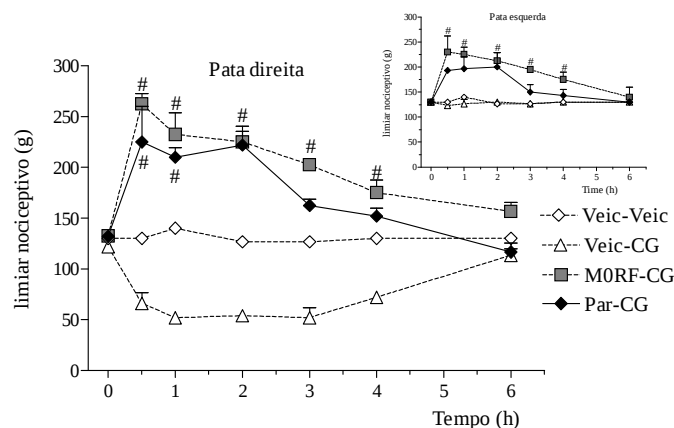


Gráfico 3. Efeito hipoalгésico induzido bilateralmente após administração sistêmica de morfina (MORF; 2 mg/kg) ou paracetamol (Par; 360 mg/kg) no modelo de hiperalgesia induzida por carragenina. Os compostos analгésicos foram administrados, por via subcutânea, ½ h antes da carragenina (CG; 250 µg, i.pl.). Veic: salina. #: maior que o valor basal; hipoalgesia (N= 5; P < 0,05).

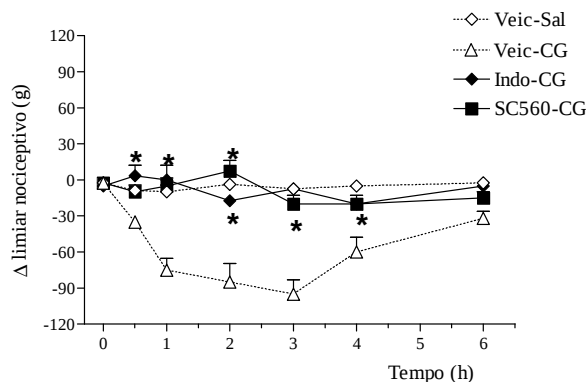


Gráfico 4. Efeito anti-hiperalгésico causado pela administração subcutânea de indometacina (Indo; 4 mg/kg) ou SC560 (5mg/kg) no modelo de hiperalgesia induzido por carragenina (CG; 250 µg, i.pl.). Indo e SC560 foram administrados ½ h antes da carragenina. Veic: etanol-tuin80-salina. *: diferente de Veic-CG (N= 5; P < 0,05).

12.3. Efeito do celecoxibe dependente do tempo de administração nos modelos de hiperalgesia induzida por carragenina ou prostaglandina E₂

Para melhor caracterizar o efeito hipoalgésico induzido por CX, procedeu-se o estudo tempo-efeito, no qual se observou que a administração de CX ½ hora após a CG, induziu efeito hipoalgésico semelhante ao padrão (pré-tratamento), nos tempos 1, 2 e 3 horas. Porém, quando administrado 1 h depois da CG, o CX mostrou apenas um efeito anti-hiperalgésico, e que a administração 2 h depois da CG causou apenas uma discreta redução da hiperalgesia induzida por CG (Gráf. 5 A). A administração de CX em animais que receberam apenas salina intraplantar não causou efeito sobre o limiar de deflagração da resposta nociceptiva no modelo estudado (Gráf. 5 A).

De forma diferente, quando a PGE₂ foi utilizada como estímulo hiperalgésico, apenas o pré-tratamento com CX foi capaz de causar efeito hipoalgésico. Este efeito observado foi de intensidade e duração menores quando comparados aos animais que receberam CG. Todos os ratos que receberam PGE₂, e foram pós-tratados com CX mostraram redução do limiar nociceptivo semelhante aos animais injetados apenas com veículo e CG, isto é, resposta hiperalgésica (Gráf. 5 B).

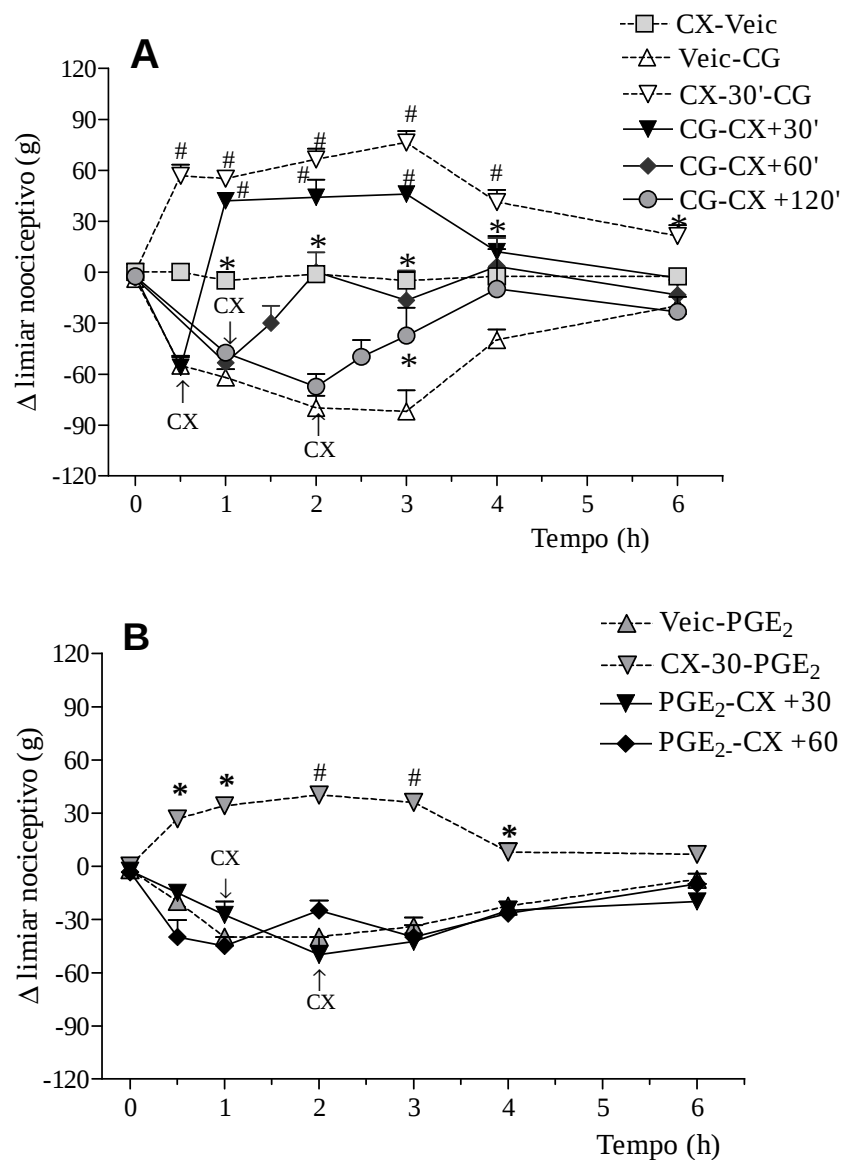


Gráfico 5. Efeito hipalgésico induzido por celecoxibe depende do tempo de sua administração e do modelo de indução de hiperalgesia utilizado. A administração do celecoxibe foi realizada ½ h antes ou ½, 1 e 2 horas após o estímulo hiperalgésico com carragenina (A) ou PGE₂ (B). Veic: etanol 2 %; CG: carragenina, 250 µg, i.pl.; PGE₂: prostaglandina E₂, 2 µg, i.pl.; CX: celecoxibe, 12 mg/kg, s.c. *: diferente de Veic-CG ou Veic-PGE₂. #: maior que zero (N= 7-9; P < 0,05).

13. PARTICIPAÇÃO DE COMPONENTES DO CITOESQUELETO NA RESPOSTA HIPOALGÉSICA

Após a confirmação do efeito hipoalgésico causado por CX e MORF, no modelo de hiperalgesia induzido pela CG, foram procedidos os experimentos para se verificar a participação de componentes do citoesqueleto neste tipo de resposta antinociceptiva.

13.1. Participação de microtúbulos na resposta hipoalgésica

13.1.1. Prevenção da hipoalgesia por inibidores da polimerização de microtúbulos

Para este estudo foram utilizados dois inibidores da polimerização de microtúbulos, o nocodazol (NDZ; 1 e 10 $\mu\text{g/pata}$ = 3,32 e 33,2 nmoles) e a colchicina (CCC; 0,8 e 8 $\mu\text{g/pata}$ = 2 e 20 μM), e ambos preveniram de maneira dose-dependente a hipoalgesia causada pelo CX (Gráf. 6 A e B). Entretanto, a administração local de CCC induziu apenas uma prevenção parcial do efeito da MORF sendo observado efeito anti-hiperalgésico nas primeiras 2 horas (Gráf. 7). Surpreendentemente, os animais tratados com CCC mostraram um efeito tardio de potencialização da hiperalgesia, ou seja; uma redução dos limiares nociceptivos abaixo do controle de hiperalgesia (Veic-CG) (Gráf. 6 B; 7 e 8). Nos ratos dos grupos controle salina a administração intraplantar isolada de NDZ ou CCC não alterou a resposta nociceptiva, porém, quando administrados 1 h antes da CG, o NDZ potencializou o efeito da CG no tempo 4 h, enquanto o pré-tratamento com 8 μg de CCC potencializou a hiperalgesia nos tempos 4 e 6 horas e ainda, prolongou tal hiperalgesia por mais de 8 h (Gráf. 8).

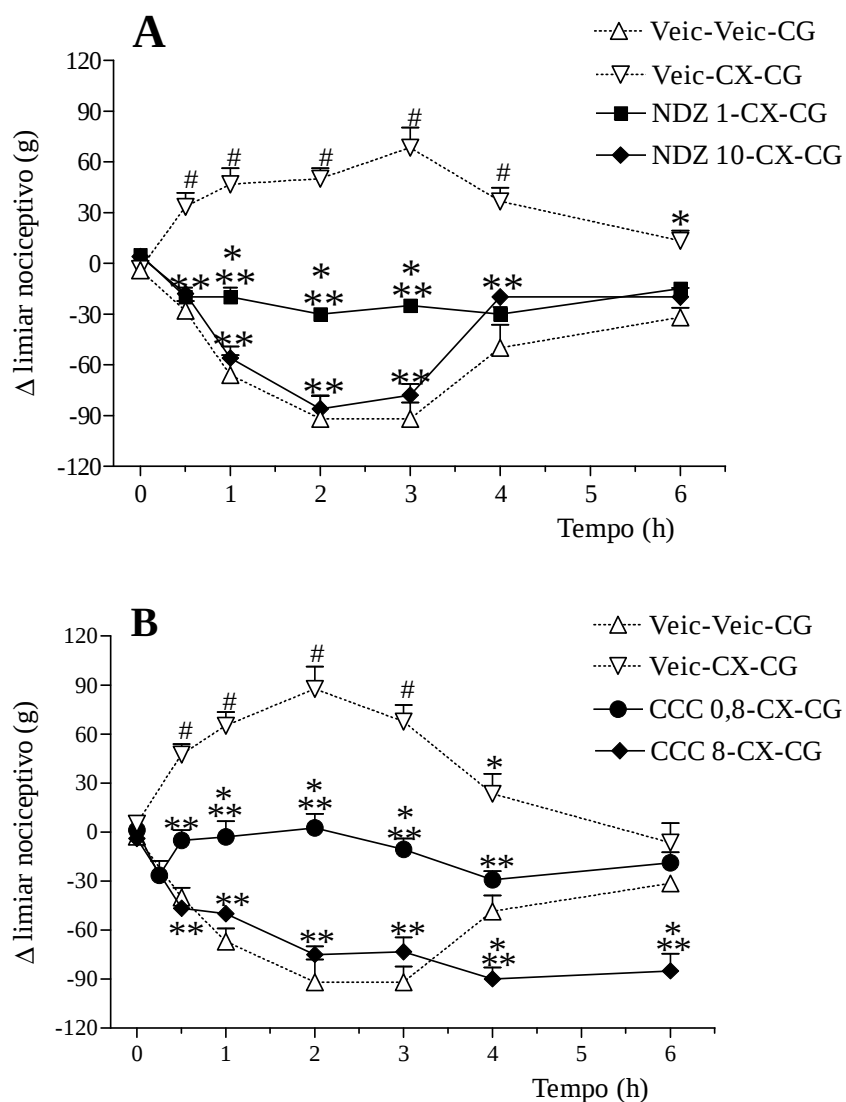


Gráfico 6. Prevenção total da hipoalgesia causada pelo CX após administração periférica de drogas modificadoras de microtúbulos. O nocodazol (NDZ; 1 e 10 μ g, i.pl.; A) e a colchicina (CCC; 0,8 e 8 μ g; B) foram administrados intraplantarmente $\frac{1}{2}$ h antes da injeção subcutânea de celecoxibe (CX; 12 mg/kg). Em todos os grupos a carragenina (CG, 250 μ g/pata) foi injetada por via intraplantar $\frac{1}{2}$ h após o celecoxibe. A pata contralateral recebeu apenas veículo. Veic: DMSO < 1%; *: diferente de Veic-CG, **: diferente de CX-CG; #: maior que zero; hipoalgesia (N=5; P < 0,05).

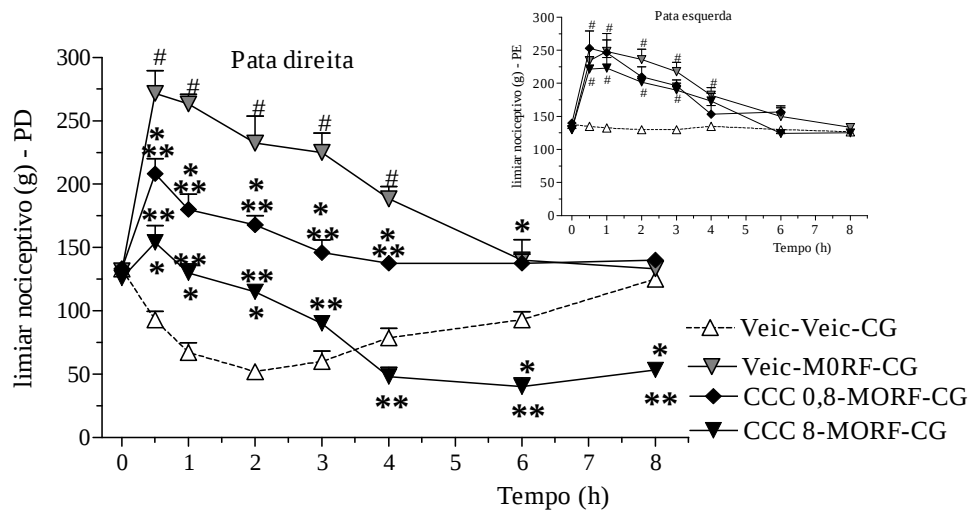


Gráfico 7. Efeito preventivo parcial da colchicina sobre o efeito analgésico induzido pela morfina. O prolongamento da hiperalgesia induzida por carragenina também é observado. O inserto mostra que a CCC não afetou a resposta hipoalgesica na pata esquerda, não inflamada. A colchicina (CCC; 0,8 e 8 μ g; B) foi administrada intraplantarmente $\frac{1}{2}$ h antes da injeção subcutânea de morfina (MORF; 2 mg/kg). Em todos os grupos a carragenina (CG, 250 μ g) foi injetada por via intraplantar $\frac{1}{2}$ h após a morfina. A pata contralateral recebeu apenas veículo. Veic: solução salina ou DMSO < 1%; *: diferente de Veic-CG, **: diferente de MORF-CG; #: maior que a resposta basal; hipoalgesia (N=5; P < 0,05).

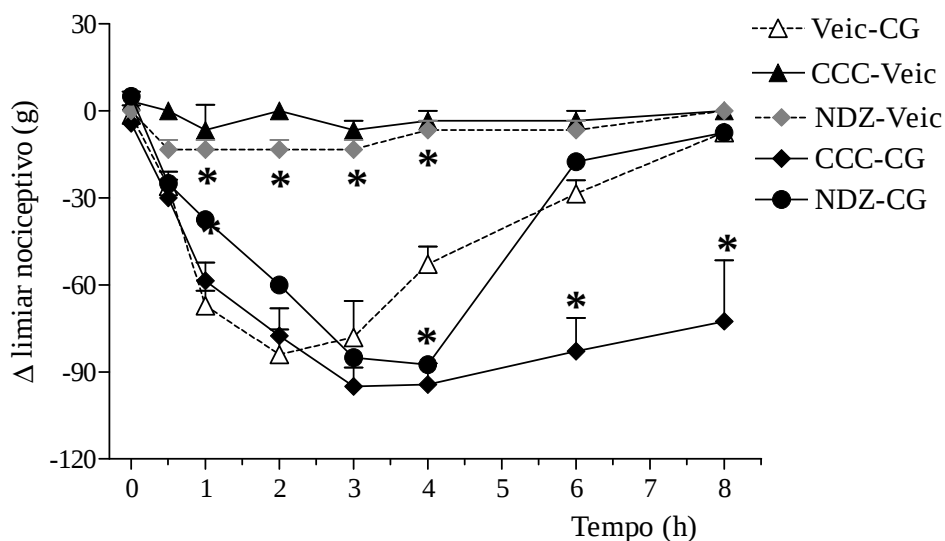


Gráfico 8. Efeito da colchicina ou nocodazol sobre a hiperalgesia induzida por carragenina. O nocodazol (NDZ; 10 µg) ou a colchicina (CCC; 8 µg) foram administrados intraplantarmente 1 h antes da carragenina (CG, 250 µg/pata). A pata contralateral recebeu apenas veículo. Veic: solução salina ou DMSO < 1%; *: diferente de Veic-CG (N=5; P < 0,05).

Os animais tratados com 8 µg de CCC e CG mostraram edema, hiperemia e eritema intensos. Tais efeitos foram observados a partir de 15 min após a injeção de CG e perduraram até 8h como apresentado na Figura 1. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ logo após a última medida de limiar nociceptivo (8 h), quando demonstravam sinais evidentes de hiperalgesia, eritema e edema nas patas direitas.



Figura 1. Aspecto macroscópico das patas dos ratos tratados intraplantarmente com colchicina e carragenina, no tempo 8 horas: hiperemia, eritema e edema. A colchicina (CCC; 8 μ g) foi administrada intraplantarmente 1 h antes da carragenina (CG, 250 μ g). A pata contralateral recebeu veículo. Veic: solução salina ou DMSO < 1%.

13.1.2. Ausência da participação da proteína associada a microtúbulo 2c (MAP2c) na resposta hipoalgésica induzida por celecoxibe

Como a MAP2c foi apontada como um possível fator de sinalização celular entre microtúbulos e microfilamentos e ainda para a proliferação tumoral e regulação de enzimas intracelulares (Chen *et al.*, 1992; Roger *et al.*, 2004; Goold & Gordon-Weeks, 2005), procurou-se determinar a influencia desta MAP sobre a resposta hipoalgésica induzida por CX. Assim, foi observado que a inibição da expressão de MAP2c através do pré-tratamento intratecal (Gráf. 9) com um oligonucleotídeo *antisense* contra MAP2c (20 µg/dia) por quatro dias consecutivos não causou efeito sobre a hipoalgesia induzida pelo CX ou sobre a hiperalgesia induzida por CG. Além disso, não foi observada diferença significativa entre o pré-tratamento com *antisense* e seu controle *mismatch* nos tempos mensurados. A inibição da expressão da proteína MAP2c pelo *antisense*, e não por seu controle, foi confirmada pela avaliação do percentual de inibição através da técnica de RT-PCR (*real time- polimerase chain reaction*) dos gânglios da raiz dorsal extraídos dos animais usados neste estudo logo após a última medida (4 horas) (Gráf. 10).

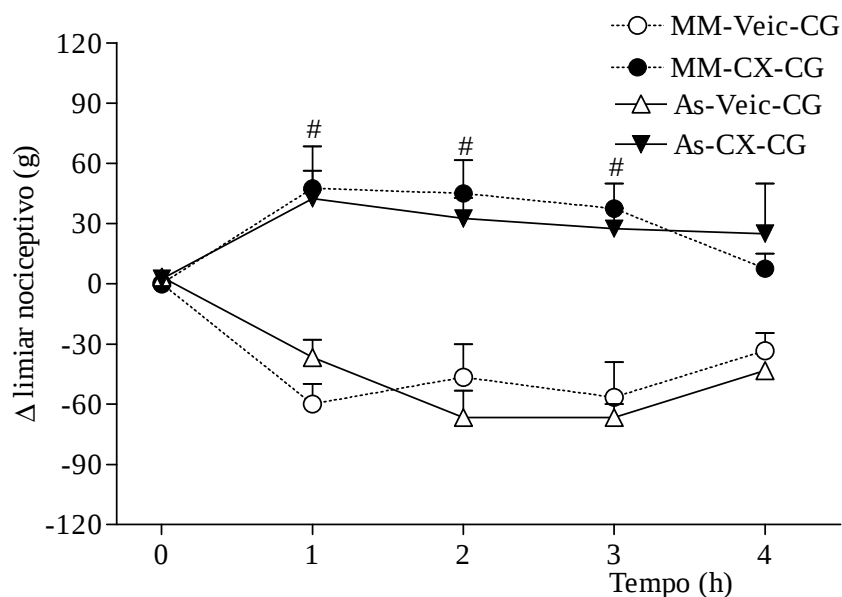


Gráfico 9. Ausência de efeito após administração intratecal de *antisense* anti-MAP2c ou controle (*mismatch*) sobre a resposta hipoalгésica causada por CX em ratos. O oligonucleotídeo *antisense* (As; 20 µg/dia) contra MAP2c ou seu controle *mismatch* (MM; 20 µg/dia) foram administrados intratecalmente por quatro dias consecutivos antes da avaliação da resposta nociceptiva mecânica em algesímetro de pressão. No dia da avaliação nociceptiva, o As e o MM foram administrados 1 h antes da injeção subcutânea de celecoxibe (CX; 12 mg/kg). Em todos os grupos a carragenina (CG, 250 µg/pata) foi injetada por via intraplantar ½ h após o celecoxibe. A pata contralateral recebeu apenas salina. #: maior que zero (N= 4-5; P < 0,05).

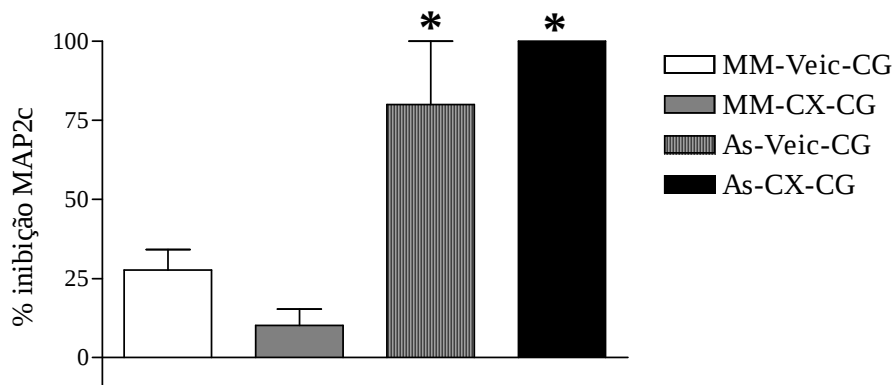


Gráfico 10. Inibição de MAP2c nos gânglios da raiz dorsal pelo antisense, avaliado pela técnica de RT-PCR (*real time- polimerase chain reaction*). Após a mensuração da resposta nociceptiva no tempo 4 h, os ratos avaliados no método de algesímetro de pressão, foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical. Os gânglios da raiz dorsal destes ratos foram extraídos e processados pela técnica de RT-PCR. MM: *Mismatch*, 20 µg/dia; As: *antisense*, 20 µg/dia; Veic: salina, i.pl.; CG: carragenina, 250 µg i.pl. *: diferente do controle MM-Veic-CG (N= 4-5; P < 0,05)

13.2. Ausência da participação de filamentos intermediários na resposta hipoalgésica

O pré-tratamento com diferentes doses de acrilamida (ACD; 0,1; 1 e 10 µg/pata = 14,1; 141 e 1410 nmoles), um inibidor de filamentos intermediários, não causou efeito sobre a resposta hipoalgésica causada por CX ou MORF (Graf. 11 A e B). A administração intraplantar prévia de 1 µg de ACD também não alterou significativamente os valores médios do limiar nociceptivo observado após a administração de salina ou CG (Gráf. 11 C). (A acrilamida usada neste estudo foi testada em ensaios paralelos que demonstraram que a droga estava ativa).

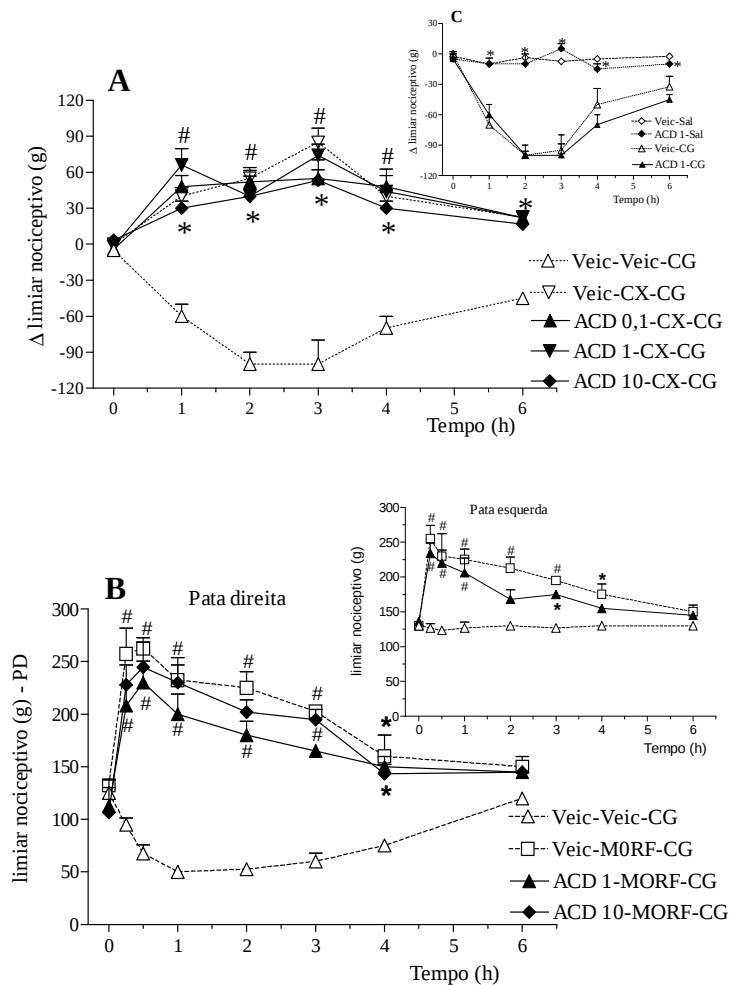


Gráfico 11. Ausência de efeito da administração intraplantar de acrilamida sobre a hipoalgesia induzida pelo celecoxibe (A) ou pela morfina (B). O inserto (C) mostra a ausência de efeito da acrilamida (1 µg, i.pl.) também sobre o limiar nociceptivo de ratos aos quais foi administrado, apenas salina ou apenas o estímulo hiperálgico. A ACD foi administrada intraplantarmente ½ h antes da injeção subcutânea de celecoxibe (CX; 12 mg/kg) ou morfina (MORF; 2 mg/kg). Em todos os grupos a carragenina (CG, 250 µg/pata) foi injetada por via intraplantar ½ h após o celecoxibe ou morfina. A pata contralateral recebeu apenas veículo. Veic: solução salina ou DMSO < 1%; ACD: acrilamida, 0,1; 1 e 10 µg, i.pl. *: diferente de Veic-CG; #: hipoalgesia (N= 5; P < 0,05).

13.3. Participação de microfilamentos na resposta hipoalgésica

O pré-tratamento intraplantar com inibidores da polimerização de microfilamentos, latrunculina B (LB; 5 ng a 500 ng = 0,012 a 12,6 nmoles) ou citocalasina B (CTB; 1 ng a 10 µg = 0,02 a 20 nmoles), preveniu de maneira dose-dependente a ação hipoalgésica causada pelo CX (Gráf. 12 A e B). As doses maiores inibiram completamente o efeito hipoalgésico. Diferentemente, um estabilizador da polimerização de microfilamentos, a faloidina (FD; 0,1 a 10 µg = 0,13 a 12,7 nmoles), não causou efeito sobre esta resposta hipoalgésica nas doses estudadas (Gráf. 13).

Nos tempos observados, os inibidores da polimerização de microfilamentos utilizados neste estudo não produziram alterações sobre a resposta nociceptiva de animais tratados apenas com veículo ou CG (Gráf. 12 C e D).

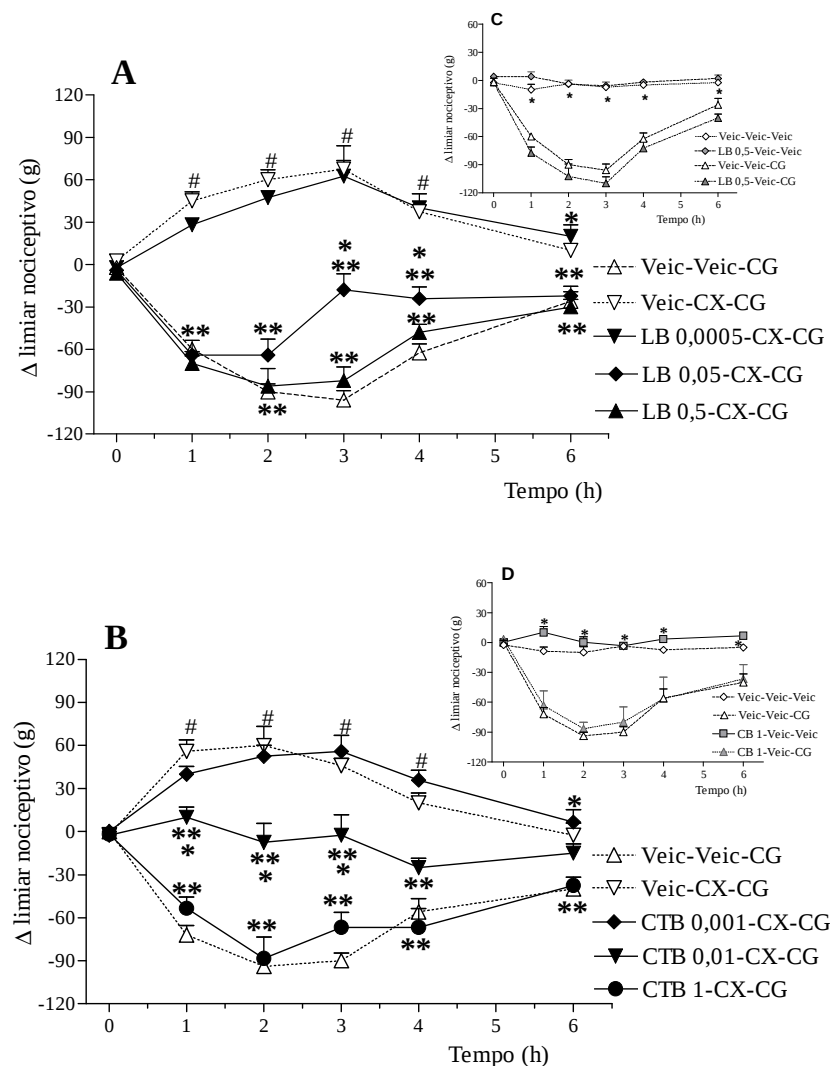


Gráfico 12. Prevenção dose-dependente da hipoalgesia causada pelo celecoxibe após administração intraplantar de inibidores da polimerização de microfilamentos. Em C e D: ausência de efeito de injeções isoladas ou em associação com carragenina (CG, 250 μ g), respectivamente de latrunculina B (LB; 0,0005; 0,05 e 0,5 μ g) ou citocalasina B (CTB; 0,001; 0,01; e 1 μ g). A LB ou CTB foram administradas intraplantarmente $\frac{1}{2}$ h antes da injeção subcutânea de celecoxibe (CX; 12 mg/kg). Em todos os grupos a CG foi injetada por via intraplantar $\frac{1}{2}$ h após o CX. Veic: salina. *: diferente de Veic-CG; **: diferente de CX-CG; #: hipoalgesia (N= 4 a 8; P < 0,05).

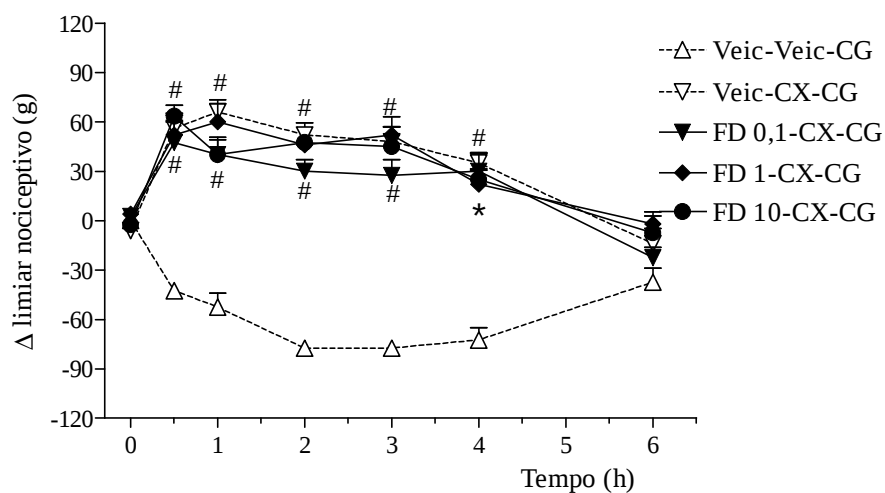


Gráfico 13. Ausência de efeito da administração intraplantar de faloidina sobre a hipotalgesia induzida pelo celecoxibe. A faloidina (FD; 1 μ g/50 μ l) foi administrada intraplantarmente $\frac{1}{2}$ h antes da injeção subcutânea de celecoxibe (CX; 12 mg/kg). Em todos os grupos a carragenina (CG, 250 μ g/100 μ l) foi injetada por via intraplantar $\frac{1}{2}$ h após o celecoxibe. A pata contralateral recebeu apenas veículo. Veic: DMSO <1 %. *: diferente de Veic-CG (N= 5; P < 0,05).

A dose de CTB (1 μ g) necessária para prevenção total da hipoalgesia induzida por CX, causou apenas prevenção parcial do efeito analgésico induzido pela MORF, sendo então, observado um efeito anti-hiperalgésico entre os tempos ½ e 3 h (Gráf. 14). Doses maiores de CTB (10 e 20 μ g) não causaram aumento da ação inibitória desta droga sobre a hipoalgesia da MORF, ou seja; o efeito inibitório máximo exercido pela CTB sobre a hipoalgesia da MORF foi expresso pela dose de 1 μ g.

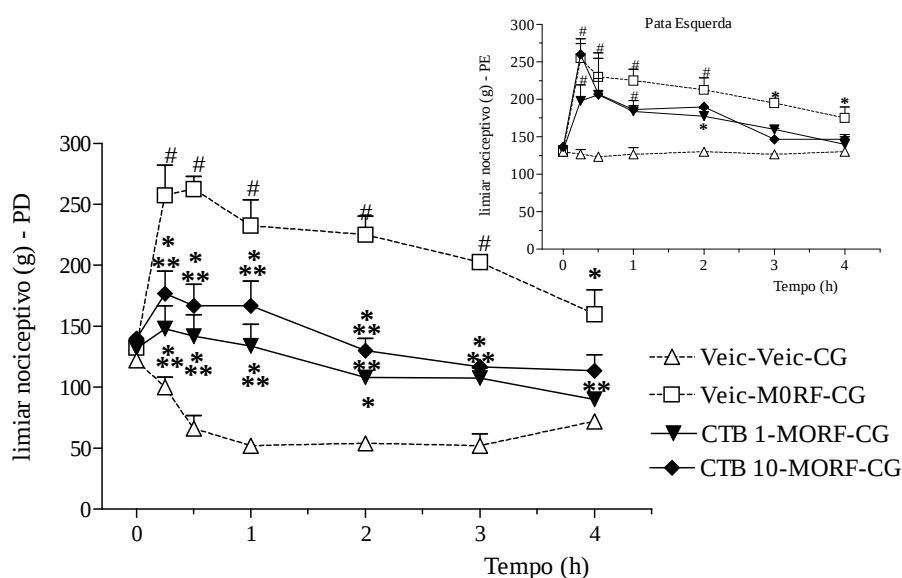


Gráfico 14. Inibição parcial do efeito analgésico induzido pela morfina causada pela administração intraplantar de citocalasina B. A citocalasina B (CTB; 1 e 10 μ g) foi administrada intraplantarmente ½ h antes da injeção subcutânea de morfina (MORF; 2 mg/kg). Em todos os grupos a carragenina (CG; 250 μ g) foi injetada por via intraplantar ½ h após a morfina ou veículo (Veic; DMSO < 1%). A pata contralateral recebeu apenas veículo. *: diferente de Veic-CG; **: diferente de MORF-CG (N= 5-6; P < 0,05).

13.4. Curva dose-efeito da participação de componentes do citoesqueleto na hipoalgesia

O gráfico 15 sumariza o efeito dos diferentes agentes inibidores da função do citoesqueleto sobre a hipoalgesia causada pelo CX no tempo 2 horas após a CG. Neste gráfico, os dados foram expressos em função logarítmica da dose em moles dos inibidores da função do citoesqueleto. A LB e a CTB foram mais eficazes em prevenir totalmente o efeito analgésico causado pelo CX do que os inibidores de microtúbulos como destacado pelo retângulo tracejado no gráfico. Para a comparação, os valores médios observados em animais tratados com CX+CG (hipoalgesia) ou Veic+CG (hiperalgesia) foram representados no gráfico como linha superior contínua e inferior tracejada, respectivamente.

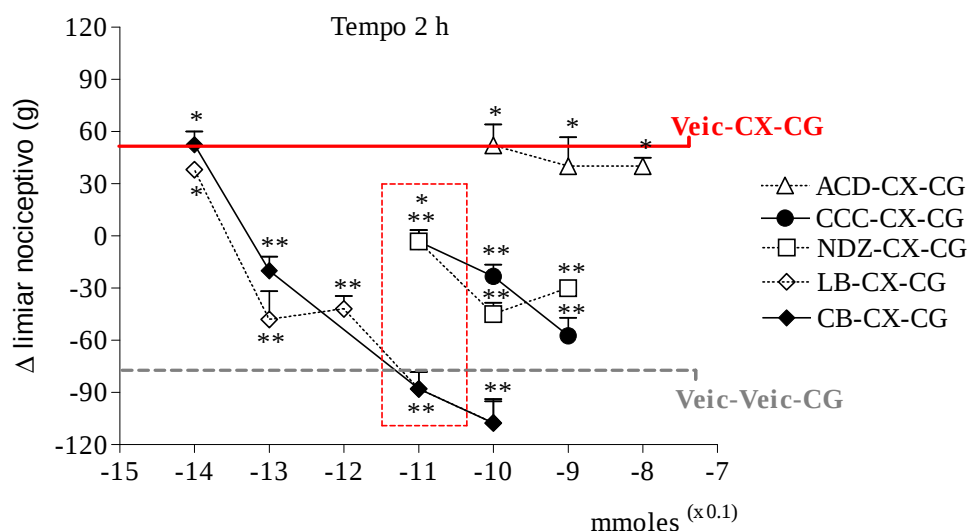


Gráfico 15. Efeito de diferentes doses de modificadores da função do citoesqueleto (MFC) sobre a hipotalgesia causada pelo celecoxibe (CX; 12 mg/kg) no tempo 2 horas.

A linha superior representa o valor médio observado em ratos hipotalgésicos e a linha inferior (tracejada) em ratos hiperalgésicos (CG; 250 µg, i.pl.), no tempo 2 h. Todos os MFC foram administrados, via i.pl., ½ h antes do CX. A CG foi injetada ½ h após o CX. ACD: acrilamida, 1,4 - 141 nmoles; CCC: colchicina, 2,03 - 20,3 nmoles; NDZ: nocodazol; 3,32 - 33,2 nmoles; LB: latrunculina B, 0,012 - 1,26 nmoles; CTB: citocalasina B, 0,002 - 2,09 nmoles. Veic: DMSO < 1%. *: diferente de Veic-CG; **: diferente de CX-CG (N= 6-8; P < 0,05).

14. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE CITOCALASINA B SOBRE A HIPOALGESIA

Como a administração de 1 µg de citocalasina B foi eficaz em prevenir totalmente a hipotalgesia causada pelo CX, sem, no entanto, afetar a resposta hiperalgésica induzida pela CG, nos estudos subseqüentes, esta droga foi utilizada como padrão para caracterização do envolvimento de microfilamentos na resposta hipotalgésica.

14.1. Exclusão de efeito sistêmico

Para se verificar o caráter local de atuação da CTB no modelo de hiperalgesia estudado, esta droga foi administrada em um grupo de animais, ½ h antes do CX na pata direita e em outro grupo na pata contralateral (não inflamada). Desta forma, o efeito inibitório o da CTB sobre a hipotalgesia causada pela injeção subcutânea de CX só foi observado quando a CTB foi administrada na pata inflamada (direita) (Gráf. 16).

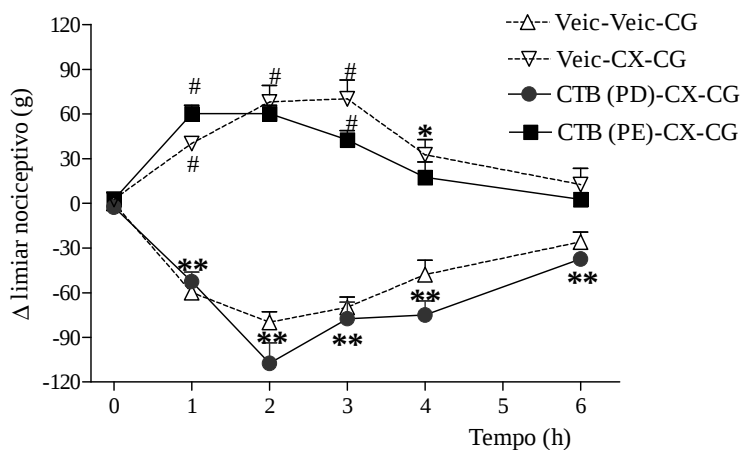


Gráfico 16. Efeito local da citocalasina B (CTB; 1µg) sobre a hipotalgesia causada pelo celecoxibe (CX; 12 mg/kg, s.c.). A CTB foi injetado 1 h antes da carragenina (CG; 250 µg) na pata esquerda (PE) ou direita (PD). Veic: salina ou DMSO < 1%. *: diferente de Veic-CG; **: diferente de Veic-CX-CG; #: maior que zero (N= 5; P < 0,05).

14.2. Avaliação do tempo de administração sobre o efeito da citocalasina B

À semelhança do que foi anteriormente descrito para o CX, procurou-se verificar se o momento da injeção da CTB seria importante para a inibição do efeito hipoalgésico. Para isso, a CTB foi também administrada $\frac{1}{2}$ e 1 h após a CG. Assim, a administração intraplantar de CTB, 30 min após o estímulo nociceptivo (CX-CG-CTB+30'), reverteu totalmente o efeito hipoalgésico causado pelo pré-tratamento com CX. Entretanto, em ratos tratados com CTB 1 hora após a CG, a reversão do efeito hipoalgésico se mostrou apenas nos tempos 3 e 4 horas (Gráf. 17).

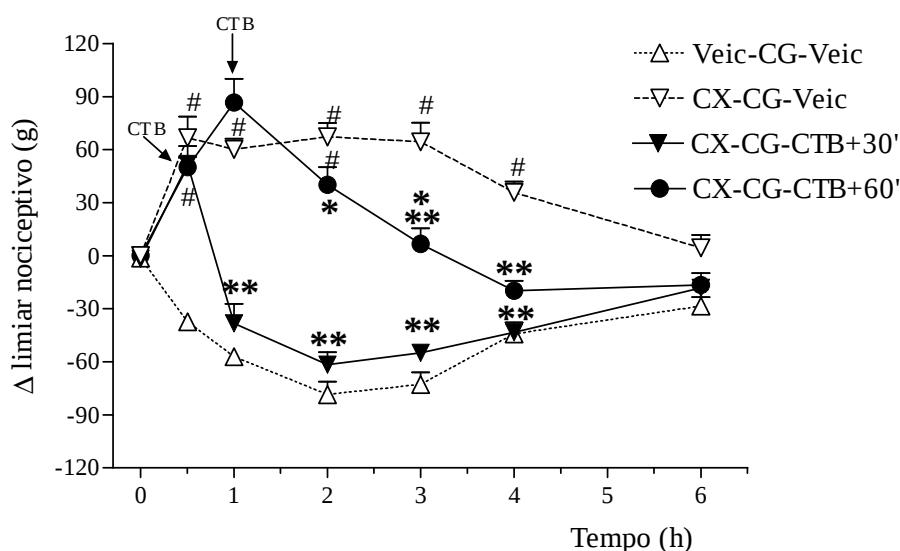


Gráfico 17. Reversão da hipoalgesia induzida pelo celecoxibe após administração intraplantar de citocalasina B. O celecoxibe (CX; 12 mg/kg) foi administrado por via subcutânea $\frac{1}{2}$ h antes da carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.), enquanto a citocalasina B (CTB; 1 μ g, i.pl.) foi administrada $\frac{1}{2}$ e 1 h após a CG. As patas contralaterais receberam veículo no mesmo volume. Veic: salina ou DMSO < 1 %.*: diferente de Veic-Veic-CG; **: diferente de Veic-CX-CG; #: maior que zero (N= 5; P < 0,05).

Para se avaliar a eficácia da dose de faloidina (FD) utilizada anteriormente e para confirmação do sítio de atuação da CTB (administrada 30 min após a CG) sobre os microfilamentos, a FD foi administrada, por via intraplantar, 30 min antes do CX. Observa-se no Gráf. 18 que a FD preveniu o efeito da CTB sobre a hipoalgesia, isto é, preveniu a reversão do efeito hipoalgésico causado pelo CX.

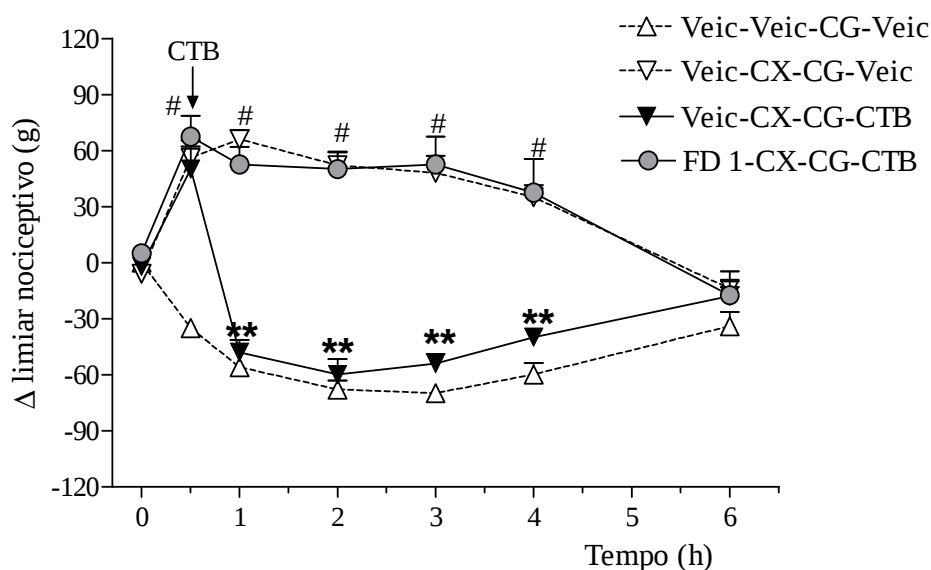


Gráfico 18. Efeito preventivo da faloidina sobre a reversão da hipoalgesia causada pela citocalasina B. A faloidina (FD; 1µg/50 µl) foi administrada intraplantarmente ½ h antes da injeção subcutânea de celecoxibe (CX; 12 mg/kg). Em todos os grupos a carragenina (CG, 250 µg/100 µl) foi injetada por via intraplantar ½ h após o celecoxibe. Após a primeira avaliação da resposta nociceptiva (tempo ½ h) a citocalasina B (CTB; 1µg/50 µl) foi administrada intraplantarmente. A pata contralateral recebeu veículo nos mesmos tempos dos tratamentos. Veic: solução salina ou DMSO < 1 %.*: diferente de Veic-Veic-CG; **: diferente de Veic-CX-CG; #: maior que zero (N= 5; P < 0,05).

14.3. Efeito do pré-tratamento com citocalasina B sobre o efeito anti-hiperalgésico induzido pela administração tardia de celecoxibe

Para avaliarmos se o componente anti-hiperalgésico do efeito analgésico induzido pela administração de CX (12 mg/kg, s.c.) 2 h após a CG seria afetado pela ação dos microfilamentos, um grupo de ratos recebeu a CTB (1 µg/ i.pl.) 1 h antes da CG e foram posteriormente tratados com CX (1 h após a CG). Desta forma, foi observado que a CTB não interferiu com o efeito anti-hiperalgésico (Gráf. 19). Portanto, no que tange a participação dos microfilamentos, o efeito hipoalgésico difere do efeito anti-hiperalgésico observados após a administração do CX em diferentes tempos.

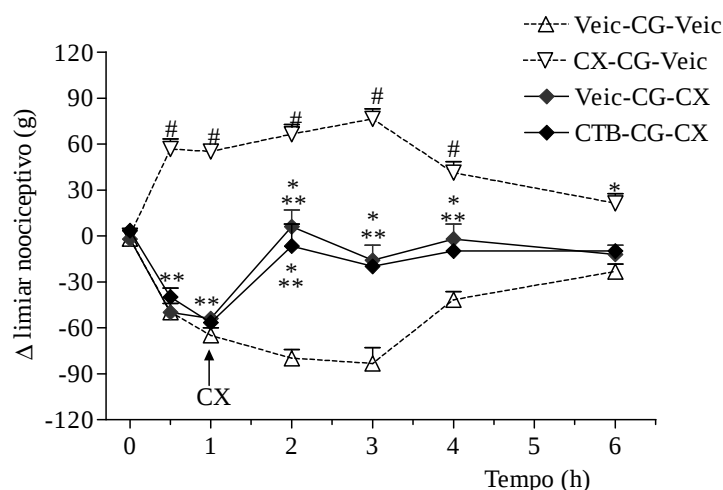


Gráfico 19. Ausência de efeito da citocalasina B sobre a anti-hiperalgesia causada pela administração tardia de celecoxibe. A citocalasina B (CTB; 1µg/50 µl) foi administrada intraplantarmente ½ h antes da injeção subcutânea de celecoxibe (CX; 12 mg/kg). Em todos os grupos o CX ou veículo foi injetado 1 h após a carragenina (CG, 250 µg/100 µl). A pata contralateral recebeu veículo nos mesmos tempos dos tratamentos. Veic: solução salina ou DMSO < 1 %.*: diferente de Veic-Veic-CG; **: diferente de Veic-CX-CG (N=5; P < 0,05).

14.4. Seletividade do efeito da citocalasina B sobre a resposta antinociceptiva induzida por diferentes inibidores de ciclooxigenase

Para se testar a seletividade de efeito da CTB sobre a resposta hipoalgésica, esta droga foi previamente administrada em animais tratados com diferentes inibidores de COX. Assim sendo, a CTB preveniu totalmente o efeito hipoalgésico induzido pelo SC236 (12 mg/kg, s.c.) tornando a resposta dos animais pré-tratados com CTB equivalente à do grupo controle hiperalgesia (Veic-CG) (Gráf. 20). De forma diferente, a administração de CTB não alterou a hipoalgesia induzida por dipirona (Dip; 360 mg/kg, s.c.) ou paracetamol (Par; 360 mg/kg, s.c.) (Graf. 21 A e B).

De forma semelhante a observada para o efeito anti-hiperalgésico induzido pela administração tardia de CX, também não foram observados efeitos da CTB sobre a anti-hiperalgesia causada pelo inibidor seletivo de COX 1 (SC560; 5 mg/kg, s.c.) ou pela indometacina (Indo; 4 mg/kg, s.c.) (Graf. 22 A e B).

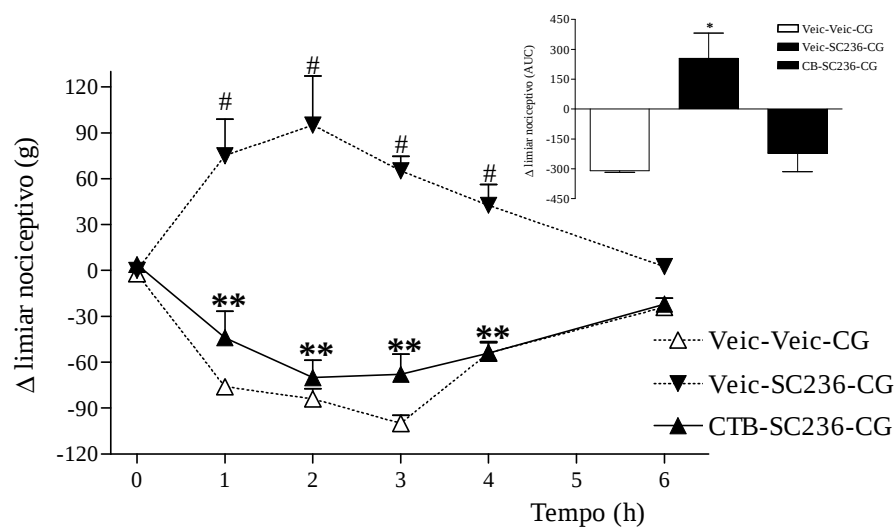


Gráfico 20. Prevenção total da hipoalgesia causada por SC236 após administração intraplantar de citocalasina B. O inserto mostra o efeito no gráfico de área sob a curva. A CTB (CTB; 1 μ g) foi administrada intraplantarmente ½ h antes da injeção subcutânea de SC236 (12 mg/kg). A carragenina (CG, 250 μ g) foi injetada por via intraplantar ½ h após o SC236. A pata contralateral recebeu apenas veículo. Veic: salina. **: diferente de Veic-SC236; #: maior que zero (N=5. P < 0,05).

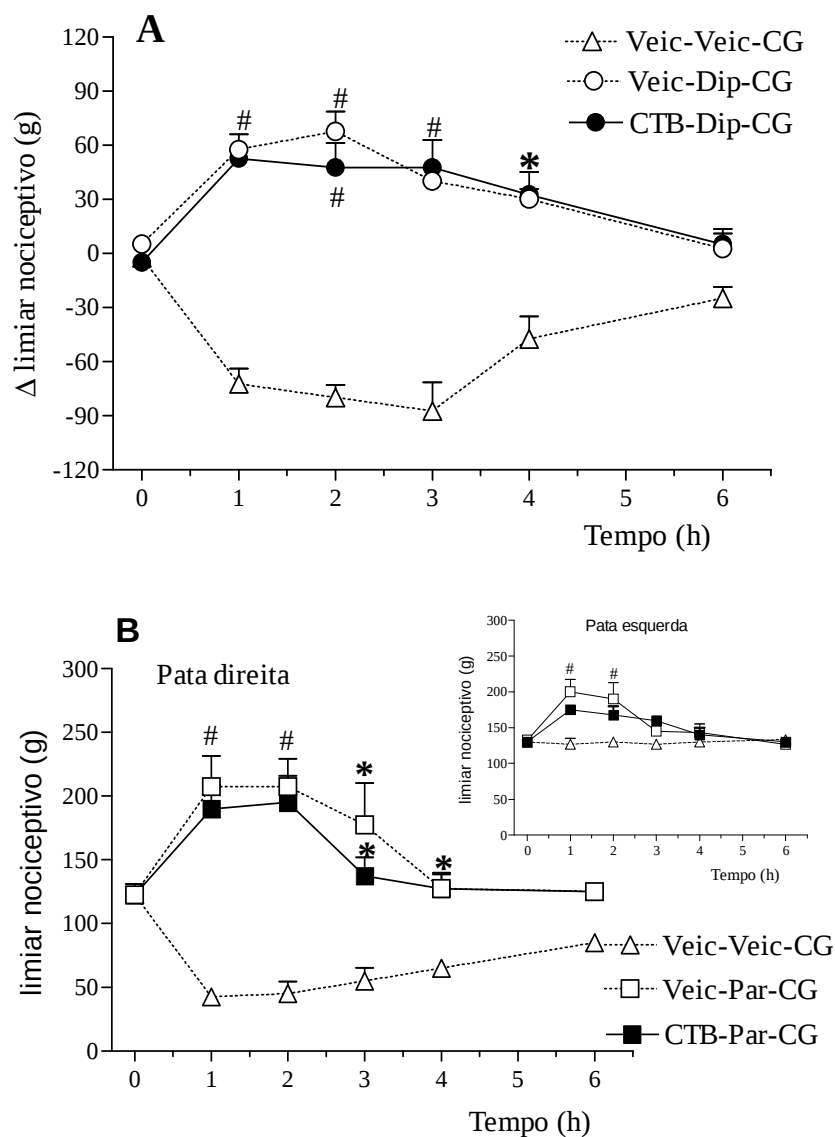


Gráfico 21. Ausência de efeito da citocalasina B (CTB; 1 μ g) sobre a hipoalgesia causada por dipirona (A) ou paracetamol (B). A CTB foi injetada intraplantarmente ½ h antes dos analgésicos. A dipirona (Dip; 360 mg/kg) ou paracetamol (Par; 360 mg/kg) foram administrados por via subcutânea ½ h antes da carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.). Veic: solução salina. *: diferente de Veic-CG; #: maior que zero (N= 5; P < 0,05).

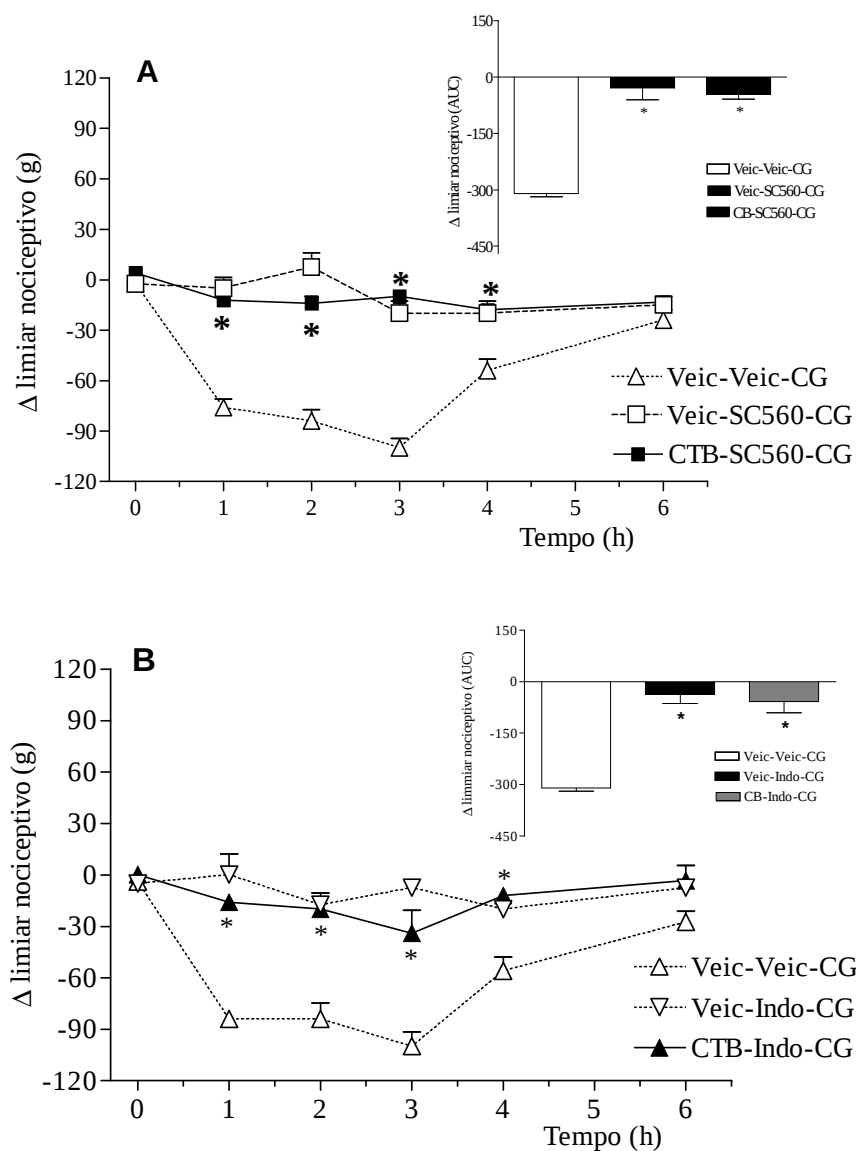


Gráfico 22. Ausência de efeito da citocalasina B (CTB; 1 μ g) sobre a anti-hiperalgesia causada por SC560 (A) ou indometacina (B). O inserto mostra o efeito no gráfico de área sob a curva. A CTB foi injetada intraplantarmente ½ h antes dos analgésicos. A indometacina (Indo; 4 mg/kg) ou SC560 (5 mg/kg) foram administrados por via subcutânea ½ h antes da carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.). Veic: solução salina-etanol-tuin 80. *: diferente de Veic-CG (N= 4-5; P < 0,05).

15. EXCLUSÃO DO COMPONENTE CENTRAL DO EFEITO HIPOALGÉSICO DO CELECOXIBE

Para se investigar a participação de receptores opióides periféricos como componente da resposta hipoalгésica induzida sistemicamente pelo CX ou pela MORF, utilizou-se um antagonista opióide que não atravessa a barreira hemato-encefálica (Ramabadran *et al.*, 1982), a naloxona metiodida (NLXm). Com base em curvas dose-efeito descritas em literatura (Kayser *et al.*, 1995; Labuz *et al.*, 2007), a NLXm foi administrada por via intraplantar, nas doses de 10 ou 50 µg, ½ h antes da MORF (Gráf. 23) ou CX (Gráf. 24).

Desta forma, semelhante à resposta observada com a CTB, após a NLXm se observou a prevenção parcial do efeito hipoalгésico induzido pela MORF (Gráf. 23). Mesmo a dose maior utilizada não foi eficaz em prevenir completamente o efeito hipoalгésico induzido pela MORF. Contrastantemente, na mesma dose, a NLXm preveniu totalmente o efeito hipoalгésico induzido pelo pré-tratamento com CX (Gráf. 24 A). Interessantemente, o efeito anti-hiperalгésico induzido pela administração tardia de CX (1 h após a CG) não foi modificado pela administração prévia de NLXm (Gráf. 24 B).

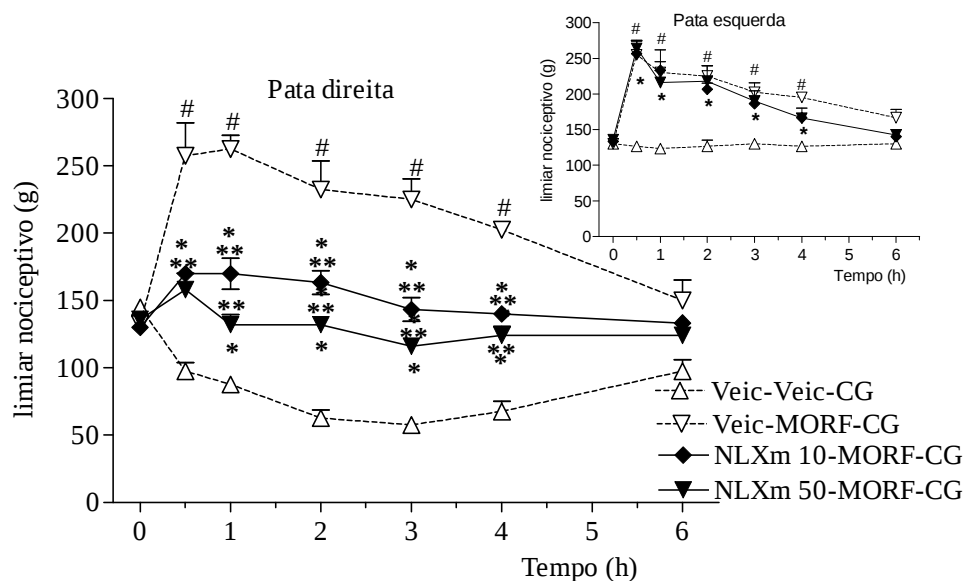


Gráfico 23: Prevenção parcial do efeito analgésico induzido pela morfina após administração intraplantar de naloxona metiodida, um antagonista de receptores opióides o qual não atravessa a barreira hemato-encefálica. A naloxona metiodida (NLXm; 50 µg/100 µl) foi administrada intraplantarmente ½ h antes da injeção subcutânea de morfina (MORF; 2mg/kg). Em todos os grupos a carragenina (CG; 250 µg) foi injetada por via intraplantar ½ h após a morfina. A pata contralateral recebeu apenas veículo. Veic: solução salina. Veic: solução salina. *: diferente de Veic-Veic-CG **: diferente de Veic-MORF-CG; #: hipoalgesia, maior que a resposta basal (N= 5-6; P < 0,05).

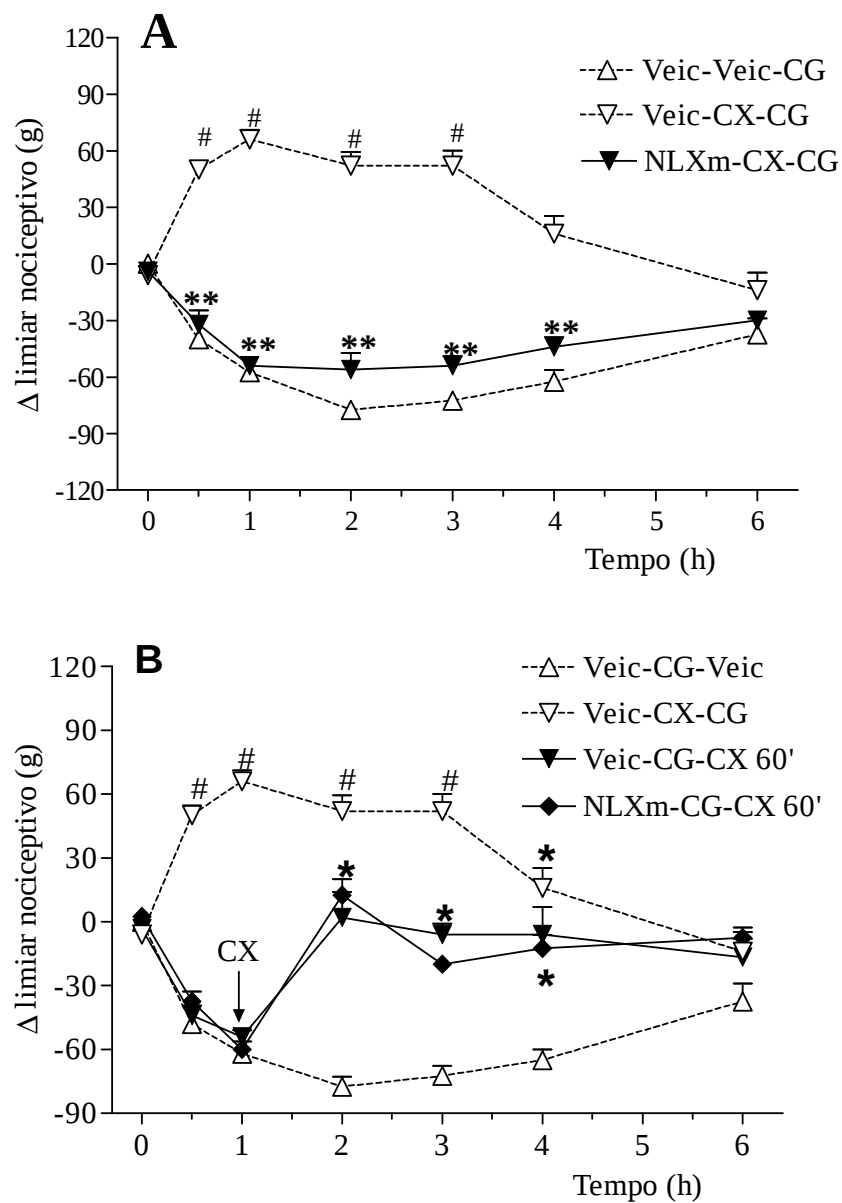


Gráfico 24. Efeito da administração intraplantar de naloxona metiodida (NLXm; 50 μ g) sobre a hipotalgesia (A) ou sobre a anti-hiperalgesia (B) induzidas pelo celecoxibe (CX; 12 mg/kg). Em A: A NLXm foi administrada $\frac{1}{2}$ h antes da injeção subcutânea de CX e 1 h antes da carragenina (CG; 250 μ g). Em B: A NLXm foi administrada 1 h antes da CG e o CX foi administrado 1 h após a CG. Veic: solução salina. **: diferente de Veic-CX-CG; #: maior que zero (N= 5 ou 7; P < 0,05).

16. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE β -ENDORFINA NA RESPOSTA HIPOALGÉSICA INDUZIDA SISTEMICAMENTE POR CELECOXIBE

Baseados em estudos de participação de queratinócitos na resposta antinociceptiva periférica (Ibrahim *et al.*, 2005), procurou-se avaliar também a participação destas células na hipoalgesia induzida por CX. Para isso, foram realizados cortes histológicos de tecido plantar excisado do sítio de administração do estímulo hiperalgésico. Tais tecidos, após processamento, foram cortados e corados pela a técnica de imuno-histoquímica. Desta forma, foi possível a avaliação de duas variáveis: percentual da área imunomarcada para a β -endorfina em relação à área total do epitélio selecionado e; densidade óptica da área marcada. Os dados obtidos permitiram a quantificação aproximada deste opióide sintetizado endogenamente nos queratinócitos (Ibrahim *et al.* 2005). A densidade óptica da área imunomarcada não mostrou diferenças significativas entre todos os grupos experimentais analisados (dados não exibidos), tornando a variável de percentual de área marcada proporcional à concentração de β -endorfina no citoplasma de queratinócitos da região avaliada.

Assim sendo, foram realizados inicialmente experimentos de avaliação da β -endorfina no epitélio da pele das patas após administrações locais de salina, PGE₂ ou CG. Desta forma, foi observado que a administração local de salina não alterou significativamente o percentual da área imunomarcada para β -endorfina em relação ao controle não tratado (*naive*) (Gráf. 25). Entretanto, um aumento dose-dependente da imunomarcção para β -endorfina foi detectado após administração local de CG (Gráf. 25).

O intenso aumento da área imunomarcada para β -endorfina foi observado a partir de 30 min após a administração da CG e tal aumento manteve-se elevado até a terceira

hora. A partir da quarta hora, observou-se a redução da área marcada para β -endorfina (Gráf. 26 A), quando também foi observado o declínio da resposta hiperalgésica nos animais tratados com CG (Gráf. 26 B).

A administração de PGE_2 também induziu um aumento agudo da imunomarcação para β -endorfina no tempo 1 hora (Gráf. 26 A), porém, foi observada uma redução significativa desta marcação menos tardia, nos tempos entre 2 e 4 h, correspondendo ao tempo de redução da hiperalgesia neste modelo (Gráf. 26 B).

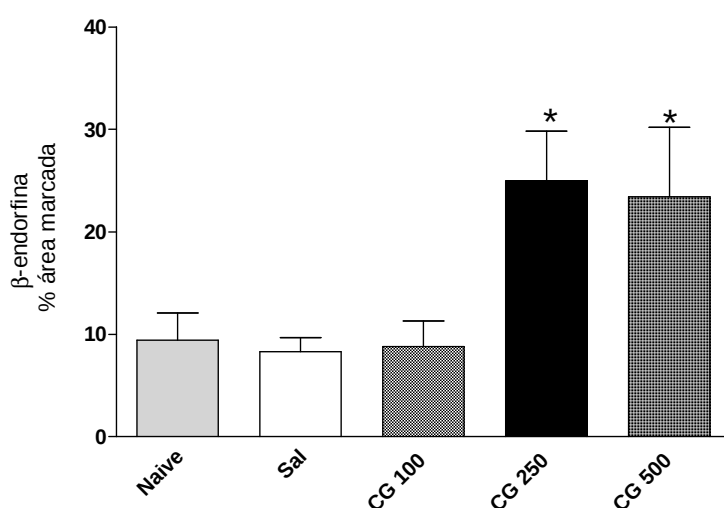


Gráfico 25. Aumento dose-dependente da área marcada para β -endorfina no epitélio da pele circunvizinha ao sítio de administração de carragenina. Tempo avaliado: 1 hora após administração de carragenina. Sal: salina; CG: carragenina; 100, 250 ou 500 μg , i.pl.
*: diferente de Sal (N= 6-7; $P < 0,05$).

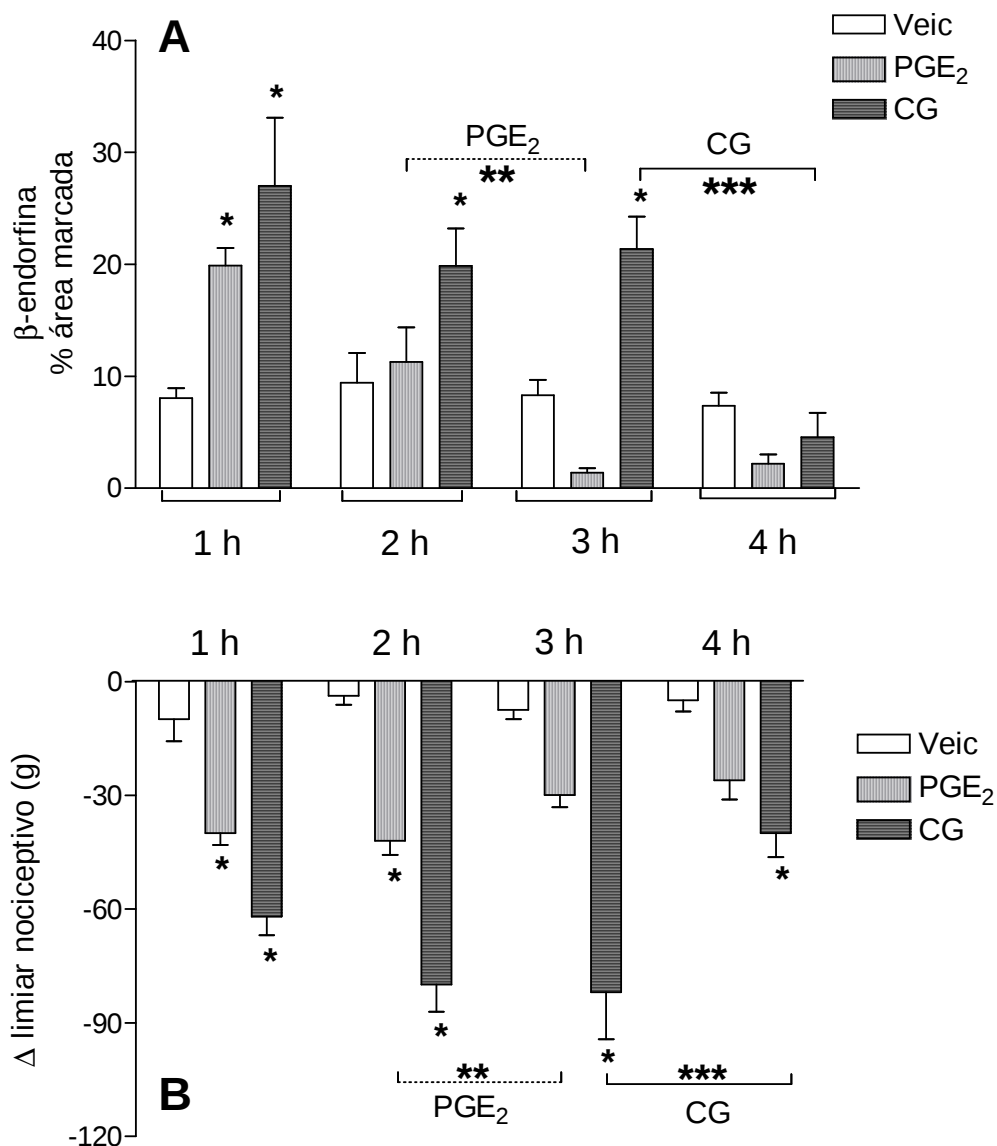


Gráfico 26. Aumento da área marcada para β -endorfina no epitélio da pele circunvizinha ao sítio de administração de prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μ g, i.pl.) ou carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.) (A) e efeito de redução concomitante da hiperalgesia (B), ao longo do tempo (1, 2, 3 e 4 h). Veic: salina.*: diferente de Sal; **: diferente entre os tempos de PGE₂; ***: diferente entre os tempos de CG (N= 7-9; P < 0,05).

Interessantemente, tanto nas amostras de epitélio de ratos pré-tratados com CX (12 mg/kg, s.c.), quanto naquelas de ratos tratados com CTB e CX, não foi observado o aumento da área marcada para β -endorfina, 1 h após administração de CG (Gráf. 27 A). A redução da área marcada no epitélio de ratos pré-tratados com CX relacionou-se com a elevação do limiar nociceptivo no teste de algesímetro de pressão (Gráf 27 B), sugerindo a liberação dos estoques celulares do opióide nos ratos tratados com CX. Entretanto, esta relação não foi observada em animais tratados com CTB e CX, os quais se mostraram hiperalgésicos no tempo 1 h, sugerindo que a CTB não impede a liberação da β -endorfina, mas sim seu efeito.

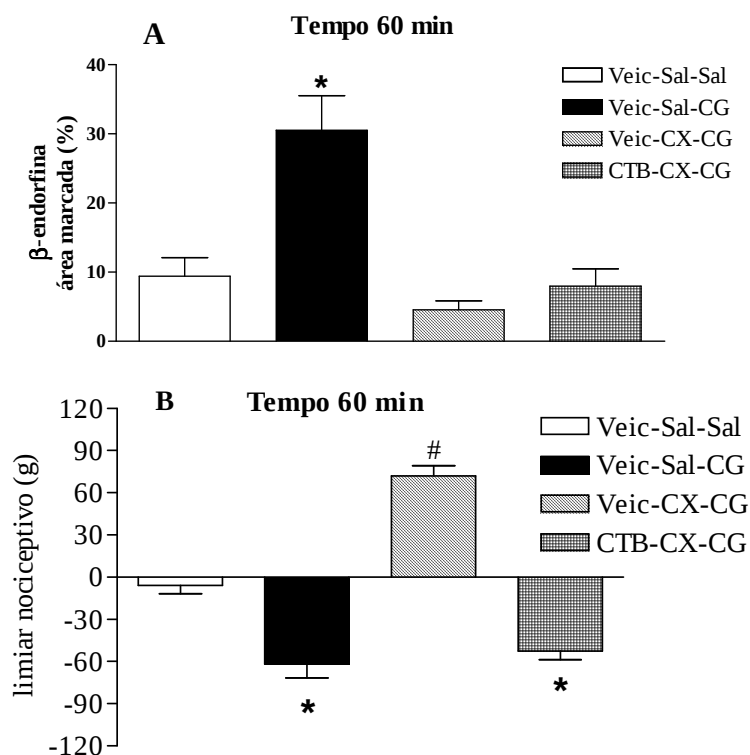


Gráfico 27. Relação entre o aumento da área imunomarcada para β-endorfina no epitélio da pata (A) e o efeito hipoalгésico (B) induzido pela administração sistêmica de celecoxibe (CX; 12 mg/kg, s.c.). A CTB foi administrada, por via i.pl., ½ h antes do CX. Os ratos receberam carragenina (Cg, 250 µg, i.pl.) ½ h após o CX. Em A: percentual da área total do epitélio da pele da pata marcada pela técnica de imuno-histoquímica. Em B: efeito dos mesmos grupos experimentais de A, sobre o limiar nociceptivo. Veic: DMSO < 1%; Sal: salina; *: diferente de Veic; #: maior que zero, isto é; hipoalgesia (N= 5-8; P < 0,05).

A figura 2 abaixo mostra a diferença da marcação (castanha) para β -endorfina nos cortes histológicos dos diferentes grupos experimentais e o padrão de distribuição da marcação ao longo dos estratos epiteliais. As amostras retiradas de ratos não tratados (*naive*) ou tratados com salina mostraram área marcada de aproximadamente 10% do epitélio. A administração de CG causou aumento da marcação (em torno de 30% do epitélio). Os animais pré-tratados com CX mostraram marcação em menos de 10% do epitélio.

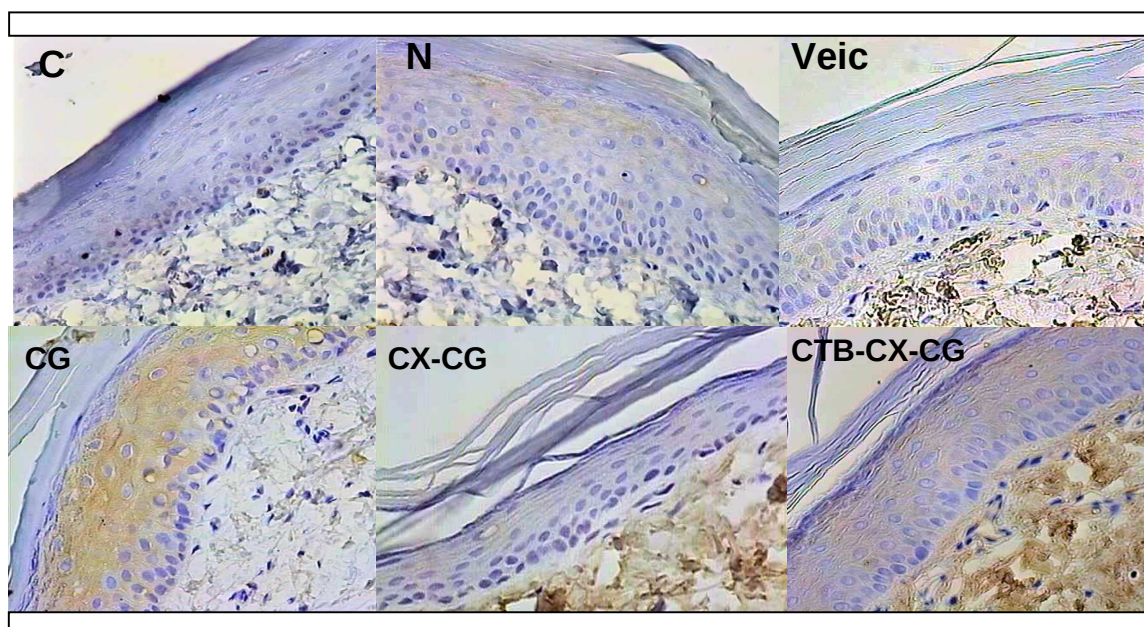


Figura 2. Aspecto da marcação imuno-histoquímica para β -endorfina no tecido excisado da região plantar de ratos. Tempo: 1h. C: controle carragenina sem anticorpo primário, N: animais não tratados (*naive*); Veic: salina (100 μ l, i.pl.); CG: carragenina (250 μ g, i.pl.); CX-CG: celecoxibe (12 mg/kg, s.c.) + carragenina (250 μ g, i.pl.); CTB-CX: citocalasina B (1 μ g, i.pl.) + celecoxibe (12 mg/kg, s.c.) e carragenina (250 μ g, i.pl.)

RESULTADOS PARTE II

Avaliação do efeito analgésico decorrente da administração intraplantar de diferentes fármacos

Avaliação do efeito decorrente da administração intraplantar de celecoxibe, β -endorfina ou agonistas canabinóides

Os resultados obtidos até o momento sugerem uma participação exclusivamente periférica de opióides na hipoalgesia causada por CX e uma participação aditiva dos efeitos periférico e central na hipoalgesia causada pela MORF. Assim, nos experimentos subseqüentes, foram usadas administrações periféricas e doses pequenas dos compostos analgésicos, na tentativa de estudar apenas os efeitos locais.

Desta forma, nos experimentos a seguir, procurou-se responder às perguntas de como o CX induz a liberação de β -endorfina na periferia do sítio inflamatório e como o citoesqueleto está implicado no efeito deste opióide no mesmo sítio.

17. HIPOALGESIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO PERIFÉRICA DE DIFERENTES COMPOSTOS ANALGÉSICOS

17.1. Curva dose-efeito de celecoxibe e OSU03012 sobre a hiperalgesia induzida por carragenina

As diferentes doses de CX (30, 100 e 300 μ g) administradas por via intraplantar, 5 min antes da CG, causaram elevação do limiar nociceptivo acima dos valores basais de forma dose-dependente, sendo que, a maior dose usada (300 μ g) induziu pico de ação em ½ h e duração de 3 h (Gráf. 28 A). Da mesma forma, o OSU03012, um análogo do CX desprovido de ação sobre COX-2, também causou elevação no limiar nociceptivo de forma dose-dependente (Gráf. 28 B).

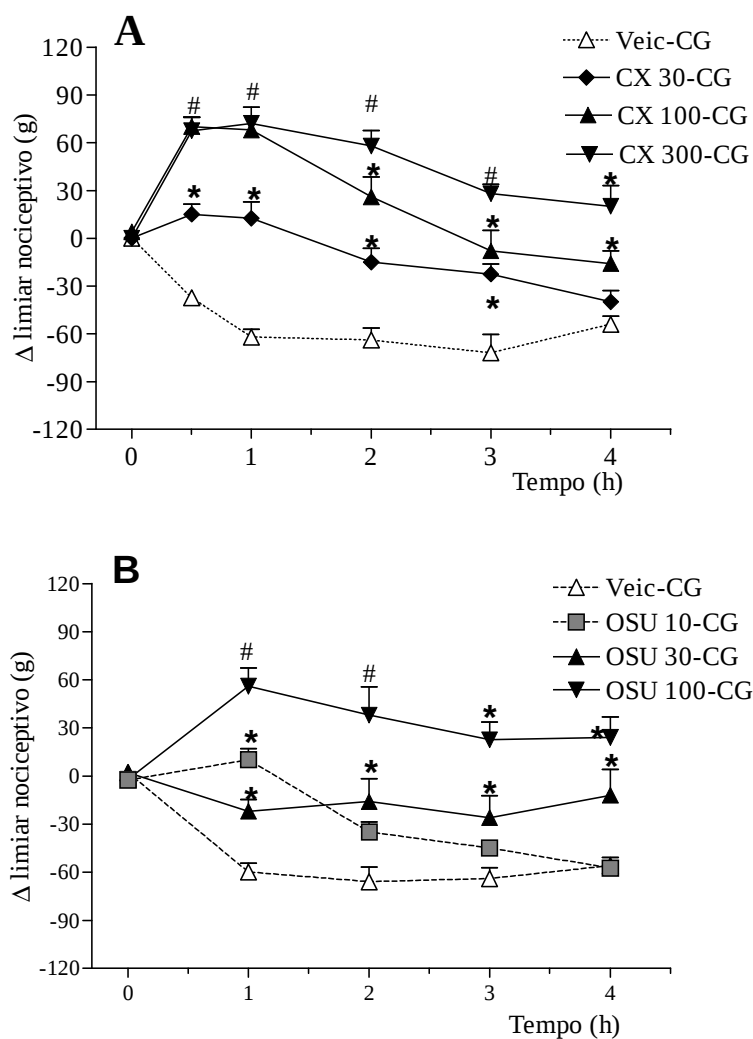


Gráfico 28. Efeito hipoalгésico dose-dependente unilateral causado pela administração intraplantar de celecoxibe (A) ou OSU03012 (B). O celecoxibe (CX; 30, 100 e 300 μ g) ou OSU03012 (OSU; 10, 30 e 100 μ g) foram administrados intraplantarmente 5 min antes da carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.). Veic: salina. *: diferente de Veic-CG; #: maior que zero (N= 5-8; P < 0,05).

17.2. Curva dose-efeito do agonista opióide β -endorfina sobre a resposta hiperalgésica causada pela carragenina

Com base nos resultados anteriores de dependência do sistema opióide endógeno periférico para ocorrência da hipoalgesia causada por CX, procurou-se verificar o efeito causado pela administração direta de β -endorfina na pata de ratos. Com isso, a administração intraplantar deste opióide 5 min antes da administração de CG, causou efeito semelhante ao CX, elevando o limiar de deflagração da resposta nociceptiva acima dos valores basais apenas na pata inflamada (Gráf. 29). Entretanto, na dose mais alta usada (2 μ g), o pico de efeito após a administração de β -endorfina foi observado aos 15 min e a hipoalgesia teve menor duração (até 2 h) do que após o CX (até 3 h). Seguindo o modelo de indução de hipoalgesia sistêmica, a administração intraplantar isolada de CX não causou efeito sobre a resposta nociceptiva, enquanto a β -endorfina causou aumento do limiar de deflagração da resposta nociceptiva na pata injetada (Gráf. 30).

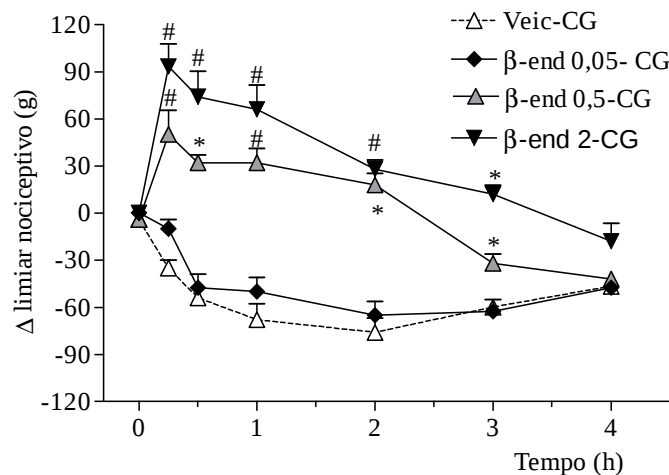


Gráfico 29. Efeito hipoalgésico dose-dependente unilateral causado pela administração intraplantar β-endorfina no modelo de hiperalgesia induzida por carragenina (CG; 250 μg). A β-endorfina (β-end; 0,05; 0,5 ou 2 μg) foi administrada intraplantarmente 5 min antes da CG. Veic: DMSO < 1%. *: diferente de Veic-CG; #: maior que zero (N= 6; P < 0,05).

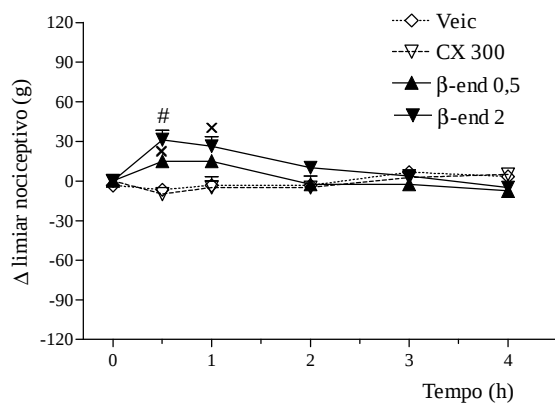


Gráfico 30. Efeito hipoalgésico unilateral causado pela administração intraplantar de β-endorfina (β-end; 0,5 e 2 μg, i.pl.) e ausência de efeito do celecoxibe (CX; 300 μg, i.pl.) em pata não inflamadas de ratos. O CX e a β-end foram administrados na pata direita enquanto a pata esquerda recebeu veículo no mesmo volume. Veic: DMSO < 1%. x: diferente de Veic, #: maior que zero (N= 4-6; P < 0,05).

17.3. Curva dose-efeito de agonistas canabinóides sobre a resposta hiperalgésica causada pela carragenina

Como vários estudos anteriores evidenciaram a relação entre os sistemas opióide e canabinóide endógeno (Guindon *et al.*, 2006a; 2006b; Ibrahim *et al.*, 2005), nesta fase do estudo, procurou-se avaliar também o efeito de agonistas canabinóides sobre a resposta nociceptiva. Desta forma, agonistas de receptores canabinóides do tipo CB₁ (ACEA) ou do tipo CB₂ (JWH015) foram testados no modelo estudado e mostraram efeito similar ao observado após administração de CX ou β -endorfina, porém, com pico de ação entre 15 e 30 min e término de efeito hipoalgésico entre 1 e 2 h (Gráf. 31 A e B).

Entretanto, para a ocorrência de efeito hipoalgésico, a dose necessária de ACEA (60 μ g) foi maior que a dose de JWH015 (33 μ g). Na comparação de doses similares (30 ou 33 μ g) o JWH mostrou-se mais eficaz em causar analgesia.

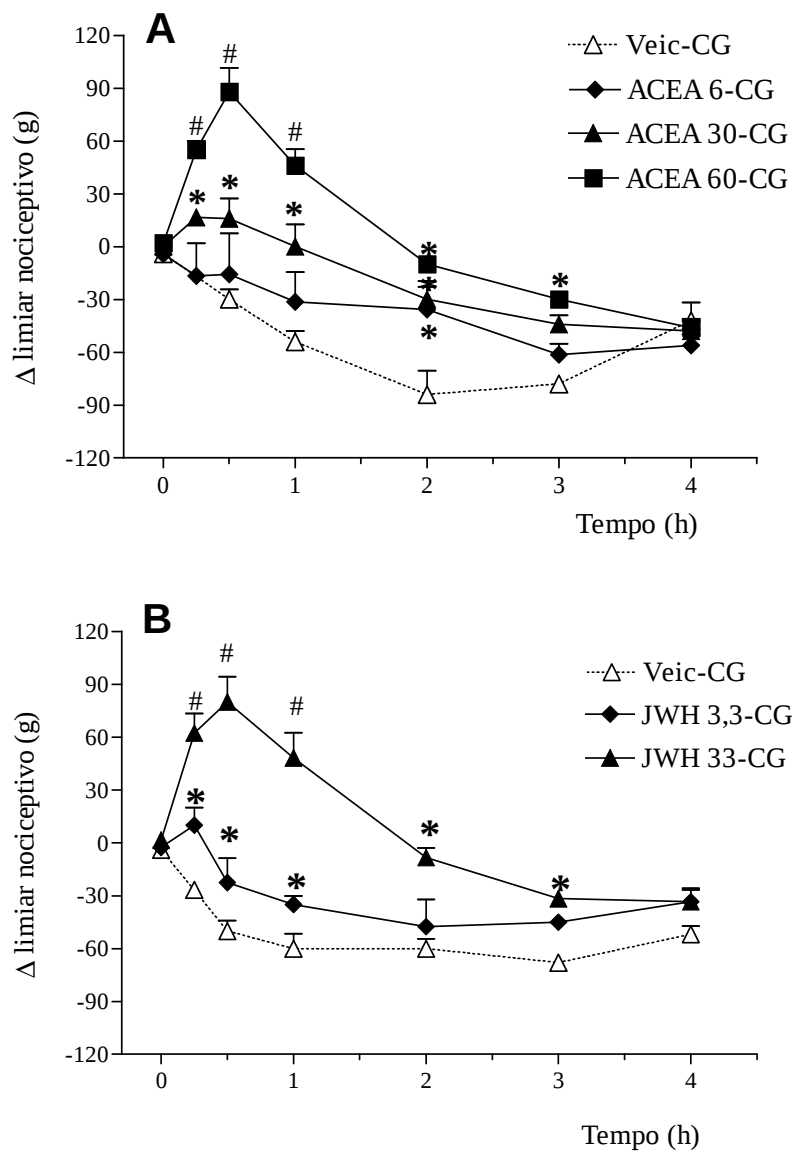


Gráfico 31. Hipotalgesia dose-dependente decorrente da administração intraplantar de agonistas de receptores canabinóide tipo CB₁ (A) ou CB₂ (B). Os agonistas canabinóides foram administrados 5 min antes da carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.). ACEA: 30 e 60 μ g, i.pl.; μ g, i.pl.; JWH: JWH015; 3,3 e 33 μ g, i.pl. Veic: DMSO < 1%. *: diferente de Veic-CG, #: maior que zero (N= 5-6; P < 0,05).

17.4. Comparação entre o efeito hipoalгésico induzido por celecoxibe, agonista opióide e canabinóide tipo CB₂

Comparando os efeitos induzidos pela administração intraplantar da maior dose estudada para o agonista opióide (β -endorfina), o agonista CB₂ (JWH015) e o coxibe (celecoxibe) foram obtidos picos de ação em 15, 30 e 60 min, respectivamente (Gráf. 32). Entretanto, também foi observado efeito hipoalгésico mais duradouro após administração de celecoxibe (até 3 h) quando comparado à hipoalgesia induzida por β -endorfina (até 2 h) ou JWH015 (até 1 h).

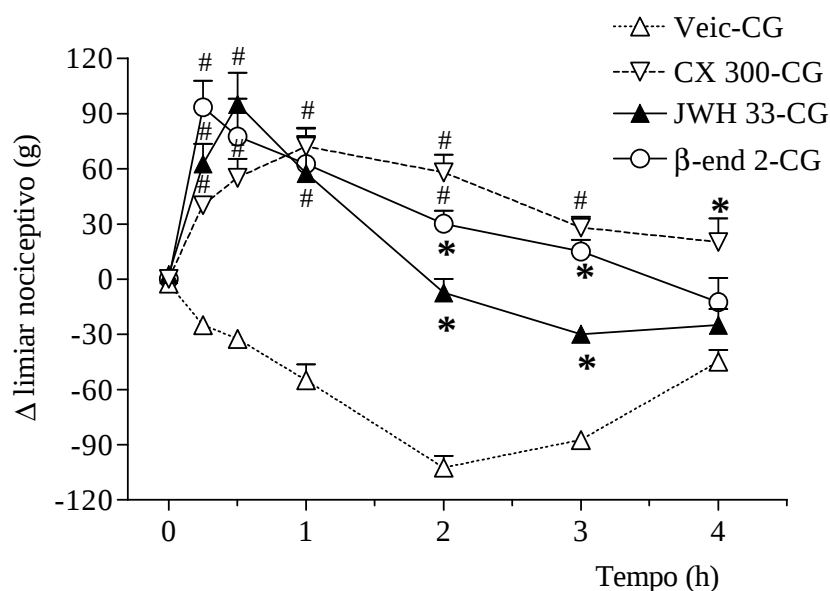


Gráfico 32. Comparação entre o efeito hipoalгésico causado pela administração intraplantar de agonistas de receptores opióides (β -endorfina; 2 μ g), canabinóide tipo CB₁ (JWH015; 33 μ g) e celecoxibe (CX; 300 μ g). Os analгésicos foram administrados 5 min antes da carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.). Veic: DMSO < 1%. *: diferente de Veic-CG, #: maior que zero (N= 5; P < 0,05).

18. EFEITO LOCAL DE CELECOXIBE

Para exclusão de efeito sistêmico, o CX (300 µg) foi injetado na pata contralateral e não mostrou efeito algum sobre a hiperalgesia induzida pela CG (Gráf. 33), mostrando que nesta via de administração causa apenas efeitos locais.

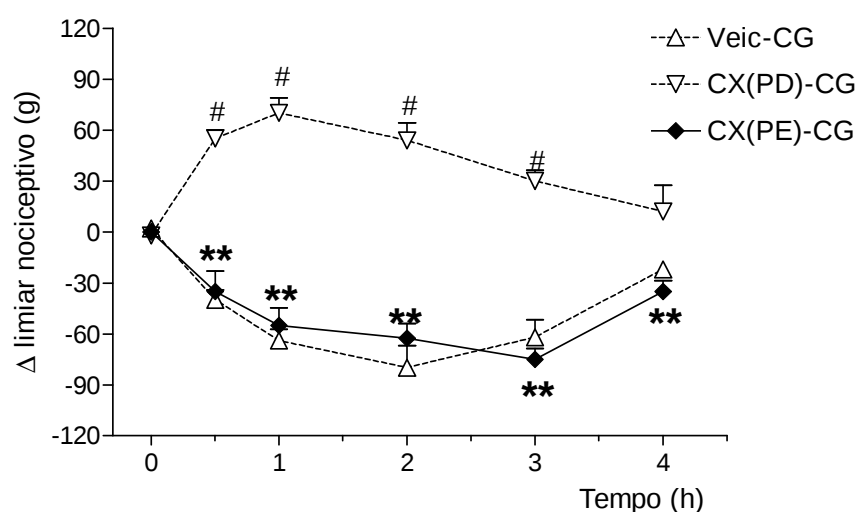


Gráfico 33. Ausência de efeito da administração de celecoxibe (CX; 300 µg) na pata esquerda (PE) não inflamada, sobre a resposta hiperalgésica da carragenina (CG; 250 µg, i.pl.). Veic: salina. **: diferente de CX(PD)-CG, #: maior que zero (N= 4-6; P < 0,05).

19. EFEITO DA CITOCALASINA B SOBRE A HIPOALGESIA INDUZIDA PERIFERICAMENTE POR DIVERSOS COMPOSTOS

A administração periférica de CTB (1 µg, i.pl.), ½ h antes, preveniu totalmente o efeito hipoalgésico induzido por administrações intraplantares de CX e de seu análogo OSU03012 (Graf. 34 A e B).

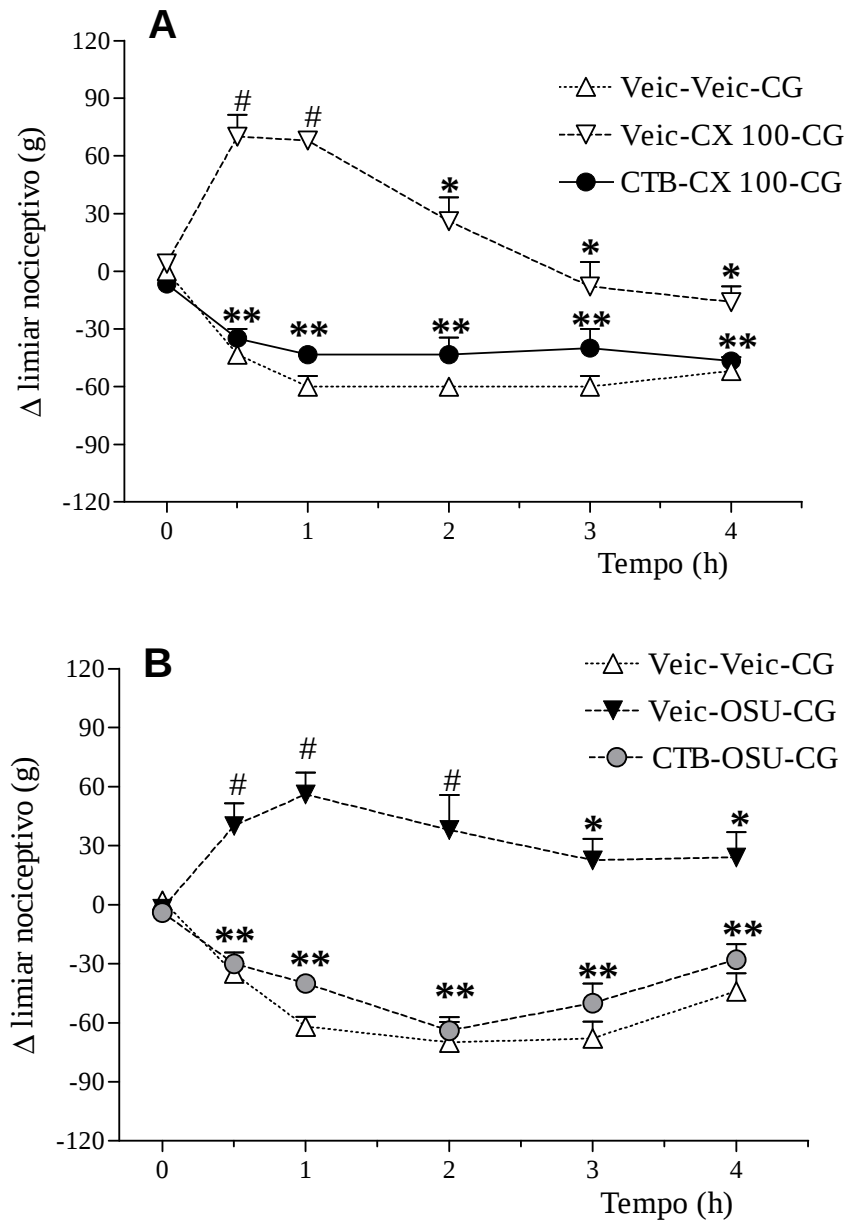


Gráfico 34. Prevenção total da hipotalgesia causada pela administração intraplantar de celecoxibe (CX; 100 µg, i.pl.) ou OSU03012 (OSU; 100 µg, i.pl.) após administração de citocalasina B. CTB: citocalasina B, 1 µg, i.pl.; CG: carragenina, 250 µg, i.pl.; Veic: salina.*: diferente de Veic-GC; **: diferente de CX-CG; #: maior que zero (N=5; P < 0,05).

De forma similar, a CTB inibiu os efeitos de β -endorfina e JHW015 (Gráf. 35 A e B), porém, não causou efeito algum sobre a hipoalgesia induzida por ACEA, o agonista de receptores CB₁ (Gráf. 36).

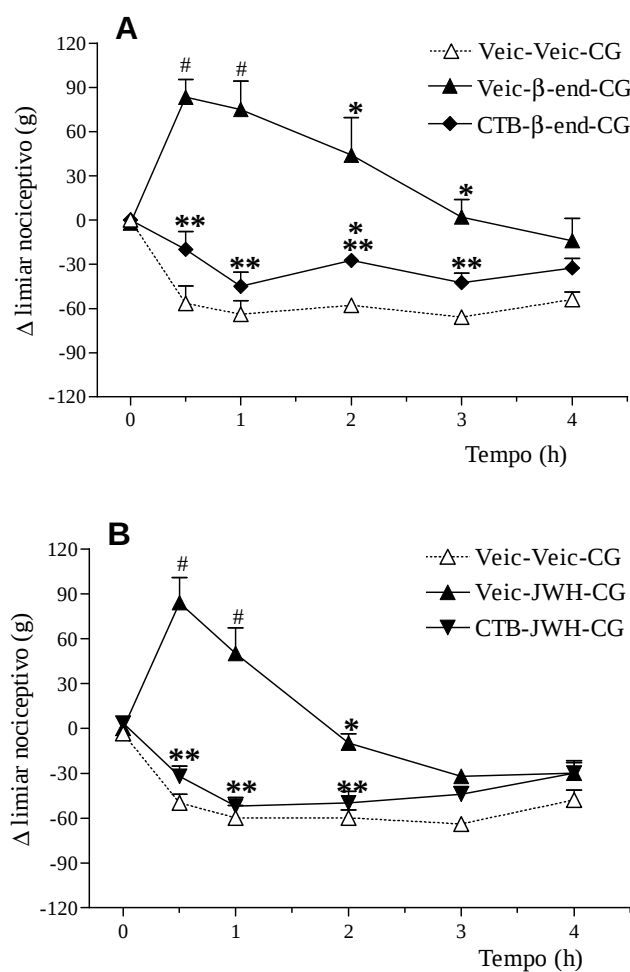


Gráfico 35. Prevenção total da hipoalgesia causada pela administração intraplantar de β -endorfina (β -end; 2 μ g) ou JWH015 (JWH; 33 μ g) após administração de citocalasina B (CTB; 1 μ g, i.pl.). A CTB foi administrada ½ h antes do JWH ou β -end. Todos os animais receberam carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.) 5 min após os compostos analgésicos. Veic: DMSO < 1 %. **: diferente de β -end-CG ou JWH-CG; #: maior que zero (N= 6; P < 0,05).

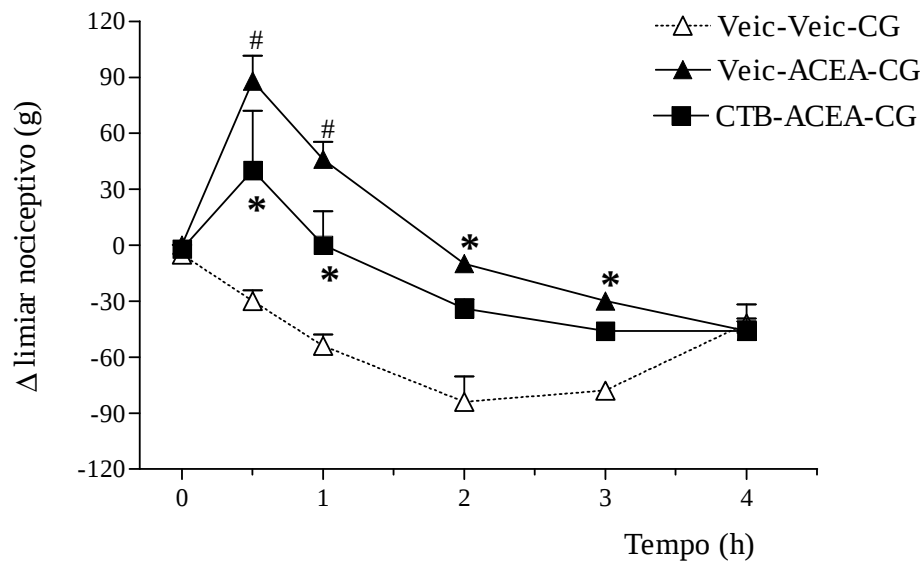


Gráfico 36. Ausência de efeito da administração local de citocalasina B (CTB, 1 µg) sobre a hipoalgesia causada pela administração intraplantar de ACEA (60 µg, i.pl.). A CTB foi administrada ½ h antes do ACEA. Todos os animais receberam carragenina (CG; 250 µg, i.pl.) 5 min após o ACEA. Veic: DMSO < 1%. *: diferente de Veic-CG; #: maior que zero (N= 5; P < 0,05).

20. EFEITO DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES OPIÓIDES OU CANABINÓIDE SOBRE A HIPOALGESIA INDUZIDA PERIFERICAMENTE

Com base em experimentos de curva dose-efeito realizados anteriormente no laboratório de inflamação e dor (Sabino *et al.*, 2008), a naltrexona, um antagonista de receptores opióides, foi administrada, por via intraplantar, na dose (50 µg) de maior eficácia em prevenir o efeito hipoalгésico da morfina. Baseados em experimento piloto e em relatos da literatura (Gutierrez *et al.*, 2007), a dose de 50 µg de SR144528 foi escolhida como padrão de antagonista de receptor canabinóide tipo 2.

Os Gráficos 37 a 41 mostram que o pré-tratamento com a naltrexona (NTX; 50 µg, i.pl.) preveniu totalmente a indução de hipoalgesia causada pela administração intraplantar de CX, OSU, β-endorfina e JWH, porém, causou inibição parcial do efeito analгésico induzido por ACEA.

De forma diferente, os mesmos gráficos (37 a 41) mostram que o SR144528 (SR; 50 µg, i.pl.), preveniu totalmente o efeito do JWH, entretanto, causou uma inibição parcial sobre a hipoalgesia induzida por CX, OSU03012 ou ACEA e ainda, não teve efeito algum sobre a hipoalgesia da β-endorfina.

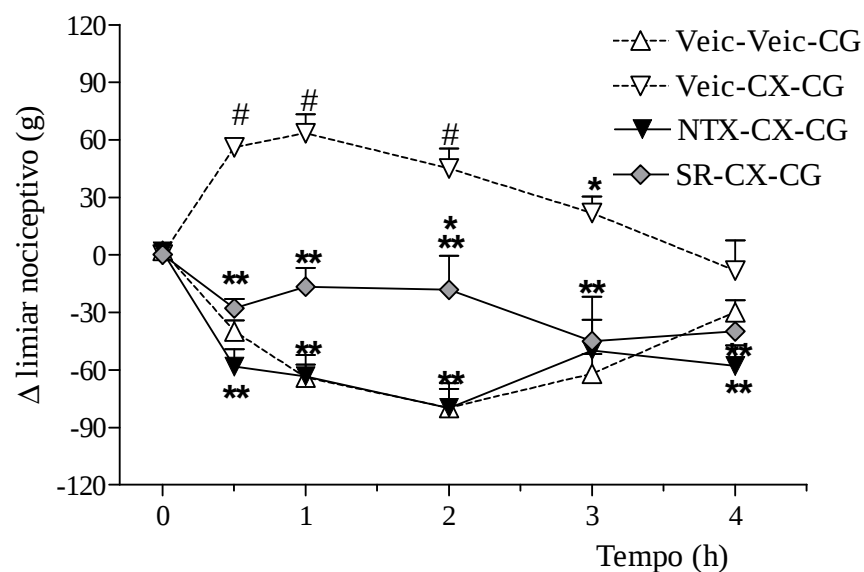


Gráfico 37. Prevenção da hipotalgesia induzida por celecoxibe (CX; 300 µg/50 µl) de maneira total pelo antagonismo de receptores opióides e parcial pelo antagonismo do receptor canabinóide tipo CB₂. A naltrexona (NTX; 50 µg/50 µl) ou SR144528 (SR; 50 µg/50 µl) foram administrados, por via intraplantar, ½ hora antes do CX. A carragenina (CG; 250 µg/100 µl) foi injetada 5 min após o CX. Veic: salina. *: diferente de Veic-CG; **: diferente de CX-CG; #: maior que zero (N= 5-7; P < 0,05).

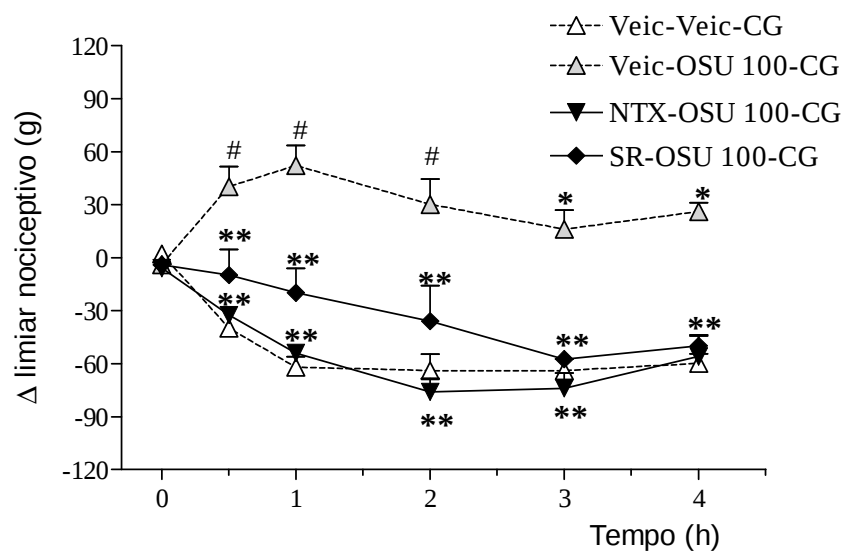


Gráfico 38. Prevenção total da hipotalgesia induzida por OSU03012 (OSU; 100 µg, i.pl.) pelo antagonismo de receptores opióides e canabinóides tipo 2 (CB₂). A naltrexona (NTX; 50 µg/50 µl) ou SR144528 (SR; 50 µg/50 µl) foram administrados, por via intraplantar, ½ hora antes do OSU. A carragenina (CG; 250 µg/100 µl) foi injetada 5 min após o OSU. Veic: salina. *: diferente de Veic-CG; **: diferente de OSU-CG; #: maior que zero (N= 5; P < 0,05).

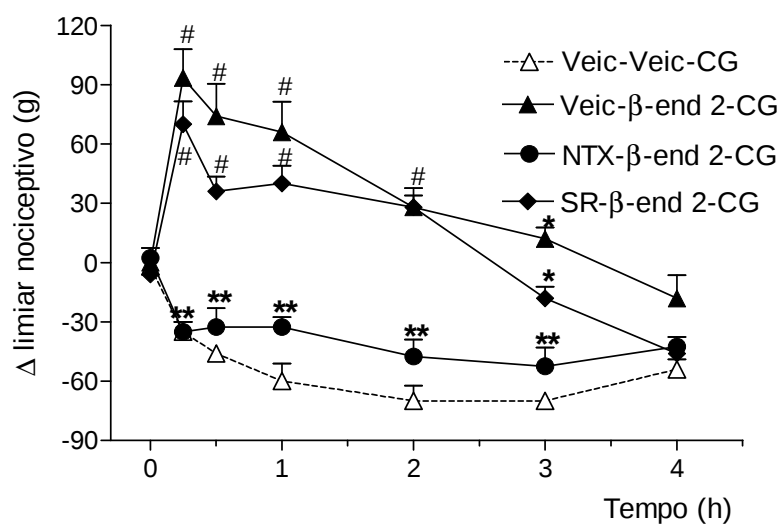


Gráfico 39. Prevenção total da hipoalgesia induzida por β-endorfina (β-end; 2 μg/50 μl) pelo antagonismo de receptores opióides e ausência de efeito do antagonista de receptor CB₂ sobre este efeito. A naltrexona (NTX; 50 μg/50 μl) ou SR144528 (SR; 50 μg/50 μl) foram administrados, por via intraplantar, ½ hora antes da β-end. A carragenina (CG; 250 μg/100 μl) foi injetada 5 min após a β-end. Veic: salina. *: diferente de Veic-CG; **: diferente de β-end-CG; #: maior que zero (N= 5; P < 0,05).

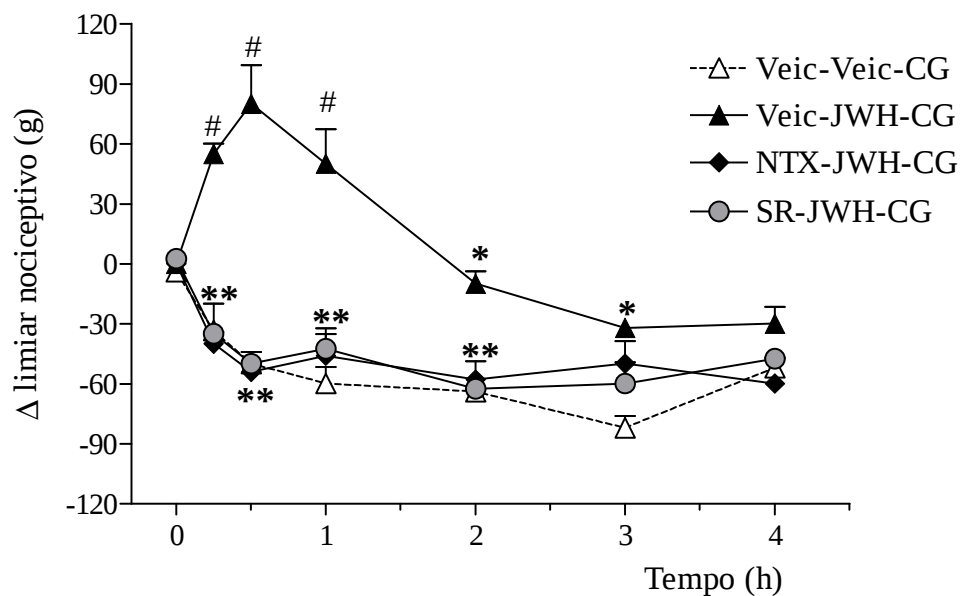


Gráfico 40. Prevenção total da hipoalgesia induzida por JWH015 (JWH; 33 µg/50 µl) após antagonismo de receptores opióides e de receptor CB₂. A naltrexona (NTX; 50 µg/50 µl) ou SR144528 (SR; 50 µg/50 µl) foram administrados, por via intraplantar, ½ hora antes do JWH. A carragenina (CG; 250 µg/100 µl) foi injetada 5 min após o JWH. Veic: DMSO < 1%. **: diferente de Veic-JWH-CG; #: maior que zero (N= 5; P < 0,05).

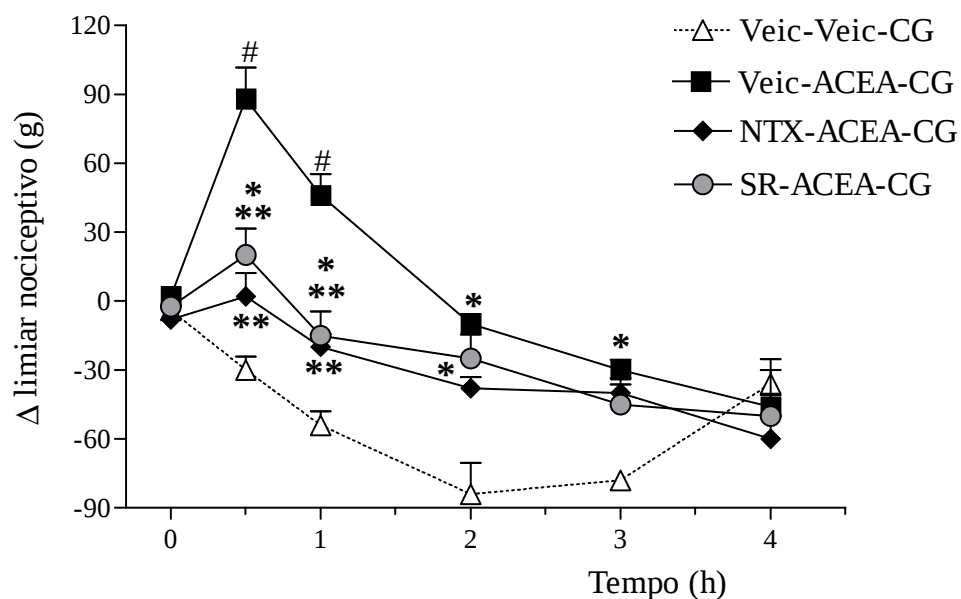


Gráfico 41. Efeito parcial de antagonistas de receptores opióides e de receptor CB₂ sobre a hipoalgesia induzida por ACEA (60 µg, i.pl.). A naltrexona (NTX; 50 µg/50 µl) ou SR144528 (SR; 50 µg/50 µl) foram administrados, por via intraplantar, ½ hora antes do ACEA. A carragenina (CG; 250 µg/100 µl) foi injetada 5 min após o ACEA. Veic: DMSO < 1%. **: diferente de hipoalgesia #: maior que zero (N= 5; P < 0,05).

21. PARTICIPAÇÃO DA β -ENDORFINA NA RESPOSTA HIPOALGÉSICA INDUZIDA PERIFERICAMENTE

Nesta etapa do estudo, foram realizados novos experimentos de marcação imunohistoquímica para β -endorfina no epitélio da pele circunvizinha ao sítio inflamatório. Como no ensaio descrito anteriormente, nos grupos pré-tratados com veículo e estimulados com CG, foi observado um aumento drástico da imunomarcação para β -endorfina e, neste ensaio, uma redução desta área marcada para β -endorfina foi observada nos animais pré-tratados, por via intraplantar, com CX ou JWH entre os tempos $\frac{1}{2}$ e 2 h (Gráf. 42 A, 43 e 46).

Interessantemente, o efeito de redução da marcação para β -endorfina causada pelo CX foi prevenido pelo antagonista de receptores CB_2 (SR144528; 50 μ g) (Gráf. 42 A e 43) nos mesmos tempos ($\frac{1}{2}$ e 1 h) em que esta dose de antagonista CB_2 foi eficiente em prevenir o efeito hipoalgésico do CX (Gráf. 42 B e 44). Sendo assim, o efeito dos tratamentos sobre a marcação de β -endorfina foi comparada aos efeitos sobre a nocicepção (nos mesmos tempos) e foram descritas separadamente nos itens seguintes:

21.1. Avaliação da imunomarcção para β -endorfina no tempo meia hora após carragenina

No tempo $\frac{1}{2}$ h, ocorreu aumento da imunomarcção para de β -endorfina no epitélio da pele da pata dos animais que receberam apenas veículo antes do estímulo hiperalgésico com CG. Entretanto, nos ratos pré-tratados com CX ou JWH não foi observado tal aumento da área marcada. Interessantemente, nos animais tratados com CX, aos quais se administrou o antagonista CB₂ (SR), foi observado o aumento da imunomarcção para β -endorfina semelhante aos controles CG.

No mesmo tempo, ao teste do algesímetro, foi observada redução do limiar nociceptivo (hiperalgesia) nos grupos de animais em cujas amostras se detectou aumento da marcação para β -endorfina e elevação do limiar nociceptivo (hipoalgesia) nos animais cujas amostras não mostraram tal aumento de marcação.

Logo, pode-se notar que, nestes grupos experimentais, o aumento da marcação para β -endorfina relacionou-se inversamente com a ocorrência de hipoalgesia, isto é, os animais pré-tratados apenas com veículo (Veic-Sal-CG) ou com SR e CX (SR-CX-CG) mostraram aumento da área marcada para β -endorfina e redução do limiar nociceptivo (hiperalgesia). Inversamente, os animais tratados com CX ou JWH antes da CG, mostraram redução da área marcada para β -endorfina e elevação do limiar nociceptivo (hipoalgesia) (Gráf. 42 A e B).

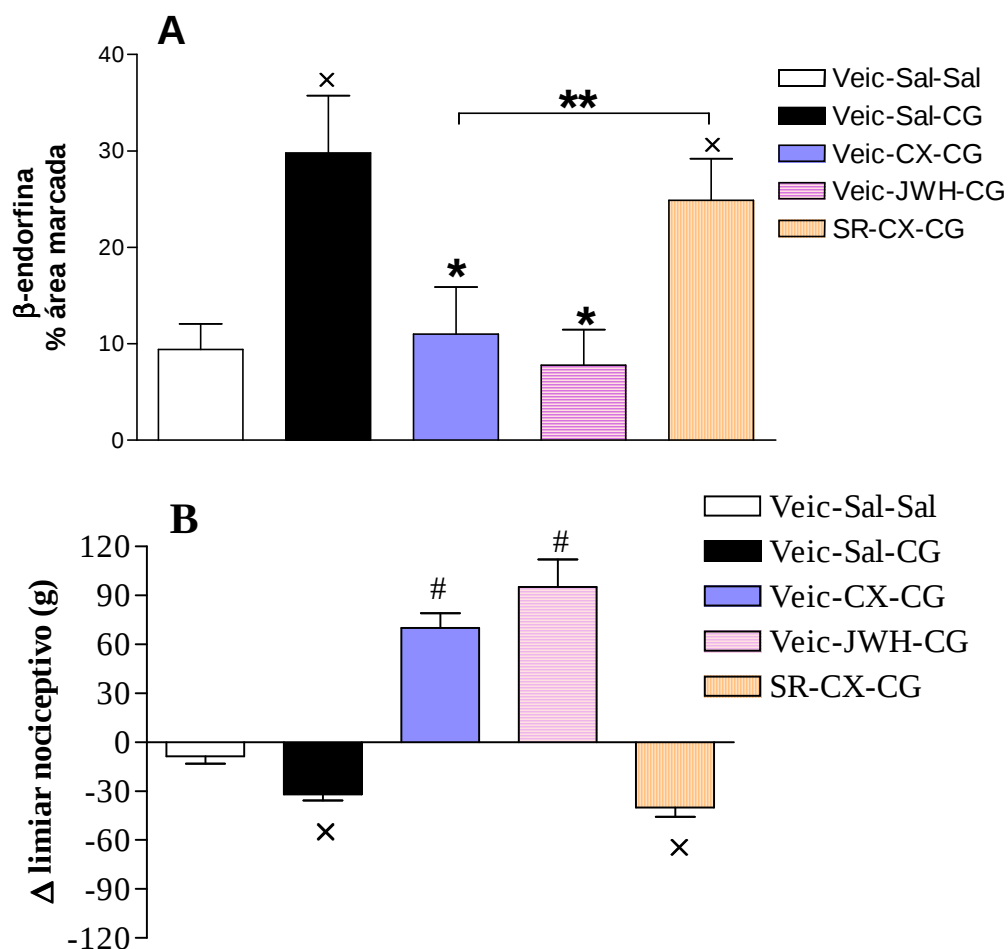


Gráfico 42. Evidência da liberação de β -endorfina no epitélio da pele da pata de ratos no tempo 30 minutos após administração de carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.). Em A: redução da área imunomarcada para β -endorfina no epitélio da pata de ratos pré-tratados com celecoxibe (CX; 300 μ g, i.pl.) ou JWH015 (JWH; 33 μ g, i.pl.) e reversão deste efeito após pré-tratamento com antagonista de receptores CB₂ (SR144528; 50 μ g, i.pl.). **Em B:** elevação do limiar nociceptivo nos animais pré-tratados com celecoxibe (CX; 300 μ g, i.pl.) ou JWH015 (JWH; 33 μ g, i.pl.) e reversão deste efeito após pré-tratamento com SR144528 no modelo de hiperalgesia induzida por CG. x: diferente de Sal; *: diferente de Veic-CG; **: diferente de CX-CG; #: maior que zero (N= 7; P < 0,05).

21.2. Avaliação da imunomarcacão para β -endorfina no tempo uma hora após a carragenina

No tempo 1 h, também foi observada a mesma relação entre redução da marcação para β -endorfina e elevação do limiar nociceptivo (Gráf. 43 e 44), isto é, o pré-tratamento com CX ou JWH (Veic-CX-CG) causou redução da imunomarcacão para β -endorfina quando comparado aos animais pré-tratados com veículo (Veic-Veic-CG) (Gráf. 43) e elevação do limiar nociceptivo (Gráf. 44).

Assim, para se esclarecer se esta redução de β -endorfina devia-se à redução da síntese ou à liberação do opióide endógeno para o interstício, o tecido plantar dos ratos tratados pelos diferentes protocolos experimentais foi excisado e incubado por 1 h em uma solução nutritora (HBSS) e um ensaio imuno-enzimático (ELISA) foi realizado para detecção da β -endorfina no sobrenadante desta solução. O ELISA demonstrou o aumento da síntese de β -endorfina nos tecidos totais da pata (macerado de tecidos plantares) em todos os grupos tratados com CG em relação ao grupo controle tratados apenas com salina (Gráf. 45).

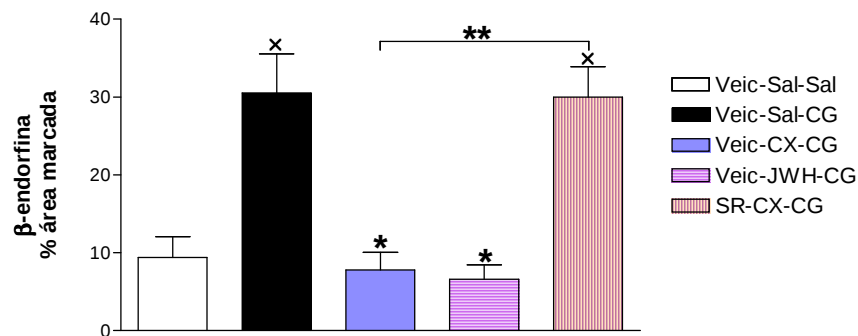


Gráfico 43. Redução da área marcada imuno-histoquímicamente para β -endorfina após administração de carragenina, em animais controle ou pré-tratados com celecoxibe (CX; 300 μ g) ou JWH015 (JWH; 33 μ g). A reversão deste efeito pelo antagonista de receptores CB_2 (SR144528, 10 μ g) também foi mostrada. Os ratos receberam salina ou carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.) 5 min após a administração de sal, CX ou JWH. O SR foi administrado 30 min antes da CG. x: diferente de Sal; *: diferente de Veic-Sal-CG (N= 7-9; $P < 0,05$).

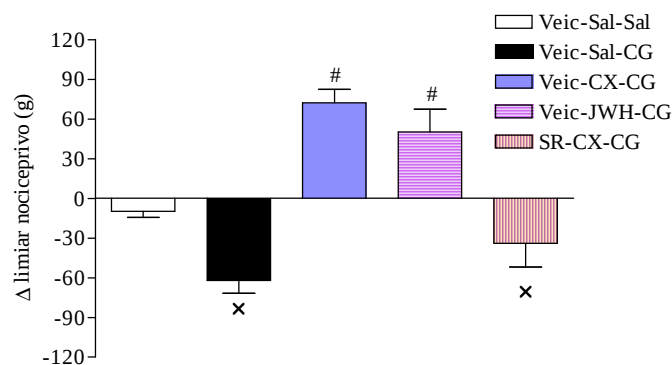


Gráfico 44. Elevação do limiar nociceptivo nos animais tratados, por via intraplantar, com celecoxibe (CX; 300 μ g) ou JWH015 (JWH; 33 μ g) e reversão total deste efeito após pré-tratamento com antagonista de receptores CB_2 (SR144528; 50 μ g, i.pl.). Os ratos receberam salina ou carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.), 5 min após a administração de veículo, CX ou JWH. O SR foi administrado 30 min antes da CG. x: diferente de Sal; #: maior que zero (N= 7; $P < 0,05$).

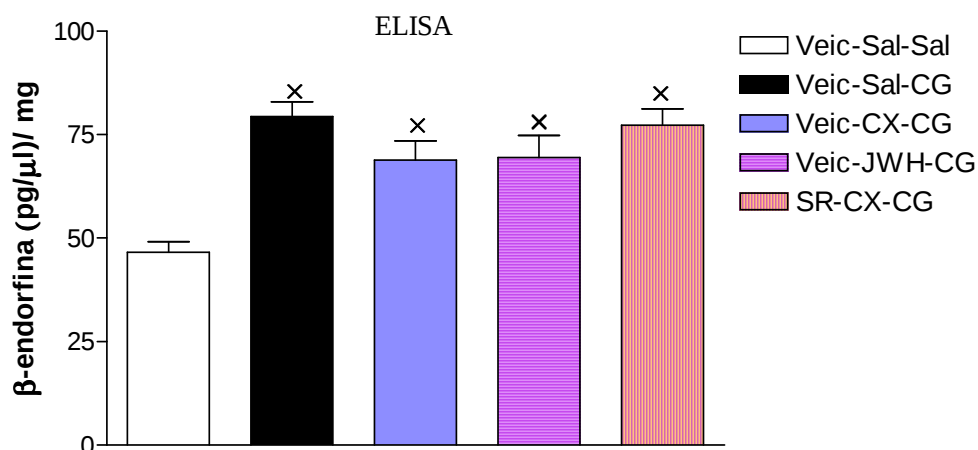


Gráfico 45. Aumento da síntese de β -endorfina nos tecidos plantares de ratos tratados com carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.). A concentração de β -endorfina foi determinada na solução nutritora na qual o tecido plantar dos ratos tratados foi incubado por 1 h e depois macerado. Para detecção, foi utilizado *Kit* imuno-enzimático (ELISA) comercial para β -endorfina. x: diferente de Veic-Sal-Sal (N= 6-8; P < 0,05).

21.3. Avaliação da imunomarcagem para β -endorfina no tempo duas hora após a carragenina

No tempo 2 h, ainda foi observado aumento da área marcada para β -endorfina nas amostras extraídas de ratos tratados intraplantarmente com veículo e CG, apesar disto, este efeito se mostrou de menor amplitude quando comparado aos tempos anteriormente descritos. Como nos tempos 30 e 60 min, foi observada uma redução da área marcada em ratos pré-tratados com CX ou JWH. Entretanto, neste tempo, de forma diferente, foi observada uma redução significativa de β -endorfina nos ratos pré-tratados também com SR e CX, fato que foi relacionado a uma elevação no limiar nociceptivo destes animais no tempo correspondente no teste do algesímetro de pressão (Gráf. 46 e 47).

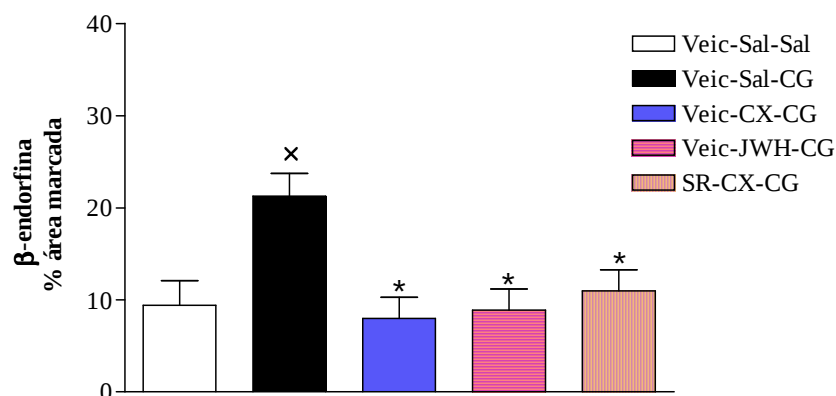


Gráfico 46. Redução da área imunomarcada para β -endorfina após a administração de carragenina, em animais controle (Veic-Sal-CG) ou pré-tratados com celecoxibe (CX; 300 μ g) ou JWH015 (JWH; 33 μ g). Tempo: 120 min. Salienta-se que o antagonista canabinóide, SR144528 (SR; 50 μ g), não afetou a redução da imunomarcção causada pelo celecoxibe neste tempo. x: diferente de Sal; *: diferente de Vei-Sal-CG (N= 7-9; P < 0,05).

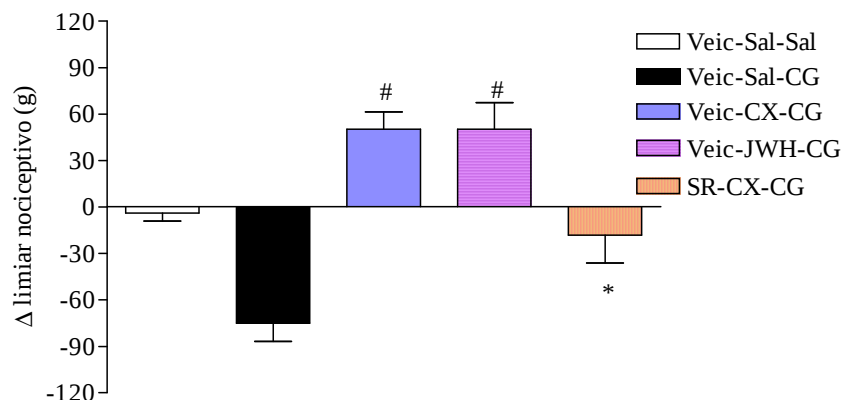


Gráfico 47. Elevação do limiar nociceptivo nos animais tratados, por via intraplantar, com celecoxibe (CX; 300 μ g) ou JWH015 (JWH; 33 μ g) e efeito anti-hiperalgésico em ratos pré-tratados com antagonista de receptores CB₂ (SR144528; 50 μ g, i.pl.). Os animais dos grupos experimentais receberam carragenina (CG; 250 μ g, i.pl.), 5 min após o CX ou JWH. O SR foi administrado 30 min antes da CG. Sal: salina. *: diferente de Sal-CG; #: maior que zero (N=7; P < 0,05).

RESULTADOS PARTE III

**Efeito hipoalgésico de um análogo do celecoxibe (araquidonoil-celecoxibe)
desenvolvido na Faculdade de Farmácia da UFMG**

22. EFEITOS DO ARAQUIDONOIL-CELECOXIBE

22.1. Efeito da administração intraplantar de araquidonoil-celecoxibe sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina em pata de ratos

O araquidonoil-celecoxibe (AACX), administrado intraplantarmente, induziu hipoalgesia unilateral de maneira dose-dependente, apresentando efeito máximo entre 15 a 30 min após a injeção da CG, sendo que sua ação analgésica total foi maior que 3 horas (Gráf. 48).

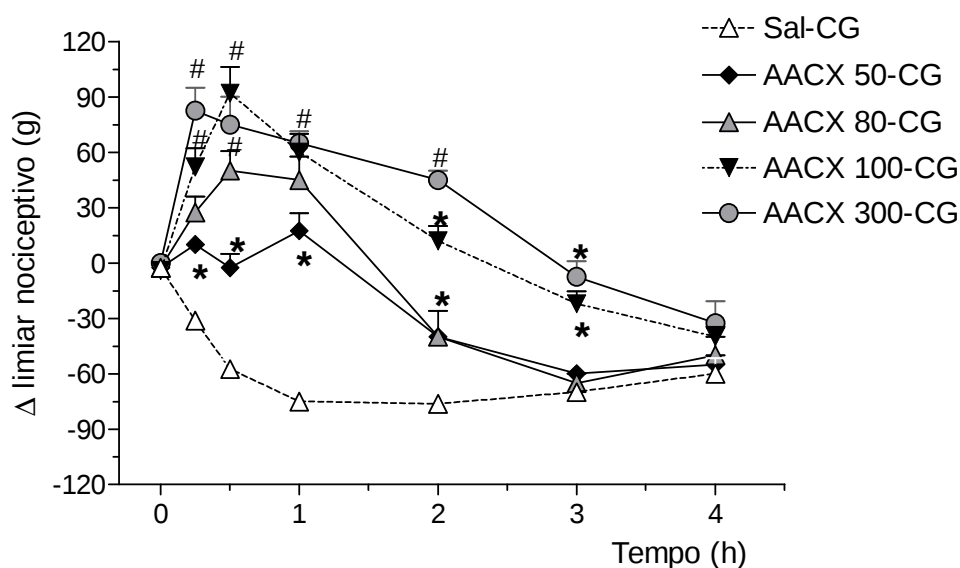


Gráfico 48. Efeito hipoaléxico induzido pela administração intraplantar de araquidonoil-celecoxibe (AACX; 50; 80; 100 e 300 µg), no modelo de hiperalgesia causado por carragenina (CG; 250 µg) em pata de ratos. O AACX foi injetado intraplantarmente 5 min antes da CG. As patas contralaterais receberam veículo no mesmo volume. *: diferente de Veic-CG; #: maior que zero (N= 6; P < 0,05).

22.2. Comparação entre o efeito hipalgésico induzido pela administração periférica de celecoxibe e do araquidonoil-celecoxibe

Quando comparado ao CX, o AACX apresentou pico de ação mais rápido, atingindo seu efeito máximo 15 minutos após a injeção da carragenina, enquanto a hipotalgesia induzida pelo CX atinge seu ápice apenas no tempo 1 h (Gráf 49), mas seu efeito analgésico total perdura até 4 h.

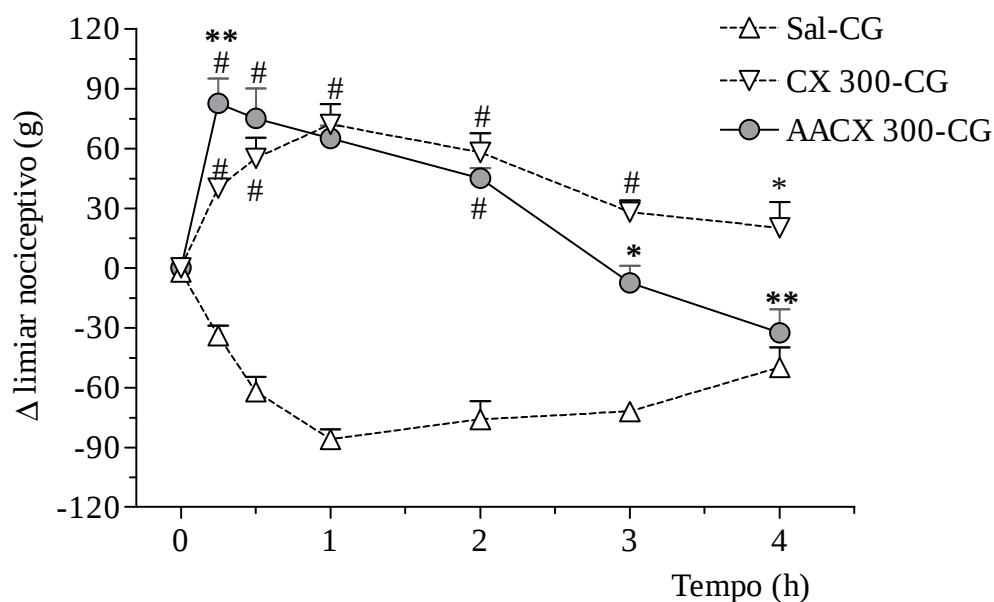


Gráfico 49. Comparação entre o efeito hipalgésico induzido por injeções intraplantares de celecoxibe (CX; 300 µg) e araquidonoil-celecoxibe (AACX; 300 µg). O CX ou AACX foram administrados 5 min antes da carragenina (CG; 250 µg). *: diferente de Veic-CG; **: diferente de CX-CG; #: maior que zero (N= 5-6; P < 0,05).

22.3. Efeito preventivo da citocalasina B, naltrexona ou SR144528 sobre a hipoalgesia causada por araquidonoil-celecoxibe

Como observado para o CX, tanto a CTB quanto a NTX foram capazes de inibir totalmente o efeito analgésico causado pela administração intraplantar de AACX (Gráf. 50). Porém, de forma diferente ao observado para o CX, o qual teve seu efeito parcialmente prevenido após a administração do antagonista CB₂, o efeito hipoalгésico causado pelo AACX foi totalmente prevenido pelo pré-tratamento com o antagonista CB₂ (SR144528) (Gráf. 50).

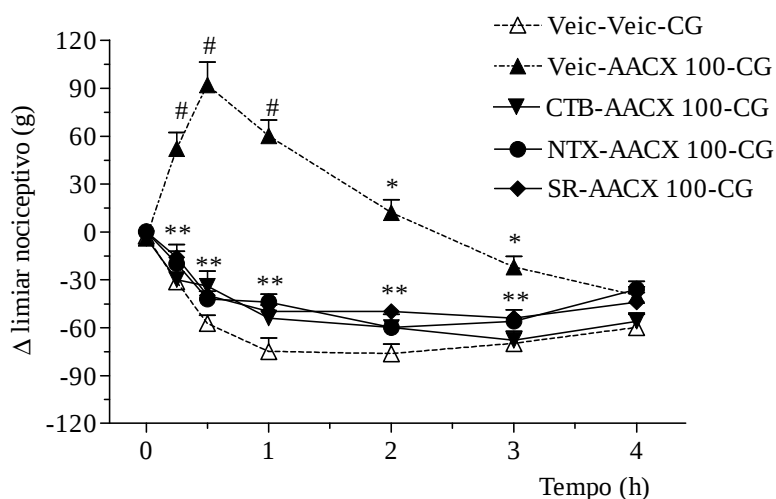


Gráfico 50. Inibição do efeito hipoalгésico induzido pela administração intraplantar de araquidonoil-celecoxibe (AACX; 100 µg/50 µl) após o tratamento com inibidor de microfilamentos (CTB; 1 µg/50 µl), antagonistas opióide (NTX; 50 µg/50 µl) ou antagonista de receptor canabinóide CB₂ (SR; 50 µg/50 µl). Os antagonistas foram administrados, por via intraplantar, 30 min antes do AACX, o qual por sua vez, foi administrado 5 min antes da carragenina (CG; 250 µg/50 µl). *: diferente de Veic-CG; **: diferente de AACX-CG; #: maior que zero (N=5; P < 0,05).

22.4. Efeito do araquidonoil-celecoxibe sobre a marcação imuno-histoquímica para β -endorfina

Os ensaios de imunomarcção para β -endorfina no epitélio da pele da pata de ratos estimulados com CG, mostraram redução drástica do percentual da área marcada após administrações intraplantares de AACX. Interessantemente, este efeito foi inibido pelo pré-tratamento com SR, um inibidor de receptor canabinóide tipo 2 (Gráf. 51)

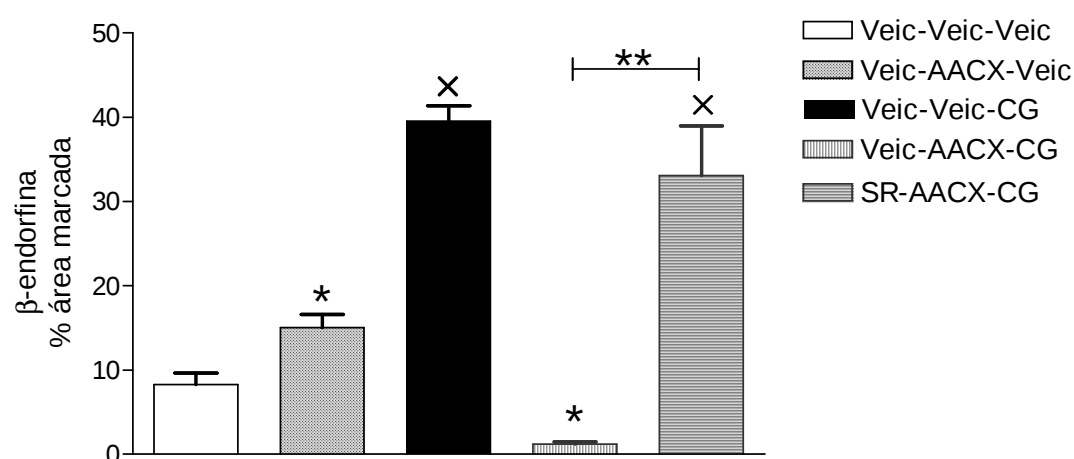


Gráfico 51. Evidência de liberação de β -endorfina pelo epitélio da pele das patas de ratos tratados, intraplantarmente, com araquidonoil-celecoxibe (AACX; 100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$). A reversão deste efeito pelo antagonista de receptor canabinóide CB_2 (SR; 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$) também é apresentado. O SR foi administrado, por via intraplantar, 30 min antes do AACX, o qual por sua vez, foi administrado 5 min antes da carragenina (CG; 250 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$). x: diferente de Veic- Veic; *: diferente de Veic-CG; **: diferente de AACX-CG (N= 7; P < 0,05).

DISCUSSÃO

A hiperalgesia aguda em resposta à sensibilização das fibras sensitivas periféricas depende principalmente da liberação local de mediadores pró-nociceptivos, os quais atuam sobre os nociceptores, ativando canais catiônicos e causando, conseqüentemente, alterações eletrofisiológicas nas membranas dos neurônios sensitivos (Hucho & Levine, 2003). Em contrapartida, a resposta antinociceptiva endógena depende primordialmente da síntese e liberação de opióides e canabinóides, assim como também da síntese, transporte e expressão de receptores destes sistemas, fenômenos dependentes de funções do citoesqueleto (Stein *et al.*, 1988; Hassan *et al.*, 1993; Mousa *et al.*, 2001; Millan, 2002; Zöllner *et al.*, 2003). Sendo assim, considerando-se a participação crucial do sistema opióide endógeno na hipoalgesia causada pelo celecoxibe (França *et al.*, 2006), no presente estudo, procurou-se investigar os efeitos de inibidores do citoesqueleto sobre os mecanismos de indução de hipoalgesia após administração de celecoxibe (CX), um coxibe-padrão, ou de morfina (MORF), um agonista opióide amplamente estudado.

Com o intuito de padronizar o modelo de avaliação da resposta nociceptiva e de confirmar dados de literatura, inicialmente, foram necessários estudos para avaliação da resposta nociceptiva de ratos tratados com diferentes compostos analgésicos, no modelo de inflamação periférica causada por carragenina (CG). Tais estudos reproduziram o efeito de elevação do limiar de deflagração da resposta nociceptiva acima dos valores basais (hipoalgesia) induzido pela administração sistêmica de celecoxibe (Francischi *et al.*, 2002), dipirona, paracetamol (Rezende *et al.*, 2008) ou morfina (Ferreira & Nakamura, 1979; Duarte & Ferreira, 1992, Yamamoto *et al.*, 1993). Foi observado, também, o efeito de retorno do limiar nociceptivo ao nível basal (anti-hiperalgesia) nas patas inflamadas de

ratos tratados com indometacina ou SC560 (Winter & Flataker, 1965; Smith *et al.*, 1998; França *et al.*, 2006).

Apesar das semelhanças observadas entre o efeito da administração sistêmica de coxibes e opióides, algumas diferenças foram evidentes, como a maior intensidade da resposta ao opióide, bem como, o caráter unilateral da resposta aos coxibes (apenas na pata inflamada), ao passo que, a morfina produziu resposta bilateral.

Outra diferença observada foi a ausência de efeito do celecoxibe sobre a resposta nociceptiva de ratos não hiperalgésicos. De forma diferente, o efeito analgésico da morfina ocorre mesmo em modelos na ausência de estímulo nociceptivo mesmo que em amplitudes menores (Stanfa *et al.*, 1992; Stanfa & Dickerson, 1995; Van der Kam *et al.*, 2008). Confirmando também relatos anteriores, foram observados resultados de uma maior elevação do limiar nociceptivo na pata inflamada em relação à pata não inflamada após o tratamento com morfina. Mais recentemente, González-Rodríguez *et al.* (2010) relacionaram este efeito de potencialização do efeito no sítio inflamado à ativação local de canais para potássio (GIRK).

Nos estudos para caracterização do decurso temporal dos efeitos do CX, observou-se que o celecoxibe induziu hipoalgesia apenas quando os ratos foram tratados até 30 min após o estímulo inflamatório com carragenina, enquanto a indução de hipoalgesia em animais pós-tratados com morfina foi observada até 2 horas após diferentes estímulos hiperalgésicos (Stanfa *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1993). De forma interessante, o efeito hipoalgésico foi similar quando o celecoxibe foi administrado antes ou ½ h depois da carragenina, fase que envolve a liberação e a ação de diversos mediadores inflamatórios, como substância P, histamina e serotonina (DiRosa, 1972; Vinegar *et al.*, 1976 e 1987).

Porém, quando o celecoxibe foi administrado durante o efeito máximo de sensibilização periférica e de grande expressão de COX-2 e PGE₂ (2 h) (Goppelt-Strube & Beich, 1997; Nantel *et al.*; 1999), apenas um efeito anti-hiperalgésico foi observado. Em concordância, quando se utilizou o modelo de hiperalgesia causada por PGE₂, em animais pós-tratados com celecoxibe não foi observado efeito analgésico algum. Este resultado é intrigante, pois o pré-tratamento com celecoxibe ainda foi capaz de causar hipoalgesia quando a PGE₂ foi utilizada como agente hiperalgésico, porém esta hipoalgesia foi de intensidade menor e observada mais tardiamente, apenas nos tempos 2 e 3 horas. Ainda, somando-se a este fato, o efeito anti-hiperalgésico causado pela administração tardia de celecoxibe não foi observado quando a hiperalgesia foi induzida pela PGE₂, o que sugere que tal efeito anti-hiperalgésico possivelmente deve-se à ação inibitória de celecoxibe sobre a COX-2.

Com base nestes resultados, sugere-se que a eficiência hipoalgésica do celecoxibe pode depender da capacidade adaptativa da resposta periférica, como, por exemplo, da abertura da barreira perineural causada pela resposta inflamatória à carragenina, a qual poderia possibilitar tanto uma ação direta do celecoxibe em alvos intracelulares (Grösch *et al.*, 2006) no neurônio nociceptivo periférico, quanto uma super-regulação e liberação de peptídeos opióides por células periféricas e/ou super-expressão de receptores (Stein *et al.*, 1990; Draisci *et al.*, 1991; Hassan *et al.*, 1993; Ji *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998; Mousa *et al.*, 2001; Machelska & Stein, 2006) nas membranas neuronais após o estímulo hiperalgésico. Ou seja, estes resultados sugerem que a ocorrência do efeito hipoalgésico causado pelo celecoxibe pode depender de alterações moleculares induzidas pela resposta endógena a um agente lesivo.

De posse destes dados iniciais e considerando-se a importante participação do citoesqueleto em fenômenos relacionados ao transporte e liberação de mediadores envolvidos na resposta nociceptiva (Stanfa *et al.*, 1992; Kayser *et al.*; 1991; Planas *et al.*, 1994; Ossipov *et al.*, 1995; Honoré *et al.*, 1996), o celecoxibe e a morfina foram escolhidas como drogas-padrão e tiveram seus efeitos comparados em uma nova abordagem farmacológica para investigação de envolvimento periférico de componentes do citoesqueleto nos mecanismos de indução de hipoalgesia, abordados a seguir.

Resposta nociceptiva e citoesqueleto

Neste contexto, procurou-se inicialmente estudar a participação periférica do citoesqueleto no efeito hipoalgésico causado pela administração sistêmica de celecoxibe ou morfina, utilizando-se para isso, inibidores da função de seus principais componentes: microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos (Lodish *et al.*, 2004; Dillon & Goda, 2005).

Os experimentos assim realizados mostraram, de maneira inédita, que a despolimerização periférica de microtúbulos e microfilamentos, mas não de filamentos intermediários, afetou a resposta hipoalgésica induzida por coxibes ou morfina. Notadamente, a hipoalgesia induzida pela morfina foi afetada apenas na pata em que os inibidores do citoesqueleto foram administrados, indicando participação local destes componentes neste efeito.

Apesar de nenhum estudo *in vitro* ter sido realizado para verificar o sítio exato de atuação das drogas modificadoras da função do citoesqueleto, Dina *et al.* (2003) e França (2007) demonstraram a eficiência de drogas também utilizadas neste estudo, em induzir disfunção do citoesqueleto em culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal. Estes

estudos avaliaram a integridade da estrutura do citoesqueleto através de ensaios de eletrofisiologia e imuno-histoquímica confocal. Sustentando também os achados deste estudo, foi observado que mais de um inibidor do citoesqueleto mostraram o mesmo efeito sobre o limiar de deflagração da resposta nociceptiva e que, para microfilamentos, este efeito foi prevenido pela estabilização prévia do mesmo componente.

Em uma abordagem geral, os resultados observados neste estudo concordam com trabalhos anteriores, os quais relataram a interferência de inibidores do citoesqueleto em sinais clínicos de dor e também demonstraram que estas drogas podem mediar mudanças morfológicas e funcionais em receptores ligados à nocicepção (Aley *et al.*, 2000; Bloch *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2002; Dina *et al.*, 2003). De acordo também, estão trabalhos que demonstraram a ativação de funções do citoesqueleto após a sensibilização de diferentes receptores periféricos envolvidos na resposta nociceptiva, quando aplicadas localmente (Lopshire & Nicol, 1998; Malik-Hall *et al.*, 2003, Goswami *et al.*, 2004 e 2007). Tais relações serão abordadas mais detalhadamente ao decorrer da discussão.

Resposta nociceptiva e microtúbulos

Inicialmente, para se verificar seletivamente o envolvimento de microtúbulos na resposta hipoalgésica, foram utilizadas duas drogas inibidoras da adição de dímeros de tubulina ao sítio de polimerização de microtúbulos, o nocodazol (NDZ) e a colchicina (CCC) (Samson *et al.*, 1979; Brinkley, 1997; Terkeltaub, 2008). Assim sendo, nocodazol e colchicina afetaram a resposta hipoalgésica observada, prevenindo totalmente o efeito do tratamento com celecoxibe e parcialmente o daquele com morfina. Interessantemente, tais inibidores potencializaram a hiperalgesia tardia induzida pela carragenina. Resultados semelhantes de indução de hiperalgesia após administração de inibidores da polimerização

de microtúbulos foram anteriormente relatados (Ahern *et al.*, 1987; Das *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2007), porém, relacionados a doses mais altas e associados à indução de neuropatia.

A observação do efeito local dos inibidores de microtúbulos sobre a resposta hipoalгésica mostrou que estes componentes participaram de forma mais importante quando o efeito foi induzido pelo celecoxibe, sugerindo importante componente periférico da resposta a este fármaco. Ainda, como a resposta à morfina foi afetada apenas na pata injetada com os inibidores de microtúbulos, sugere-se a participação local destes componentes.

Interessantemente, o aumento da duração da hiperalgesia induzida por carragenina após ruptura de microtúbulos, especialmente após administração de colchicina, contrasta agudamente com o relato anterior de atenuação da hiperalgesia induzida por epinefrina (Dina *et al.*, 2003). A epinefrina atua através de receptores β_2 -adrenérgicos (Aley *et al.*, 2001), os quais, uma vez ativados desencadeiam cascatas intracelulares de ativação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e das proteína-quinases A (PKA) e C *epsilon* (PKC ϵ), cujos efeitos dependem da integridade do citoesqueleto (Khasar *et al.*, 1999b; Aley *et al.*, 2000; Dina *et al.*, 2003). Com isso, o aparente contraste de resultados pode ser explicado através das diferenças entre vias de ativação intracelulares no modelo de hiperalgesia induzida pela carragenina e no modelo de hiperalgesia induzida pela epinefrina. A administração local de carragenina leva à estimulação de uma grande variedade de receptores, os quais, além de ativar as mesmas cascatas intracelulares que a epinefrina, também atuam diretamente sobre a proteína-quinase dependente de GMPc (PKG) e canais iônicos e ainda, sinalizam a super-regulação gênica de COX e G-proteínas (Khasar *et al.*, 1999; Nantel *et al.*, 1999; Aley *et al.*, 2000; Askari *et al.*, 2008).

Apesar destas importantes diferenças de mecanismo de indução de hiperalgesia, a explicação para a discrepância entre os resultados obtidos neste estudo e os obtidos por Dina *et al.* (2003) parece envolver principalmente a super-regulação neuronal de opióides e de seus referidos receptores induzido pela administração local de carragenina (Mousa *et al.*, 2001; Guan *et al.*, 2002; Puehler *et al.*, 2004 e 2006), ao passo que, nenhuma evidência da ocorrência desta supra-regulação após administrações de epinefrina tenha sido encontrada (Khasar *et al.*, 1999b, Satarian *et al.*, 2008). Apesar de a epinefrina não ter sido estudada em nosso estudo, reforçam esta hipótese os resultados obtidos de estímulo da síntese de β -endorfina em queratinócitos após a administração de carragenina, conforme discussão a seguir.

Como explicação para os resultados de aumento da duração do efeito da carragenina por inibidores de microtúbulos, não se pode descartar um potencial efeito nociceptivo neurotóxico (Kumar *et al.*, 2007) da colchicina sobre os nociceptores. Entretanto, este não parece ser a causa da observada extensão do tempo de hiperalgesia, pois, doses maiores deste fármaco não foram relacionadas a efeitos degenerativos em fibras sensitivas ou a déficit motor ou de sensibilidade ao estímulo mecânico (Csillik *et al.*, 1978; Kingery *et al.*, 1998). Além disso, o efeito neurotóxico da colchicina parece se limitar a fibras colinérgicas (Kumar *et al.*, 2007).

De forma interessante, injeções perineurais de inibidores de microtúbulos mostraram efeitos inibitórios sobre o transporte axonal e a difusão lateral de proteínas na membrana neuronal (Berk *et al.*, 1992; Yamamoto & Yaksh; 1993; Archer *et al.*, 1994; Kingery *et al.*, 1998). Tais funções celulares são requeridas para o transporte intracelular de um grande número de moléculas, inclusive de citocinas, neurotransmissores e receptores

metabotrópicos (Okabe & Hirokawa, 1989). Assim, sustentando também nossos achados, Colburn & DeLeo (1999) demonstraram que a injeção perineural de colchicina proximal ao nervo ciático, bloqueou o transporte axonal rápido da periferia para o SNC e que tal transporte não foi crucial para o desenvolvimento da alodínia mecânica. O mesmo estudo ainda sugere que a descontinuidade dos sinais transportados da periferia causada pela colchicina, provoca a ativação de astrócitos e da micróglia no corno dorsal da medula espinhal. A ativação destas células induz a liberação local de mediadores pró-nociceptivos, os quais desempenham papel crucial na manutenção do estado hiperalgésico e na cronificação de processos nociceptivos agudos (revisado em Svensson & Bordin, 2010). Ainda de acordo, Dilley & Bove (2008) relataram um aumento da resposta de fibras C sensitivas após injeções perineurais de colchicina. Extrapolando tais resultados para o modelo usado no presente estudo, da mesma forma, o transporte axonal rápido da periferia para o SNC parece não estar criticamente envolvido no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica causada pela carragenina. Entretanto, os resultados observados também sugerem que o transporte axonal seria crucial para a resposta endógena antinociceptiva, possivelmente através da sinalização de supra-regulação, transporte (Mousa *et al.*, 2001; Puehler *et al.*, 2004) e a expressão de receptores opióides, especialmente na periferia (Planas *et al.*, 1994; Kozak *et al.*, 2002; Guan *et al.*, 2005). Assim, o resultado de prolongamento do estado hiperalgésico causado pela carragenina, após a CCC, pode ser explicado pela inibição da resposta antinociceptiva periférica, a qual causa a limitação da hiperalgesia ou ainda, pela liberação de mediadores pró-nociceptivos pela glia ativada no corno dorsal da medula espinhal.

Outros resultados interessante­mente relacionados aos dados obtidos neste estudo foram relatados por Goswami *et al.* (2004, 2006 e 2007), que demonstraram uma interação direta e específica entre microtúbulos e receptores denominados TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid type 1*). O TRPV1 é um canal catiônico não seletivo exposto em membranas de neurônios sensitivos primários (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000) e desempenha um papel estabelecido na transmissão do sinal nociceptivo, podendo ser ativado por uma variedade de estímulos potencialmente nocivos (Caterina *et al.*, 1997 e 2000; Hwang *et al.*, 2002). Uma vez ativado, o TRPV1 promove a rápida despolimerização de microtúbulos no meio intracelular favorecendo a deflagração do potencial nociceptivo, evento parcialmente dependente de cálcio (Goswami *et al.*, 2007a, 2007b e 2008). Vários estudos subseqüentes da relação entre a ativação de TRPs e a dinâmica de microtúbulos levaram à formulação da hipótese de que o TRPV1 estaria envolvido no processo de cronificação da dor (Goswami *et al.*, 2009) com a qual, indiretamente, corroboram nossos resultados de extensão do estado hiperalgésico induzido por carragenina após ruptura farmacológica de microtúbulos. Em suma, estes resultados sugerem uma similaridade de efeito entre a ativação de TRPV1 (e conseqüente despolimerização de microtúbulos) e a ruptura farmacológica de microtúbulos. Obviamente, apesar desta indicação, estudos mais pormenorizados desta relação são necessários para se concluir uma relação direta entre estes componentes e a cronificação de estados nociceptivos.

Resposta nociceptiva e filamentos intermediários

Subseqüentemente, o papel de filamentos intermediários na hipoalgesia foi avaliado e, diferentemente do observado para inibidores de microtúbulos, a ausência de efeito do desestabilizador de filamentos intermediários (em doses referidas como efetivas por Dina *et*

al., 2003) sobre o limiar de deflagração da resposta nociceptiva de ratos, indicou a ausência de efeito deste componente na resposta estudada. Desta forma, os filamentos intermediários não parecem estar envolvidos nem no estabelecimento da dor inflamatória (hiperalgesia) induzida pela carragenina, nem na hipoalgesia induzida pelo celecoxibe ou pela morfina. Este fato pode ser explicado pela função basicamente estrutural relacionada a este componente do citoesqueleto (revisado em Herrmann *et al.*, 2009).

Continuando os estudos dos componentes do citoesqueleto, o envolvimento de microfilamentos na resposta hipoalgésica foi avaliado através da administração periférica de inibidores da sua polimerização, latrunculina B (LB) e citocalasina B (CTB) (Cooper *et al.*, 1987; Kueh & Mitchison, 2009).

Resposta nociceptiva e microfilamentos

Como observado nos experimentos com nocodazol e colchicina, a administração de inibidores de microfilamentos (LB e CTB) preveniu o efeito hipoalgésico induzido pelo celecoxibe totalmente e aquele induzido pela morfina, parcialmente. De forma interessante, a estabilização de microfilamentos, através da administração de faloidina, não alterou a resposta hipoalgésica induzida por celecoxibe, sugerindo que a polimerização subsequente dos microfilamentos não é requerida para que ocorra a hipoalgesia, porém, o dismantelamento (pelos inibidores) da rede citoesquelética pré-formada é capaz de alterar esta resposta. Apesar da menção na literatura científica da importância das funções do citoesqueleto na resposta nociceptiva (Bhave & Gereau, 2003), não foram encontrados estudos similares de efeitos periféricos de inibidores da função do citoesqueleto sobre a resposta antinociceptiva, tornando estes resultados sem precedentes para comparação científica.

Entretanto, como discutido anteriormente para nocodazol e colchicina, a ausência de efeito de latrunculina B e citocalasina B sobre a hiperalgesia induzida pela carragenina também contrastou com os resultados de atenuação da hiperalgesia induzida pela epinefrina após administração destas drogas (Dina *et al.*, 2003). A administração periférica de latrunculina B ou citocalasina B não causou efeito significativo sobre a resposta hiperalgésica induzida por carragenina, sendo que, os animais assim tratados desenvolveram hiperalgesia de intensidade similar aos animais controle (Veic-CG). Desta forma, estes dados são coerentes com a hipótese da importância da função dos microtúbulos no processo de cronificação da hiperalgesia, visto que, interações entre TRPV1 e a actina foram descartadas (Goswami *et al.*, 2006).

De posse destes resultados e devido à ausência de efeito da inibição de microfilamentos sobre a hiperalgesia induzida por carragenina, nos estudos subsequentes, a citocalasina B foi escolhida como droga padrão de inibição do citoesqueleto. Assim, primeiramente, foi demonstrado o caráter periférico do envolvimento de microfilamentos e a reversão tempo-dependente da hipoalgesia. Ainda, se observou que o efeito da citocalasina B foi suprimido em animais que receberam previamente um estabilizador de microfilamentos, confirmando a participação periférica destes componentes na resposta antinociceptiva.

Um resultado particularmente interessante foi a observada ausência de efeito de citocalasina B e de naloxona metiodida sobre a anti-hiperalgesia induzida por administrações tardias de celecoxibe (administrado 1 h após carragenina), sugerindo que mais de um mecanismo possa estar envolvido na indução de analgesia derivada da administração sistêmica de celecoxibe.

Estes resultados concordam com os dados anteriormente discutidos e principalmente com estudos que demonstram a importância da sinalização via componentes do citoesqueleto (Prekeris *et al.*, 1996 e 1998; Aley *et al.*, 2000 e 2001; Dina *et al.*, 2003; Beahve & Gereau, 2004) na cronificação de processos hiperalgésicos agudos, a qual pode ser mediada através da troca de sinalização intracelular e principalmente da manutenção do estímulo induzido por PKC ϵ (Khasar *et al.*, 1999; 2000; 2008; Souza *et al.*, 2002). A ativação de PKC ϵ tem sido apontada por diversos estudos como sendo uma etapa crucial de sinalização para cronificação de processos dolorosos (Souza *et al.*, 2002; Khasar *et al.*, 2008) e sua relação com microfilamentos foi evidenciada (Prekeris *et al.*, 1996 e 1998). Estes fatos fortalecem a teoria da chave para a sinalização de cronificação residir em modificações estruturais de componentes do citoesqueleto (Bhave & Gereau, 2004).

No presente estudo, a ruptura farmacológica de microfilamentos, efeito associado à desativação da PKC ϵ , um agente de cronificação da hiperalgesia (Prekeris *et al.*, 1996 e 1998; Aley *et al.*, 2000), permitiu o retorno natural ao limiar nociceptivo basal no tempo esperado. De forma complementar, a ruptura de microtúbulos, efeito relacionado à ativação de o TRPV1, agente diretamente implicado na cronificação da dor (Caterina *et al.*, 2000; Goswami *et al.*, 2004), prolongou o estado hiperalgésico causado pela carragenina. Esta constatação pode representar um novo alvo para desenvolvimento de novas terapias que visem evitar a cronificação de estados patológicos cujos cursos tendam a este desfecho. Em teoria, se a cronificação de processos agudos depende localmente da polimerização de microfilamentos (ativação de PKC) e/ou da despolimerização de microtúbulos (ativação de TRPV1), possivelmente o uso periférico de estabilizadores destes componentes na fase aguda de estados patológicos com tendência à cronificação pode ter alguma relevância

clínica. Novamente, estudos mais aprofundados são necessários para confirmação desta hipótese.

Microfilamentos e compostos analgésicos

Para se confirmar a hipótese de seletividade de efeito do citoesqueleto sobre a resposta hipoalgésica, nos estudos subseqüentes, avaliou-se o efeito da dose padrão do inibidor de microfilamentos (CTB; 1 µg, i.pl.) sobre outros compostos com efeito analgésico. Assim, observou-se que o inibidor de microfilamentos não causou efeito sobre a anti-hiperalgesia induzida por indometacina ou pelo inibidor seletivo de COX-1, SC560 (Winter & Flataker, 1965; Smith *et al.*, 1996; 1998). A ausência de efeito da citocalasina B sobre tais drogas pode ser explicada pelo fato de seus efeitos analgésicos se deverem primordialmente à ação inibitória sobre a enzima COX (Vane, 1971; Smith *et al.*, 1996), evento não relacionado a funções do citoesqueleto. Posteriormente, o pré-tratamento com citocalasina B mostrou-se também ineficaz em inibir a resposta hipoalgésica induzida unilateralmente pela dipirona ou bilateralmente pelo paracetamol. De forma diferente da indometacina e do SC560, a participação de opióides no efeito analgésico do paracetamol e da dipirona foi anteriormente comprovada, porém relaciona-se em sua maior parte, se não exclusivamente, à ação de opióides endógenos em estruturas do SNC (Pini *et al.*, 1997; Bujalska, 2004; Vanegas & Tortorici, 2004; Crawley *et al.*; 2008; Rezende *et al.*, 2008). De forma ainda mais interessante, a citocalasina B inibiu parcialmente a hipoalgesia induzida sistemicamente pela morfina. Em conjunto, estes dados sugerem que a participação periférica de componentes do citoesqueleto pode estar seletivamente relacionada à atuação periférica de opióides e, por conseqüência, também sugerem que o modo de ação do

celecoxibe depende crucialmente da resposta antinociceptiva periférica endógena, mesmo após administrações sistêmicas.

Com isso, para se testar a possível seletividade de inibição periférica sobre efeitos de opióides e se o celecoxibe realmente dependeria deste sistema perifericamente para a indução de hipoalgesia, a naloxona metiodida, um antagonista opióide que não atravessa a barreira hemato-encefálica (Ramabadran *et al.*, 1982), foi administrada intraplantarmente e mostrou, como a CTB, efeito inibitório total sobre a hipoalgesia induzida pelo celecoxibe, indicando fortemente que o componente opióide periférico é a chave para indução do efeito unilateral após administração sistêmica de celecoxibe.

De forma diferente, a hipoalgesia bilateral induzida pela morfina mostrou-se como uma sobreposição das respostas observadas central e perifericamente, isto é, tanto a CTB como a naloxona metiodida preveniram parcialmente a elevação do limiar nociceptivo induzido pela morfina. Este resultado pode ser interpretado como efeito da inibição do componente periférico desta resposta nas patas inflamadas, mas não o componente central desta resposta (Sofia *et al.*, 1975; Duarte & Ferreira, 1992; Labuz *et al.*, 2007; Van der Kam *et al.*, 2008). O componente central da resposta induzida por morfina foi expresso como aproximadamente 54% do efeito total nas patas inflamadas, resultados próximos ao relatado por Labuz *et al.* (2007) após administração da naloxona metiodida.

Sendo assim, a seletividade de inibição periférica sobre efeitos de opióides foi confirmada pela supressão total do efeito hipoalgésico induzido por celecoxibe após administração intraplantar de citocalasina B ou naloxona metiodida. Em conjunto, estes resultados indicam fortemente que o componente opióide periférico é a chave para indução do efeito unilateral após a administração sistêmica de celecoxibe.

Com isso, os dados anteriores também sugerem uma participação seletiva do citoesqueleto sobre o efeito analgésico periférico de opióides. Este resultado pode ser molecularmente explicado pela indução de disfunção em receptores opióides através da inativação de subunidades da proteína G_i acoplada a receptores opióides, amplamente distribuídos na membrana de neurônios sensitivos periféricos (revisado em Simonds, 1988 e Smith, 2008). Este efeito de inativação da proteína G_i por inibidores de microfilamentos foi anteriormente descrito em cardiomiócitos por Bloch *et al.* (2001), cujos resultados demonstraram que a ruptura de microfilamentos deslocou seletivamente a subunidade β_1 da proteína G_i de receptores muscarínicos. Em neurônios sensitivos, a ativação de receptores acoplados a G_i leva à liberação do complexo $\beta\gamma$ no meio intracelular, que por sua vez, inibe a ativação de canais para Ca^{++} , contribuindo para a manutenção do potencial de repouso da membrana celular (Rane *et al.*, 1989; Diversé-Pierluissi *et al.*, 1995). Entretanto, de forma interessante, esta inibição dos canais para Ca^{++} ocorre, seletivamente, quando o complexo $\beta\gamma$ liberado contém a subunidade tipo β_1 (Diversé-Pierluissi *et al.*, 2000), cuja efetividade depende da atividade de microfilamentos (Bloch *et al.*, 2001). Desta maneira, explica-se como a ruptura local do citoesqueleto interromperia seletivamente o efeito relacionado a receptores opióides periféricos, desinibindo o influxo de Ca^{++} nos nociceptores e, consequentemente, permitindo a deflagração do potencial de ação neuronal e a nocicepção.

Interessantes resultados similares aos observados no presente trabalho para o celecoxibe, foram relatados para um agonista opióide, a metadona, cujo efeito analgésico depende exclusivamente da ativação do sistema opióide periférico, mesmo quando a droga é administrada em vias supra-espinais (He *et al.*, 2009). Ainda em concordância, Bileviciute-Ljungar *et al.* (2006) também demonstraram um potente efeito analgésico

exclusivamente através de mecanismos periféricos, após administrações sistêmicas (via oral ou s.c.) do HS-731, um agonista sintético de receptores μ -opióides.

De posse destes dados iniciais e com base nos estudos de Ibrahim *et al.* (2005), os quais demonstraram a liberação periférica de β -endorfina de queratinócitos, após ativação de receptores canabinóides, procedeu-se então a avaliação da participação de queratinócitos na resposta antinociceptiva periférica como componente da hipoalgesia causada por administrações sistêmicas de celecoxibe.

Queratinócitos e resposta antinociceptiva periférica

A síntese de β -endorfina nos tecidos excisados do sítio de administração do estímulo hiperalgésico foi avaliada através da marcação imuno-histoquímica específica para este opióide. Com o uso desta técnica, identificou-se seletivamente a presença da β -endorfina em células reconhecidamente produtoras (Cabot *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1999; Ibrahim *et al.*, 2005), ou seja; em leucócitos (distribuídos no tecido subcutâneo) e em células do epitélio da pele (topográfica e morfológicamente identificadas como queratinócitos). Como o epitélio da pele glabra de ratos compõe-se apenas de queratinócitos (97-99 %) e células dendríticas (1-3 %) e estas últimas não são produtoras de β -endorfina (revisado em Toebak *et al.*, 2009), os resultados obtidos sugerem fortemente que a β -endorfina imunomarcada foi sintetizada em queratinócitos da pele da pata. Além disso, o padrão de distribuição da marcação imuno-histoquímica ao longo dos estratos epiteliais observado neste estudo, ocorreu de forma bastante similar ao observado em trabalhos prévios, os quais utilizaram a técnica de marcação por imunofluorescência do mesmo opióide na pele de ratos (Khodorova *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 2005).

A presença da β -endorfina foi avaliada através do percentual da área marcada para o opióide em relação à área total do epitélio selecionado. Como a densidade óptica da área marcada não mostrou diferenças significativas entre todos os grupos experimentais analisados (dados não apresentados), sugere-se que a variável de percentual de área marcada se relacionou proporcionalmente com a concentração de β -endorfina no citoplasma de queratinócitos da região avaliada.

Tais experimentos demonstraram, também de forma inédita, uma super-regulação dose-dependente do conteúdo de β -endorfina nos queratinócitos, após administrações locais de carragenina e PGE_2 . Entretanto, apesar desta supra-regulação da síntese de β -endorfina expressar-se agudamente (antes de 30 min), tal síntese não parece relacionar-se com a liberação aguda do opióide para o interstício, em um primeiro momento. O que parece ocorrer é um acúmulo do opióide no citoplasma dos queratinócitos durante a fase de grande intensidade de resposta hiperalgésica. Assim, a liberação da β -endorfina ocorreria ao longo do tempo restaurando o limiar nociceptivo lentamente.

No modelo com carragenina, observa-se uma lenta redução de β -endorfina nos queratinócitos, a partir do tempo 3 h, fato relacionado ao início da restauração do limiar nociceptivo (4 h). Entre 3 e 4 h a resposta hiperalgésica sofre redução significativa, sugerindo que a β -endorfina foi liberada no interstício e conseqüentemente, atuou nos receptores opióides presentes nos nociceptores. A mesma relação temporal de redução da marcação para β -endorfina nos queratinócitos e redução da resposta hiperalgésica foi observada no modelo de administração de PGE_2 , sugerindo fortemente o envolvimento de queratinócitos na resposta antinociceptiva endógena periférica. Sustentando estes resultados, Alves *et al.* (2010, dados não publicados) mostram um efeito de prolongamento

da hiperalgesia após administração intraplantar de antagonistas opióides. Além disso, a potenciação das respostas hiperalgésicas após administrações de antagonistas opióides foi intensamente relatada e relacionada à inibição da resposta antinociceptiva endógena (Kokka & Fairhurst, 1977; Jacob & Ramabadram, 1978; Buchsbaum *et al.*, 1983; Millan & Colpaert, 1991), inclusive na redução do efeito placebo (Levine *et al.*, 1978).

No mesmo ensaio imuno-histoquímico, demonstrou-se que o pré-tratamento com celecoxibe reduziu a imunomarcagem de β -endorfina no epitélio inflamado. Relacionando este resultado à ocorrência de hipoalgesia nos animais tratados com celecoxibe e carragenina, sugere-se que o fármaco causou a liberação da β -endorfina sintetizada agudamente após estímulo causado pela carragenina. Para se investigar se a ausência da marcação para β -endorfina em ratos pré-tratados com celecoxibe seria decorrente da prevenção da síntese do opióide, um ensaio imunoenzimático foi realizado para detecção da β -endorfina nos tecidos totais da pata. Desta forma, tal ensaio mostrou a supra-expressão do opióide em todos os grupos experimentais tratados com carragenina. Como nos ratos pré-tratados com celecoxibe ou JWH015 a presença da β -endorfina não foi detectada no epitélio, mas sim nos demais tecidos da pata, sugere-se que ocorreu a liberação da β -endorfina para o interstício local. Assim, sugere-se que o opióide supra-regulado e liberado desta maneira foi responsável, pelo menos em parte, pelo efeito hipoalgésico causado pela administração sistêmica de celecoxibe, na presença do estímulo hiperalgésico.

Outro resultado interessante foi demonstrado com a ausência de efeito da administração local de citocalasina B sobre a redução da imunomarcagem para β -endorfina, isto é, em ratos pré-tratados com citocalasina B e celecoxibe ocorreu a liberação de β -endorfina para o interstício do sítio hiperalgésico, porém, como relatado anteriormente, o

efeito hipoalgésico foi totalmente prevenido. Com isso, pode-se sugerir que a função dos microfilamentos não é necessária para que ocorra liberação local da β -endorfina, porém, é crucial em algum momento posterior da via de indução de hipoalgesia.

Similarmente, a PGE_2 estimulou a síntese local de β -endorfina, porém, este estímulo causou menor aumento da imunomarcção nos queratinócitos, quando comparado à carragenina. Este fato explica também a menor intensidade de resposta hipoalgésica causada pelo celecoxibe (nas doses aqui utilizadas) para o modelo de hiperalgesia induzida por PGE_2 , também em comparação à carragenina.

Após a obtenção destes resultados, procurou-se investigar como o celecoxibe induz a liberação de opióides na periferia e, com base em inúmeros trabalhos mostrando interações entre AINEs, sistema opióide e canabinóide na resposta antinociceptiva endógena periférica (Welch & Eads, 1999; Massi *et al.*, 2001; Guindon *et al.*; 2006a e b; Ibrahim *et al.*, 2005 e 2006; Gutierrez *et al.*, 2006; Guindon & Hohmann, 2008), o interesse deste trabalho foi ampliado para o investigação do envolvimento periférico dos sistemas opióide e canabinóide na hipoalgesia induzida pelo celecoxibe.

Com a finalidade de se evitar interferência da ação direta das drogas analisadas sobre o SNC e focar a resposta periférica, os experimentos seguintes passaram a estudar a resposta hipoalgésica induzida perifericamente.

Estudo da hipoalgesia induzida perifericamente

Para a caracterização da hipoalgesia induzida perifericamente, foram realizados estudos iniciais para avaliação da resposta nociceptiva após tratamento intraplantar com diferentes compostos de ação analgésica. Estes estudos comprovaram a indução periférica

de hipotalgesia por celecoxibe, β -endorfina e agonistas de receptores canabinóides (ACEA e JWH015). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, os quais mostraram efeitos analgésicos semelhantes após administração dos compostos aqui estudados em diferentes modelos (Malan *et al.*, 2001; Forman, 2003; Johanek & Simone, 2004; Quartilho *et al.*, 2004; França *et al.*, 2006; Corrêa *et al.*, 2010).

Nestes experimentos, foi observada a ausência de efeito da administração de celecoxibe sobre a resposta nociceptiva de ratos não submetidos a um estímulo hiperalgésico, ao passo que, a β -endorfina produziu efeito discreto nas mesmas condições. Estes resultados são corroborados por relatos mais antigos da literatura, tanto para opióides, como para canabinóides (Sofia *et al.*, 1975; Stanfa *et al.* 1992; Van der Kam, 2008). Entretanto, resultados conflitantes de ausência de efeito analgésico de morfina em tecidos não inflamados (Stein *et al.*, 1989; Kayser *et al.*, 1991; Likar *et al.*, 2001) também foram relatados. Segundo Rittner *et al.* (2009), a antinocicepção mediada por opióides endógenos em tecidos não inflamados requer a abertura da barreira perineural ao acesso dos peptídeos, bem como, a supra-regulação de receptores opióides, ambas condições relacionadas a funções do citoesqueleto. Em concordância com estes resultados, Nishiyama (2006) também descreveu a ausência de efeito da administração central de celecoxibe em um modelo de avaliação da resposta nociceptiva térmica (*tail flick*), no qual não são administrados estímulos inflamatórios prévios. Diferentemente, a morfina foi capaz de produzir efeitos analgésicos nas mesmas condições de avaliação da nocicepção (Houdi *et al.*, 1996; Bhalla *et al.*, 2002 e 2004). Ainda em concordância, González-Rodríguez *et al.* (2010) também atribuíram a potencialização local do efeito hipotalgésico induzido pela

morfina à síntese de proteínas G e conseqüente aumento da expressão de receptores opióides induzidos periféricamente na pata a qual foi aplicado um estímulo hiperalgésico.

No presente estudo, foi demonstrada a indução de hipoalgesia após a administração periférica do OSU03012, um análogo do celecoxibe desprovido de ação inibitória sobre a COX-2 (Johnson *et al.*, 2005), corroborando dados anteriores que sugeriram que o efeito hipoalgésico do celecoxibe ocorreria de forma independente da ação sobre COX-2 (Francischi *et al.*, 2002; Rezende *et al.*, 2009). Além disso, a descoberta deste efeito analgésico de fármacos análogos a coxibes concedeu a este grupo de pesquisa uma patente (PI 0802850-8) de segundo uso para estas promissoras drogas, as quais vêm sendo associadas a importantes efeitos anti-tumorais (Zhu *et al.*, 2004; Dent *et al.*, 2005; Kardosh *et al.*, 2005; Pyrko *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2008). Como estas drogas atuam em enzimas intracelulares diferentes de COX (Kucab *et al.*, 2005), os resultados aqui apresentados abrem uma nova possibilidade de alvos enzimáticos, para o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos, os quais, em teoria, poderiam mostrar-se equípotentes aos coxibes sem os efeitos indesejáveis induzidos pela inibição sobre a COX-2.

Posteriormente, demonstrou-se que a CTB foi capaz de inibir totalmente a hipoalgesia induzida periféricamente por celecoxibe, β -endorfina e JWH015 (agonista CB₂), entretanto, não teve efeito algum sobre o ACEA. Considerando que o JWH015 induziria a liberação de β -endorfina via ativação de receptores CB₂ (Ibrahim *et al.*, 2005) e que a β -endorfina atua diretamente sobre os receptores opióides expressos nas membranas dos nociceptores (Cabot *et al.*, 1997; Bigliardi-Qi *et al.*, 2004), e ainda, que ambos tiveram seus efeitos abolidos pela citocalasina B, estes resultados, aliados aos anteriormente descritos nos ensaios imuno-histoquímicos, demonstram a participação dos

microfilamentos em uma etapa posterior à liberação local de opióides na via de indução da resposta hipoalгésica. Estes resultados indicam, ainda, uma via de ativação intracelular comum para ação analгésica de celecoxibe, β -endorfina e JWH015 e que, esta via não contribuiria com a ação analгésica do ACEA, na periferia. Como o mecanismo de ação do ACEA foge ao escopo desta tese, não foi estudado mais aprofundadamente.

Assim, na tentativa de se estabelecer uma via de ativação comum a estes compostos, foi avaliada a participação periférica de receptores opióides e do receptor CB₂ na ocorrência da hipoalgesia causada por cada um dos compostos anteriormente estudados. Observou-se a dependência completa de receptores opióides para a ocorrência do efeito do coxibe e do agonista CB₂ (além do próprio agonista opióide), mas não do agonista CB₁. Este resultado é sustentado pelos achados de Ibrahim *et al.* (2005) que demonstraram a liberação de β -endorfina após a ativação de receptores do tipo CB₂ e também por relatos anteriores da interação dos sistemas opióide e canabinóide na periferia (Welsh & Eads, 1999; Manzanares *et al.*, 2001; Cichewicz, 2004; Pacheco *et al.*, 2008). De forma diferente, o antagonista de receptores CB₂ foi capaz de suprimir totalmente apenas a hipoalgesia induzida pelo agonista CB₂ e parcialmente aquela induzida pelo celecoxibe ou pelo OSU03012, sem, no entanto, causar efeito sobre a hipoalgesia induzida pela β -endorfina ou pelo agonista CB₁. Estes resultados fortalecem a hipótese de uma cascata de ativação envolvendo os receptores canabinóides e, posteriormente, opióides, para a ocorrência da hipoalgesia induzida pelo celecoxibe.

Relacionando os resultados de resposta nociceptiva com os de presença de β -endorfina no epitélio (imuno-histoquímica), foi demonstrado que o celecoxibe administrado por via intraplantar, previamente à carragenina, também foi capaz de induzir a liberação

aguda de β -endorfina por queratinócitos e que o antagonismo de receptores tipo CB₂ (administração intraplantar de SR144528), preveniu esta liberação até o tempo 1 h. Entretanto, de forma interessante, a partir do tempo 2 h, o SR144528 não foi mais capaz de prevenir a liberação periférica de β -endorfina nos animais tratados com celecoxibe. Este resultado também explica a prevenção parcial do SR144528 (50 μ g) sobre o efeito hipalgésico do celecoxibe. Apesar disso, no presente estudo, uma dose maior que 50 μ g de SR144528 não foi utilizada para se estabelecer se a prevenção parcial desta droga sobre a hipotalgesia ou sobre a liberação de β -endorfina causadas pelo celecoxibe decorreu da não saturação dos receptores disponíveis. Entretanto, segundo dados de literatura (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1998; Gutierrez *et al.*, 2007), a dose de 33 μ g, via i.pl., foi capaz de prevenir totalmente o efeito analgésico de um agonista CB₂ (AM1241) no modelo de indução de hiperalgesia por carragenina.

Uma outra possível teoria para se explicar a prevenção parcial do SR144528 sobre a hipotalgesia, seria a formação periférica gradual de um metabólito do celecoxibe o qual competiria com o SR144528 pelo sítio de ação em CB₂. Desta forma, quando tal metabólito atingisse concentrações críticas, se reiniciaria a liberação de β -endorfina (a partir da segunda hora) nos animais pré-tratados com esta dose de SR144528 e celecoxibe. Com esta teoria, foi gerada a questão de uma possível reação endógena alterar a conformação do celecoxibe, fazendo com que este fármaco passe a atuar como um agonista canabinóide na periferia.

Para se responder a este questionamento, o grupo se baseou em relatos de interação de outros AINEs com o ácido araquidônico (Huang *et al.*, 2001 e 2002; Högestätt *et al.*, 2005; Mallet *et al.*, 2008) e em experimentos de potenciação dos efeitos do celecoxibe após

a inibição da FAAH (*fatty acid amide hydrolase*) (Rezende *et al.*; 2009), enzima responsável pela degradação de canabinóides endógenos (Ueda *et al.*, 2002). Com isso, criou-se a hipótese do celecoxibe se complexar ao ácido araquidônico gerando um composto denominado, então, araquidonoil-celecoxibe (AACX), o qual seria o metabólito com atividade sobre CB₂.

Para se testar a hipótese, o AACX foi sintetizado no laboratório de análises químicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, sob a orientação do prof. Dr. André A. G. Faraco. O composto mostrou efeito hipoalgésico similar ao celecoxibe, porém, seu efeito foi revertido totalmente pela administração periférica de antagonistas de receptores opióides ou de receptores CB₂. Diferente do observado com o celecoxibe, a mesma dose do antagonista canabinóide tipo CB₂ (50 µg de SR144528) foi capaz de prevenir totalmente o efeito do AACX, mostrando uma atividade deste composto sobre receptores canabinóides periféricos. Confirmando estes resultados, na técnica de imuno-histoquímica, também o pré-tratamento com AACX induziu redução da imunomarcação para β-endorfina no epitélio da pele das patas inflamadas. Em concordância, este efeito também foi prevenido totalmente pelo antagonista de CB₂. Estes resultados podem sugerir também que o celecoxibe não atua diretamente como um agonista de CB₂, mas o AACX, sim.

SUMÁRIO DA DISCUSSÃO

Em resumo, os resultados do presente estudo demonstram a importância da participação de componentes do citoesqueleto na nocicepção e corroboram os achados de vários estudos os quais indicaram que a cronificação de processos nociceptivos agudos pode ser mediada através de componentes do citoesqueleto. Estes dados também sugerem, pelo menos em teoria, um possível ganho clínico em portadores de estados patológicos cujo desenvolvimento tenda à cronificação da dor, se tratados localmente com estabilizadores da polimerização de componentes do citoesqueleto.

Este estudo ainda indicou a seletividade da influência do citoesqueleto sobre a ação periférica de opióides, e que o celecoxibe exerceria seu efeito analgésico de mais de uma maneira. Em especial, quando administrado até ½ h após o estímulo hiperalgésico, o celecoxibe poderia periféricamente complexar-se ao ácido araquidônico, ativando receptores CB₂ em queratinócitos, os quais liberariam β-endorfina para o interstício do sítio de estímulo hiperalgésico (Fig. 3). A β-endorfina liberada atua diretamente sobre os receptores opióides expressos nos nociceptores, cujos efeitos intracelulares dependem da integridade conformacional da rede citoesquelética pré-formada. Da mesma forma, o efeito da morfina necessita deste componente opióide periférico para que ocorra a hipoalgesia, mas este componente periférico não seria crucial para a atividade analgésica central da morfina.

Sugere-se, por fim, que o efeito hipoalgésico induzido pelo celecoxibe poderia decorrer da ação de um metabólito formado (AA-CX), que agiria como um agonista de receptores CB₂ para causar a liberação local de β-endorfina. Assim, a liberação de opióide

no local, associada ao efeito inibitório sobre a COX-2, culminaria no efeito hipotalgésico descrito para o celecoxibe.

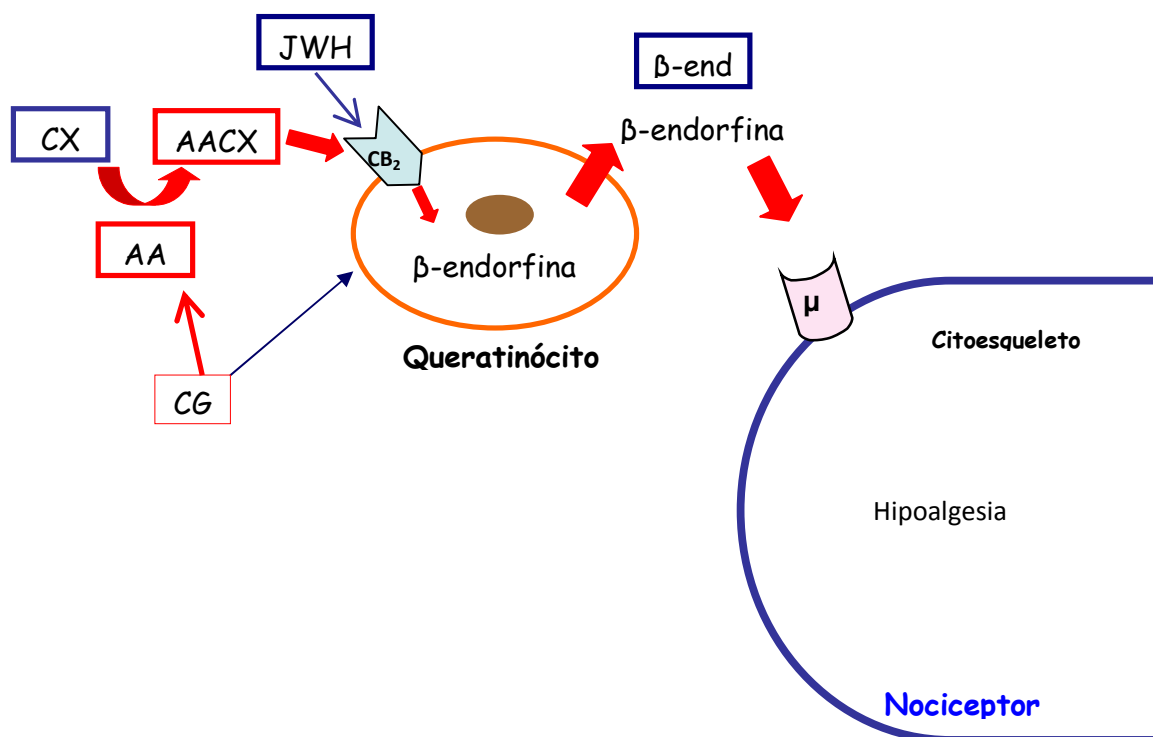


Figura 3. Representação esquemática dos achados da tese. A administração intraplantar de carragenina (CG) causaria tanto a liberação de ácido araquidônico (AA) no interstício do sítio inflamatório, quanto o estímulo da síntese de β-endorfina (β-end) em queratinócitos. Assim, com a administração de celecoxibe (CX), ocorreria a formação do metabólito araquidonoil-celecoxibe (AACX), o qual atuaria como o JWH015 (JWH), ativando receptores canabinóides tipo 2 (CB₂). A ativação de CB₂ determinaria, então, a liberação aguda da β-endorfina sintetizada pelos queratinócitos. A β-endorfina atuaria nos receptores opióides (μ) nas membranas dos nociceptores. A ocorrência da hipoalgesia após a ativação dos receptores opióides dependeria da integridade de microfilamentos e microtúbulos.

CONCLUSÕES:

Para as drogas, vias de administração e modelos utilizados nestes experimentos, podemos concluir:

- 1) A rede intracelular previamente formada por microtúbulos e microfilamentos é importante para que ocorra a hipoalgesia periférica, uma vez que a ruptura destes componentes previne tal resposta antinociceptiva e a estabilização de microfilamentos, não;
- 2) Componentes do citoesqueleto, em especial os microtúbulos, participam da resposta hiperalgésica tardia, indicando uma possível sinalização periférica destes componentes para a cronificação de processos dolorosos agudos;
- 3) As alterações causadas perifericamente são crucialmente importantes para a ocorrência do efeito analgésico causado pelo celecoxibe, mas não para o causado pela morfina;
- 4) O celecoxibe e o agonista de receptores canabinóides JWH015 exercem seu efeito hipoalgésico, pelo menos em sua maior parte, através da liberação periférica de β -endorfina;
- 5) Os queratinócitos têm papel importante na resposta antinociceptiva periférica endógena e participam da resposta hipoalgésica causada pelo celecoxibe e pelo JWH015, os quais induzem a liberação de β -endorfina no interstício peri-inflamatório;

ANEXO: Nomes químicos

- ACEA: Araquidoil-2-cloroetilamida ou N-(2-Cloroetil)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamida
- Celecoxibe (CX): 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-il] benzenosulfonamida
- Dipirona (DIP): Sódio [(2,3-dihidro- 1,5-dimetil- 3-oxo- 2-fenil- 1H- pirazol- 4-il) metilamino] metanosulfanato
- Indometacina (Indo): 2-ácido-[[(4-clorofenil)carbonil]-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-il-1} acético
- JWH015 (JWH): (2-Metil-1-propil-1H-indol-3-il)-1-naftalenilmetanona
- Morfina (MORF): 1,2,3,9,10,10 α -hexahidro-10,4a(4H)-iminoetanofenantrena
- Naloxona metiodida (NLXm): N-Metilnaloxona iodida ou (5 α ,17R)-4,5-Epoxi-3,14-dihidroxi-17-metil-6-oxo-17-(2-propenil)-morfinanina iodida
- Naltrexona (NTX): 17-(ciclopropilmetil)-4,5 α -epoxi- 3,14-dihidroximorfina-6-ona
- OSU03012 (OSU): 2-amino-N-{4-[5-(2-fenantrenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-phenil} acetamida
- Paracetamol (Par): N-(4-hidroxifenil)acetamida
- SC236: 4-[5-(4-Clorofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]-benzenosulfonamida
- SC560: 5-(4-Clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-3-trifluorometil pirazol

- SR144528 (SR): {N-[(1S)-endo-1,3,3-trimetil-biciclo-[2.2.1] hepta-2-il]-5-(4-cloro-3-metilfenil)-1-(4-metilbenzil)-pirazol-3-carboxamida}

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERN, MJ; REID, C; GORDON, TP; MCCREDIE, M; BROOKS, PM; JONES, M. Does colchicine work? The results of the first controlled study in acute gout. Australian and New Zeland Journal of Medicine, 1987; 17(3): 301-4.

AL-BASSAM, J; OZER, RS; SAFER, D; HALPAIN, S; MILLIGAN, RA. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. Journal of Cell Biology, 2002; 157(7): 1187–1196.

ALEY, KO; MESSING, RO; MOCHLY-ROSEN, D; LEVINE, JD. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the ϵ isozyme of protein kinase C. Journal of Neuroscience, 2000; 20(12): 4680–4685.

ALEY, KO; MARTIN, A; MCMAHON, T; MOK, J; LEVINE, JS; MESSING, RO. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. Journal of Neuroscience, 2001; 21(17): 6933–6939.

ALLOUI, A; CHASSAING, C; SCHMIDT, J; ARDID, D; DUBRAY, C; CLOAREC, A; ESCHALIER, A. Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. European Journal of Pharmacology, 2002; 443(1-3): 71-7.

ALTORKI, NK; KERESZTES, RS; PORT, JL; LIBBY, DM; KORST, RJ; FLIEDER, DB; FERRARA, CA; YANKELEVITZ, DF; SUBBARAMAIAH, K; PASMANTIER, MW; DANNENBERG, AJ. Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase 2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. Journal of Clinical Oncology, 2003; 21: 2645-2650.

ARCHER, DR; DAHLIN, LB; MCLEAN, WG. Changes in slow axonal transport of tubulin induced by local application of colchicine to rabbit vagus nerve. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1994; 150(1): 57-65.

ARMSTRONG, RA. Platelet prostanoid receptor. *Pharmacology & Therapeutics*, 1996; 72(3): 171-191.

ASKARI, N; MAHBOUDI, F; HAERI-ROHANI, A; KAZEMI, B; SARRAMI, R; EDALAT, R; AHMADIANI, A. Effects of single administration of morphine on G-protein mRNA level in the presence and absence of inflammation in the rat spinal cord. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2008; 67: 47-52.

BEICHE, F; SCHEUERER, S; BRUNE K; GEISSLINGER, G; GOPPELT-STRUEBE, M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Letters*, 1996; 390: 165-169.

BENSEN, WG; FIECHTNER, JJ; MCMILLEN, JI; ZHAO, WW; YU, SS; WOODS, EM; HUBBARD, RC; ISAKSON, PC; VERBURG, KM; GEIS, GS. Treatment of osteoarthritis with celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor: a randomized controlled trial. *Mayo Clinical Proceedings*, 1999; 74: 1095-1105.

BENYHE, S. Morphine: new aspects in the study of an ancient compound. *Life Sciences*, 1994; 55(13): 969-79.

BERK, DA; CLARK, A; HOCHMUTH, RM. Analysis of lateral diffusion from a spherical cell surface to a tubular projection. *Journal Biophysical Society*, 1992; 61: 1-8.

BHALLA, S; MATWYSHYN, G; GULATI, A. Potentiation of morphine analgesia by BQ123, an endothelin antagonist. *Peptides*, 2002; 23(10): 1837-45.

BHALLA, S; MATWYSHYN, G; GULATI, A. Central endothelin-B receptor stimulation does not affect morphine analgesia in rats. *Pharmacology*, 2004; 72(1): 20-5.

BHAVE G; GEREAU, RW. Growing pains: cytoskeleton as a critical regulator of pain plasticity. *Neuron*, 2003; 39: 577-83.

BIGLIARDI-QI, M; SUMANOVSKI, LT; BÜCHNER, S; RUFLI, T; BIGLIARDI, PL. Mu-opiate receptor and beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin. *Dermatology*, 2004; 209(3): 183-9.

BILEVICIUTE-LJUNGAR, I; SPETEA, M; GUO, Y; SCHÜTZ, J; WINDISCH, P; SCHMIDHAMMER, H. Peripherally mediated antinociception of the mu-opioid receptor agonist (HS-731) after subcutaneous and oral administration in rats with carrageenan-induced hindpaw inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2006; 317(1): 220-7.

BING, RJ; LOMNIKA, M. Why do cyclo-oxygenase-2 inhibitors cause cardiovascular events? *Jornal of American College of Cardiology*, 2002; 39(3): 521-2.

BLOCH, W; FAN, Y; HAN, J; XUE, S; SCHÖNEBERG, T; JI, G; LU, ZJ; WALTHER, M; FÄSSLER, R; HESCHELER, J; ADDICKS, K; FLEISCHMANN, BK. Disruption of cytoskeletal integrity impairs Gi-mediated signaling due to displacement of Gi proteins. *Journal of Cell Biology*, 2001; 154(4): 753–761.

BOLAY, H; MOSKOWITZ, MA. Mechanisms of pain modulation in chronic syndromes. *Neurology*, 2002; 59(5 Suppl. 2): S2-7.

BOMBARDIER, C; LAINE, L; REICIN, A; SHAPIRO, D; BURGOS-VARGAS, R; DAVIS, B; DAY, R; FERRAZ, MB; HAWKEY, CJ; HOCHBERG MC; KVIEN, TK;

SCHNITZER, TJ. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR study group. *New England Journal of Medicine*, 2000; 343: 1520–1528.

BOMBARDIER, C; LAINE, L; BURGOS-VARGAS, R; DAVIS, B; DAY, R; FERRAZ, MB; HAWKEY, CJ; HOCHBERG, MC; KVIEN, TK; SCHNITZER, TJ; WEAVER, A. Response to expression of concern regarding VIGOR study. *New England Journal of Medicine*, 2006; 354(11): 1196-9.

BOTTING, R. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thrombosis Research*, 2003; 110: 269-272.

BOTTING, R; AYOUB, SS. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 2005; 72(2): 85-87.

BRACK, A; LABUZ, D; ANU SCHILTZ, A; RITTNER, HL; MACHELSKA, H; SCHÄFER, M; RESZKA, R; STEIN, C. Tissue monocytes macrophages in inflammation hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception. *Anesthesiology*, 2004a; 101: 204-11.

BRACK, A; RITTNER, HL; MACHELSKA, H; SHAQURA, M; MOUSA, SA; LABUZ, D; ZOLLNER, D; SCHAFFER, M; STEIN, C. Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression. *Pain*, 2004b; 108: 67-75.

BRINKLEY, W. Microtubules: a brief historical perspective. *Journal of Structural Biology*, 1997; 118: 84-86.

BUJALSKA, M. Effect of nonselective and selective opioid receptors antagonists on antinociceptive action of acetaminophen [part III]. Polish Journal of Pharmacology, 2004; 56: 539-545.

BUCHSBAUM, MS; DAVIS, GC; NABER, D; PICKAR, D. Pain enhances naloxone-induced hyperalgesia in humans as assessed by somatosensory evoked potentials. Psychopharmacology (Berlin), 1983; 79(2-3): 99-103.

BUNTING, S; SIMMONS, PM; MONCADA, S. Inhibition of platelet activation by prostacyclin: possible consequences in coagulation and anticoagulation. Thrombosis Research, 1981; 21(1-2): 89-102.

CABOT, PJ; CARTER, L; GAIDDON, C; ZHANG, Q; SCHÄFER, M; LOEFFLER, JP; STEIN, C. Immune cell-derived beta-endorfin: production, release and control of pain in rats. Journal of Clinical Investigation, 1997; 100(1): 142–148.

CALIARI, MV. Princípios de morfometria digital: KS300 para iniciantes. Belo Horizonte: Editora UFMG, 1997; 1: 149 p.

CATERINA, MJ; SCHUMACHER, MA; TOMINAGA, M; ROSEN, TA; LEVINE, JD; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature, 1997; 389(6653): 816-24.

CATERINA, MJ; LEFFLER, A; MALMBERG, AB; MARTIN, WJ; TRAFTON, J; PETERSEN-ZEITZ, KR; KOLTZENBURG, M, BASBAUM, AI; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. Science, 2000; 288(5464): 306-13.

CHANDRASEKHARAN, NV; DAI, H; ROSS, TLK; NATHAN, KE; TOMSIK, J; ELTON, TS; SIMMONS, DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Science: USA*, 2003; 99(21): 13926-13931.

CHEN, J; KANAI, Y; HIROKAWA, N. Projection domains of map2 and tau determine spacing between microtubules in dendrites and axons. *Nature*, 1992; 360: 674-677.

CHENG, H; HARRIS, RC. Cyclooxygenases, the kidney and hypertension. *Hypertension*, 2004; 43: 525-530.

CICHEWICZ, DL. Synergistic interactions between cannabinoids and opioids analgesics. *Life Sciences*, 2004; 74: 1317-1324.

COLBURN, RW; DELEO, JA. The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Brain Research Bulletin*, 1999; 49: 419-27.

CONDE, C; CARCÉRECE, A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews: Neuroscience*, 2009; 10: 319-32.

COOPER, JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *Journal of Cell Biology*, 1987; 105: 1473-8.

CORRÊA, JD; PAIVA-LIMA, P; REZENDE, RM; DOS REIS, WGP; FERREIRA-ALVES, DL; BAKHLE, YS; FRANCISCHI, JN. Peripheral μ -, δ - and κ -opioid receptors mediate the hypoalgesic effect of celecoxib in a rat model of thermal hyperalgesia. *Life Sciences*, 2010;

CRAWLEY, B; SAITO, O; MALKMUS, S; FITZSIMMONS, B; HUA, XY; YAKSH, TL. Acetaminophen prevents hyperalgesia in central pain cascade. *Neuroscience Letters*, 2008; 442(1): 50–53.

CSILLIK, B; KNYIHÁR, E; JÓJÁRT, I; ELSHIEKH, AA; PÓR, I. Perineural microtubule inhibitors induce degenerative atrophy of central nociceptive terminals in the Rolando substance. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 1978; 21(3): 467-84.

CUNHA, TM; VERRI JR, WA; SCHIVO, IR; NAPIMOGA, MA; PARADA, CA; POOLE, S; TEIXEIRA, MM.; FERREIRA, SH; CUNHA, FQ. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *Journal of Leukocyte Biology*, 2008; 83: 1-9.

CUNNINGHAM, CC; LECLERC, N; FLANAGAN, LA; LU, M; JANMEY, PA; KOSIK, KS. Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line. *Journal of Cell Biology*, 1997; 136(4): 845-57.

DAS, SK; RAMAKRISHNAN, S; MISHRA, K; SRIVASTAVA, R; AGARWAL, GG; SINGH, R; SIRCAR, AR. A randomized controlled trial to evaluate the slow-acting symptom-modifying effects of colchicine in osteoarthritis of the knee: a preliminary report. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)*, 2002; 47(3): 280–284.

DAVIS, JB; GRAY, J; GUNTHORPE, MJ; HATCHER, JP; DAVEY, PT; OVEREND, P; HARRIES, MH; LATCHAM, J; CLAPHAM, C; ATKINSON, K; HUGHES, SA; RANCE, K; GRAU, E; HARPER, AJ; PUGH, PL; ROGERS, DC; BINGHAM, S; RANDALL, A;

SHEARDOWN, SA. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 2000; 405: 183-187.

DEHMELT, L; SMART, FM; OZER, RS; HALPAIN, S. The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *Journal of Neuroscience*, 2003; 23(29): 9479 –9490.

DENT, P; YACOUB, A; GRANT, S. DMC novel celecoxib derivatives to rap cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 2005; 4(5): 583-584.

DiROSA, M. Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1972; 24: 89-102.

DILLEY, A; BOVE, GM. Resolution of inflammation-induced axonal mechanical sensitivity and conduction slowing in C-fiber nociceptors. *Journal of Pain*. 2008; 9(2): 185-92.

DILLON, C; GODA, Y. The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annals Reviews in Neuroscience*, 2005; 28: 25-55.

DINA, AO; MCCARTER, GC; COUPADE, C; LEVINE, JD. Role of the sensory neuron cytoskeleton in second messenger signalling for inflammatory pain. *Neuron*, 2003; 39: 613-24.

DING, H; HAN, C; GUO, D; WANG, D; CHEN, C; D'AMBROSIO, SM. OSU03012 activates Erk1/2 and Cdks leading to the accumulation of cells in the S-phase and apoptosis. *International Journal of Cancer*, 2008; 123: 2923–2930.

DIVERSÉ-PIERLUISSI, M; DUNLAP, K. Interaction of convergent pathways that inhibit N-type calcium currents in sensory neurons. *Neuroscience*, 1995; 65:477-83.

DIVERSÉ-PIERLUISSI, M; GOLDSMITH, PK; DUNLAP, K. Transmitter-mediated inhibition of N-type calcium channels in sensory neurons involves multiple GTP-binding proteins and subunits. *Neuron*, 1995; 14(1): 191-200.

DIVERSÉ-PIERLUISSI, M; MCINTIRE, WE; MYUNG, CS; LINDORFER, MA; GARRISON, JC; GOY, MF; DUNLAP, K. Selective coupling of G protein beta gamma complexes to inhibition of Ca²⁺ channels. *Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275(37): 28380-5.

DOMINGUEZ, R. Actin filament nucleation and elongation factors-structure-function relationships. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2009; 44(6): 351-66.

DRAISCI, G; KAJANDER, KC; DUBNER, R; BENNETT, GJ; IADAROLA, MJ. Up-regulation of opioid gene expression in spinal cord evoked by experimental nerve injuries and inflammation. *Brain Research*, 1991; 560(1-2): 186-92.

DRIESSEN, A; LANDUYT, W; PASTOREKOVA, S; MOONS, J; GOETHALS, L; HAUSERMANS, K; NAFTEUX, P; PENNINCKX, F; GEBOES, K; LERUT, T; ECTORS, N. Expression of carbonic anhydrase IX (CA IX), a hypoxia-related protein, rather than vascular-endothelial growth factor (VEGF), a pro- angiogenic factor, correlates with an extremely poor prognosis in esophageal and gastric adenocarcinomas. *Annals of Surgery*, 2006; 243: 334-40.

DUARTE, ID; LORENZETTI, BB; FERREIRA, SH. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *European Journal of Pharmacology*, 1990; 186 (2-3): 289-93.

The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *European Journal of Pharmacology*, 1992; 221(1): 171-174.

DUCREUX, M; KOHNE, CH; SCHWARTZ, GK; VANHOEFER, U. Irinotecan in metastatic colorectal cancer: dose intensification and combination with new agents, including biological response modifiers. *Annals of Oncology*, 2003; 14 suppl, 2ii: 17-23.

ELMES, SJR; WINYARD, LA; MEDHURST, SJ; CLAYTON, NM; WILSON, AW; KENDALL, DA; CHAPMAN, V. Activation of CB1 and CB2 receptors attenuates the induction and maintenance of inflammatory pain in the rat. *Pain*, 2005; 118: 327-335.

EMMERSON, BT. The management of gout. *New England Journal of Medicine*, 1996; 334(7): 445-51.

FAN, FR; YANG, J; CAI, L; PRICE, DW JR; DIRK, SM; KOSYNKIN, DV; YAO, Y; RAWLETT, AM; TOUR, JM; BARD, AJ. Charge transport through self-assembled monolayers of compounds of interest in molecular electronics. *Journal of the American Chemical Society*, 2002; 124(19): 5550-60.

FANG, D; HALLMAN, J; SANGHA, N; KUTE, TE; HAMMARBACK, JA; WHITE, WL; SETALURI, V. Expression of microtubule-associated protein 2 in benign and malignant melanocytes: implications for differentiations and progression of cutaneous melanoma. *American Journal of Pathology*, 2001; 158(6): 2107-15.

FARKOUH, ME; KIRSHNER, H; HARRINGTON, RA; RULAND, S; VERHEUGT, FWA; SCHNITZER, TJ; BURMESTER, GR; MYSLER, E; HOCHBERG, MC; DOHERTY, M; EHRSAM, E; GITTON, X; KRAMMER, G; MELLEIN, B; GIMONA, A;

MATCHABA, P; HAWKEY, CJ; CHESEBRO, JH. Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the therapeutic arthritis research and gastrointestinal event trial (TARGET) cardiovascular outcomes: randomized controlled trial. *The Lancet*, 2004; 364: 675–84.

FENTON, C; KEATING, GM; WAGSTAFF, AJ. Valdecoxib: a review of its use in the management of osteoarthritis, rheumatoid arthritis, dysmenorrhoea and acute pain. *Drugs*, 2004; 64(11): 1231-1261.

FERREIRA, SH. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature New Biology*, 1972; 204: 200-203.

FERREIRA, SH; LORENZETTI, BB; CORRÊA, FM. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *European Journal of Pharmacology*, 1978; 53(1): 39-48.

FERREIRA, SH; NAKAMURA, M. I-Prostaglandin hiperalgesia, a cAMP/ Ca^{++} dependent process. *Prostaglandins*, 1979; 18:179-90.

FERREIRA, SH; DUARTE, ID; LORENZETTI, BB. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *European Journal of Pharmacology*, 1991; 201: 121-122.

FIELDS, HL; HEIRINCHER, MM; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annals Reviews of Neuroscience*, 1991; 14: 219-245.

FIRUZI, O; PRATICÒ, D. Coxibs and Alzheimer's disease: should they stay or should they go? *Annals of Neurology*, 2006; 59(2): 219-28.

FITZGERALD, GA. Coxibs and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, 2004; 351: 17.

FLETCHER, DA; MULLINS, RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 2010; 463(7280):485-92.

FORMAN, LJ. The effect of cannabinoid receptor antagonism with SR141716A on antinociception induced by cocaine and the NMDA receptor antagonist, MK-801. *Brain Research Bulletin*, 2003; 61: 153–158.

FRANÇA, DS; FERREIRA-ALVES, DL; DUARTE, IDG; RIBEIRO, MC; REZENDE, RM; BAKHLE, YS; FRANCISCHI, JN. Endogenous opioids mediate the hypoalgesia induced by selective inhibitors of cyclooxygenase 2 in rat paws treated with carrageenan. *Neuropharmacology*, 2006; 51(1): 37-43.

FRANÇA, DS. Mecanismos envolvidos na hypoalgesia induzida por inibidores seletivos de ciclooxigenase-2 em modelos de inflamação em pata de ratos. Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biológicas - UFMG, Belo Horizonte, 2007; 155p.

FRANCISCHI, JN; CHAVES, CT; MOURA, ACL; LIMA, AS; ROCHA, OA; FERREIRA-ALVES, DL; BAKHLE, YS. Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 2002; 137: 837-844.

FRANCISCHI, JN; PAIVA-LIMA, P; FRANÇA, DS; BAKHLE, YS. Crucial role of the cytoskeleton in hypoalgesia induced by celecoxib in rat inflammatory pain. In: VIIIth World Congress of Inflammation, Copenhagen, *Inflammation Res.* 2007; 56: 389-389.

FROLOV, RV; BERIM, IG; SINGHI, S. Inhibition of delayed rectifier potassium channels and induction of arrhythmia: a novel effect of celecoxib and the mechanism underlying it. *Journal of Biological Chemistry*, 2008; 283: 1518-24.

FROLOV, RV; BONDARENKO, VE; SINGH, S. Mechanisms of K(v)2.1 channel inhibition by celecoxib - modification of gating and channel block. *British Journal of Pharmacology*, 2010; 159: 405-18.

FU, JY; MASFERRER, JL; SEIBERT, K; RAZ, A; NEEDLEMAN, P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 1990; 265: 16737-16740.

GASSANI, BCA; REZENDE, RM; PAIVA-LIMA, P; FERREIRA-ALVES, DL; DOS REIS, WGP; BAKHLE, YS; FRANCISCHI, JN. Is the sulphonamide radical in the celecoxib molecule essential for its analgesic activity? *Pharmacological Research*. 2010;

GOLDEN, BD; ABRAMSON, SB. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 1999; 25: 359-378.

GONZÁLEZ-RODRIGUES, S; HIDALGO, A; BAAMONDE, A; MENÉNDEZ, L. Involvement of Gi/o proteins and GIRK channels in the potentiation of morphine-induced spinal analgesia in acutely inflamed mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2010a; 381: 59-71.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, S; HIDALGO, A; BAAMONDE, A; MENÉNDEZ, L. Spinal and peripheral mechanisms involved in the enhancement of morphine analgesia in acutely inflamed mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2010b; 30: 113–121.

GOOLD, RG; GORDON-WEEKS, PR. The MAP kinase pathway is upstream of the activation of GSK3B that enables it to phosphorylate MAP1B and contributes to the stimulation of axon growth *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2005; 28: 524-534.

GOPPELT-STRUEBE, M; BEICHE, F. Cyclooxygenase-2 in the spinal cord: localization and regulation after a peripheral inflammatory stimulus. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1997; 433: 213-6.

GORDON-WEEKS, PR. Actin dynamics: re-drawing the map. *Nature Cell Biology*, 2004; 6(5): 390-91.

GOSWAMI, C; DREGER, M; JAHNEL, R; BOGEN, O; GILLEN, G; HUCHO, F. Identification and characterization of a Ca²⁺-sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. *Journal of Neurochemistry*, 2004; 91: 1092-1103.

GOSWAMI, C; DREGER, M; OTTO, H; SCHWAPPACH, B; HUCHO, F. Rapid disassembly of dynamic microtubules upon activation of the capsaicin receptor TRPV1. *Journal of Neurochemistry*, 2006; 96: 254-66.

GOSWAMI, C; HUCHO, TB; HUCHO, F. Identification and characterization of novel tubulin-binding motifs located within the c-terminus of TRPV1. *Journal of Neurochemistry*, 2007a; 101: 250-62.

GOSWAMI, C; SCHMIDT, H; HUCHO, F. TRPV1 at nerve endings regulates growth cone morphology and movement through cytoskeleton reorganization. *FEBS Journal*, 2007b; 274: 760-72.

GOSWAMI, C; HUCHO, T. Submembraneous microtubule cytoskeleton: biochemical and functional interplay of TRP channels with the cytoskeleton. *FEBS Journal*, 2008; 275: 4684-99.

GRAHAM, DJ; CAMPEN, D; HUI, R; SPENCE, M; CHEETHAM, C; LEVY, G; SHOOR, S; RAY; WA. Risk of acute myocardial infarction and sudden cardiac death in

patients treated with cyclo-oxygenase 2 selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs: nested case-control study. *The Lancet*, 2005; 365: 475-481.

GRÖSCH, S; MAIER, TJ; SCHIFFMANN, S; GEISLINGER, G. Effects of selective cox-2 inhibitors cyclooxygenase-2 (cox-2): independent anticarcinogênico. *Journal of the National Cancer Institute*, 2006; 98(11): 736-747.

GUAN, J; XU, Z; GAO, H; HE, S; MA, G; SUN, T; WANG, L; ZHANG, L; LENA, I; KITCHEN, I; ELDE, R; ZIMMER, A; HE, C; PEI, G; BAO, L; ZHANG, X. Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of δ -opioid receptors and opioid analgesia. *Cell*, 2005; 122: 619-631.

GUINDON, J; DÉ LEAN, A; BEAULIEU, P. Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain*, 2006a; 121: 85-93.

GUINDON, J; LOVERME, J; LÉAN, A; PIOMELLI, D; BEAULIEU, P. Synergistic antinociceptive effects of anandamide, an endocannabinoid, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in peripheral tissue: a role for endogenous fatty-acid ethanolamides? *European Journal of Pharmacology*, 2006b; 550: 68–77.

GUINDON, J; HOHMANN, AG. Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *British Journal of Pharmacology*, 2008; 153: 319–334.

GUTIERREZ, T; FARTHING, JN; ZVONOK2, AM; MAKRIYANNIS, A; HOHMANN, AG. Activation of peripheral cannabinoid CB1 and CB2 receptors suppresses the

maintenance of inflammatory nociception: a comparative analysis. *British Journal of Pharmacology*, 2007; 150: 153-163.

HABERSTOCK-DEBIC, H; WEIN, M; BARROT, M; COLAGO, EE; RAHMAN, Z; NEVE, RL; PICKEL, VM; NESTLER, EJ; VON ZASTROW, M; SVINGOS, AL. Morphine acutely regulates opioid receptor trafficking selectively in dendrites of nucleus accumbens neurons. *Journal of Neuroscience*, 2003; 23(10): 4324-32.

HADENEMOS, G. Aspirin: history and application. *The Science Teacher*, 2005; 72(8): 30-34.

HAMILTON, GR; BASKETT, TF. History of anesthesia in the arms of morpheus: the development of morphine for postoperative pain relief. *Canadian Journal of Anesthesiology*, 2000; 47(4): 367–374.

HASSAN, AHS; ABLEITNER, A; STEIN, C; HERZ, A. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience*, 1993; 55: 185-195.

HE, L; KIM, J; OU, C; MCFADDEN, W; VAN RIJN, RM; WHISTLER, JL. Methadone antinociception is dependent on peripheral opioid receptors. *Journal of Pain*, 2009; 10(4): 369-79.

HERRMANN, H; STRELKOV, SV; BURKHARD, P; AEBI, U. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *Journal of Clinical Investigation*, 2009; 119: 1772-83.

HÖGESTÄTT, ED; JÖNSSON, BA; ERMUND, A; ANDERSSON, DA; BJÖRK, H; ALEXANDER, JP; CRAVATT, BF; BASBAUM, AI; ZYGMUNT, PM. Conversion of

acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *Journal of Biological Chemistry*, 2005; 280(36): 31405-12.

HOHMANN, AG; HERKENHAM, M. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience*, 1999; 92(4): 1171-5.

HONORÉ, P; BURITOVA, J; BESSON, JM. The effects of morphine on carrageenin-induced spinal c-Fos expression are completely blocked by beta-funaltrexamine, a selective mu-opioid receptor antagonist. *Brain Research*, 1996; 732(1-2): 242-6.

HOUDI, AA; KOTTAYIL, S; CROOKS, PA; BUTTERFIELD, DA. 3-O-acetylmorphine-6-O-sulfate: a potent, centrally acting morphine derivative. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1996; 53(3): 665-71.

HSIAO, FY; TSAI, YW; HUANG, WF. Changes in physicians' practice of prescribing cyclooxygenase-2 inhibitor after market withdrawal of rofecoxib: a retrospective study of physician-patient pairs in Taiwan. *Clinical Therapeutics*, 2009; 31(11): 2618-27.

HSUEH, SF; LU, CY; CHAO, CS; TAN, PH; HUANG, YW; HSIEH, SW; HSIAO, HT; CHUNG, NC; LIN, SH; HUANG, PL; LYU, PC; YANG, LC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs increase expression of inducible COX-2 isoform of cyclooxygenase in spinal cord of rats with adjuvant induced inflammation. *Molecular Brain Research*, 2004; 125: 113-119.

HUANG, H; RAO, Y; SUN, P; GONG, L. Involvement of actin cytoskeleton in modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels from rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuroscience Letters*, 2002; 332: 141-5.

HUANG 2001

HUCHO, T; LEVINE, JD. Signaling pathways in sensitization: towards a nociceptor cell biology. *Neuron*, 2007; 55 (2): 365-76.

HUGHES, J; BEAUMONT, A; FUENTES, JA; MALFROY, B; UNSWORTH, C. Opioid peptides: aspects of their origin, release and metabolism. *Journal of Experimental Biology*, 1980; 89: 239-255.

HWANG, SW; OH, U. Hot channels in airways: pharmacology of the vanilloid receptor. *Current Opinion in Pharmacology*, 2002; 2(3): 235-42.

IBRAHIM, MM; DENG, H; ZVONOK, A; COCKAYNE, DA; KWAN, J; MATA, HP; VANDERAH, TW; LAI, J; PORRECA, F; MAKRIYANNIS, A; MALAN JR, TP. Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: Pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2003; 100 (18): 10529-10533.

IBRAHIM, MM; PORRECA, F; LAI, J; ALBRECHT, PJ; RICE, FL; KHODOROVA, A; DAVAR, G; MAKRIYANNIS, A; VANDERAH, TW; MATA, HP; MALAN, TP Jr. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2005; 102(8): 3093-3098.

JACOB, JJ; RAMABADRAN, K. Enhancement of a nociceptive reaction by opioid antagonists in mice. *British Journal of Pharmacology*, 1978; 64(1): 91-8.

JI, RR; ZHANG, Q; LAW, PY; LOW, HH; ELDE, R; HÖKFELT, T. Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *Journal of Neuroscience*, 1995; 15(12): 8156-66.

JOHANEK, LM; SIMONE, DA. Activation of peripheral cannabinoid receptors attenuates cutaneous hyperalgesia produced by a heat injury. *Pain*, 2004; 109: 432–442.

JOHANEK, LM; HEITMILLER, DM; TURNER, M; NADER, N; HODGES, J; SIMONE, DA. Cannabinoids attenuate capsaicin-evoked hyperalgesia through spinal and peripheral mechanisms. *Pain*, 2001; 93: 303-315.

JOHNSON, AM; SMITH, LL; ZHU, J; HEEREMA, NA; JEFFERSON, S; MONE, A; GREVER, M; CHEN, CS; BYRD, JC. A novel celecoxib derivative, OSU03012, induces cytotoxicity in primary CLL cells and transformed B-cell lymphoma cell line via a caspase- and Bcl-2-independent mechanism. *Blood*, 2005; 105: 2504-2509.

JOHNSON, AJ; HSU, AL; LIN, HP; SONG, X; CHEN, CS. The cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase: a plausible link with its anti-tumor effect and cardiovascular risks. *Biochemistry Journal*, 2006; 366: 831-7.

JULIUS, D; BASBAUM, AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 2001; 413: 203-210.

JUNI, P; RUTJES, AWS; DIEPPE, RA. Are selective COX-2 inhibitors superior to traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs? *Archives of Internal Medicine*, 2002; 324: 1287-1288.

KAWSUK, S; HUTAMEKALIN, P; KETTERMAN, AJ; KHOTCHABHAKDI, N; GOVITRAPONG, P; CASALOTTI, SO. Morphine induces short-lived changes in G-protein gene expression in rat prefrontal cortex. *European Journal of Pharmacology*, 2001; 411: 11-16.

KARDOSH, A; WANG, W; UDDIN, J; PETASIS, NA; HOFMAN, MF; CHEN, TC; SCHÖNTHAL, AH. Dimethyl-Celecoxib (DMC), a derivative of celecoxib that lacks cyclooxygenase-2-inhibitory function, potently mimics the anti-tumor effects of celecoxib on burkitt's lymphoma in vitro and in vivo. *Cancer Biology & Therapy*, 2005; 4(5): 571-582.

KAYSER, V; CHEN, YL; GUILBAUD, G. Behavioural evidence for a peripheral component in the enhanced antinociceptive effect of a low dose of systemic morphine in carrageenin-induced hyperalgesic rats. *Brain Research*, 1991; 560(1-2): 237-44.

KHASAR, SG; LIN, Y; MARTIN, A; DADGAR, J; MCMAHON, T; WANG, D; HUNDLE, B; ALEY, KO; ISENBERG, W; MCCARTER, G; GREEN, PG; HODGE, CW; LEVINE, ID; MESSING, RO. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase c e mutant mice. *Neuron*, 1999a; 24: 253-60.

KHASAR, SG; MCCARTER, G; LEVINE, JD. Epinephrine produces a b-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. *Journal of Neurophysiology*, 1999b; 81: 1104-12.

KHASAR, SG; BURKHAM, J; DINA, OA; BROWN, AS; BOGEN, O; ALESSANDRI-HABER, N; GREEN, PG; REICHLING, DB; LEVINE, JD. Stress induces a switch of

intracellular signaling in sensory neurons in a model of generalized pain. *Journal of Neuroscience*, 2008; 28(22): 5721-5730.

KHODOROVA, A; NAVARRO, B; JOUAVILLE, LS; MURPHY, JE; RICE, FL; MAZURKIEWICZ, JE; LONG-WOODWARD, D; STOFFEL, M; STRICHARTZ, GR; YUKHANANOV, R; DAVAR, G. Endothelin B receptor triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. *Nature Medicine*, 2003; 9(8): 1055-61.

KIM, SJ; JEONG, HJ; PARK, RK; LEE, KM; KIM, HM; UM, JY; HONG, SH. The regulatory effect of SC-236 (4-[5-(4-chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1-pyrazol-1-yl]-benzenesulfonamide) on stem cell factor induced migration of mast cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007; 220(2): 138-45.

KIMMEL, SE; BERLIN, JA; REILLY, M; JASKOWIAK, J; KISCHEL, L; CHITTAMNS, J; STROM, BL. Patients exposed to rofecoxib and celecoxib have different odds of nonfatal myocardial infarction. *Annals of Internal Medicine*, 2005; 142: 157-64.

KINGERY, WS; GUO, TZ; POREE, LR; MAZE, M Colchicine treatment of the sciatic nerve reduces neurogenic extravasation, but does not affect nociceptive thresholds or collateral sprouting in neuropathic or normal rats. *Pain*, 1998; 74(1): 11-20.

KNUDSEN, JF; CARLSSON, U; HAMMARSTRÖM, P; SOKOL, GH; CANTILENA, LR. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent inhibitor of human carbonic anhydrase II. *Inflammation*, 2004; 28(5): 285-290.

KOKKA, N; FAIRHURST, AS. Naloxone enhancement of acetic acid-induced writhing in rats. *Life Sciences*, 1977; 21(7): 975-80.

KOLE, MHP; ILSCHNER, SU; KAMPA, BM; WILLIAMS, SR; RUBEN, PC; STUART, GJ. Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nature*, 1993; 11(2): 178-186.

KOZAK, KR; CREWS, BC; MORROW, JD; WANG, LH; MA, YH; WEINANDER, R; JAKOBSSON, PJ; MARNETT, LJ. Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. *Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277(47): 44877-44885.

KOZAK, KR; PRUSAKIEWICZ, JJ; ROWLINSON, SW; PRUDHOMME, DR; MARNETT, LJ. Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of endocannabinoid anandamide. *Biochemistry*, 2003; 42(30): 9041-9049.

KROTZ, F; SCHIELE, TM; KLAUSS, V; SOHN, HY. Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. *Journal Vascular Research*, 2005; 42: 312-324.

KUCAB, JE; LEE, C; CHEN, CS; ZHU, J; GILKS, CB; CHEANG, M; HUNTSMAN, D; YORIDA, E; EMERMAN, J; POLLAK, M; DUNN, SE. Celecoxib analogues disrupt Akt signaling, which is commonly activated in primary breast tumours. *Breast Cancer Research*, 2005; 7: R796-807.

KUEH, HY; MITCHISON, TJ. Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics. *Science*, 2009; 325(5943): 960-3.

KUJUBU, DA; FLETCHER BS; VARNAM, BC; LIM, RW; HERSCHMA, HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel

prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologous. Journal of Biological Chemistry, 1991; 266: 12866-12872.

KUJUBU, DA; REDDY, ST; FLETCHER, BS; HERSCHMAN, HR. Expression of the protein product of the prostaglandin synthase-2/TIS10 gene in mitogen-stimulated Swiss 3T3 cells. Journal of Biological Chemistry, 1993; 268(8): 5425-30.

KULP, SK; YANG, YT; HUNG, CC, CHEN, KF; LAI, JP; TSENG, PH; FOWBLE, JW; WARD, PJ; CHEN, CS. 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. Cancer Research, 2004; 64: 1444-1451.

KUMAR, A; SEGHAL, N; NAIDU, PS; PADI, SSV; GOYAL, R. Colchicines-induced neurotoxicity as an animal model of sporadic dementia of Alzheimer's type Pharmacological Reports, 2007; 59:274-283.

KUNDU, N; SMYTH MJ; SAMSEL, L; FULTON, AM. Cyclooxygenase inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle. Breast Cancer Research and Treatment, 2002; 76(1): 57-64.

LABUZ, D; MOUSA, SA; SCHÄFER, M; STEIN, C; MACHELSKA, H. Relative contribution of peripheral versus central opioid receptors to antinociception. Brain Research, 2007; 1160: 30-8.

LAUFFENBURGER, DA; HORWITZ, AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. Cell, 1996; 84(3): 359-369.

LETOURNEAU, PC. Actin in axons: stable scaffolds and dynamic filaments. Results & Problems in Cell Differentiation, 2009; 48: 65-90.

LEVINE, JD; GORDON, NC; FIELDS, HL. The mechanism of placebo analgesia. The Lancet. 1978; 2(8091): 654-7.

LIKAR, R; KOPPERT, W; BLATNIG, H; CHIARI, F; SITTL, R; STEIN, C; SCHÄFER, M. Efficacy of peripheral morphine analgesia in inflamed, non-inflamed and perineural tissue of dental surgery patients. Journal of Pain Symptom and Management, 2001; 21(4): 330-7.

LILES, JH; FLECKNELL, PA. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the relief of pain in laboratory rodents and rabbits. Lab Anim, Comparative Biology Centre, Medical School, Newcastle upon Tyne, UK. 1992; 26: 241-255

LIN, MT; LEE, RC; YANG, PC; HO, FM; KUO, ML. Cyclo-oxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. Journal of Biology and Chemistry, 2001; 276: 48997-9002.

LIN, Q. Statistical reviewer briefing document for the advisory committee. [March 3, 2004]. Available at: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3677b2_0=_stats.pdf.

LODISH, H; BERK, A; MATSUDAIRA, P; KAISER, CA; KRIEGER, M; SCOTT, MP; ZIPURSKY, SH; DARNELL, J. Cap. 19: Cytoskeleton I: microfilaments and intermediate filaments. In: Molecular Cell Biology. 5 ed. New York: W. H. Freeman; 2004; 817-973p.

LODISH, H; BERK, A; MATSUDAIRA, P; KAISER, CA; KRIEGER, M; SCOTT, MP; ZIPURSKY, SH; DARNELL, J. Cap. 20: Cytoskeleton II: microtubules. In: Molecular Cell Biology. 5 ed. New York: W. H. Freeman; 2004; 779-816p.

LOGUINOV, AV; ANDERSON, LM; CROSBY, GJ; YUKHANANOV, RY. Gene expression following acute morphine administration. *Physiological Genomics*, 2001; 6: 169-181.

LOPSHIRE, JC; NICOL, GD. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *Journal of Neuroscience*; 18(16): 6081-92.

LORENZETTI, BB; FERREIRA, SH. Mode of analgesic action of dipyrrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *European Journal of Pharmacology*, 1985; 114: 375-381.

LU, HL. Statistical reviewer Briefing Document for the Advisory Committee. [March 3, 2004]. Available at:

http://www.pubmedcentral.nih.gov/redirect3.cgi?auth=0c0orQmMG5b9MOHk-bHql0FQvQ_Sp39vXops1DAvUHuaD7U28ATvO29iI4zYfXGkB=g1e_S&reftype=extlink&artid=1140734&iid=138050&jid=3D239&FROM=Article%7CCitationRef&TO=External%7CLink%7CURI&am=;article-id=1140734&journal-id=239&rendering-type=normal&a=p;&http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3677b1.htm.

MA, K; ZHOU, QH; CHEN, J; DU, DP.; JI, Y; JIANG, W. TTX-R Na⁺ current reduction by celecoxib correlates with changes in PGE₂ and CGRP within rat DRG neurons during acute incisional pain. *Brain Research*, 2008; 1209: 57-64.

MACHELSKA, H; STEIN, C. Leukocyte-derived opioid peptides and inhibition of pain. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2006; 1: 90-7.

MAKAROWISKI, W; ZHAO, WW; BEVIRT, T; RECKER, DP. Efficacy and safety of the cox-2 specific inhibitor valdecoxib in the management of osteoarthritis of the hip: a randomized, double-blind, placebo-controlled comparison with naproxen. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002; 10(4): 290-296.

MALAN, TP; IBRAHIM, MM; DENG, H; LIU, Q; MATA, HP; VANDERAH, T; PORRECA, F; MAKRIYANNI, A. CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain*, 2001; 93: 239-245.

MALHOTRA, S; CHAFIQ, M; PANDHI, P. COX-2 inhibitors: a CLASS act or just VIGORously promoted? *Medscape General Medicine*, 2004; 6(1): 6-17.

MALIK-HALL, M; POON, WL; BAKER, MD; WOOD, JN; OKUSE, K. Sensory neuron proteins interact with the intracellular domains of sodium channel Nav 1.8. *Molecular Brain Research*, 2003; 110: 298–304.

MALLET, C; DAULHAC, L; BONNEFONT, J; LEDENT, C; ETIENNE, M; CHAPUY, C; LIBERT, F; ESCHALIER, A. Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain*, 2008; 139: 190-200.

MANZANARES, J; CORCHERO, J; FUENTES, JA. Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Research*, 1999; 839(1): 173-9.

MARCHALANT, Y; ROSSI, S; WENK, GL. Anti-inflammatory property of the cannabinoid agonist win-55212-2 in a rodent model of chronic brain inflammation. *Neuroscience*, 2007; 144: 1516-1522.

MARIE-CLAIRE, C; COURTIN, C; ROQUES, BP; NOBLE, F. Cytoskeletal genes regulation by chronic morphine treatment in rat striatum. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29(12): 2208-15.

MASSI, P; VACCANI, A; ROMORINI, S; PAROLARO, D. Comparative characterization in the rat of the interactions between cannabinoids and opiates for their immunosuppressive and analgesic effects. *Journal of Neuroimmunology*, 2001; 117: 116-124.

MENEZES, GB; DOS REIS, WG; SANTOS, JM; DUARTE, ID; FRANCISCHI, JN. Inhibition of prostaglandin F(2alpha) by selective cyclooxygenase 2 inhibitors accounts for reduced rat leukocyte migration. *Inflammation*, 2005; 29(4-6): 163-169.

MILLAN, MJ; COLPAERT, FC. 5-hydroxytryptamine (HT)_{1A} receptors and the tail-flick response. III. Structurally diverse 5-HT_{1A} partial agonists attenuate mu- but not kappa-opioid antinociception in mice and rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1991; 256(3): 993-1001.

MILLAN, MJ. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 1999; 57: 1-164.

MILLAN, MJ. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 2002; 66: 355-474.

MILLIS, DL; WEIGEL, JP; MOYERS, T; BUONOMO, FC Effect of deracoxib, a new COX-2 inhibitor, on the prevention of lameness induced by chemical synovitis in dogs. *Veterinary Therapeutics*, 2002; 3(4): 453-64.

MINTER, HA; EVESON, JW; HUNTLEY, S; ELDER DJ; HAGUE. A. The cyclooxygenase 2-selective inhibitor NS398 inhibits proliferation of oral carcinoma cell

lines by mechanisms dependent and independent of reduced prostaglandin E2 synthesis. *Clinical Cancer Research*, 2003; 9(5): 1885-1897.

MITCHELL, JA; EVANS, TW. Cyclooxygenase-2 as a therapeutic target. *Inflammation Research*, 1998; Supl 2, S88-S92.

MOUSA, SA; ZHANG, Q; SITTE, N; JI, R; STEIN, C. Beta-Endorphin-containing memory-cells and μ -opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *Journal of Neuroimmunology*, 2001; 115: 71-78.

MUKHERJEE, MD; NISSEN, SE; TOPOL, EJ. Risk of cardiovascular events associated with selective cox 2 inhibitors. *Journal of American Medical Association*, 2001; 286: 954-959.

MUSCARA, MN; VERGNOLLE, N; LOVREN, F; TRIGGLE, CR; ELLIOTT, SN; ASFAHA, S; WALLACE, JL. Selective COX-2 inhibition with celecoxib elevates blood pressure and promotes leukocyte adherence. *British Journal of Pharmacology*, 2000; 129: 1423-1430.

NANTEL, F; DENNIS, D; GORDON, R; NORTHEY, A; CIRINO, M; METTERS, KM; CHAN, CC. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 1999; 128, 853-859.

NISHIMURA, G; YANOMA S, MIZUNO H, KAWAKAMI K, TSUKUDA M. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses tumor growth in nude mouse xenografted with human head and neck squamous carcinoma cells. *Journal of Cancer Research*, 1999; 90: 1152-62.

NISHIYAMA, T. Analgesic effects of intrathecally administered celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in the tail flick test and the formalin test in rats. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 2006; 50(2): 228-33.

NIVSARKAR, M; BANERJEE, A; PADH, H. Cyclooxygenase inhibitors: a novel direction for Alzheimer's management. *Pharmacological Reports*, 2008; 60(5): 692-8.

NUSSMEIER, NA; WHELTON, AA.; BROWN, MT; JOSHI, GP; LANGFORD, RM; SINGLA, NK; BOYE, ME; VERBURG, K. M. Safety and efficacy of the cyclooxygenase-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after noncardiac surgery. *Anesthesiology*, 2006; 104:518-26.

OKABE, S; HIROKAWA, N. Axonal transport. *Current Opinion in Cell Biology*, 1989; 1(1): 91-7.

ONODA, T; ONO, T; DHAR, DK; YAMANOI, A; FUJII, T; NAGASUE, N. Doxycycline inhibits cell proliferation and invasive potential: combination therapy with cyclooxygenase-2 inhibitor in human colorectal cancer cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2004; 143(4): 207-216.

ORFANOS, CE. From Hippocrates to modern medicine. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2007; 21: 852–858.

OSSIPOV, MH; LOPEZ, Y; NICHOLS, ML; BIAN, D; PORRECA, F. The loss of antinociceptive efficacy of spinal morphine in rats with nerve ligation injury is prevented by reducing spinal afferent drive. *Neuroscience Letters*, 1995; 199(2): 87-90.

OTT, E; NUSSMEIER, NA; DUKE, PC; FENECK, RO; ALSTON, RP; SNABES, MC; HUBBARD, RC; HSU, PH; SAIDMAN, LJ; MANGANO, DT. Efficacy and safety of the

cyclooxygenase 2 inhibitors parecoxib and valdecoxibe in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2005; 125(6): 1481-1492.

PACHECO, CF; QUEIROZ-JUNIOR, CM; MALTOS, KLM; CALIARI, MV; ROCHA, OA; FRANCISCHI, JN. Local opioids in a model of periodontal disease in rats. *Archives of Oral Biology*, 2007; 52 (7): 677-683.

PACHECO, DF; KLEIN, A; PEREZ, AC; PACHECO, CMF; FRANCISCHI, JN; DUARTE, ID. The mu-opioid receptor agonist morphine, but not agonists at delta- or kappa-opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology*, 2008; 154(5): 1143-1149.

PARENTE, L; PERRETTI, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochemical Pharmacology*, 2003; 65(2): 153-9.

PARK, SY; KIM, TH; KIM, HI; SHIN, YK; LEE, CS; PARK, M; SONG, JH. Celecoxib inhibits Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*, 2007; 1148: 53-61.

PAVONE, F; LUVISETTO, S; MARINELLI, S; STRAFACE, E; FABBRI, A; FALZANO, L; FIORENTINI, C; MALORNI, W. The Rac GTPase-activating bacterial protein toxin CNF1 induces analgesia up-regulating mu-opioid receptors. *Pain*, 2009; 145(1-2): 219-29.

PERROT, S; GUILBAUD, G; KAYSER, V. Differential behavioral effects of peripheral and systemic morphine and naloxone in a rat model of repeated acute inflammation. *Anesthesiology*, 2001; 94: 870-5.

PIERÓG, J; KUBISA, B; GORDZKI, T; WÓJCIK, J; PANKOWISK, J; OSTROWKA, J; JUZYSZYN, Z; DROZDZIK, M. Colchicine against ischemia-reperfusion injury in experimental lung transplantation. *Annals of Transplant*, 2007; 12(4): 32-37.

PINI, LA; VITALE, G; OTTANI, A; SANDRINI, M. Naloxone-reversible antinociception by paracetamol in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1997; 280(2): 934-940.

PLANAS, ME; RODRIGUEZ, L; SANCHEZ, S; POL, O; PUIG, MM. Pharmacological evidence for the involvement of the endogenous opioid system in the response to local inflammation in the rat paw. *Pain*, 1995; 60: 67-71.

PREKERIS, R; MAYHEW, MW; COOPER, JB; TERRIAN, DM. Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *The Journal of Cell Biology*, 1996; 132: 77-90.

PREKERIS, R; HERNANDEZ, RM; MAYHEW, MW; WHITE, MK; TERRIAN, DM. Molecular analysis of the interactions between protein kinase C- ϵ and filamentous actin. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998; 273: 26790-98.

PRUTHI, RS; DERKSEN, JE; MOORE, D. A pilot study of use of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib in recurrent prostate cancer after definitive radiation therapy or radical prostatectomy. *British Journal of Urology: International*, 2004; 93: 275-8.

PRZEWLOCKA, B; LASON, W; PRZEWLOCKI, R. The effect of chronic morphine and cocaine administration on the Gs and Go protein messenger RNA levels in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 1994; 63: 1111–1116.

PUEHLER, W; ZOLLNER, C; BRACK, A; SHAQURA, MA; KRAUSE, H; SCHAFER, M; STEIN, C. Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction. *Neuroscience*, 2004; 129(2): 473-9.

PUEHLER, W; RITTNER, HL; MOUSA, SA; BRACK, A; KRAUSE, H; STEIN, C; SCHAFER, M. Interleukin-1 beta contributes to the upregulation of kappa opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation. *Neuroscience*, 2006; 141(2): 989-998.

PYRKO, P; KARDOSH, A; LIU, YT; SORIANO, N; XIONG, W; CHOW, RH; UDDIN, J; PETASIS, NA; MIRCHEFF, AK; FARLEY, RA; LOUIE, SG; CHEN, TC; SCHÖNTHAL, AH. Calcium-activated endoplasmic reticulum stress as a major component of tumor cell death induced by 2,5-dimethyl-celecoxib, a non-coxib analogue of celecoxib. *Molecular Cancer Therapy*, 2007; 6(4): 1262-75.

QUARTILHO, A; MATA, HP; IBRAHIM, MM; VANDERAH, TW; PORRECA, F; MAKRIYANNIS, A; MALAN, TP Jr. Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral cb2 cannabinoid receptor. *Anesthesiology*, 2003; 99: 955–60.

RAMABADRAN, K; SUAUDEAU, C; JACOB, JJ. A comparison of some pharmacological effects of naloxone and N-methylnaloxone in mice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1982; 60(5): 715-9.

RANDALL, LO; SELITTO, JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. *Arch Int Pharmacodyn*, 1957; 111: 409-419.

RANE, SG; WALSH, MP; MCDONALD, JR; DUNLAP, K. Specific inhibitors of protein kinase C block transmitter-induced modulation of sensory neuron calcium current. *Neuron*, 1989; 3(2): 239-45.

RATUSHNYAK, AS; ZAPARA, TA; ZHARKIKH, AA; RATUSHNYAK, OA. Effects of changes in dynamic equilibrium in microtubule and microfilament systems on the plastic responses of neurons. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 1997; 27(4): 353-359.

RAY, WA; STEIN, CM; HALL, K; DAUGHERTY, JR; GRIFFIN, MR. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of serious heart disease: an observational cohort study. *The Lancet*, 2002; 359: 118-123.

REDING, T; BIMMLER, D; PERREN, A; SUN, LK; FORTUNATO, F; STORNI, F; GRAF, R. A selective COX-2 inhibitor suppresses chronic pancreatitis in an animal model (WBN/Kob rats): significant reduction of macrophage infiltration and fibrosis. *Gut*, 2006; 55(8): 1165-73.

RESNICK, RB; VOLAVKA, J; FREEDMAN, AM; THOMAS, M. Studies of EN-1639A (naltrexone): a new narcotic antagonist. *Am J Psychiatry* 1974; 131(6): 646-50.

REZENDE, RM; FRANÇA, DS; MENEZES, GB; DOS REIS, WPG; BAKHLE, YS; FRANCISCHI, JN. Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyrrone in a rat model of inflammatory pain. *British Journal of Pharmacology*, 2008; 153: 760-8.

REZENDE, RM; REIS, WGP; DUARTE, ID; LIMA, PP; BAKHLE, YS; FRANCISCHI, JN. The analgesic actions of centrally administered celecoxib are mediated by endogenous opioids. *Pain*, 2009; 142: 94-100.

RIENDEAU, D; PERCIVAL, MD; BRIDEAU, C; CHARLESON, S; DUBÉ, D; ETHIER, D; FALGHEYRET, JP; FRIESEN, RW; GORDON, R; GREIG, G; GUAY, J; MANCINI, J; OUELLET, M; WONG, E; XU, L; BOYCE, S; VISCO, D; GIRARD, Y; PRASIT, P; ZAMBONI, R; RODGER, IW; GRESSER, M; FORD-HUTCHINSON, AW; YOUNG, RN; CHAN, CC. Etoricoxib (MK-0663): preclinical and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001; 296: 558-566.

RINALDI-CARMONA, M; BARTH, F; MILLAN, J; DEROCQ, JM; CASELLAS, P; CONGY, C; OUSTRIC, D; SARRAN, M; BOUABOULA, M; CALANDRA, B; PORTIER, M; SHIRE, D; BRELIÈRE, JC, LE FUR, GL. SR 144528, the First Potent and Selective Antagonist of the CB2 Cannabinoid Receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1998; 284: 644–650.

RITTNER, HL; LUX, C; LABUZ, D; MOUSA, SA; SCHÄFER, M; STEIN, C; BRACK, A. Neurokinin-1 receptor antagonists inhibit the recruitment of opioid-containing leukocytes and impair peripheral antinociception. *Anesthesiology*, 2007; 107(6): 1009-1017.

RITTNER, HL; HACKEL, D; YAMDEU, RS; MOUSA, SA; STEIN, C; SCHÄFER, M; BRACK, A. Antinociception by neutrophil-derived opioid peptides in noninflamed tissue- role of hypertonicity and the perineurium. *Brain Behavior and Immunology*, 2009; 23(4): 548-57.

ROGER, B; AL-BASSAM, J; DEHMELT, L; MILLIGAN, RA; HALPAIN, S. MAP2c, but not tau, binds and bundles f-actin via its microtubule binding domain. *Current Biology*, 2004; 14(5): 363-71.

RYAN, WG; MOLDAVE, K; CARITHERS, D. Clinical effectiveness and safety of a new NSAID, firocoxib: a 1,000 dog study. *Veterinary Therapeutics*, 2006; 7(2): 119-26.

SABINO, GS; SANTOS, CMF; FRANCISCHI, JN; REZENDE, MA. Release of endogenous opioids following transcutaneous electric nerve stimulation in an experimental model of acute inflammatory. *Pain*, 2008; 9(2): 157-163.

SAINI, SS; GESSELL-LEE, DL; PETERSON, JW. The cox-2-specific inhibitor celecoxib inhibits adenylyl cyclase. *Inflammation*, 2003; 27(2):

SAMSON, F; DONOSO, JA; BETTINGER, IH; WATSON, D; HIMES, RH. Nocodazole action on tubulin assembly, axonal ultrastructure and fast axoplasmic transport. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1979; 208: 411-417.

SATARIAN, L; JAVAN, M; FATHOLLAHI, Y. Epinephrine inhibits analgesic tolerance to intrathecal administered morphine and increases the expression of calcium-calmodulin-dependent protein kinase II alpha. *Neurosci Letters*, 2008; 430(3): 213-7.

SCHAIBLE, HG. Peripheral and central mechanisms of pain generation. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2007; 177: 3-28.

SCULIGOI, R. Effect of colchicine on nerve growth factor-induced leukocyte accumulation and thermal hyperalgesia in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1998; 358: 264-269.

SESSIONS, JK; REYNOLDS, LR; BUDSBERG, SC. In vivo effects of carprofen, deracoxib, and etodolac on prostanóide production in blood, gastric mucosa, and sinovial fluid in dogs with chronic osteoarthritis. American Journal of Veterinary Research, 2005; 66(5): 812-817.

SHIBATA, M; OHKUBO, T; TAKAHASHI, H; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. Pain, 1989; 38: 347-352.

SILVERSTEIN, FE; FAICH, G; GOLDSTEIN, JL; SIMON, LS; PINCUS, T; WHELTON, A; MAKUCH, R; EISEN, G; AGRAWAL, NM; STENSON, WF; BURR, AM; ZHAO, WW; KENT, JD; LEFKOWITH, JB; VERBURG, KM; GEIS, GS. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs. nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: a randomized controlled trial. celecoxib long-term arthritis safety study. Journal of the American Medical Association, 2000; 284:1247-1255.

SILVERSTEIN, F; SIMON, L; FAICH, G. Reporting of 6-month vs 12-month data in a clinical trial of celecoxib. Journal of the American Medical Association, 2001; 286: 2399–2480.

SIMMONS, DL. Variants of cyclooxygenase and their roles in medicine. Thrombosis Research, 2003; 110: 265-268.

SIMON, LS; LANZA, FL; LIPSKY, PE; HUBBARD, RC; TALWALKER, S; SCHWARTZ, BD; ISAKSON, PC; GEIS, GS. Preliminary study of the safety and efficacy of sc-58635, a novel cyclooxygenase 2 inhibitor. Arthritis and Rheumatism, 1998; 41: 1591-1602.

SIMONDS, WF. The molecular basis of opioid receptor function. *Endocrine Reviews*, 1988; 9(2): 200-12.

SMITH, WL; MARNETT, LJ. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalyses. *Biochemistry and Biophysics Acta*, 1991; 1083: 1-17.

SMITH, PB; WELCH, SP; MARTIN, BR. Interactions between delta-9-tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. *The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, 1994; 268(3): 1381-1387.

SMITH, WL; DEWITT, DL. Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2. *Advances in Immunology*, 1996; 62: 167-215.

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

SMITH 2008.

SOFIA, RD; VASSAR, HB; KNOBLOCH, LC. Comparative analgesic activity of various naturally occurring cannabinoids in mice and rats. *Psychopharmacologia*, 1975; 40(4): 285-95.

SOLTANI, MH; PICHARDO, R; SONG, Z; SANGHA, N; CAMACHO, F; SATYAMOORTHY, K; SANGUEZA, OP; SETALURI, V. Microtubule-associated protein 2, a marker of neuronal differentiation, induces mitotic defects, inhibits growth of melanoma cells, and predicts metastatic potential of cutaneous melanoma. *American Journal of Pathology*, 2005; 166: 1841-50.

STANFA, LC; SULLIVAN, AF; DICKENSON, AH. Alterations in neuronal excitability and the potency of spinal mu, delta and kappa opioids after carrageenan-induced inflammation. *Pain*, 1992; 50(3): 345-54.

STANFA, L; DICKENSON, A. Spinal opioid systems in inflammation. *Inflammation Research*, 1995; 44(6): 231-41.

STEIN, C; MILLAN, MJ; YASSOURIDIS, A; HERZ, A. Antinociceptive effects of mu- and kappa-agonists in inflammation are enhanced by a peripheral opioid receptor-specific mechanism. *European Journal of Pharmacology*, 1988; 155(3): 255-64.

STEIN, C; GRAMSCH, C; HERZ, A. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and β -endorphin. *The Journal of Neuroscience*, 1990; 10(4): 1292-8.

STEIN, C; LANG, LJ. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Current Opinion in Pharmacology*, 2009; 9: 3–8.

STONE, E. An account of the success of the bark of the willow in the cure of agues. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, 1763; 53: 195-200.

STRICKER, J; FALZONE, T; GARDEL, ML. Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *Journal of Biomechemistry*, 2010; 43(1): 9-14.

SVENSSON, CI; BRODIN, E. Spinal astrocytes in pain processing: non-neuronal cells as therapeutic targets. *Molecular Interventions*, 2010; 10(1): 25-38.

SZEKELY, CA; TOWN, T; ZANDI, PP. NSAIDs for the chemoprevention of Alzheimer's disease. *Subcellular Biochemistry*, 2007; 42: 229-48.

TERKELTAUB, RA. Colchicine update: 2008. *Seminars in Arthritis and Rheumatology*, 2008; 38(6): 411-9.

TOEBAK, MJ; GIBBS, S; BRUYNZEEL, DP; SCHEPER, R; RUSTEMEYER, T. Dendritic cells: biology of the skin. *Contact Dermatitis*, 2009; 60: 2-20.

TRACY, RP. The five cardinal signs of inflammation: calor, dolor, rubor, tumor and penuria (apologies to Aulus Cornelius Celsus, de medicina). *Journal of Gerontology*, 2006; 61(10): 1051-2.

TRILLER, A; CHOQUET, D. Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move! *Trends in Neuroscience*, 2005; 28(3): 133-9.

UEDA, N. Endocannabinoid hydrolases. *Prostaglandins Other Lipid Mediators*, 2002; 68-69: 521-34.

VAN DER KAM, EL; VRY, JD; SCHIENE, K; TZSCHENTKE, TM. Differential effects of morphine on the affective and the sensory component of carrageenan-induced nociception in the rat. *Pain*, 2008; 136(3): 373-9.

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

VANE, JR; BAKHLE, YS; BOTTING, RM. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1998; 38: 97-120.

VANE, JR. The fight against rheumatism: from willow bark to COX1-sparing drugs. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2000; 51(4): 573-586.

VANEGAS, H; TORTORICI, V. Opioidergic effects of nonopioid analgesics on the central nervous system. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2002; 22(5/6).

VAUGHAN, CW; INGRAM, SL; CONNOR, MA; CHRISTIE, MJ. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature*, 1997; 390: 611-614.

VAZQUEZ, E; HERNANDEZ, N; ESCOBAR, W; VANEGAS, H. Antinociception induced by intravenous dipyron (metamizol) upon dorsal horn neurons: involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats. *Brain Research*, 2005; 1048: 211-217.

VINEGAR, R; TRUAX, JF; SELPH, JL. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. *Fed Proc.*, 1976; 35 (13): 2447-56.

VINEGAR, R; TRUAX, JF; SELPH, JL; JOHNSTON, PR; VENABLE, AL; McKENZIE, KK. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed. Proc.*, 1987; 46(1): 118-146.

WARNER, TD; MITCHELL, JA. Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proceedings of National Academy of Science: USA*, 2002; 99(21): 13371-13373.

WELCH, SP; EADS, M. Synergistic interactions of endogenous opioids and cannabinoid systems. *Brain Research*, 1999; 848: 183–190.

WHITTLE, BJR. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2003; 17: 301-313.

WILLIS, WD. Anatomy and physiology of descending control of nociceptive responses of dorsal horn neurons. *Progress in Brain Research*, 1988; 77: 1-29.

WINTER, CA; FLATAKER, L. Nociceptive thresholds as affected by parenteral administration of irritants and of various antinociceptive drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1965; 148(8): 373-379.

WONG, PYD; CHAN, HC; LEUNG, PS; CHUNG, YW; WONG, YL, LEE, WM. Regulation of anion secretion by cyclo-oxygenase and prostanoids in cultured epididymal epithelia from rat. *Journal of Physiology*, 514(3): 809-820

WOODCOCK, J; WITTER, J; DIONNE, RA. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 2007; 6(9): 703-10.

WOOLF, CJ; MA, Q. Nociceptors: noxious stimulus detectors. *Neuron*, 2007; 55: 353-364.

XU, ZQD; ZHANG, X; SCOTT, L. Regulation of G protein-coupled receptor trafficking. *Acta Physiologica*, 2007, 190: 39–45.

YAMAMOTO, T; SHIMOYAMA, N; MIZUGUCHI, T. The effects of morphine, MK-801, an NMDA antagonist, and CP-96,345, an NK1 antagonist, on the hyperesthesia evoked by carageenan injection in the rat paw. *Anesthesiology*, 1993; 78(1): 124-33.

YAMAMOTO, T; YAKSH, TL. Effects of colchicine applied to the peripheral nerve on the thermal hyperalgesia evoked with chronic nerve constriction. *Pain*, 1993; 55(2): 227-33.

YAMAMOTO, DS; VIALE, PH. Cyclooxygenase – 2: from arthritis treatment to new indications for the prevention and treatment of cancer. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 2003; 7(1): 21-29.

YAMASHITA, H; OSAKI, M; HONJO, S; YOSHIDA, H; TESHIMA, R; ITO, H. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor, NS-398, inhibits cell growth by cell cycle arrest in a

human malignant fibrous histiocytoma cell line. *Anticancer Research*, 2003; 23(6C): 4671-4676.

ZHANG, Y; TAO, J; HUANGB, H; DING, G; CHENGA, Y; SUNA, W. Effects of celecoxib on voltage-gated calcium channel currents in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Pharmacological Research*, 2007; 56: 267-74.

ZHOU, L; ZHANG, Q; STEIN, C; SCHÄFER, M. Contribution of opioid receptors on primary afferent versus sympathetic neurons on peripheral opioid analgesia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1998; 286: 1000-1006.

ZHU, J; HUANG, JW; TSENG, P; YANG, YT; FOWBLE, J; SHIAU, C; SHAW, YJ; KULP, SK; CHEN, CS. From the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib to a novel class of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 inhibitors. *Cancer Research*, 2004; 64, 4309-4318.

ZÖLLNER, C; SHAQUIRA, MA; BOPAIAH, CP; MOUSA, S; STEIN, C; SCHÄFER, M. Painful inflammation-induced increase in μ -opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Molecular Pharmacology*, 2003; 64: 202-210.

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](#)