

Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos^(*)

Effect of nitric oxide synthase in articular inflammatory pain and cellular influx of zymosan-induced arthritis in rats

Francisco Airton Castro da Rocha⁽¹⁾, José Carlos da Silva Rocha⁽²⁾, Magno Eric Barbosa Peixoto⁽¹⁾, Sonia Jancar⁽⁴⁾, Fernando de Queiroz Cunha⁽³⁾ e Ronaldo de Albuquerque Ribeiro⁽²⁾

RESUMO

Objetivo: Investigar o papel do óxido nítrico (NO) no influxo celular (IC) e a incapacitação articular (IA) na artrite por zymosan (AZy). **Métodos:** Ratos Wistar receberam injeção de Zy (1mg) no joelho direito. Grupos-controles receberam salina. A IA foi avaliada pelo Teste de incapacitação articular para ratos. Após sacrifício, o IC e a liberação de PGE2 foram avaliados no lavado articular. Avaliou-se o edema pela diferença peso úmido/peso seco do tecido articular. Grupos foram tratados i.p. com L-NAME – inibidor de sintases de NO (NOS) (LN=30-300mg/kg) ou aminoguanidina (AG= 30-300mg/kg) – inibidor seletivo de iNOS – 30 min antes ou 2 h após o Zy. **Resultados:** O pré-tratamento com L-NAME ou AG inibiu de forma dose-dependente a IA e o IC, mas não o edema ou a liberação de PGE2, sendo máximo para LN ou AG (100mg/kg). L-arginina (1g/kg) co-injetada com LN (100mg/kg) reverteu a inibição da IA e do IC. D-NAME (100mg/kg) não teve efeito. Co-injeção de naloxona (antagonista opióide) reverteu o efeito de LN e AG sobre a IA. A pressão arterial média elevou-se ($p<0,01$) após LN (100mg/kg), mas não com AG (100mg/kg). LN e AG (100mg/kg) dados 2 h após Zy não tiveram efeito. Azul de metileno (inibidor de GMPc), e não hemoglobina (scavenger de NO), reduziu IA e IC ($p<0,01$). Nitroprussiato de sódio (doador de NO) dado 2 h após Zy, reduziu a IA, mas não o IC ($p<0,01$). **Conclusões:** A antinocicepção na AZy por inibição da iNOS só ocorre como pré-tratamento, por efeito antiinflamatório via GMPc, independentemente de NO exógeno ou de PGE2, associada à liberação de opióides endógenos. Um doador de NO

ABSTRACT

Objective: To study the role of nitric oxide (NO) in the cell influx (CI) and the articular incapacitation (AI) in the zymosan induced-arthritis (ZyA). **Methods:** Wistar rats received 1 mg of zymosan (Zy) into the right knee joint, and controls received saline. The AI was evaluated by the Test for AI in rats. After sacrifice, the CI and the release of prostaglandin E2 (PGE2) were assessed in the joint exudate. The joint edema was measured by the wet/dry weight ratio of the articular tissue. Groups were treated i.p. with L-NAME – NO synthase (NOS) inhibitor (LN = 30-300 mg/kg) or aminoguanidine (AG = 30-300 mg/kg) – selective iNOS inhibitor – 30 minutes before or 2 hours after the Zy. **Results:** Pretreatment with L-NAME or AG dose-dependently inhibited the AI and the CI, but not altering edema or PGE2 release, being maximal for the 100 mg/kg doses of L-N and AG. Coinjection of L-arginine (1g/kg) and LN (100 mg/kg) reversed the inhibition of the AI and of the CI. D-NAME (100 mg/kg) had no effect. Coinjection of naloxone (opioid antagonist) reversed LN or AG effect on the AI. Mean arterial pressure increased ($p<0,01$) with LN (100 mg/kg), but not with AG (100 mg/kg). LN and AG (100 mg/kg) given 2 hours after the Zy had no effect. Methylene blue (GMPc inhibitor), but not hemoglobin (NO scavenger) reversed AI and CI ($p<0,01$). Sodium nitroprusside (NO donor) given 2 hours after Zy reduced significantly AI, but not CI ($p<0,01$). **Conclusions:** The antinociceptive effect of iNOS inhibition in ZyA happens only with a prophylactic administration, due to an anti-inflammatory

* Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (FMUFCE). Este trabalho recebeu apoio dos fundos remanescentes da SBR e foi agraciado com o prêmio Luiz Vertzman, 2000. Recebido em 09/01/03. Aprovado, após revisão, em 24/02/03.

1. Disciplina de Reumatologia da FMUFCE.
2. Departamento de Fisiologia e Farmacologia da FMUFCE.
3. Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP/FMRP).
4. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Endereço para correspondência: Francisco Airton Castro da Rocha. Rua Tiburcio Cavalcante, 2100/1201, CEP 60125-101, Fortaleza, CE, e-mail: arocha@ufc.br

produz analgesia na AZy. Enfim, o trabalho demonstra efeito analgésico de um doador de NO em um modelo de periartrose, abrindo a perspectiva do uso dessas substâncias em humanos

Palavras-chave: Óxido nítrico, artrite, dor, hiperalgesia, neutrófilos, zymosan.

INTRODUÇÃO

O óxido nítrico é produzido por um sistema de sintases de NO (NOS) usando L-arginina como substrato. Três isoformas de NOS foram descritas até hoje, sendo as isoformas endotelial (NOS1) e neuronal (NOS3) denominadas constitutivas (cNOS), ao passo que a NOS2 é conhecida com NOS indutível (iNOS). As cNOS produzem NO em quantidades pico-nanomolares por curtos períodos, por mecanismo dependente de cálcio; iNOS produz NO em grande quantidade e por longo tempo, uma vez que ocorra ativação celular por estímulos inflamatórios como citocinas e lipopolissacarídeo. A produção de NO via cNOS está relacionada à homeostase, enquanto a produção de NO via ativação da iNOS está ligada a fenômenos fisiopatológicos.

Dados anteriores sugerem um papel do NO em mecanismos de dor. Foi mostrado que a administração de L-NMMA (N^ω-monometil-L-arginina), um inibidor de NOS, bloqueou a analgesia periférica induzida por acetilcolina⁽¹⁾. Também foi descrito que a antinocicepção periférica da morfina em ratos submetidos à hiperalgesia induzida por prostaglandina E2 foi mediada por liberação de NO via ativação da GMP-ciclase⁽²⁾. Entretanto, há controvérsias com relação ao papel do NO em fenômenos dolorosos, uma vez que a injeção local de NO em humanos produz dor, possivelmente via estimulação local de nociceptores⁽³⁾. A administração de L-NAME (N^ω-nitro-L-arginina-metil-éster), um inibidor de NOS, teve efeito antinociceptivo em camundongos e reverteu a hiperalgesia térmica em ratos submetidos à artrite por carragenina⁽⁴⁾. Várias evidências revelam a participação do NO em artrites. Níveis elevados de NO foram associados com o desenvolvimento de artrite induzida por parede de estreptococos⁽⁵⁾. A administração de inibidores de NOS reverteu a inflamação em outras artrites experimentais^(6,7).

A limitação de movimentos representa uma lesão importante a portadores de artrites. Embora o alívio da dor seja freqüentemente o objetivo principal no tratamento agudo nessas patologias, pouco se sabe dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de dor em artropatias. O teste da incapacitação articular para ratos foi desenvolvido para estudar a incapacitação articular, definida com

effect via GMPc, independently of exogenous NO or PGE2 release, but is associated to endogenous opioid release. The administration of an NO donor produces analgesia in ZyA.

Keywords: Nitric oxide, arthritis, pain, hyperalgesia, neutrophils, zymosan.

a inabilidade de um rato com artrite deambular normalmente⁽⁸⁾. Nesse teste, a incapacitação articular é assumida como devida à alteração de nocicepção seqüente à injeção de um estímulo inflamatório nas juntas. Usando esse modelo, nós recentemente demonstramos o desenvolvimento de alterações da marcha (incapacitação articular-IA) em ratos submetidos à artrite por zymosan (Zy). Após a injeção do Zy, os animais desenvolvem progressiva IA que se inicia na segunda hora e é máxima entre a terceira e quarta horas de artrite. Há ainda aumento da permeabilidade vascular levando a edema local e ainda acentuado influxo celular, que é máximo na sexta hora, com predomínio de polimorfonucleares. Por meio de uma variação na estratégia de administração do estímulo nesse modelo, nós demonstramos que a IA da artrite por Zy é causada por estimulação de nociceptores localizados nos tecidos periarticulares, e não na sinóvia, e que a IA independe do influxo celular e do edema local⁽⁹⁾.

Considerando que o papel exato do NO no desencadeamento de dor ainda é controverso e que os mecanismos de dor em artropatias inflamatórias ainda não estão elucidados, nós decidimos investigar a participação do NO na IA da artrite induzida por Zy. Os resultados relatados neste trabalho sugerem que os inibidores de NOS têm efeito antinociceptivo indireto por causa de um efeito antiinflamatório via inativação da NOS indutível e que a administração de doadores de NO promove analgesia na artrite por Zy.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais – foram utilizados ratos Wistar machos (180–220g), providos pelo biotério central da Universidade Federal do Ceará. Os procedimentos cirúrgicos foram efetuados de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (DHEW Publication, Bethesda, MD, USA).

Avaliação do efeito do NO na incapacitação articular (IA) – Após anestesia com éter, os ratos foram submetidos à injeção intra-articular (ia) de 1mg de Zy (50ml volume total) no joelho direito. Grupos-controles receberam salina. Utilizamos o teste de IA para ratos, descrito previamente⁽⁸⁾. Resumindo, após a injeção do Zy no joelho direito,

os animais foram postos para deambular em um cilindro metálico (30 cm x 50 cm), coberto com uma malha de aço inoxidável, que gira a 3rpm. Sapatilhas metálicas foram adaptadas em ambas as patas traseiras dos animais, deixando-se os animais para se habituarem por 30 minutos. A sapatilha da pata direita foi conectada a um circuito de aquisição de dados. O Tempo de Suspensão da Pata (TSP) foi tomado como o tempo que o animal deambula sem tocar o cilindro com a pata injetada com Zy, durante um período de 60 segundos, o qual é diretamente proporcional à IA. L-NAME (10-300mg kg⁻¹), aminoguanidina (10-300mg kg⁻¹), D-NAME (100mg kg⁻¹) ou salina estéril foram administrados ip 30 minutos antes da indução da artrite. Um outro grupo recebeu L-arginina (1g kg⁻¹ per os) 30 min antes de L-NAME (100mg kg⁻¹), seguindo-se injeção de Zy (1mg) i.a. Outros grupos receberam L-NAME (100mg kg⁻¹), aminoguanidina (100mg kg⁻¹) ou nitroprussiato de sódio intra-articular (NPS 100-500mg) 2h após indução da artrite. No intuito de avaliar se os inibidores de NOS estariam agindo por meio da liberação de opióides, grupos de animais artríticos foram pré-tratados (1h) com naloxone (1mg kg⁻¹ i.p.), um antagonista de receptor μ -opióide. Uma vez que a maioria das ações do NO é modulada via ativação da GMP-ciclase, investigamos o efeito da administração intra-articular de um inibidor de GMPC, azul de metileno (500mg i.a.), dado 1h antes da indução da artrite por Zy. Ainda, o efeito de *scavengers* de NO foi investigado pela administração de hemoglobina (30 mmol/junta i.a.), dada imediatamente antes da indução da artrite.

Avaliação do influxo celular, edema local e liberação de prostaglandina E2 – Os animais foram anestesiados (Hidrato de Cloral 400mg kg⁻¹ i.p.), mortos por decapitação e exsanguinados. A cavidade articular dos joelhos foi lavada com 0,4ml de salina heparinizada. O exsudato aspirado foi centrifugado (500g/10min) e a celularidade total e diferencial foi determinada, usando câmara de Neubauer e corante Diff-Quick, respectivamente. O sobrenadante desse material aspirado foi coletado e guardado à -20°C para posterior análise da concentração de prostaglandina E2 (PGE2), feita por enzima imunoensaio, usando estojo adquirido comercialmente, como descrito previamente⁽¹⁰⁾. Nós descrevemos previamente que a permeabilidade vascular na artrite por Zy é máxima às 3h de artrite⁽⁹⁾. Grupos de animais foram então sacrificados após 3h de artrite, sob anestesia, e tiveram o tecido articular, incluindo patela e sinóvia, retirados e anotado o peso úmido. Essas amostras foram secas (80°C) por 24h e o peso seco anotado. A diferença peso úmido e peso seco desse material, medida em

gramas (g), foi usada como uma medida de edema local. No intuito de analisar o efeito do NO sobre o edema, animais foram pré-tratados (30 min) com L-NAME (100mg kg⁻¹ i.p.) ou aminoguanidina (100mg kg⁻¹ i.p.) e submetidos ao mesmo procedimento.

Registro da pressão arterial média (PAM) – com o objetivo de detectar possíveis alterações de fluxo sanguíneo causadas pela administração de inibidores de NOS, a PA média foi medida. Ratos foram anestesiados com éter e canulou-se a artéria carótida comum. Após acordados, a PAM foi medida adaptando-se a cânula arterial a um transdutor de pressão acoplado a um polígrafo. Tomaram-se medidas da PAM a intervalos de 30 minutos após injeção i.p. de L-NAME (100mg kg⁻¹ i.p.) ou aminoguanidina (100mg kg⁻¹ i.p.) e subsequentemente a intervalos horários até 4 horas após, sendo comparados aos valores basais.

Drogas e reagentes – Todas as drogas e os reagentes usados foram comprados da Sigma Chem Co. St. Louis, USA, e dissolvidos em salina estéril apirogênica.

Análise Estatística – Os resultados são expressos representando média \pm e.p.m. As diferenças estatísticas entre grupos foram medidas usando ANOVA univariada seguida por teste de Tukey P<0,05 foi considerado significativo.

RESULTADOS

Efeito de inibidores de NOS na incapacitação articular (IA) da artrite por Zy – O efeito de L-NAME e aminoguanidina na IA está mostrado nas Figuras 1a e 1b, respectivamente. A injeção de Zy (1mg) na cavidade articular dos ratos provocou aumento no Tempo de Suspensão da Pata (TSP), que começou 2 horas após a indução da artrite e foi máximo entre a terceira e quarta horas, como descrevemos anteriormente⁽⁹⁾. O pré-tratamento com L-NAME (inibidor inespecífico de NOS) ou aminoguanidina (inibidor específico de iNOS) reduziu de forma dose-dependente a IA. Como o efeito máximo foi obtido a partir das doses de L-NAME (100mg kg⁻¹) e aminoguanidina (100mg kg⁻¹), decidimos utilizar essas concentrações nos experimentos posteriores. A Figura 1c mostra que a administração de D-NAME, um isômero inativo do L-NAME, não modificou a IA e também que a administração de L-arginina (1g kg⁻¹) – substrato normal para a NOS, associada ao L-NAME (100mg kg⁻¹) reverteu os efeitos desse último composto sobre a IA. Esses dados indicam que o efeito dos inibidores de NOS na nocicepção articular da artrite por Zy ocorreu via inativação da iNOS.

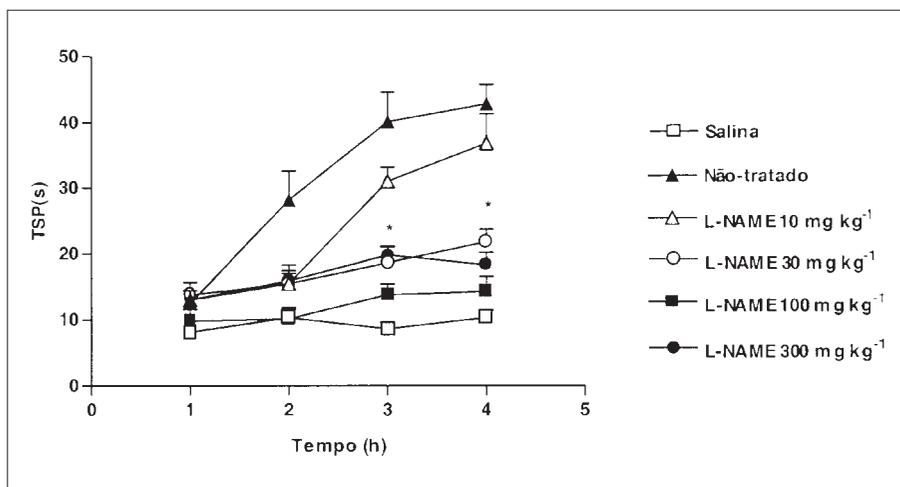


Figura 1a – Efeito dose-dependente de L-NAME (LN) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan (Zy) em ratos. Zy (1mg) foi injetado intra articularmente e a IA foi registrada, a cada hora, por 4 horas, pelo tempo de suspensão da Pata (TSP) obtido usando o teste de IA para ratos (veja texto para detalhes). LN (10, 30, 100, 300mg kg⁻¹ ip) foi injetado 30 min antes do Zy. Animais do grupo-controle receberam salina ia. Os resultados foram expressos como a média± e.p.m. de cada hora para n= 6 animais. *p< 0,05 vs animais não-tratados (NT).

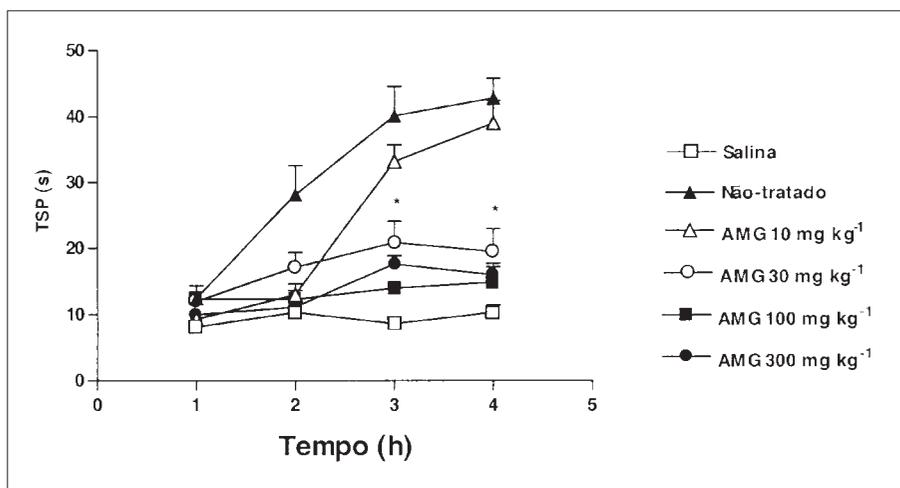


Figura 1b – Efeito dose-dependente de aminoguanidina (AMG) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan (Zy) em ratos. Zy (1mg) foi injetado intraarticularmente (ia) e a IA foi medida, a cada hora, por 4 horas, pelo tempo de suspensão da pata (TSP) obtido usando o teste de IA para ratos (veja texto para detalhes). AMG (10, 30, 100, 300mg kg⁻¹ ip) foi injetado 30 min antes do Zy. Animais do grupo-controle receberam salina ia. Os resultados foram expressos como a média± e.p.m. de cada hora para n= 6 animais. *p< 0,05 vs animais não-tratados (NT).

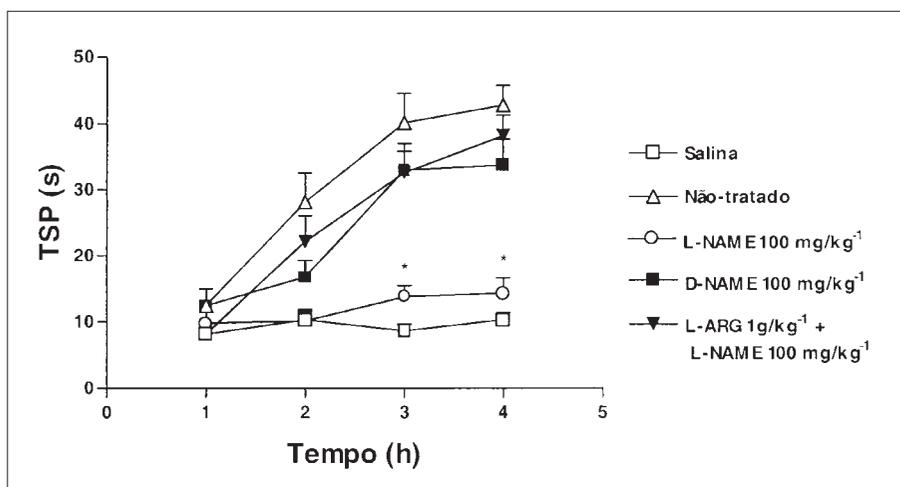


Figura 1c – Efeito da co-administração de L-arginine (L-arg) e -NAME (LN) ou D-NAME (DN) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan (Zy) em ratos. Zy (1mg) foi injetado intraarticularmente (ia) e a IA foi medida, a cada hora, por 4 horas, pelo tempo de suspensão da pata (TSP) obtido usando o teste de IA para ratos (veja texto para detalhes). LN (100mg kg⁻¹ ip) foi injetado 30 min antes do Zy. L-Arg (1g kg⁻¹) foi dado 30 min antes do LN (100mg kg⁻¹ ip) seguido do Zy (1mg) i.a. DN (100mg kg⁻¹ ip) foi injetado 30 min antes do Zy. Animais do grupo-controle receberam salina i.a. Os resultados foram expressos como a média± e.p.m. de cada hora para n= 6 animais. *p< 0,05 vs animais não-tratados (NT).

Efeito de Naloxona na antinociceção dos inibidores de NOS – A figura 2 mostra que a administração de Naloxona (1mg kg^{-1}), um antagonista de receptor opióide do tipo m, previamente à administração de L-NAME (100mg kg^{-1}) ou aminoguanidina (100mg kg^{-1}), inibiu significativamente o efeito de ambos, L-NAME ou aminoguanidina, sugerindo que o efeito dos inibidores de NOS sobre a IA é mediado pela liberação de opióides endógenos.

Efeito de inibidores de NOS no influxo celular na artrite por Zy – O efeito de L-NAME e aminoguanidina na IA está mostrado nas Figuras 3a e 3b, respectivamente. A injeção de Zy (1mg) na cavidade articular dos ratos provocou intensa migração celular, que é máxima na 6ª hora e tem predomínio de polimorfonucleares, como descrevemos anteriormente⁽⁹⁾. O pré-tratamento com L-NAME (inibidor inespecífico de NOS) ou aminoguanidina (inibidor específico de iNOS) reduziu de forma dose-dependente o influxo celular. Como o efeito máximo foi obtido a partir das doses de L-NAME (100mg kg^{-1}) e aminoguanidina (100mg kg^{-1}), decidimos utilizar essas concentrações nos experimentos posteriores. A Figura 3c mostra que a administração de D-NAME, um isômero inativo do L-NAME, não modificou o influxo celular e também que a administração de L-arginina (1g kg^{-1}) – substrato normal para a NOS –, associada ao L-NAME (100mg kg^{-1}) reverteu os efeitos desse último composto sobre a migração celular. Esses dados indicam que o efeito dos inibidores de NOS na migração celular da artrite por Zy ocorre via inativação da iNOS.

Efeito de um inibidor de GMP-cíclico ou de um scavenger de NO na artrite por Zy – As Figuras 4a e 4b ilustram o efeito da administração local de azul de metileno, um inibidor de GMP-cíclico, ou de hemoglobina, um scavenger de NO, sobre a IA e influxo celular na artrite por Zy, respectivamente. A administração do azul de metileno reduziu significativamente ambos os parâmetros, enquanto que a Hemoglobina não alterou nenhum deles, sugerindo que o NO participa no influxo celular e na IA da artrite por Zy via ativação da via do GMPc. O fato da hemoglobina não ter modificado os parâmetros sugere que fontes exógenas de NO não estão envolvidas nesses fenômenos.

Efeito de inibidores de NOS na liberação de prostaglandina E2 – A Figura 5 mostra que tanto a administração de L-NAME (100mg kg^{-1}) como a de aminoguanidina (100mg kg^{-1}), em doses efetivas para inibir a IA e o influxo celular, não alteraram a liberação de PGE2 para a cavidade articular, medida às 6 horas de artrite.

Efeito de inibidores de NOS no edema articular e na pressão arterial média (PAM) – A Tabela 1 mostra que a administração tanto de L-NAME (100mg kg^{-1}) como de aminoguanidina (100mg kg^{-1}) não modificou o edema articular na artrite por Zy. A medida da PAM mostrou que a administração de L-NAME (100mg kg^{-1}), e não a de aminoguanidina (100mg kg^{-1}), provocou hipertensão arterial nos animais. Esses dados sugerem que a aminoguanidina não inibiu a NOS constitutiva nas condições usadas nesse trabalho e que a inibição da IA e do influxo celular por L-NAME ou por aminoguanidina não está associada à redução de edema articular.

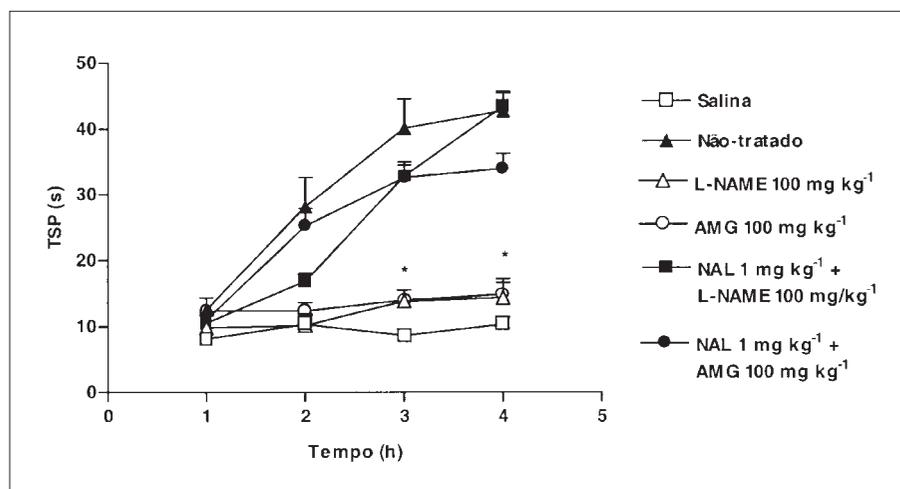


Figura 2 – Efeito da co-administração de naloxona (NL) e L-NAME (LN 100mg kg^{-1} ip) ou aminoguanidina (AMG 100mg kg^{-1} ip) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan (Zy) em ratos. Zy (1mg) foi injetado intra-articularmente (ia) e a IA foi medida, a cada hora, por 4 horas, como aumento do tempo de suspensão da pata (TSP) obtido usando o teste de IA para ratos (veja texto para detalhes). LN (100mg kg^{-1} ip) ou AMG (100mg kg^{-1} ip) foram injetados 30 min antes do Zy. Animais do grupo-controle receberam salina ia. Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m. de cada hora para $n=6$ animais. * $p<0,05$ vs animais não-tratados (NT).

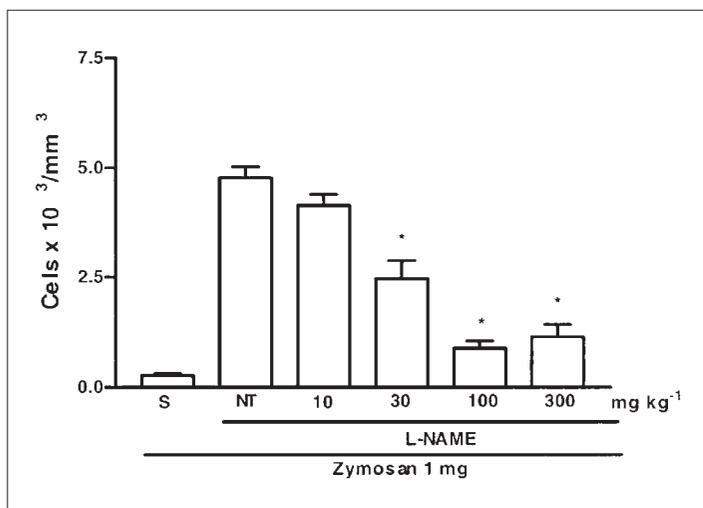


Figura 3a – Efeito de L-NAME (LN) sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos. Zy (1mg) foi injetado intra-articularmente (ia) e o IC foi medido na 6ª hora após de artrite no exsudato articular usando câmara de Neubauer. LN (10, 30, 100, 300mg kg⁻¹ ip) foi injetado 30 min antes do Zy. Animais do grupo- controle receberam salina ia. Os resultados foram expressos como a média± e.p.m. de cada hora para n= 6 animais. *p< 0,05 vs animais não-tratados (NT).

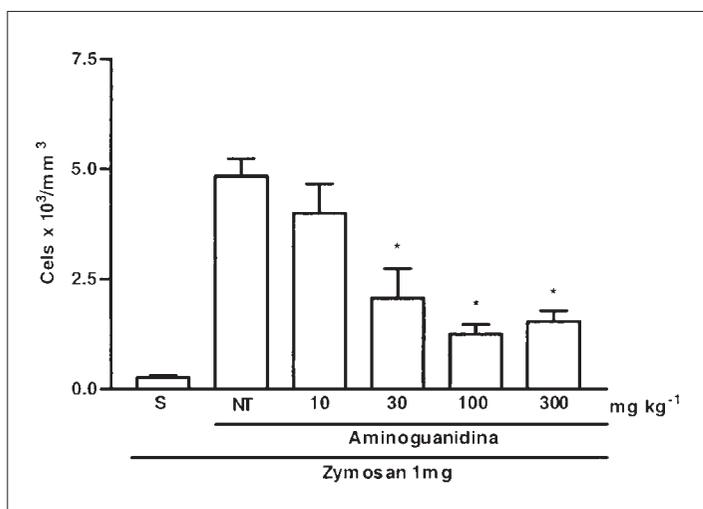


Figura 3b – Efeito de aminoguanidina (AMG) sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan em ratos. Zy (1mg) foi injetado intraarticularmente (ia) e o IC foi medido na 6ª hora após a indução da artrite no exsudato articular usando câmara de Neubauer. AMG (10, 30, 100, 300mg kg⁻¹ ip) foi injetado 30 min antes do Zy. Animais do grupo-controle receberam salina ia. Os resultados foram expressos como a média± e.p.m. de cada hora para n= 6 animais. *p< 0,05 vs animais não-tratados (NT).

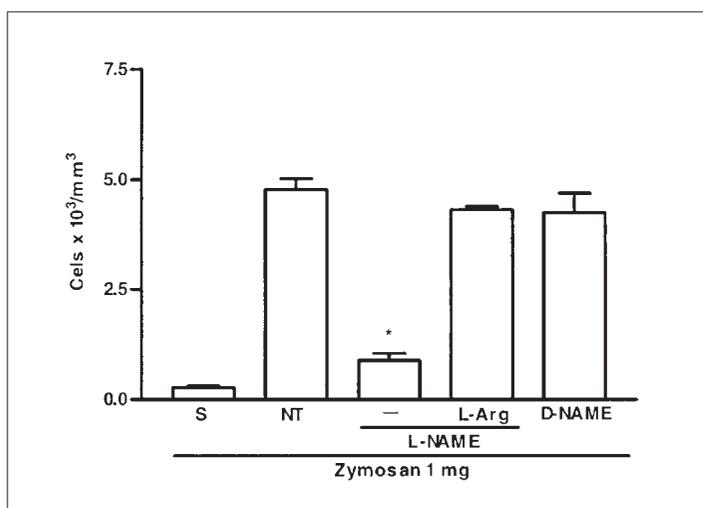


Figura 3c – Efeito da co-administração de L-arginine (L-arg) e L-NAME (LN) ou D-NAME (DN) sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan (Zy) em ratos. Zy (1mg) foi injetado intra-articularmente (ia) e o IC foi medido na 6ª hora após a indução da artrite no exsudato articular usando câmara de Neubauer. LN (10, 30, 100 mg kg⁻¹ ip) foi injetado 30 min antes do Zy. L-Arg (1 mg kg⁻¹ ip) foi dado 30 min antes do LN (100mg kg⁻¹ ip) seguido do Zy (1mg) i.a. DN (100mg kg⁻¹ ip) foi injetado 30 min antes do Zy. Animais do grupo-controle receberam salina i.a. Os resultados foram expressos como a média± e.p.m. de cada hora para n= 6 animais. *p< 0,05 vs animais não-tratados (NT).

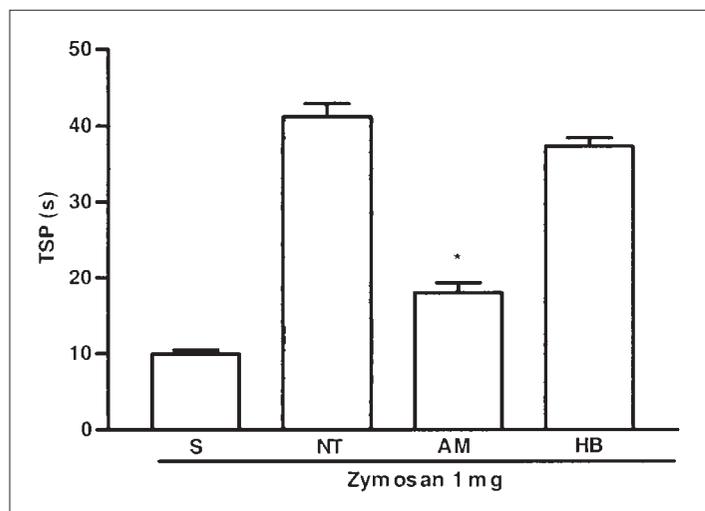


Figura 4a – Efeito da administração intra-articular de (i.a.) de azul de metileno (AM 500µg/joint) ou hemoglobina (30µmol/junta) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan (Zy) em ratos. Zy (1mg) foi injetado ia e a IA foi medida a cada hora, por 4 horas, como aumento do tempo de suspensão da Pata (TSP) obtido usando o teste de IA para ratos (veja texto para detalhes). Animais do grupo-controle receberam salina i.a. Os resultados foram expressos como a média± e.p.m. de cada hora para n= 6 animais. *p< 0,05 vs animais não-tratados (NT).

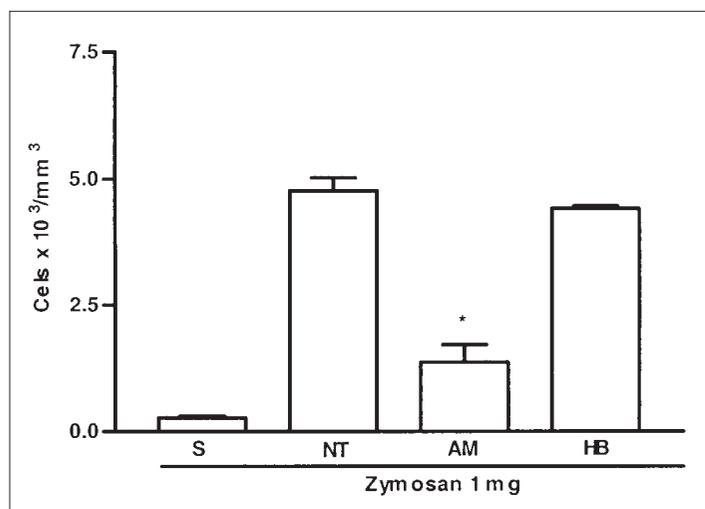


Figura 4b – Efeito da administração intra-articular (ia) de azul de metileno (AM MB 500µg/junta) ou hemoglobina (HB 30µmol/junta) sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan (Zy) em ratos. Zy (1mg) foi injetado ia e o IC foi medido na 6ª hora de artrite no exsudato articular usando câmara de Neubauer. Animais do grupo-controle receberam salina ia. Os resultados foram expressos como a média± e.p.m. de cada hora para n= 6 animais. *p< 0,05 vs animais não-tratados (NT).

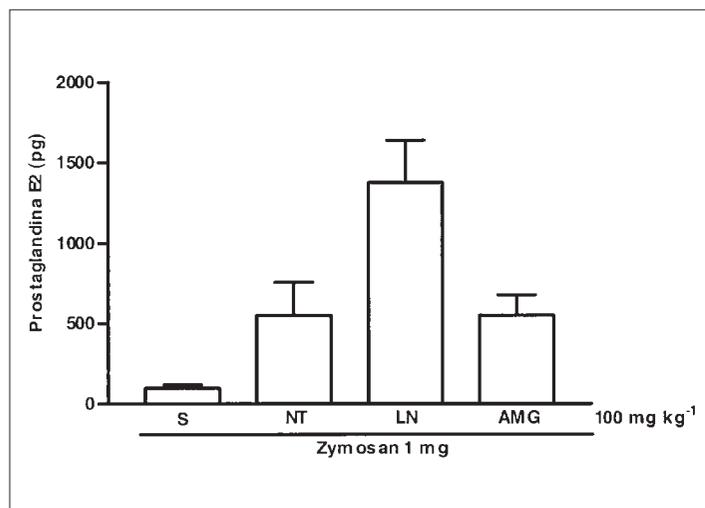


Figura 5 – Efeito da administração de L-NAME (LN 100mg kg⁻¹ ip) ou aminoguanidina (AMG 100mg kg⁻¹ ip) sobre a liberação de prostaglandina E2 (PGE2) na cavidade articular na artrite induzida por zymosan (Zy) em ratos. Zy (1mg) foi injetado intra-articularmente e a concentração de PGE2 foi medida usando ELISA. LN (100mg kg⁻¹) ou AMG (100mg kg⁻¹) foi injetado 30 min antes do Zy. Animais do grupo-controle receberam salina ia. Os resultados foram expressos como a média±e.p.m. obtido a partir do exsudato articular de n= 6 animais na 6ªh de artrite. *p< 0,05 vs animais não-tratados (NT).

Efeito do pós-tratamento com inibidores de NOS na artrite por Zy

– A administração de L-NAME (100mg kg⁻¹) ou aminoguanidina (100mg kg⁻¹), dados 2 horas após a indução da artrite, não alterou nem a IA nem o influxo celular na artrite por Zy (Figura 6). Nesses experimentos, as drogas foram administradas 1 hora antes do tempo em que a IA é máxima. Nenhum dos compostos alterou os parâmetros estudados, sugerindo que não apresentaram efeito antinociceptivo uma vez desencadeada a artrite provavelmente por não terem eficácia antiinflamatória uma vez desencadeada a artrite.

Efeito de nitroprussiato de sódio (NPS) na IA da artrite por Zy – No intuito de investigar o efeito da administração de um fonte exógena de NO na nocicepção inflamatória articular, nós administramos o NPS, um doador de NO, aos ratos, 2 horas após a indução da artrite. A Figura 7 mostra que o NPS inibiu de forma dose-dependente a IA, o que sugere um efeito direto nociceptor de um doador de NO nessas condições.

TABELA 1

EFEITO DE INIBIDORES DE NOS SOBRE O EDEMA ARTICULAR E A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOZAN EM RATOS

	Edema (g)	MAP
Controle	69,2±10	96,0±4
Não-tratado (NT)	142,3±18	98,2±3
L-NAME	154,9±40	153,0±7
AMG	171,3±35	97,6±4

Ratos foram submetidos à injeção intra-articular de Zy (1mg) na articulação do joelho direito, e o edema foi medido após a 3^ah de artrite (veja texto para detalhes). A PAM, obtida em animais cuja carótida foi canulada e acoplada a um tradutor de pressão e um polígrafo, foi registrada durante 4 horas, com intervalos horários. Grupos-controles foram tratados com L-NAME (100mg kg⁻¹ ip) or aminoguanidina (AMG 100mg kg⁻¹ ip) 30min antes da injeção de Zy. Os dados representam a média± e.p.m. de n= 6 animais. *p< 0,05 usando ANOVA, comparado com animais não-tratados (NT).

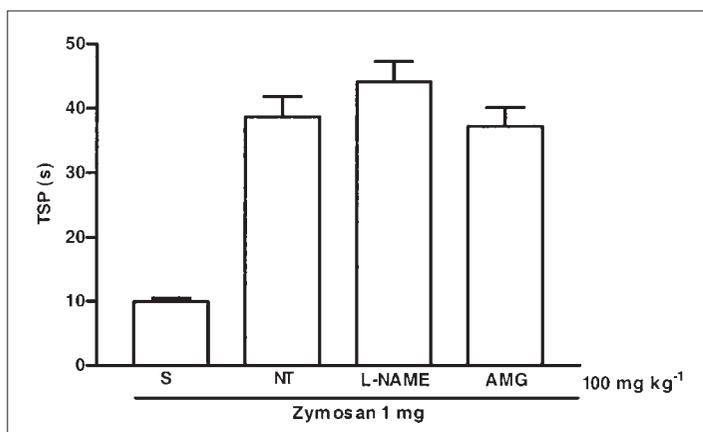


Figura 6a – Efeito da co-administração de L-NAME (LN 100mg kg⁻¹ ip) ou aminoguanidina (AMG 100mg kg⁻¹ ip) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan (Zy) em ratos. Zy (1mg) foi injetado intra-articularmente (ia) e a IA foi medida, a cada hora, por 4 horas, pelo aumento do tempo de suspensão da pata (TSP) obtido usando o teste de IA para ratos (veja texto para detalhes). LN (100mg kg⁻¹ ip) or AMG (100mg kg⁻¹ ip) foi injetado 2h após a injeção de Zy. Animais do grupo-controle receberam salina ia. Os resultados estão expressos como a média+e.p.m. do TSP máximo medido entre a 3^a e 4^a de artrite em n= 6 animais. *p< 0,05 vs animais não-tratados (NT).

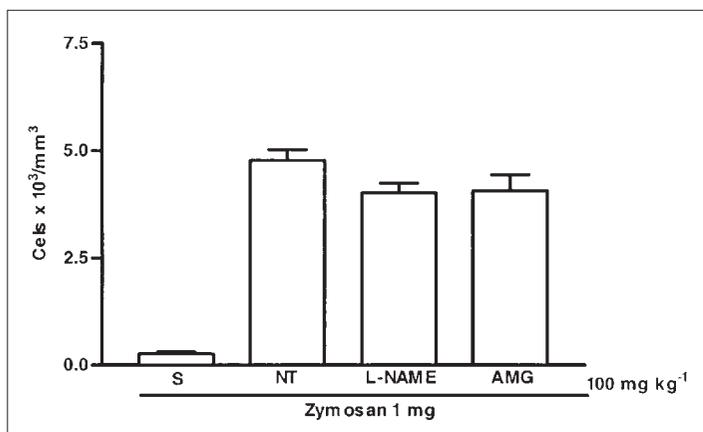


Figura 6b – Efeito da co-administração de L-NAME (LN 100mg kg⁻¹) ou aminoguanidina (AMG 100mg kg⁻¹ ip) sobre o influxo celular (IC) na artrite induzida por zymosan (Zy) em ratos. Zy (1mg) foi injetado intra-articularmente (ia) e o IC foi medido no exsudato articular na 6^ah de artrite usando câmara de Neubauer. LN (100mg kg⁻¹ ip) ou AMG (100mg kg⁻¹ ip) foi injetado 2h após a injeção de Zy. Animais controle receberam salina ia. Os resultados foram expressos como a média± e.p.m. de cada hora para n= 6 animais. *p< 0,05 vs animais não-tratados (NT).

DISCUSSÃO

A inflamação articular induzida por zymosan (Zy) no joelho de ratos é caracterizada por acentuada migração celular, liberação de mediadores inflamatórios, assim como por desenvolvimento de hiperalgesia⁽⁹⁾. Originalmente descrito no modelo de artrite induzida por carragenina⁽⁸⁾, o teste de incapacitação articular (IA) para ratos mostrou-se reprodutível na artrite por Zy. Os resultados obtidos na artrite por Zy recapitulam os descritos na artrite por carragenina, ocorrendo alteração da marcha dos animais, que foi denominada incapacitação articular (IA). Uma grande vantagem desse método é a possibilidade de se mensurar um parâmetro de dor que não decorre de atitude comportamental, utilizando um dado objetivo, que não depende do julgamento do observador, podendo-se avaliar três animais a um só tempo. Nós recentemente demonstramos que a IA na artrite por Zy decorre da sensibilização de nociceptores específicos localizados no tecido periarticular. Curiosamente, embora os animais submetidos à artrite por Zy desenvolvam progressiva sinovite com deformidade articular, havendo invasão pela sinóvia da cartilagem e do osso subcondral, o que lembra o *pannus* reumatóide, a IA é tipicamente um fenômeno agudo, que declina após 4 horas de artrite, cessando após 12 horas. Nós detectamos também que a migração de neutrófilos ou o edema não estão associados com a IA⁽⁹⁾. Isso faz com que o estudo dos mecanismos envolvidos na IA da artrite por Zy possam ser úteis à compreensão da dor que ocorre em patologias agudas periarticulares.

No presente estudo, nós mostramos que o pré-tratamento com dois inibidores de NOS inibiu significativamente ambos a IA e o influxo celular na artrite por Zy. O fato da co-administração de L-arginina e L-NAME reverter a inibição do L-NAME sobre ambos parâmetros e da administração do isômero inativo D-NAME não os ter alterado indica fortemente que a ação do L-NAME se deu especificamente por inibição da NOS. Ainda, a aminoguanidina (AG) inibiu ambas a IA e o influxo celular. Há vários relatos atestando ser a AG um inibidor seletivo de iNOS. Demonstrou-se que a AG reduziu a exsudação de plasma na pele de camundongos⁽¹¹⁾ e que a AG inibiu a inflamação induzida por carragenina no modelo da pata de rato⁽¹²⁾, ambos fenômenos considerados decorrentes da ativação de iNOS.

No presente estudo, os animais submetidos à dose mais efetiva de L-NAME apresentaram elevação da pressão arterial média (PAM), o que não ocorreu nos animais que receberam AG. A inibição da NOS constitutiva sabidamente altera a microcirculação, induzindo um estado vasoconstrictor. A redução do fluxo sanguíneo decorrente poderia, potencialmente, explicar efeitos da inibição da cNOS. O fato dos animais tratados com AG não terem apresentado alteração da PAM indica que o efeito antinociceptivo dos inibidores de NOS se deu por inibição da iNOS e não se deveu à alteração local da microcirculação.

Dados da literatura mostraram que o L-NAME promoveu antinocicepção dose-dependente no modelo de retirada da pata após injeção de formalina em camundongos⁽¹³⁾. A administração intratecal de AG ou de 2-amino-5,6-dihidrometilazina, um outro inibidor seletivo de iNOS, reduziu a

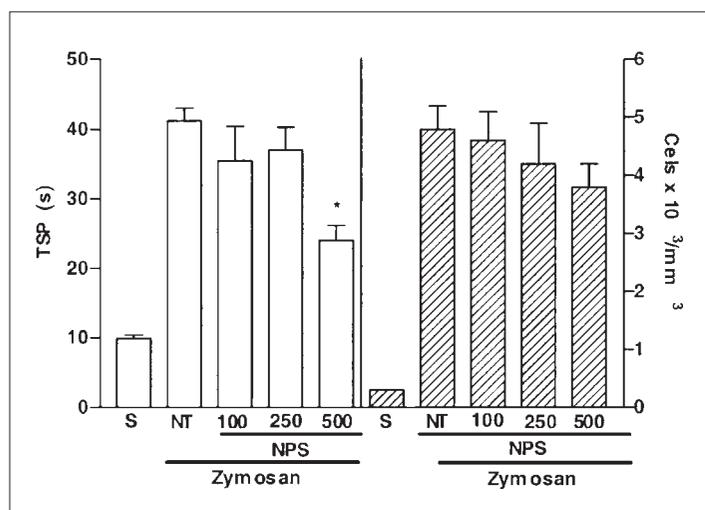


Figura 7 – Efeito dose-dependente do nitroprussiato de sódio (NPS) sobre a incapacitação articular (IA) na artrite induzida por zymosan (Zy) em ratos. Zy (1mg) foi injetado intra-articularmente (ia) e a IA foi medida a cada hora, por 4 horas, como aumento do tempo de suspensão da pata (TSP) obtido usando o teste de IA para ratos (veja texto para detalhes). NPS (100, 250, 500 µg) foi injetado ia 2h após a injeção de Zy. Animais do grupo-controle receberam salina i.a. Os resultados foram expressos como a média ± e.p.m. de cada hora para n = 6 animais. *p < 0,05 vs animais não-tratados (NT).

hiperalgesia térmica induzida por carragenina em ratos⁽¹⁴⁾. Em juntas, mostrou-se que a administração local de L-NAME ou de 7-nitro-indazol, um inibidor seletivo de NOS neuronal, reduziu a hiperalgesia ao calor irradiado em ratos submetidos à artrite por carragenina-kaolin⁽⁴⁾. O presente estudo é o primeiro a investigar o efeito de inibidores de NOS na dor inflamatória articular. Ainda, a reversão do efeito antinociceptivo dos inibidores de NOS pela naloxona sugere uma interação entre a liberação de NO e a ativação de receptores opióides por liberação endógena dessas substâncias.

A liberação de PGE2 na cavidade articular da artrite por Zy é máxima na sexta hora (dados não mostrados). A medida da concentração de PGE2 nesse tempo não foi diferente entre os animais não-tratados e aqueles que receberam L-NAME ou AG, em doses efetivas para bloquear a IA e o influxo celular. Foi sugerido que o NO pode promover a liberação de prostaglandinas, particularmente PGE2, por meio da ativação de iNOS e após estímulo celular com citocinas e lipopolissacáride^(15,16). Entretanto, dados conflitantes foram relatados, mostrando que altas concentrações de NO podem reduzir a produção de prostaglandina⁽¹⁷⁾. Ainda foi mostrado que o NO poderia ter um efeito bifásico em células de linhagem macrofágica em camundongos⁽¹⁸⁾. Uma vez que o NO pode reagir com enzimas contendo grupos heme, a ciclooxigenase 2 (COX2) é candidata a reagir com o NO, por causa do grupo heme em sua molécula. Considerando os efeitos clássicos da PGE2 em promover dor, investigamos se a administração de inibidores de NOS alteraria os níveis de PGE2 liberados na cavidade articular dos animais. Entretanto, nem L-NAME nem AG alteraram essa liberação. Uma possível explicação é que o efeito antinociceptivo dos inibidores de NOS no presente estudo não esteja associado à inibição da ciclooxigenase. Contudo, como nós demonstramos que a sensibilização de nociceptores periarticulares, e não na sinóvia, é crucial no desencadeamento da IA na artrite por Zy, é possível que os níveis de PGE2 no lavado articular não sejam representativos do efeito nociceptor de eicosanóides liberados em nível periarticular.

Como vimos acima, a inibição da NOS promoveu analgesia. Entretanto, na hiperalgesia provocada pela injeção local de carragenina ou PGE2 na pata do rato, relatou-se que a ação antinociceptiva da acetilcolina é mediada pela liberação de NO via ativação de GMPc⁽¹⁹⁾. Esses efeitos aparentemente discrepantes talvez possam ser explicados pelo fato de aqueles autores terem investigado o efeito da administração local e usaram diferentes modelos de estudo de

dor. Porém, nós observamos que L-NAME ou AG, em doses que foram claramente efetivas em suprimir ambas, a IA e o influxo celular quando administradas como pré-tratamento falharam em inibir ambos parâmetros quando dadas 2 horas após a indução da artrite. A possibilidade de que não tivesse havido tempo suficiente para ação dos compostos pode ser descartada, uma vez que já se demonstrou que esses compostos são efetivos cerca de 15 minutos após administração intraperitoneal. A falha em inibir a migração celular quando dado como pós-tratamento suporta a hipótese de perda da ação antiinflamatória. Assim, nós propomos que o efeito antinociceptivo de L-NAME e AG na artrite por Zy se deveu a uma ação antiinflamatória inespecífica. Uma vez iniciado o processo inflamatório, esses inibidores de NOS não seriam mais efetivos.

Considerando os dados obtidos por outros autores com acetilcolina e os resultados apontando para uma ação hiperalgésica do NO discutidos acima, decidimos investigar o efeito de um doador de NO na artrite por Zy em curso. Nossos dados mostraram que a administração local de nitroprussiato de sódio (NPS) inibiu de forma dose-dependente a IA sem alterar o influxo celular. O efeito do NPS foi comparável ao obtido com o pré-tratamento com as mais altas doses de L-NAME ou AG. Embora paradoxal, esse importante resultado aponta para um efeito antinociceptivo direto do NO na hiperalgesia inflamatória articular. Vários relatos já demonstraram que a administração de doadores de NO por adesivos cutâneos reduz a dor pós-operatória⁽²⁰⁾. Nós estamos atualmente iniciando estudos para investigar essa ação antinociceptiva do NO artrite por Zy.

De maneira análoga ao observado na IA, ambos L-NAME e AG significativamente e de forma dose-dependente inibiram a migração celular para a cavidade articular na artrite por Zy. Esse efeito também pôde ser revertido pela co-administração de L-arginina, e o isômero D-NAME não modificou o influxo celular. A redução de parâmetros inflamatórios pela inibição da NOS em outros modelos de artrite já foi descrita. Entretanto, a maioria dos estudos avalia o influxo celular na sinóvia, ao passo que nós o fizemos no lavado articular. De forma semelhante ao que ocorre na sinovite crônica reumatóide, as células presentes na sinóvia da artrite por Zy são predominantemente linfomononucleares, enquanto que os polimorfonucleares predominam no lavado articular. No modelo de artrite induzida por antígeno em coelhos, a administração crônica de L-NAME reduziu o influxo celular⁽²¹⁾. Também já foi relatado que o L-NAME reduz a migração de eosinófilos e de neutrófilos induzidos por zymosan ou fator ativador de plaquetas na

pele de cobaias, bem como na anafilaxia passiva cutânea⁽²²⁾. Foi sugerido que a inibição do NO aumentaria o estresse oxidativo intracelular, promovendo inibição da interação de neutrófilos e células endoteliais levando à diminuição da adesão celular⁽²³⁾. Entretanto, os mecanismos que causam essa inibição da migração celular por meio de inibidores de NOS ainda demandam investigação.

Nós não observamos redução do edema articular após administração dos inibidores de NOS. A injeção local de L-NAME reduziu o edema induzido por bradicinina, histamina e plasma ativado por zymosan⁽²²⁾, carragenina^(12,24,25) ou dextran⁽²⁵⁾. A discrepância com os nossos dados pode ser explicada pelo fato de que nós fizemos injeção sistêmica desses inibidores e medimos o edema três horas após indução da artrite, quando ele é mais intenso. De fato, foi relatado que L-NAME ou hemoglobina reduzem o edema de pata em ratos somente no período inicial após a injeção do estímulo⁽²⁶⁾. O fato de que nós verificamos inibição da IA e do influxo celular sem haver alteração do edema reforça a nossa idéia que esses fenômenos são mediados por mecanismos diferentes^(8,9).

No presente estudo, a hemoglobina não alterou o influxo celular ou a IA na artrite por Zy. Esse composto é um *scavenger* de NO exógeno, uma vez que ele não age intracelularmente^(27,28). No modelo de artrite por adjuvante em ratos, foi demonstrado que a hemoglobina reduziu parâmetros inflamatórios. Entretanto, aqueles autores utilizaram o aumento do volume da pata dos animais e a histologia da pata como um todo como índices inflamatórios⁽⁵⁾. Essas alterações devem ter refletido principalmente as alterações em todo o subcutâneo envolvendo a junta, diferentemente da avaliação do edema apenas das estruturas articulares que efetuamos. A administração intratecal de hemoglobina reduziu a hiperalgesia no modelo da imersão de cauda de ratos⁽²⁹⁾ e na hiperalgesia térmica⁽³⁰⁾. Nós não conseguimos explicar o fato da hemoglobina não ter sido efetiva em reduzir a IA ou a migração celular na artrite por Zy, quando cotejando nossos dados com a literatura, mas diferenças metodológicas certamente estão envolvidas. No entanto, nós podemos concluir que a IA e o influxo celular

na artrite por Zy não foram por causa da liberação extracelular de NO ou a fontes exógenas de NO.

A injeção do azul de metileno, um inibidor solúvel de GMPc, inibiu ambos IA e influxo celular, sugerindo que o NO promove esses fenômenos via ativação de GMPc. Novamente há controvérsias, uma vez que dados da literatura relatam que a ativação de GMPc via NO promove antinocicepção^(19,31). Entretanto, foi relatado que a administração local de azul de metileno reverteu a hiperalgesia induzida por bradicinina na pata do rato⁽³²⁾. Ainda, a injeção intratecal de azul de metileno reverteu a hiperalgesia induzida por um doador de NO⁽²⁹⁾. Essas controvérsias ilustram que resultados obtidos em diferentes modelos de dor não podem ser diretamente extrapolados para outras situações. Ainda, a via de administração dos compostos influencia de forma marcante os resultados obtidos.

Em conclusão, os resultados apresentados no presente estudo sugerem que inibidores de NOS reduzem a hiperalgesia inflamatória e o influxo celular na artrite induzida por zymosan em ratos apenas quando dados de forma profilática. A ação sobre a IA parece ser decorrente de um efeito antiinflamatório geral e não por causa de efeito antinociceptivo próprio da inibição da NOS. A administração de um doador de NO, por outro lado, parece ter um efeito antinociceptivo direto na dor inflamatória articular, efeito esse que precisa ser melhor esclarecido.

O modelo de IA usado no presente estudo mimetiza achados clínicos de periartrites, em que a movimentação é fator determinante no desencadeamento de dor, distinguindo-se da dor que ocorre em artrites crônicas, que se agrava pós-reposo. A demonstração que um doador de NO promove analgesia na artrite por Zy já instalada abre uma perspectiva de curto prazo para estudos clínicos com doadores de NO em síndromes dolorosas periarticulares.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio dos fundos remanescentes da Sociedade Brasileira de Reumatologia e foi agraciado com o Prêmio Luiz Vertzman em 2000.

REFERÊNCIAS

- Duarte IG, Lorenzetti BB, Ferreira SH: Acetylcholine induces peripheral analgesia by the release of nitric oxide. *In*: Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system. S. Moncada e E.A.Higgs, ed. 165-71, 1990a.
- Ferreira SH, Duarte IG, Lorenzetti BB: Molecular base of acetylcholine and morphine analgesia. *Agents Actions Suppl* 32:101-6, 1991.
- Holthusen H, Arndt JO: Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. *Neurosci. Lett.*, 165(1-2): 71-74, 1994.
- Lawand NB, Willis WD, Westlund KN: Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide inhibitor. *Neuroreport*, 8(4): 895-9, 1997.
- McCartney-francis NL, Song XY, Mizel DE, Wahl CL, Wahl SM: Hemoglobin protects from streptococcal cell wall-induced arthritis. *Arthritis & Rheum.*, 42(6): 1119-27, 1999.

6. Stefanovic-Racic M, Meyers K, Meschter C, Coffey JW, Hoffman RA, Evans C: N-monomethyl arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. *Arthritis Rheum.*, 37(7): 1062-9, 1994.
7. Stefanovic-Racic M, Meyers K, Meschter C, Coffey JW, Hoffman RA, Evans CH: Comparison of the nitric oxide synthase inhibitors methylarginine and aminoguanidine as prophylactic and therapeutics agents in rat adjuvant arthritis. *J Rheumatol* 22(10): 1922-28, 1995.
8. Tonussi CR, Ferreira SH: Rat knee-joint incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain* 48: 421-7, 1992.
9. Rocha FAC, Aragão Jr. AGM, Oliveira RC, Vale MR, Ribeiro RA: Periarthritis promotes articular incapacitation in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflamm Res* 48:485-90, 1999.
10. Pradelles P, Grassi J, Maclouf J: Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem*, 57(7): 1170-3, 1985.
11. Fujii E, Irie K, Ogawa A, Ohba K, Muraki T: Role of nitric oxide and prostaglandins in lipopolysaccharide-induced increases in vascular permeability in mouse skin. *Eur J Pharmacol* 297(3): 257-63, 1996.
12. Salvemini D, Wang ZQ, Bourdon DM, Stern MK, Currie MG, Manning PT: Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. *Eur J Pharmacol*, 303: 217-20, 1996a.
13. Moore PK, Oluyomi RC, Babbedge RC, Wallace P, Hart SL: L-N^G-nitro-arginine-methyl-ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol* 102: 198-202, 1991.
14. Osborne MG, Coderre TJ: Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *B J Pharmacol*: 126(8): 1840-6, 1999.
15. Salvemini D, Manning PT, Zweifel BS, et al: Dual inhibition of nitric oxide and prostaglandin production contributes to the antiinflammatory properties of nitric oxide synthase inhibitors. *J Clin Invest* 96: 301-8, 1995a.
16. Salvemini D, Settle SL, Masferrer JL, Seibert K, Currie M & Needleman P: Regulation of prostaglandin by nitric oxide; an in vivo analysis. *Br J Pharmacol* 114: 1171-8, 1995b.
17. Swierkosz TA, Mitchell JA., Warner T D, Botting RM & Vane JR: Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. *Br J Pharmacol* 114: 1335-42, 1995.
18. Milano S, Arcoleo F, Dieli M, D'agostino P, Nucci G, Cillari E: Prostaglandin E2 regulates inducible nitric oxide in the murine macrophage cell line J774. *Prostaglandins* 49(2): 105-115, 1995.
19. Duarte IDG, Lorenzetti BB, Ferreira SH: Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* 186: 289-93, 1990b.
20. Lauretti GR, Lima IC, Reis MP, Prado WA, Pereira NL: Oral ketamine and transdermal nitroglycerin as an analgesic adjuvants to oral morphine therapy for cancer pain management. *Anesthesiology* 90(6):1528-33, 1999.
21. Mello SB, Novaes GS, Laurindo IM, Muscara MN, Maciel FM, Cossermelli W: Nitric oxide synthase inhibitor influences prostaglandin and interleukin-1 production in experimental arthritic joints. *Inflamm Res* 46(2): 72-7, 1997.
22. Teixeira MM, Williams TJ, Hellewell PG: Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. *Br J Pharmacol* 110: 1515-21, 1993.
23. Niu XF, Smith CW, Kubes P: Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ Res* 74: 1133-40, 1994.
24. Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt, et al: Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol* 118(4): 829-38, 1996b.
25. Ialenti A, Ignarro A, Moncada S, Rosa M: Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 211: 177-182, 1992.
26. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Calapai G, Nava F & Caputi AP: zymosan-activated plasma induces paw oedema by nitric oxide and prostaglandin production. *Life Sci* 60(3): 215-20, 1997.
27. Martin W, Villani GM, Desingaro J, Furchgott RF: Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol Exp Therap* 232(3): 708-16, 1985
28. Kelm M, Schrader J: Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res* 66(6): 1561-75, 1990.
29. Inoue T, Mashimo T, Shibuta S, Yoshiya I: Intrathecal administration of a new nitric oxide donor, NOC-18, produces acute thermal hyperalgesia in the rat. *J Neuro Sci* 153(1): 1-7, 1997.
30. Inoue T, Mashimo T, Shibata M, Shibuta S, Yoshiya I: Rapid development of nitric oxide-induced hyperalgesia depends on an alternate to the cGMP-mediated pathway in the rat neuropathic pain model. *Brain Res* 792: 263-70, 1998.
31. Duarte IDG, Ferreira SH: The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 221(1): 171-4, 1992.
32. Nakamura A, Fujita M, Shiomi H: Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 117(3): 407-12, 1996.