

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO VALERIL SALICILATO, UM
INIBIDOR DA CICLOOXIGENASE-1, EM MODELOS DE EDEMA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro-do-Valle Nicolau

JARBAS MOTA SIQUEIRA JUNIOR
Florianópolis
2003

SIQUEIRA-JUNIOR, JARBAS MOTA. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO VALERIL SALICILATO, UM INIBIDOR DA CICLOOXIGENASE-1 (COX-1) EM MODELOS DE EDEMA EM CAMUNDONGOS. Florianópolis, 2003. 77p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro-do-Valle Nicolau.

Defesa: 25/02/2003

O presente trabalho procurou avaliar a participação da ciclooxigenase-1 (COX-1) nos modelos de edema de pata e edema de orelha em camundongos, utilizando o Valeril salicilato, um inibidor da COX-1, como ferramenta farmacológica.

De acordo com os resultados obtidos, a inibição da COX-1, promove uma redução no edema de pata formado na primeira fase do edema (nas primeiras 4 horas após a injeção de carragenina), bem como outros inibidores, indometacina e o inibidor seletivo para a COX-2, celecoxib. Entretanto, em 48 horas após a injeção de carragenina, apenas os animais tratados com o valeril salicilato, apresentaram um aumento significativo do edema formado. Os resultados demonstram que, para que este evento ocorra, além da inibição da COX-1, há a participação da via da lipooxigenase e do óxido nítrico.

[Edema de pata] [edema de orelha] [camundongos] [carragenina] [valeril salicilato].

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO VALERIL SALICILATO, UM
INIBIDOR DA CICLOOXIGENASE-1, EM MODELOS DE EDEMA EM
CAMUNDONGOS”**

POR

JARBAS MOTA SIQUEIRA JUNIOR

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo orientador e membros
da Banca Examinadora, composta pelos
professores doutores:**

Banca examinadora:

**Rosa Maria Ribeiro-do-Valle Nicolau
(orientadora – FMC/UFSC Membro Titular)**

**Sonia Jancar
(FMC/USP – Membro titular)**

**Giles Alexander Rae
(FMC/UFSC – Membro titular)**

**Jamil Assreuy Filho
(FMC/UFSC – Membro titular)**

**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do programa de Pós-graduação
em Farmacologia da UFSC**

Florianópolis-SC, 25 de fevereiro de 2003.

ÍNDICE

SUMMARY	i
RESUMO	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>BIOSSÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS E LEUCOTRIENOS</i>	2
1.2 <i>ISOFORMAS DA ENZIMA CICLOOXIGENASE OU PROSTAGLANDINA H SINTASE</i>	5
1.2.1 <i>O sítio ativo da ciclooxigenase</i>	7
1.3 <i>INDUÇÃO DA COX-1 E COX-2</i>	9
1.4 <i>RELAÇÃO ENTRE A CICLOOXIGENASE E ÓXIDO NÍTRICO</i>	12
1.5 <i>ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINES)</i>	13
1.5.1 <i>Inibição da cox por AINES</i>	15
1.5.2 <i>Base estrutural de ligação e seletividade dos AINES</i>	15
1.6 <i>PAPEL FISIOLÓGICO DA COX</i>	16
1.7 <i>PARTICIPAÇÃO DA COX EM EVENTOS PATOLÓGICOS</i>	18
1.8 <i>CICLOOXIGENASE E INFLAMAÇÃO</i>	20
2. OBJETIVOS	23
2.1 <i>OBJETIVO GERAL</i>	23
2.2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 <i>ANIMAIS</i>	25
3.2 <i>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</i>	25
3.2.1 <i>Teste do edema de pata</i>	25
<i>Tratamento profilático</i>	26
<i>Tratamento terapêutico</i>	26
<i>Duração do efeito com o tratamento com valeril salicilato</i>	26
<i>Tratamento local</i>	26
<i>Tratamento com outras drogas</i>	27
<i>Avaliação da reposição de PGE₂ e participação da via do óxido nítrico</i>	27
<i>Avaliação do tratamento com o inibidor da via da 5-lipooxigenase, REV5901, sobre a atividade do valeril salicilato (VS)</i>	27

3.2.2 <i>Teste do edema de orelha</i>	28
3.3 <i>DROGAS E REAGENTES</i>	29
3.4 <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	29
4. RESULTADOS	30
4.1 <i>EFEITO DO TRATAMENTO PROFILÁTICO COM VALERIL SALICILATO SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE CARRAGENINA</i>	30
4.2 <i>EFEITO DO TRATAMENTO PROFILÁTICO COM CELECOXIB E INDOMETACINA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE CARRAGENINA</i>	32
4.3 <i>EFEITO DO TRATAMENTO TERAPÊUTICO COM VALERIL SALICILATO, CELECOXIB E INDOMETACINA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE CARRAGENINA</i>	35
4.4 <i>DURAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO PROFILÁTICO COM VALERIL SALICILATO (VS) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE CARRAGENINA</i>	38
4.5 <i>EFEITO DO TRATAMENTO INTRAPLANTAR COM VALERIL SALICILATO SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA</i>	40
4.6 <i>EFEITO DO TRATAMENTO PROFILÁTICO PELA VIA INTRAPERITONEAL COM ÁCIDO ACETILSALICÍLICO, RESVERATROL E SC560</i>	42
4.7 <i>EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO COM VALERIL SALICILATO E CELECOXIB SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO</i>	44
4.8 <i>EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO COM VALERIL SALICILATO E CELECOXIB SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE ÓLEO DE CRÓTON</i>	46
4.9 <i>EFEITO DA REPOSIÇÃO DE PROSTAGLANDINA E₂ SOBRE A ATIVIDADE DO VALERIL SALICILATO NO MODELO DO EDEMA DE PATA</i>	48
4.10 <i>AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A ATIVIDADE DO VALERIL SALICILATO</i>	50
4.11 <i>EFEITO DO TRATAMENTO COM O INIBIDOR DA VIA DA 5-LIPOOXIGENASE, REV5901</i>	53
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	67
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação da COX-1 nos modelos de edema de pata e edema de orelha em camundongos utilizando o valeril salicilato (VS), um inibidor da enzima COX-1, como ferramenta farmacológica. Foram avaliadas ainda, a participação da via do óxido nítrico e da lipooxigenase.

Os resultados deste estudo demonstraram que:

- O tratamento prévio com VS reduziu significativamente o edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA), sem apresentar o mesmo efeito no edema de orelha induzido por óleo de cróton (OC), enquanto que o celecoxib, ao contrário, reduziu significativamente o edema de orelha induzido por OC sem alterar a resposta edematogênica ao AA;
- O tratamento profilático com VS foi capaz de reduzir o edema de pata formado na primeira fase (0 - 4 horas após a injeção de carragenina), sendo o mesmo efeito observado com o celecoxib (inibidor seletivo da COX-2) e com a indometacina (inibidor não seletivo). Entretanto, em 48 horas apenas os animais tratados com VS, apresentaram um aumento no edema;
- A injeção de PGE₂ (30 nmol/pata), cinco minutos antes da injeção de carragenina, reverteu o efeito do VS nas duas fases do edema de pata. Da mesma maneira, a injeção de L-ARG (15 μmol/pata), também foi capaz de reverter o efeito do VS em ambas as fases;

- O tratamento com o inibidor da 5-lipooxigenase, REV5901 e associação com o VS foi capaz de reverter o edema formado em 48 horas.

Em conjunto os resultados sugerem que:

- A inibição da COX-1 antes do início do processo, pode promover uma alteração da resposta normal à carragenina, retardando o processo de resolução do edema, porém este não é um efeito específico do VS, uma vez que o tratamento com ácido acetilsalicílico, salicilato de sódio e SC560 apresentaram o mesmo perfil.
- A injeção de PGE₂ na pata dos animais reverte o efeito do VS em ambas as fases sugerindo que, por ser constitutivamente expressa, as PGE₂ derivadas da COX-1 são responsáveis pelo início do processo inflamatório.
- O óxido nítrico pode participar, de alguma forma, na modulação da atividade da COX, uma vez que, a injeção de L-ARG (15 µmol/pata) foi capaz de reverter o efeito do VS em ambas as fases.
- Por fim, os resultados demonstraram que o edema ocasionado em 48 horas pode ter a participação ainda da lipooxigenase, pela produção de leucotrienos, uma vez que o inibidor da lipooxigenase REV5901, foi capaz de reduzir o edema formado neste intervalo.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of valeryl salicylate (VS), a COX-1 inhibitor, in the early and late paw edema and early ear edema in mice. In parallel, it was also contribute to understanding of COX-1 involvement in these inflammatory process.

The results of this study demonstrated that:

- The prophylactic treatment with VS significantly reduced the ear edema induced by arachidonic acid (AA), without affect in edema induced by CO. In contrast, celecoxib reduced significantly edema induced by OC, without modify the response to AA.
- The previous treatment with VS, celecoxib and indomethacin was able to reduce paw edema formed in the early phase (0 – 4 hrs after carrageenan injection). However, in the late phase (48 hrs after carrageenan injection), only the animals treated with VS showed an increase in edema in comparison with control. The same effect was observed for other inhibitors, such as AAS and SC560.
- The PGE2 injection, 5 min. before the carrageenan injection, reverted the effect of the VS in early phase of paw edema. In the same way, the injection of L-ARG was also able to revert the effect of VS. These results indicated that the COX-1 enzymatic activity at early, was very important to late phase.

- The concomitant treatment with 5-LOX inhibitor, REV5901 and VS was able to revert edema formed in the late phase.

These results indicate that:

- The opposite effects demonstrated by VS and by celecoxib on ear edema induced by AA and CO suggest the involvement of COX-1 in this process.
- The inhibition of COX-1 observed in the early phase suggests suppression of PGE2 production and its involvement in paw edema formation. However, the inhibition of the COX-1 by VS and other inhibitors delays the process of paw edema resolution, as observed in the late phase.
- The injection of PGE2 in the paw of the animals reverts the effect of the VS at early phase. NO can participate, of some way, in the activation of COX-1, since the injection of L-ARG was able to revert the effect of VS, similarly observed to PGE2. These results indicated that the COX-1 enzymatic activity at early, was very important to late phase.

Finally, the results demonstrated that edema caused in 48 hours, could also be due to leukotriens produced by LOX, since the 5-LOX inhibitor, REV5901, was able to reduce the edema formed in this interval.

LISTA DE TABELAS

1. FUNÇÕES FISIOLÓGICAS ESPECÍFICAS PARA AS ISOFORMAS DA COX	18
--	----

LISTA DE FIGURAS

1. SÍNTESE DE PGH_2 PELA COX OU PGH SINTASE (PGHS)	4
2. ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA COX-1	7
3. EFEITO DO TRATAMENTO PROFILÁTICO COM VALERIL SALICILATO SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE CARRAGENINA	31
4. EFEITO DO TRATAMENTO PROFILÁTICO COM CELECOXIB E INDOMETACINA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE CARRAGENINA	33
5. EFEITO DO TRATAMENTO PROFILÁTICO COM VALERIL SALICILATO, CELECOXIB E INDOMETACINA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE CARRAGENINA	34
6. EFEITO DO TRATAMENTO TERAPÊUTICO COM VALERIL SALICILATO SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE CARRAGENINA	36
7. EFEITO DO TRATAMENTO TERAPÊUTICO COM CELECOXIB E INDOMETACINA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE CARRAGENINA	37
8. DURAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO PROFILÁTICO COM VALERIL SALICILATO (VS) SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO DE CARRAGENINA	39
9. EFEITO DO TRATAMENTO INTRAPLANTAR COM VALERIL SALICILATO SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	41
10. EFEITO DO TRATAMENTO PROFILÁTICO PELA VIA INTRAPERITONEAL COM ÁCIDO ACETILSALICÍLICO, RESVERATROL E SC560	43
11. EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO COM VALERIL SALICILATO E CELECOXIB SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO	45
12. EFEITO DO TRATAMENTO TÓPICO COM VALERIL SALICILATO E CELECOXIB SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA DE ÓLEO DE CRÓTON	47
13. EFEITO DA REPOSIÇÃO DE PROSTAGLANDINA E_2 SOBRE A ATIVIDADE DO VALERIL SALICILATO NO MODELO DO EDEMA DE PATA	49
14. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A ATIVIDADE DO VALERIL SALICILATO	52
15. EFEITO DO TRATAMENTO COM O INIBIDOR DA VIA DA 5-LIPOOXIGENASE, REV5901	54

1. INTRODUÇÃO

Em 1930, dois ginecologistas americanos, Kurzok e Lieb, observaram que o útero humano relaxava ou contraía fortemente quando exposto ao sêmen humano. Alguns anos mais tarde, Goldblatt na Inglaterra, relatou que o sêmen humano possuía um fator que reduzia a pressão sangüínea e estimulava a musculatura lisa. No mesmo período, von Euler na Suécia, fazendo um estudo completo da ocorrência do *composto P*, um peptídeo que ele havia descoberto poucos anos antes, relatou que, no sêmen, nos extratos de próstata ou de vesículas seminais de macacos e de carneiros havia um fator lipossolúvel diferente do seu *composto P*, que promovia uma forte diminuição na pressão sangüínea e também estimulava a musculatura lisa, denominando-o então de prostaglandina (para revisão ver Bergström, 1982).

Mais de vinte anos se passaram antes da demonstração de que as prostaglandinas eram de fato uma família de compostos únicos, formados por vinte carbonos, sendo semelhantes aos ácidos graxos essenciais. A estrutura de dois destes compostos, chamados de prostaglandina E_1 (PGE_1) e prostaglandina $F_{1\alpha}$ ($PGF_{1\alpha}$) foram esclarecidas em 1962 (Samuelsson, 1982).

1.1 Biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos

O mecanismo de biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos foi esboçado em 1967 por Hamberg e Samuelsson. A principal característica no mecanismo proposto foi a formação de peróxidos bicíclicos (endoperóxidos) como produtos iniciais da oxigenação dos ácidos graxos poliinsaturados (para revisão ver Samuelson, 1982).

O passo inicial para a síntese de prostaglandinas e leucotrienos é a formação de ácido araquidônico (AA), derivados de diferentes fontes dietéticas ou através da catálise de fosfolipídeos de membrana, mediada pelas diferentes formas da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂). O AA é então metabolizado principalmente pelas vias das enzimas ciclooxigenase (COX), também conhecida como prostaglandina H sintase (PGHS), pela via da lipooxigenase (LOX) originando seus derivados, prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente.

As lipooxigenases são classificadas de acordo com a posição em que ocorre a oxidação do ácido araquidônico. Embora existam três isoformas em mamíferos, 5-lipooxigenase, 12-lipooxigenase e 15-lipooxigenase, a primeira é a forma mais importante do ponto de vista biológico. É encontrada principalmente em células de origem mielóide, como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, monócitos, basófilos, e linfócitos B, que estão envolvidos em reações imunológicas e nos processos inflamatórios. A enzima 5-lipooxigenase catalisa o passo inicial para a síntese de leucotrienos, convertendo o ácido araquidônico em uma molécula estereoespecífica, o ácido (5S)-trans-5,6-oxido-7,9-trans-11,14-cis-eicosatetraenóico, através da remoção do hidrogênio localizado no carbono-7 e da

inserção de oxigênio molecular no carbono-5 da estrutura do ácido araquidônico. Esta molécula é denominada de ácido 5 - hidroxiperoxi-eicosatetraenoico (5-HPETE). Esta mesma enzima também catalisa a remoção de um hidrogênio, formando um epóxido instável, leucotrieno A₄ (LTA₄). A conversão do LTA₄ a um potente agente quimiotático, o leucotrieno B₄ (LTB₄), é catalisada pela enzima leucotrieno A₄ hidrolase, enquanto que a conjugação do LTA₄ com a glutatona reduzida para formar LTC₄ é catalisada pela enzima leucotrieno C₄ sintase. A enzima γ -glutamiltanspeptidase catalisa a conversão de LTC₄ para LTD₄ através do tripeptídeo conjugado, glutatona, para um dipeptídeo conjugado, cisteinilglicina. O LTD₄, é biologicamente mais potente que o LTC₄. A enzima LTD₄ dipeptidase converte LTD₄ para LTE₄. LTC₄, LTD₄ e LTE₄, são também denominados de peptidoleucotrienos ou cisteinil-leucotrienos (Bertolini et al., 2001).

As isoformas da COX catalisam a conversão do ácido araquidônico a prostaglandina H₂ (PGH₂) utilizando duas moléculas de O₂ e dois elétrons. Este é o passo comprometido com a formação de prostaglandinas, prostacilinas e tromboxanos. As isoformas da COX catalisam duas reações separadas incluindo uma reação de ciclooxigenase em que o AA é convertido a prostaglandina G₂ (PGG₂) e uma reação de peroxidase em que a PGG₂ formada sofre uma redução em dois elétrons para originar PGH₂. Estas reações ocorrem em locais fisicamente distintos, mas interativos, localizados no interior da enzima COX (Garavito e Dewitt, 1999; Yedgar et al, 2000; Thuresson et al., 2001). Uma vez formada, a PGH₂ sofre a ação de isomerases e redutases, onde dará origem às prostaglandinas das séries E, F, D, tromboxanos e prostacilinas (Figura 1).

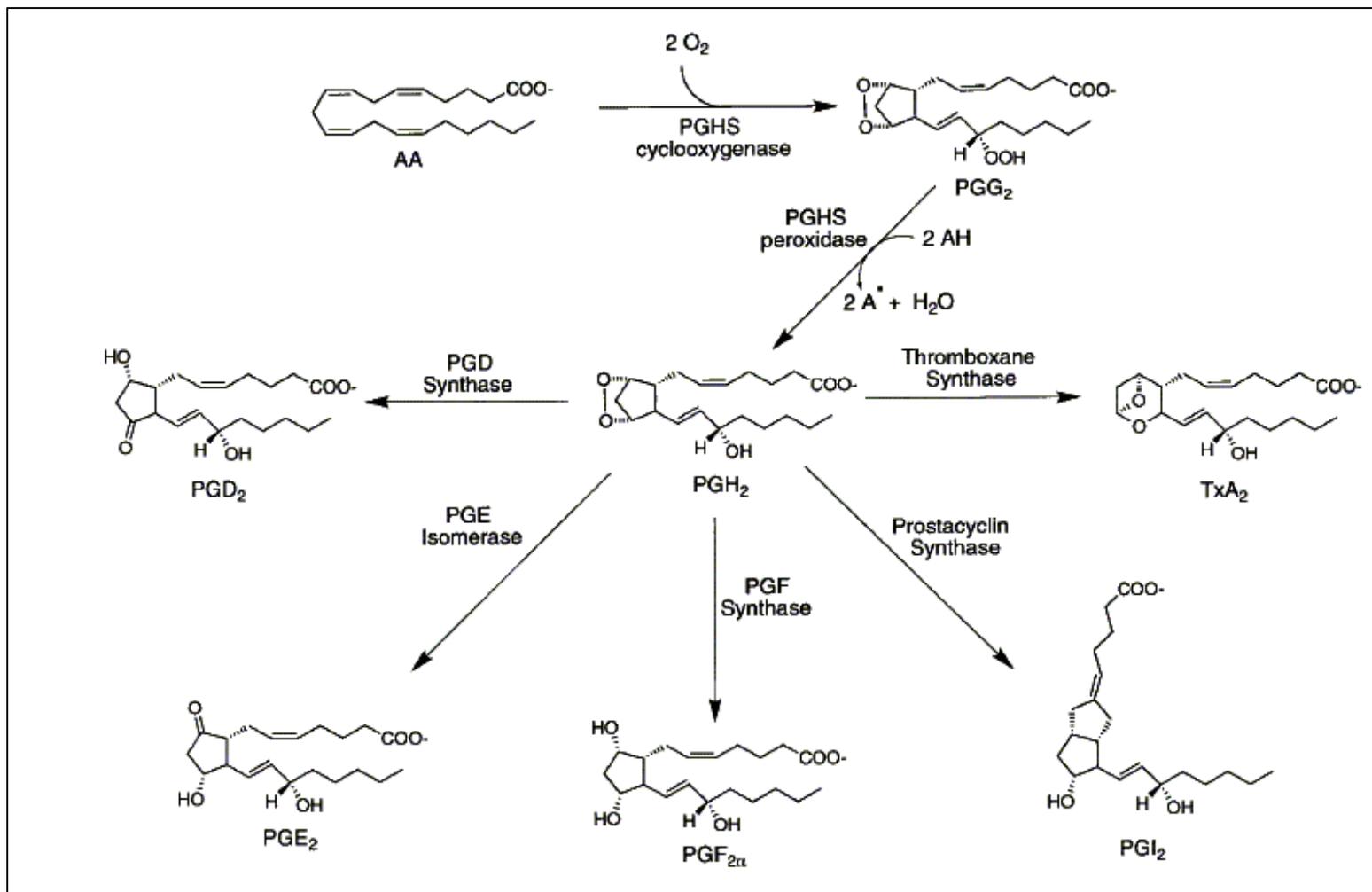


Figura 1. Síntese de PGH₂ pela COX ou PGH sintase (PGHS) a partir do ácido araquidônico e formação de outros prostanóides (Goodwin et al., 1999).

1.2 Isoformas da enzima ciclooxigenase ou prostaglandina H sintase

A enzima COX foi isolada em 1976 e clonada em 1988 (DeWitt et al., 1988). Possui um peso molecular de 71 kDa, e é encontrada em grandes concentrações no retículo endoplasmático de células formadoras de prostanóides (Smith, 1986). Contém duas atividades enzimáticas: a ciclooxigenase que adiciona duas moléculas de oxigênio ao ácido araquidônico para formar PGG₂, e a atividade de peroxidase que reduz a PGG₂ em dois elétrons, formando PGH₂.

Nos anos 90, estudos biológicos demonstraram um aumento na atividade desta enzima em uma variedade de células expostas a endotoxinas bacterianas, citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, hormônios e promotores de tumor. Foi descoberto então, que esta resposta requeria síntese de novas proteínas e era sensível a inibição por corticóides. Esta observação deu ênfase ao conceito de que poderia existir uma atividade constitutiva da COX, mediada pela primeira isoforma - COX-1, e uma atividade induzida, subseqüentemente referida como COX-2 (O'Bannion, et al, 1991).

Das isoformas da COX conhecidas, somente três delas possuem sua estrutura tridimensional caracterizada: COX-1 de ovinos, COX-2 recombinante de humanos e COX-2 recombinante de camundongos. Todas as três estruturas revelam a completa forma dimérica destas enzimas (Figura 2) (Garavito e DeWitt, 1999).

COX-1 e COX-2 originárias da mesma espécie apresentam cerca de 60 – 65% em sua seqüência de identidade, embora a similaridade destas isoformas

entre diferentes espécies animais varie de 85 – 90%. COX-1 possui 576 e a COX-2 587 aminoácidos em suas constituições. Ambas estão presentes na superfície do retículo endoplasmático e nas superfícies interna e externa da membrana nuclear. As maiores diferenças entre as estruturas primárias das isoformas da COX ocorrem em quatro áreas distintas (Figura 2). Primeiro, ambas as enzimas possuem sinais peptídicos de comprimentos variáveis. Segundo, há uma inserção de 18 aminoácidos na porção C-terminal da COX-2 que não está presente na COX-1. Terceiro, diferenças substanciais entre as duas isoformas foram encontradas no domínio de ligação à membrana (DLM) (Spencer et al., 1999), embora nenhuma explicação para as conseqüências deste fenômeno seja conhecida. Finalmente, a COX-1 é N-glicosilada em três locais, enquanto que a COX-2 é glicosilada variavelmente em dois a quatro locais (Garavito et al., 2002).

Outras diferenças estruturais entre as isoformas da COX que determinam a interação com antiinflamatórios não esteróidais (AINEs), são a presença de isoleucina na posição 523 na COX-1 e de valina (que é menor em um grupo metil) na COX-2. Uma molécula menor (valina) na COX-2 deixa uma abertura na parede do canal, permitindo acesso a uma “bolsa lateral”, sendo sítio de ligação de muitas drogas seletivas. Por ser estruturalmente maior, a isoleucina na posição 523 na COX-1 é suficiente para bloquear o acesso a esta “bolsa lateral” (Wong et al, 1997; Lanzo et al, 1998; Hawkey, 1999; Marnett e Kalgutkar, 1999; Bertolini et al., 2001).

Apesar destas diferenças, o sítio catalítico da COX, o ligante heme, sítio de acetilação da aspirina, estão conservados na COX-2 (Tir371, His374 e Ser530). O

domínio para o fator de crescimento endotelial permanece também conservado entre as isoformas da COX.

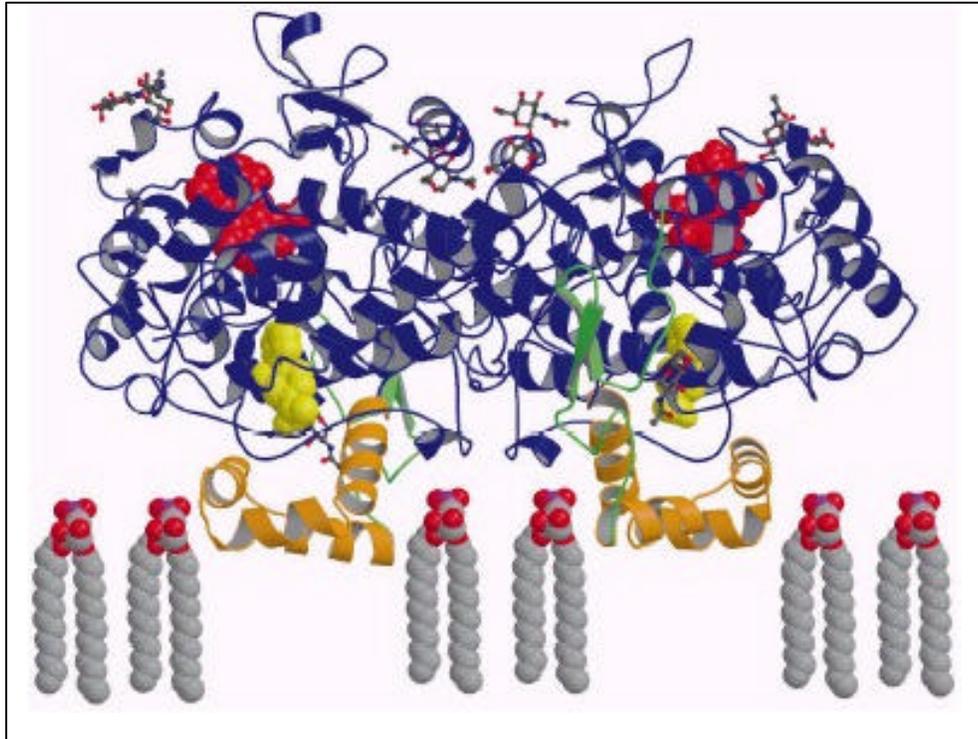


Figura 2. Estrutura da COX-1 de ovinos, demonstrando a relação entre o grupamento heme (vermelho), sítio de ligação para o flurbirprofeno (amarelo). O domínio para o fator de crescimento endotelial (EGF), domínio de ligação à membrana e domínios catalíticos em verde, amarelo ouro e azul respectivamente (Garavito e DeWitt, 1999).

1.2.1 O sítio ativo da ciclooxigenase

O ácido araquidônico (AA) é orientado no interior do sítio ativo da COX em uma conformação em “forma de L”. A porção apical do substrato se liga de modo que o radical carboxil interage com o grupamento guanidina da Arg120. Carbonos 7 - 14 do ácido araquidônico adquirem uma conformação em “S” que circunda a cadeia lateral da Ser530 (o resíduo acetilado pela aspirina). Nesta conformação o

AA está posicionado de modo que o carbono 13 é orientado a uma posição próxima ao oxigênio fenólico da Tir385, um hidrogênio é retirado para iniciar a reação de ciclooxigenase. Além disso, o carbono 11 está posicionado acima de uma pequena bolsa, circundada pela Val349, Ala527, Ser530 e Leu531, de maneira que o O₂ proveniente da camada lipídica possa migrar (Malkowski et al., 2000). A porção ω-terminal do AA (carbonos 14 - 20) se liga ao encaixe hidrofóbico acima da Ser530, onde é estabilizado pela Phe205, Phe209, Val344, Phe381 e Leu534. O AA faz um total de 48 ligações de van der Waals e duas ligações hidrofílicas com 19 resíduos no sítio ativo do canal da COX (Malkowski et al., 2000).

Embora a COX-1 sintetize primariamente a PGG₂, também há a produção em concentrações pequenas, mas significantes, de ácido 11-*R*-hidroperoxi-(5Z, 8Z, 12E, 13Z)-eicosatetranóico (11*R*-HPETE) e ácido 15-hidroperoxi-(5Z, 8Z, 12E, 13Z)-eicosatetranóico (15*R*-HPETE e 15*S*-HPETE). A cinética de formação destes produtos sugere que o AA pode adotar no mínimo quatro conformações diferentes, mas cataliticamente competentes no sítio ativo da COX (Thuresson et al., 2000). Por fim, a atividade peroxidase reduz o grupamento 15-hidroperóxido da PGG₂ produzindo PGH₂ (Smith et al., 1996). A PGH₂, por sua vez sofre ação de outras sintases e isomerases para formar as prostaglandinas das séries E, F, D, tromboxanos e prostacilinas.

1.3 Indução da COX-1 e COX-2

A COX-1 é expressa em muitas células de mamíferos. Vários estudos indicam evidências convincentes de que a expressão e o nível celular da enzima COX-1 são regulados por ésteres de forbol biologicamente ativos como *phorbol-12-myristate-13-acetate* (PMA) em HUVEC, células MC3T3-E1 e células epiteliais de traquéias de rato; por soro em células MC3T3-E1, por fator de crescimento tumoral- β (TGF- β) em células MC3T3-E1; por prostanóides (PGF_{2 α} , PGE₂, e *iloprost*) em células MC3T3-E1 e por oncogenes (Mos, Src, Abl, Fes) em células NIH3T3 (Pilbeam et al., 1993; Wu, 1995). Estas diferenças podem estar relacionadas às diferentes células utilizadas nos experimentos e, além disso, poderiam ser atribuídas à dificuldade na determinação quantitativa do pequeno aumento dos níveis do RNAm na COX-1. Entretanto, nos relatos onde foi observado um aumento significativo na expressão da COX-1, há um conceito de que a indução da COX-1 é diferente da indução da COX-2. Primeiro, a magnitude de indução da COX-1 é somente de duas a três vezes maior do que os níveis basais, sendo com isso, menor do que a da COX-2. Segundo, a indução da COX-1 é evidente em cerca de uma hora após a adição do agente indutor, com picos que variam entre quatro e seis horas chegando até vinte e quatro horas. Terceiro, em contraste com a super indução da COX-2, a cicloheximida suprime a expressão da COX-1. Estes achados indicam que ambas as isoformas da COX são indutíveis, mas os mecanismos que levam à indução são diferentes (Wu, 1995).

COX-2 é mais seletivamente distribuída nos tecidos de mamíferos que a COX-1, que está presente em quase todos os tecidos e células. COX-2 se encontra expressa primariamente em macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células da musculatura lisa. Células quiescentes, normalmente expressam ou níveis muito baixos de COX-2 ou não expressam esta enzima. Estudos em muitos tipos celulares em várias espécies animais e em humanos tem demonstrado, invariavelmente, que a COX-2 é fortemente induzida por citocinas, fatores de crescimento, hormônios e oncogenes. O RNAm expresso nestas células é de 4,0 – 4,5 Kilobases (Kb), que é maior que o da COX-1 (2,7 Kb). Ésteres de forbol como PMA, segundo relatos, são capazes de induzir COX-2 em fibroblastos NIH 3T3, em células de roedores 3T3 (Kujubu e Herchmann, 1992), linhagem celular de osteoclastos MC 3T3-E1 (Pilbeam et al., 1993), células endoteliais de veias umbilicais de humanos (HUVEC) (Hla e Nielson, 1992) e células epiteliais de traquéia de ratos (Wu, 1995).

A magnitude da indução foi de 3 vezes em HUVEC a > 50 vezes além dos níveis basais em fibroblastos de roedores. A indução é rápida (aprox. 30 min após adição dos agentes indutores), com picos em aproximadamente 4 h, e após 24 h. Interleucina-1 (IL-1) tem sido relatada por induzir a expressão de COX-2 em monócitos humanos (O'Banion et al., 1992), células endoteliais (Hla e Nielsen, 1992) e células mesangiais de ratos (Wu, 1995) de maneira semelhante ao PMA. Vários relatos indicam que lipopolissacarídeos (LPS) são capazes de induzir a expressão de COX-2 em macrófagos aoveolares de coelhos (Ristimaki et al., 1994), macrófagos aoveolares de roedores e HUVEC, de maneira similar à

descrita acima para o PMA. A indução da COX-2 por PMA, IL-1, fatores de crescimento e oncogenes é aumentada por cicloheximida que está relacionada com o conceito de que a COX-2 é resposta de um gene primário (Wu, 1995).

Hormônios gonadotrópicos, segundo relatos, induzem COX-2 em células da granulosa *in vitro* e *in vivo* em ratos de maneira similar à relatada acima. A indução da COX-2 possui importância fisiológica na ovulação. Análogos do AMP cíclico são capazes de induzir COX-2 em linhagens celulares de osteoblastos MC3T3-E1, sugerindo o envolvimento da proteína quinase A na indução da COX-2. Demais estudos demonstram que $\text{PGF}_{2\alpha}$ e análogos estáveis da prostaciclina como iloprost são também indutores da expressão da COX-2 indicando um *feedback* positivo (Pilbeam et al., 1993). Com isso pode-se concluir que a indução da COX-2 é mediada por um complexo sinal transducional envolvendo no mínimo proteínas quinases C e A (Wu, 1995).

A hipótese original sobre o papel destas isoformas da COX propõe que a COX-1, que é constitutivamente expressa em muitos tecidos, regula muitas funções fisiológicas através da liberação de prostaglandinas (PGs) (Pairet e Engelhardt, 1996). A COX-2, ao contrário, por ser constitutivamente expressa em baixos níveis em alguns tecidos e ser induzida por citocinas pró-inflamatórias, endotoxinas, mitógenos, promotores de tumor e ainda PGE_2 e fator ativador de plaquetas (PAF) (Akarasereenont et al., 1994; Hemple et al., 1994; Arias-Negrete et al., 1995; Nantel et al., 1999), seria responsável por conduzir o processo inflamatório ou teria participação em estados patológicos (Chan et al., 1994; Pairet

e Engelhardt, 1996). De acordo com este papel para COX-1 e COX-2, foi sugerido que a inibição seletiva da COX-2 poderia ser um alvo relevante para a atividade de drogas antiinflamatórias desprovido dos típicos efeitos adversos dos antiinflamatórios tradicionais (Vane, 1994; Masferrer et al., 1994; Lane, 1997; Bjarnason et al., 1997; Vane e Botting, 1998).

1.4 Relação entre a ciclooxigenase e o óxido nítrico

Óxido nítrico sintase (NOS) catalisa a conversão de L-arginina a óxido nítrico (NO) e L-citrulina. O NO possui um papel importante em muitas condições fisiológicas e patológicas (Marletta, 1993). É um potente mediador que mantém a homeostasia por agir sobre plaquetas e tônus vascular, age como um neurotransmissor com funções no sistema nervoso central e periférico e um agente imunomodulador não específico participando no controle da invasão de microorganismos e tumores. Possui uma isoforma induzida (NOS_i ou NOS-2) e duas isoformas constitutivas (NOS_c), sendo uma neuronal (NOS-1) e a outra endotelial (NOS-3). Em várias condições fisiológicas e patológicas, o NO e prostanoídes trabalham de forma cooperada. Por exemplo, NO e prostaciclina agem sinergisticamente na via do GMPc e AMPc, respectivamente, para inibir a ativação de plaquetas, agregação e relaxamento do tônus vascular, assim mantendo o fluxo sangüíneo e a tonicidade vascular normais (Wu, 1995).

Relatos indicam que a COX-2 e NOS_i são expressas simultaneamente em modelos animais de inflamação (Vane et al., 1994). As induções prolongadas da

COX-2 e NOSi podem causar vários efeitos deletérios ao tecido uma vez que, as duas enzimas podem gerar uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção excessiva destes radicais pode causar dano tecidual, principalmente pela formação de peroxinitrito (resultante da reação do óxido nítrico com o ânion superóxido) (Wu, 1995). Alguns trabalhos indicam ainda que, a COX e a NOS podem interagir através de seus metabólitos. Salvemini et al. (1993), relataram que o NO estimula a atividade da COX em macrófagos RAW 264,7, possivelmente através de uma reação com o grupamento heme ligado ao sítio ativo da COX. Em contraste, Habib e colaboradores (1997), demonstraram que o NO endógeno inibe a síntese de prostaglandinas em condrócitos e macrófagos estimulados por LPS; Clancy e colaboradores (2000), avaliando os efeitos do NO sobre as isoformas da COX, observaram que o NO ativa a produção de PGE₂ derivada da COX-1, porém inibe a produção derivada da COX-2. Embora seja reconhecido que há uma interação entre os produtos das vias da COX e NOS, a literatura está dividida no que diz respeito à atividade do NO; se há uma inibição ou ativação da produção de prostaglandinas derivadas das duas isoformas.

1.5 Antiinflamatórios não esteroidais (AINEs)

Em 1893, o químico alemão Félix Hoffman, no interesse de auxiliar seu pai, portador de artrite reumatóide severa, iniciou junto com seu empregador, a companhia Bayer, um processo comercial para produzir uma molécula com

atividade analgésica chamada ácido acetilsalicílico ou aspirina. O que se desenvolveu a partir deste evento histórico foi uma classe de drogas, os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), que são considerados os agentes terapêuticos mais amplamente utilizados nos últimos 100 anos, para o tratamento de várias condições patofisiológicas. Estas incluem, tratamento profilático contra doenças cardiovasculares, para o desconforto associado com danos menores, dores de cabeça e alívio para a dor severa causada por uma variedade de doenças inflamatórias e degenerativas das articulações (Dubois et al., 1998).

Apesar da grande utilização dos AINEs, nos últimos cem anos, seu mecanismo de ação não foi conhecido até 1971, quando o Dr. John Vane e colaboradores publicaram suas observações propondo que a capacidade dos AINEs de reduzir os efeitos da inflamação seria o resultado primário da inibição da enzima ciclooxigenase. Esta inibição limitaria a produção de prostaglandinas proinflamatórias no local da lesão (Vane, 1971; Dubois et al., 1998).

Antes de 1971, pouco se conhecia sobre os mecanismos de ação dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), exceto que eles produziam um efeito antiinflamatório que era qualitativamente e quantitativamente diferente do mais potente antiinflamatório esteroidal. Muito dos efeitos bioquímicos dos AINEs tinham sido documentados, mas as teorias baseadas nestes efeitos acabaram sendo abandonadas. Talvez a hipótese mais racional daquele tempo, estava baseada na observação de que os salicilatos poderiam inibir várias proteases. Aumento da atividade proteolítica tinha sido observado em vários modelos de inflamação, e acreditava-se ser este aumento o responsável pelo dano tecidual

caracterizado nas doenças crônicas como artrites reumatóides (Vane e Botting, 1998).

1.5.1 Inibição da COX por AINEs

Os AINEs podem ser subdivididos em duas classes de drogas: (a) AINEs clássicos, não específicos e (b) inibidores da COX-2. Todos os AINEs clássicos inibem ambas as isoformas da COX, mas tendem a se ligar mais fortemente à COX-1 (DeWitt, 1999). Em contraste, a segunda classe tem sido elaborada para exibir maior seletividade para a COX-2.

1.5.2 Base estrutural de ligação e seletividade dos AINEs

As drogas tendem a se ligar na parte superior do canal da COX entre arg120 e tir385. Estruturalmente, os AINEs acídicos clássicos (p. ex: profenos e fenamatos) interagem com a arg120 em ambas as isoformas da COX (DeWitt, 1999), onde pontes de hidrogênio ou interações eletrostáticas provêm a maior porção da energia da ligação e seletividade. A relação da droga com o sítio de ligação na enzima para inibição tempo-dependente nas isoformas da COX não está bem compreendida. Por exemplo, o flurbiprofeno inibe a COX-1 por um mecanismo pseudo-irreversível e tempo dependente, mas o ibuprofeno, não. Assim, alguns aspectos particulares da interação da droga com as enzimas COX induzem uma transição conformacional para uma ligação forte (Garavito e DeWitt, 1999; DeWitt, 1999). Para muitos AINEs que exercem seu efeito de maneira tempo-dependente, uma interação com arg120 parece ser necessária (Bhattacharyya et al., 1996; Mancini et al., 1995).

A substituição da ile523 na COX-1 pela val523 na COX-2 resulta em uma pequena bolsa lateral tornando-se mais acessível para o sítio ativo do canal, assim, aumentando o volume do sítio ativo da COX. Esta alteração é composta pela substituição de ile434 na COX-1 com val434 na COX-2, no interior da segunda seqüência de aminoácidos que circundam os sítio ativo da COX. Esta substituição também aumenta o tamanho efetivo do canal do sítio ativo pelo aumento da mobilidade local das cadeias laterais no interior da bolsa lateral. A combinação dessas duas diferenças nas posições 523 e 434 na COX-2 concede um movimento da phe518 que permite o acesso à bolsa lateral polar. O canal principal mais largo combinado com esta “bolsa lateral” aumentam o volume do sítio de ligação dos AINEs na COX-2 em cerca de 20% a mais que na COX-1 (Garavito et al., 2002).

Este volume extra é o aspecto estrutural explorado pelos inibidores da COX-2. Quando o acesso a esta “bolsa lateral” é restrito por uma mutação de val530 para uma isoleucina, há uma diminuição na sensibilidade a estes inibidores (Gierse et al., 1996; Guo et al., 1996). Ao contrário, uma mutação de isoleucina para valina na posição 530 na COX-1, aumenta a afinidade para inibidores da COX-2 (Wong et al., 1997).

1.6 Papel fisiológico da COX

Desde a descoberta da segunda isoforma da COX, houve um interesse considerável em determinar porque existem duas isoformas desta enzima e quais

papéis elas podem desempenhar. Camundongos deficientes para expressão da COX-1 ou da COX-2 e inibidores específicos têm sido desenvolvidos e utilizados para investigar as funções fisiológicas destas enzimas. Estes estudos sugerem que existem processos em que cada enzima está separadamente envolvida (por exemplo, agregação plaquetária para a COX-1 e ovulação para a COX-2)(Tabela1) e outros em que as enzimas funcionam de maneira coordenada (por exemplo, carcinogênese e inflamação) (Langenbach et al., 1995; Morham et al., 1995; Dinchuk et al., 1995).

Fisiologicamente, no trato gastrintestinal, prostaciclina e prostaglandina E_2 reduzem a secreção gástrica, exercem efeito vasodilatador sobre os vasos da mucosa gástrica e estimulam a produção de muco, que forma uma barreira protetora (Vane e Botting, 1988; Raskin, 1999; Tanaka et al., 2001). No rim, prostaglandinas vasodilatadoras (prostaciclina, PGE_2 e PGD_2) possuem um papel chave na regulação do fluxo de sangue renal, diminuição da resistência vascular, dilatação do leito vascular renal e aumento na perfusão do órgão (Whelton, 1999). Há também eventos fisiológicos em que uma isoforma da COX funciona normalmente, mas para que a outra possa compensar quando a primeira está em falta (por exemplo, parto e remodelagem do duto arterial) (Smith e Langenbach, 2001).

Tabela 1. Funções fisiológicas específicas para as isoformas da COX.

<i>Processo fisiológico</i>	<i>COX-1</i>	<i>COX-2</i>	<i>Prostaglandina envolvida</i>
Ovulação	---	Essencial	PGE ₂
Implantação	---	Essencial	PGI ₂
Parto	Essencial	Compensatória	PGF _{2α}
Agregação plaquetária	Essencial	---	TXA ₂
Remodelagem do duto arterial	Compensatória	Essencial	TXA ₂ / PGH ₂
Desenvolvimento de células T	Estágio-específica	Estágio-específica	PGE ₂
Ulceração Gástrica	Necessária a inibição de ambas isoformas		Não determinado
Cicatrização de úlceras	---	Essencial	Não determinado
Câncer intestinal	Ambas as isoformas possuem papel essencial		Não determinado
Sobrevivência de células tronco	Essencial	Compensatória	PGE ₂

Fonte: Smith e Langenbach, 2001.

1.7 Participação da COX em eventos patológicos

Dano tecidual local e doenças inflamatórias como osteoartrite estão associadas com aumento de prostaglandinas (PGs), e é conhecido que os receptores relacionados com a transmissão dolorosa são sensíveis à baixos níveis de PGs. Assim, o papel da COX no local do dano tecidual, em relação à transmissão dolorosa, é hiperalgésico e a atividade dos AINEs de aliviar a dor local pode ser facilmente explicada por este mecanismo. Além disto, as PGs agem sobre a medula espinhal para facilitar a transmissão da resposta dolorosa, embora haja pouco conhecimento de como esta facilitação ocorra (Dubois et al., 1998).

Durante muito tempo a inibição da COX-1 por AINEs foi considerada o evento bioquímico responsável pelo desenvolvimento de ulcerações gástricas. Estudos em animais deficientes para a expressão de COX-1 obtiveram resultados surpreendentes onde foi observado que estes animais apresentaram uma redução de 99% nos níveis gástricos de PGE₂ sem o desenvolvimento espontâneo de úlceras. Inicialmente, muitos pesquisadores atribuíram esta ausência de ulceração gástrica em animais deficientes para a COX-1 a um mecanismo compensatório. Entretanto, mais recentemente, foi relatado um modelo de úlcera gástrica induzida por AINEs com um mecanismo dependente da atividade da ciclooxigenase onde foi observado que nem o inibidor seletivo para a COX-1, SC-560, nem o inibidor seletivo para COX-2, celecoxib, *per se*, foram suficientes para induzir úlceras, mas o dano gástrico ocorreu quando os dois AINEs foram administrados concomitantemente. Provavelmente se a inibição da atividade da COX for o mecanismo de indução de ulceração, a administração de inibidores da COX-1 em animais deficientes para a COX-2 ou inibidores da COX-2 em animais deficientes para a COX-1 será ulcerogênica (Smith e Langenbach, 2001).

Atualmente, muitos estudos têm indicado que a COX-2 é a principal isoforma envolvida na carcinogênese. Entretanto, Chulada e colaboradores (2000) observaram que a deficiência para ambas as isoformas da COX são capazes de reduzir a formação de pólipos em camundongos de maneira semelhante (aprox. 80%). Estes estudos aumentam a questão sobre a participação das isoformas da COX e como contribuem para a carcinogênese, se é através de um mecanismo comum ou diferente. Chulada et al (2000) observaram ainda que no estágio de

adenoma do desenvolvimento tumoral a COX-2 está presente em células intersticiais antes de estarem presentes nas células tumorais, com isso, os prostanoídes formados via COX-2 exercem um efeito parácrino anterior ao efeito autócrino para promover o crescimento do tumor. Trabalhos com camundongos deficientes para COX indicam que ambas as isoformas contribuem para o aumento da produção de PGE₂ observada em pólipos. Em geral, estes resultados sugerem que ambas enzimas COX-1 e COX-2 possuem papel chave na carcinogênese intestinal e que a COX-1 também pode ser um alvo efetivo para os AINEs (Smith e Langebach, 2001).

1.8 Ciclooxigenase e inflamação

A inflamação é um dos mais importantes processos envolvidos na defesa de um organismo, entretanto, freqüentemente progride a situações dolorosas ou doenças crônicas, necessitando de tratamento farmacológico. O processo inflamatório envolve uma série de eventos que podem ser induzidos por vários estímulos (p. ex., agentes infecciosos, isquemia, interações antígeno anticorpo ou ainda danos de origem física ou térmica). Ao nível macroscópico, a resposta é geralmente acompanhada pelos sinais clínicos clássicos de: rubor, calor, dor, edema e perda de função, decorrentes de um influxo marcante de células inflamatórias e extravasamento plasmático para o local lesado (Celotti e Laufer, 2001). A resposta inflamatória pode ser esquematizada em três fases distintas, cada umas delas sendo mediada, aparentemente, por mecanismos diferentes.

Assim, é inicialmente evidenciada uma fase aguda de duração variável, onde ocorre vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar, seguida de uma fase subaguda, caracterizada por infiltração de leucócitos e de células fagocíticas, e posteriormente, a fase de regeneração tecidual ou fibrose.

De acordo com a hipótese original, por estar aumentada durante o processo inflamatório, a inibição da forma induzida da COX (COX-2), seria então o principal mecanismo de ação dos AINEs, responsável pelos efeitos benéficos conhecidos, sendo os efeitos deletérios (p.ex.: ulceração gástrica) decorrentes da inibição da COX-1 (Bateman, 1994; Vane e Botting, 1998).

A contribuição relativa das isoformas da COX na resposta inflamatória não está completamente resolvida. Desde a identificação da segunda isoforma, havia a hipótese de que a COX-2 seria a origem primária de prostanóides que contribuem para a inflamação. Entretanto, estudos têm demonstrado que os prostanóides formados pela COX-1 também estão envolvidos (Langenbach et al., 1995; Wallace et al., 1998; Ochi e Goto, 2002).

Interessantemente, alguns estudos recentes têm indicado que a COX-2 atua em ambos, no início do processo inflamatório e a fase de resolução. Gilroy e colaboradores (1999), relataram que a expressão de COX-2 e os níveis de PGE₂ aumentam transitoriamente na fase inicial da pleurisia induzida por carragenina em ratos. Mais tarde, a COX-2 teve sua expressão novamente aumentada, mas desta vez acompanhada de prostaglandinas antiinflamatórias, como PGD₂ e 15-deoxy- Δ^{12-14} -PGJ₂ e baixos níveis da pro-inflamatória PGE₂.

Em 1998, Wallace et al., observaram um efeito antiinflamatório significativo nas doses de drogas que inibem a COX-1 em modelos induzidos por carragenina. Smith et al. (1998), demonstrou que administrações profiláticas de SC560, um inibidor seletivo para a COX-1, era capaz de reduzir os níveis de prostaglandinas nas patas dos ratos injetadas com carragenina. Utilizando modelos de atrite em ratos, Ochi e Goto (2002), avaliaram a contribuição da COX-1 na inflamação crônica, e observaram que o tratamento por via oral com o inibidor seletivo para a COX-1, o FR122047, produziu um efeito antiinflamatório seguido da inibição da produção de PGE₂ e TXB₂ no local da inflamação.

A COX-2 possui um papel tanto fisiológico, quanto patológico, como, por exemplo, sua alta expressão em locais de inflamação porém, deve-se considerar, entretanto, que a COX-1 pode exercer uma importante contribuição da produção de substâncias ativas em eventos inflamatórios.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

O presente trabalho procurou avaliar o efeito do valeril salicilato, um inibidor da COX-1 (Bhattacharyya et al., 1995), em modelos de edema em camundongos, tanto na fase aguda, quanto na tardia.

2.2 Objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito do valeril salicilato, descrito na literatura como um inibidor da enzima COX-1, seria farmacologicamente ativo no modelo do edema de pata e com isso investigar um possível papel pró-inflamatório da enzima COX-1.
2. Comparar o efeito do valeril salicilato com, o do inibidor seletivo para a COX-2, celecoxib; inibidores não-seletivos de COX-1 e COX-2, como indometacina e ácido acetilsalicílico; e com outros inibidores mais seletivos para a COX-1 como resveratrol e SC560, no modelo do edema de pata.
3. Comparar o efeito do tratamento com valeril salicilato e celecoxib no modelo do edema de orelha em camundongos induzido por ácido araquidônico e óleo de cróton.
4. Avaliar se a “reposição” de PGE₂ poderia afetar o perfil de resposta exibido pelos animais tratados com VS, procurando com isso, confirmar a

importância da atividade enzimática da COX-1 no início do processo inflamatório, no modelo do edema de pata.

5. Investigar se o efeito do VS observado seria dependente de NO, através do tratamento com o inibidor da NO sintase L-NOARG e adição do precursor de óxido nítrico, L-ARG.
6. Investigar uma possível participação da via da lipooxigenase no efeito do VS observado neste estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Os experimentos foram realizados com camundongos suíços machos pesando entre 25 - 35 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em sala com a temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e um ciclo de claro escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração. O protocolo experimental foi submetido e aprovado sob o número 188 pela Comissão de Ética na Utilização de Animais – CEUA, desta universidade.

3.2. Procedimentos experimentais

- **3.2.1. Teste do edema de pata**

Para esta série de experimentos, os animais receberam uma injeção na pata posterior esquerda de carragenina λ tipo IV (1%, 25 μL), diluída em PBS, sendo a pata direita injetada com este veículo e no mesmo volume, conforme proposto por Henriques et al. (1987). A avaliação da variação do volume das patas foi feita com auxílio de um becker sobre balança contendo uma solução de lauril éter sulfato de sódio a 5 %, onde as patas esquerda e direita foram imersas até a junção tíbio-társica. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (Erro Padrão da Média) da diferença de volume em microlitros (μL) entre as patas esquerda e direita.

- ***Tratamento profilático.***

Os animais foram pré-tratados com valeril salicilato (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.), celecoxib (10, 30 e 100 mg/kg, i.p.) ou indometacina (0,5 e 5 mg/kg, i.p.) meia hora antes da injeção intraplantar de carragenina. O edema foi avaliado nos tempos de 0,5; 1; 2; 4; 24; 48 e 72 horas após a injeção do agente flogístico (Henriques et al., 1987).

- ***Tratamento terapêutico***

Duas horas após a injeção de carragenina na pata esquerda dos animais, os animais foram tratados com valeril salicilato (3, 10 e 30 mg/kg, i.p.), celecoxib (10, 30 e 100 mg/kg, i.p.) ou indometacina (0,5 ou 5 mg/kg, i.p.), sendo o edema avaliado nos tempos de 0,5; 1; 2; 4; 24; 48 e 72 horas após a injeção do agente flogístico.

- ***Duração do efeito com o tratamento com valeril salicilato***

Os animais foram separados em grupos e pré-tratados com valeril salicilato (30 mg/kg) nos intervalos de 0,5; 1; 2; 4; 6; 24 e 48 h antes da injeção de carragenina, sendo avaliados nos tempos de 2, 4, 24 e 48 horas após a injeção do agente flogístico.

- ***Tratamento local***

Os animais receberam uma injeção intraplantar de valeril salicilato (1,5; 4,5; 15 ou 45 µg/pata; 10 µL) na mesma pata onde, uma hora depois, foram injetados 25 µL de carragenina 1%, sendo o edema avaliado em 2, 4, 24 e 48 horas após a

indução com carragenina. A determinação das doses utilizada foi feita considerando o animal como um compartimento único.

- ***Tratamento com outras drogas***

Meia hora antes da injeção de carragenina, os animais foram tratados por via intraperitoneal com ácido acetilsalicílico (100 mg/kg), resveratrol (30 mg/kg) e SC560 (30 mg/kg) por via subcutânea. A variação do edema foi avaliada 2 e 48 horas após a indução com o agente flogístico.

- ***Avaliação do efeito da reposição de prostaglandina E₂ e participação da via do óxido nítrico***

Os animais foram pré-tratados (30 minutos) com valeril salicilato (30 mg/kg, i.p.) e cinco minutos antes da administração de carragenina, foi injetado na pata esquerda dos animais, em um volume de 10 µL, uma solução contendo: PGE₂ (30 ηmol/pata), L-NOARG (2,5 µmol/pata) ou L-ARG (15 µmol/pata). A variação do edema foi medida nos intervalos de 2 e 48 horas após a indução com o agente flogístico na mesma pata.

- ***Avaliação do efeito do tratamento com o inibidor da via da 5-lipooxigenase, REV5901, sobre a atividade do valeril salicilato (VS)***

O tratamento com o inibidor da via da 5-lipooxigenase, REV5901 (30 mg/kg; 0,1 mL/animal, subcutâneo) foi efetuado em associação com o VS onde um grupo recebeu VS + REV5901 30 minutos antes da injeção de carragenina e outros dois grupos previamente determinados que, receberam VS (30 min. antes) + REV5901 (24 horas após a injeção de carragenina) e VS (30 min. antes) + REV5901 (46

horas após a injeção de carragenina). Um outro grupo recebeu somente REV5901 30 minutos antes da injeção do agente flogístico. Os animais controle foram tratados apenas o veículo (tween 80, 1 %). O edema formado foi avaliado nos intervalos de 2 e 48 horas após a injeção de carragenina.

3.2.2. Teste do edema de orelha

O edema de orelha foi induzido pela administração tópica de ácido araquidônico (AA; 2 mg/orelha; 20 μ L) ou óleo de cróton (OC; 1 mg/orelha; 20 μ L) na superfície interna da orelha esquerda de camundongos. Os animais foram pré-tratados (1 hora) com valeril salicilato (1,5; 4,5; 15 e 45 μ g/orelha; 20 μ L) ou celecoxib (4,5; 15; 45 ou 100 μ g/orelha; 20 μ L) por administração tópica na superfície externa da mesma orelha. A orelha direita recebeu o mesmo volume do veículo (acetona).

As variações da espessura das orelhas foram avaliadas com o auxílio de um micrômetro (Fisher, USA) nos tempos zero e uma hora após indução com ácido araquidônico ou nos tempos zero e seis horas após indução com óleo de cróton. Os resultados foram expressos como médias \pm E.P.M. da diferença da espessura em micrômetros (μ m) das orelhas esquerda e direita.

3.3. Drogas e Reagentes

Para os experimentos foram utilizados: λ -carragenina tipo IV, L-NOARG, L-arginina, indometacina, resveratrol, PBS e óleo de cróton, provenientes da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, U.S.A). Valeril salicilato, SC5650, REV5901, PGE₂ e Ácido araquidônico provenientes da Cayman Chemicals. Celebrex[®] (celecoxib) é uma marca registrada da Searle/Pfizer/Farmacacia, vendido no Brasil como Celebra[®].

3.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. As porcentagens de inibição foram apresentadas como área sob a curva das inibições obtidas em cada experimento individual. A análise estatística dos dados foi realizada através do teste t não pareado de Student quando necessário ou análise de variância (ANOVA) complementada com teste de Dunnett. Os valores de P menores que 0.05 (* $p > 0.05$) ou 0.01 (** $p > 0.01$) foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do tratamento profilático com valeril salicilato sobre o edema de pata induzido pela injeção de carragenina.

O edema de pata foi induzido pela injeção intraplantar de carragenina 1% (25 μ L), sendo avaliado nos intervalos de 0,5; 1; 2 e 4 (considerada 1^a. fase) e 24, 48 e 72 horas (considerada 2^a. fase) após a indução do agente flogístico. O tratamento profilático (0,5 h antes) intraperitoneal de VS nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg foi capaz de reduzir o edema formado até 4 horas em 34, 44 e 57 %, respectivamente (área sob a curva), demonstrando um pico em 2 horas (Figura 3A). Nos intervalos de 48 e 72 horas após a injeção de carragenina, houve um aumento significativo no edema formado em 80, 100 e 145 % para 48 horas (controle = $58,33 \pm 6,00 \mu$ L) e 63, 141 e 160 % para 72 horas (controle = $38,33 \pm 8,33 \mu$ L), quando comparados aos seus respectivos controles. Em 24 horas, os resultados não apresentaram diferenças estatísticas significantes (Figura 3B).

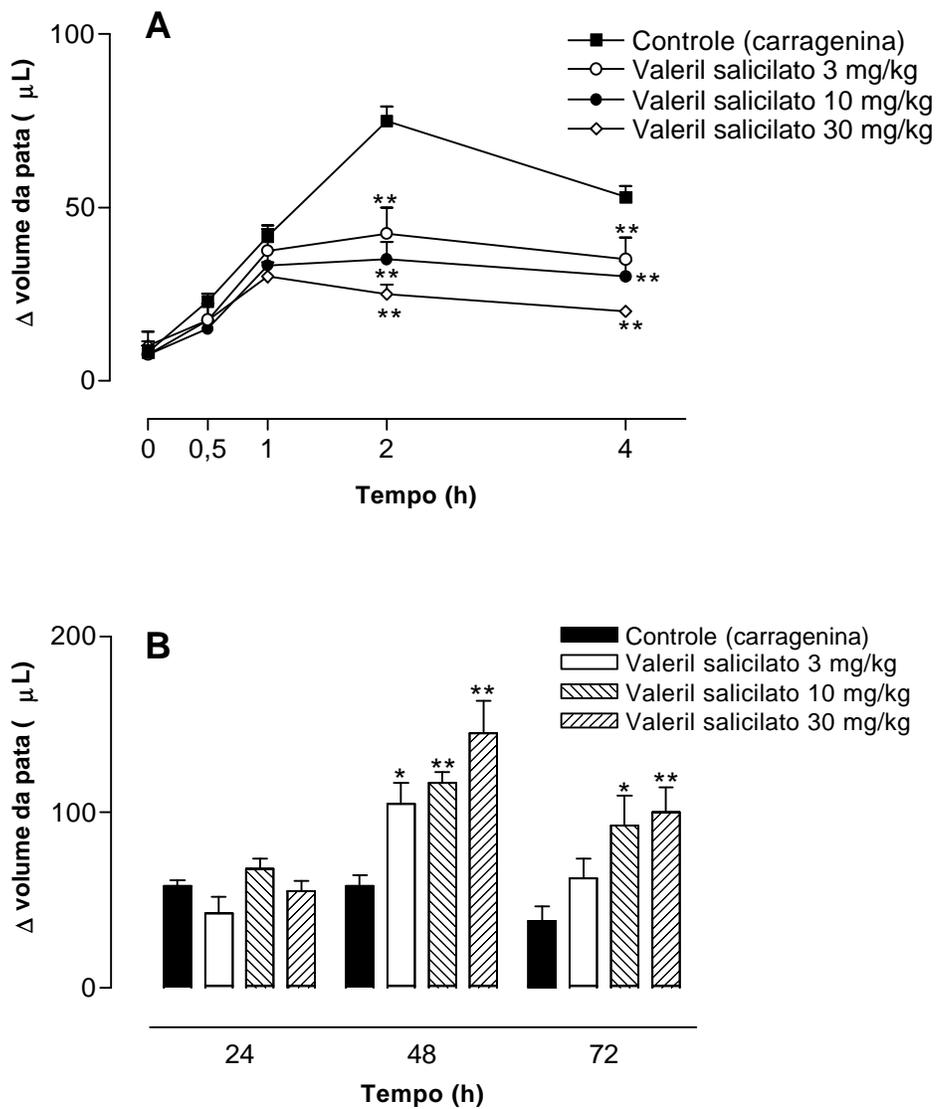


Figura 3. Efeito do tratamento profilático com VS nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, i.p., sobre o edema de pata induzido por carragenina até 4 horas, considerado como primeira fase (A) e de 24 a 72 horas considerado segunda fase (B). Cada ponto (A) ou barra (B) equivale à média \pm EPM da diferença entre pata esquerda e direita de 6-8 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo ANOVA complementadas com o teste de Dunnett, sendo que as diferenças significantes indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.2. Efeito do tratamento profilático com celecoxib e indometacina sobre o edema de pata induzido pela injeção de carragenina.

O tratamento profilático (0,5 h antes) intraperitoneal com celecoxib (CEL) nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg foi capaz de reduzir o edema formado até 4 horas em 43, 53 e 57 %, respectivamente (área sob a curva)(Figura 4A). O tratamento profilático i.p. com indometacina (INDO) nas doses de 0,5 e 5 mg/kg da mesma maneira reduziu o edema formado até 4 horas em 37 e 56 %, respectivamente (área sob a curva)(Figura 4B). Nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após a injeção de carragenina, diferentemente dos resultados apresentados com o VS, não houve um aumento significativo no edema formado em 48 e 72 horas. Ao contrário, apresentou redução significativa no edema formado nos grupos tratados com celecoxib na dose de 100 mg/kg com inibição de 29 % (controle = $58,33 \pm 6,00 \mu\text{L}$) no intervalo de 24 horas (Figura 4C) e com indometacina na dose de 5 mg/kg nos intervalos de 24 (54% de inibição, controle = $55,30 \pm 3,07 \mu\text{L}$) e 48 (34% de inibição, controle = $58,33 \pm 6,01 \mu\text{L}$) horas (Figura 4D). Uma outra forma de apresentação dos resultados está na Figura 5A, estão apresentados os resultados referentes aos picos em 2 horas e na Figura 5B em 48 horas dos grupos tratados com VS, CEL e INDO.

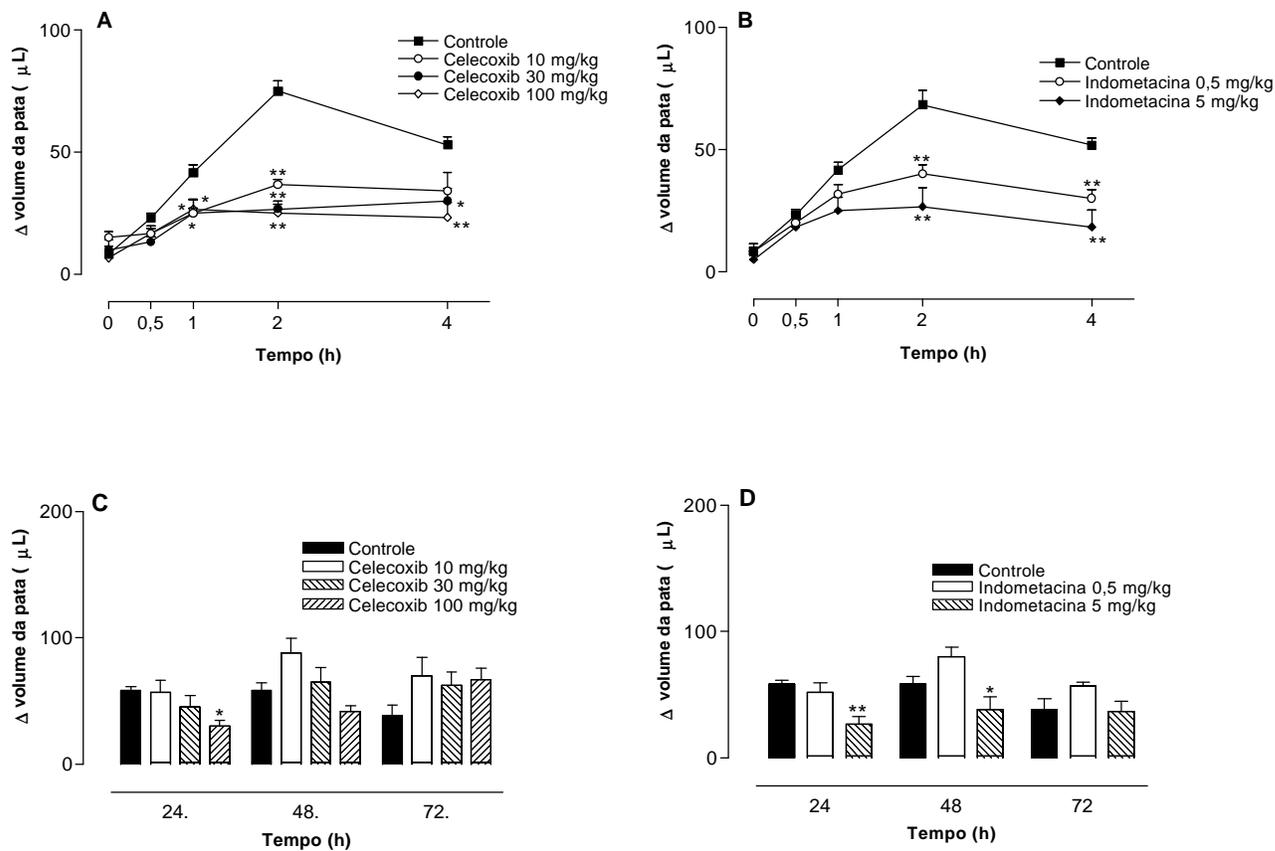


Figura 4. Efeito do tratamento profilático com celecoxib (CEL) nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, indometacina (INDO) i.p., sobre o edema de pata induzido por carragenina até 4 horas, considerado como primeira fase (A) e (B) e de 24 a 72 horas considerado segunda fase (C) e (D). Cada ponto (A) e (B) ou cada barra (C) e (D) equivale à média \pm EPM da diferença entre pata esquerda e direita de 6-8 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo ANOVA complementadas com o teste de Dunnett sendo indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

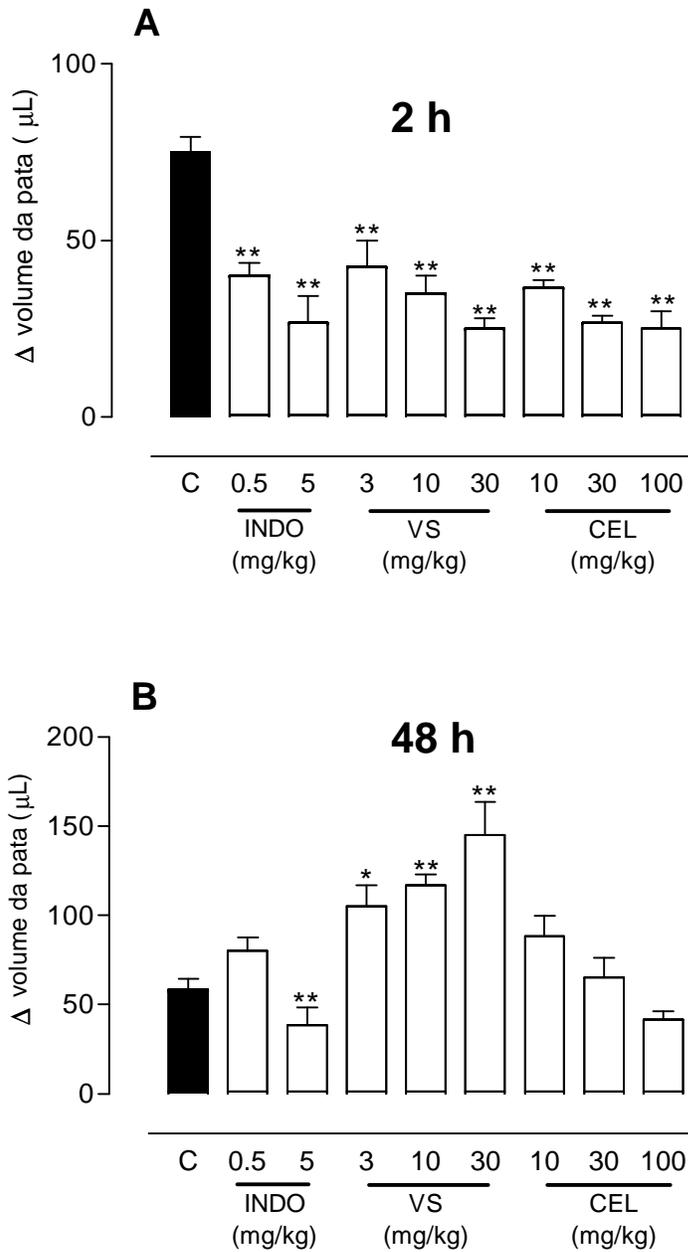


Figura 5. Efeito do tratamento profilático com valeril salicilato (VS) nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, i.p., celecoxib (CEL) nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg i.p. e indometacina (INDO) nas doses de 0,5 e 5 mg/kg i.p., sobre o edema de pata induzido por carragenina avaliado em 2 horas (A) e em 48 horas (B). Cada barra equivale à média \pm EPM da diferença entre pata esquerda e direita de 6-8 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo ANOVA complementadas com o teste de Dunnett sendo indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.3. Efeito do tratamento terapêutico com valeril salicilato, celecoxib e indometacina sobre o edema de pata induzido pela injeção de carragenina.

Na figura 6 estão apresentados os resultados com o tratamento terapêutico (2 h após a injeção de carragenina) por via intraperitoneal com valeril salicilato (VS). Nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, o tratamento com VS não foi capaz de inibir de maneira significativa o edema formado em nenhum dos intervalos avaliados. Em contrapartida, o tratamento com celecoxib (CEL) nas doses de 30 e 100 mg/kg reduziu o edema formado no intervalo de quatro horas após a injeção de carragenina em 27 e 41 %, respectivamente (controle = $36,67 \pm 2,10 \mu\text{L}$) (Figura 7). O tratamento terapêutico i.p. com indometacina (INDO) na dose de 5 mg/kg também foi capaz de reduzir o edema em 4 horas em 45 % (controle = $36,67 \pm 2,10 \mu\text{L}$) (Figura 7). Somente no intervalo de 24 horas após a injeção de carragenina, diferentemente dos resultados apresentados com tratamento profilático, houve uma redução significativa no edema formado nas patas dos animais tratados com celecoxib na doses de 10 e 100 mg/kg e nas patas dos animais tratados com indometacina na dose de 5 mg/kg (Figura 7C e 7D) . Nos demais intervalos não houve diferenças estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle.

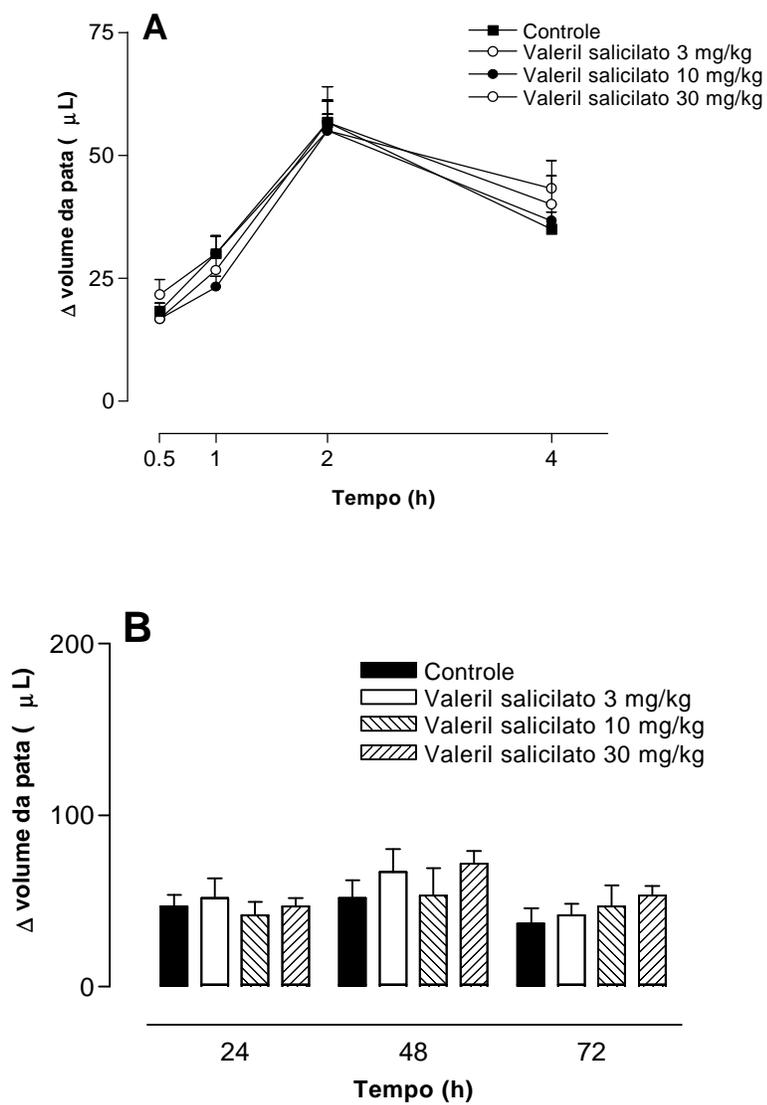


Figura 6. Efeito do tratamento terapêutico com valeril salicilato (VS) nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, i.p., sobre o edema de pata induzido por carragenina até 4 horas, considerado como primeira fase (A) e de 24 a 72 horas considerado segunda fase (B). Cada ponto (A) ou barra (B) equivale à média \pm EPM da diferença entre pata esquerda e direita de 6-8 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo ANOVA complementadas com o teste de Dunnett sendo indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

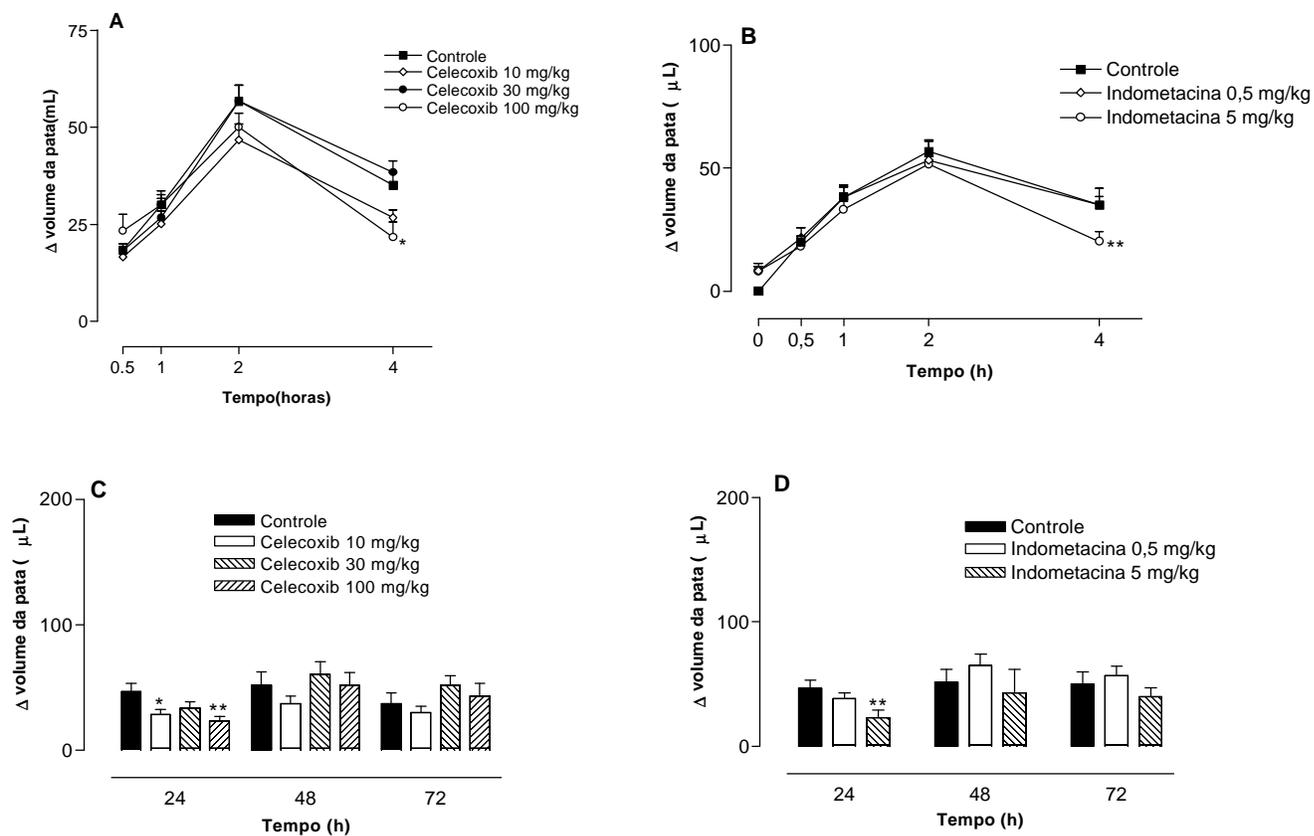


Figura 7. Efeito do tratamento terapêutico com celecoxib (CEL) nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, e indometacina (INDO) nas doses de 0,5 e 5 mg/kg, i.p., sobre o edema de pata induzido por carragenina até 4 horas, considerado como primeira fase (A) e (B) e de 24 a 72 horas considerado segunda fase (C) e (D). Cada ponto (A) e (B) ou cada barra (C) e (D) equivale à média \pm EPM da diferença entre pata esquerda e direita de 6-8 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo ANOVA complementadas com o teste de Dunnett sendo indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.4. Duração do efeito do tratamento profilático com valeril salicilato (VS) sobre o edema de pata induzido pela injeção de carragenina.

Os animais foram separados em grupos e tratados com VS por 0,5; 1; 2; 4; 6; 24 e 48 h antes da injeção de carragenina sendo o edema avaliado nos intervalos de 2 e 48 horas após a injeção do agente flogístico. Nos animais que receberam o tratamento 0,5, 1 e 2 horas antes da injeção de carragenina houve uma redução estatisticamente significativa do edema formado em 66,70 % (controle = $75,00 \pm 4,28 \mu\text{L}$), 45,50 % (controle = $55,00 \pm 4,00 \mu\text{L}$) e 33,40 % (controle = $66,00 \pm 5,00 \mu\text{L}$) quando avaliados 2 horas após a injeção de carragenina e comparados ao seu respectivo controle (Figura 8A). Em 48 h após a injeção de carragenina, os grupos tratados por 0,5; 1 e 4 horas antes da indução do edema apresentaram aumentos estatisticamente significantes quando comparados aos respectivos controles (Figura 8B).

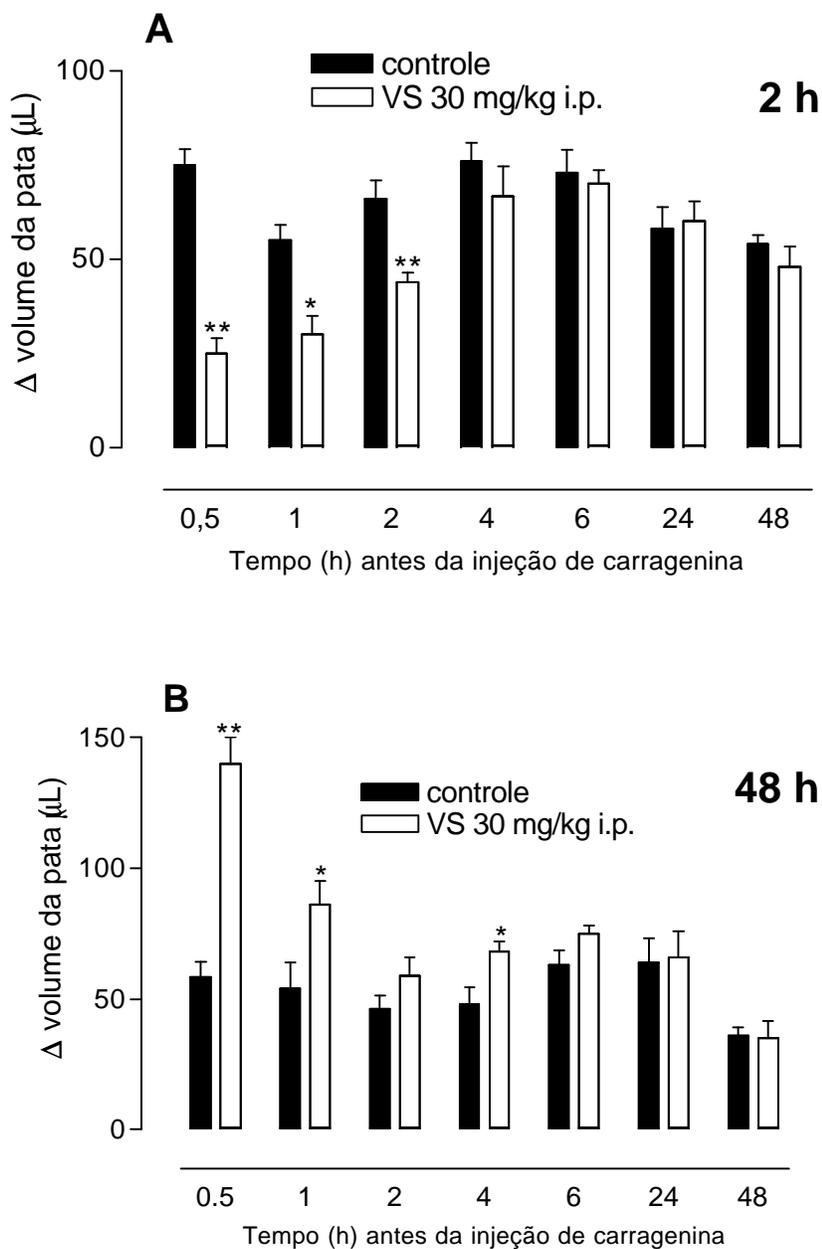


Figura 8. Efeito do tratamento profilático com valeril salicilato (VS) na dose de 30 mg/kg, i.p., sobre o edema de pata avaliado em 2 horas (A) e em 48 horas (B) após a indução com carragenina. Cada barra equivale à média \pm EPM da diferença entre pata esquerda e direita de 6-8 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste t de Student não pareado sendo indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.5. Efeito do tratamento intraplantar com valeril salicilato sobre o edema de pata induzido por carragenina.

O tratamento profilático (1 h antes) por via intraplantar com valeril salicilato (VS) nas doses de 1,5; 4,5; 15 e 45 $\mu\text{g/pata}$ foi capaz de reduzir significativamente o edema formado em 2 e 4 horas (Figura 9A) e, 48 horas após a injeção de carragenina, as mesmas patas avaliadas anteriormente apresentaram um aumento gradativo no edema formado, sendo significante apenas na dose de 45 $\mu\text{g/pata}$ (Figura 9B).

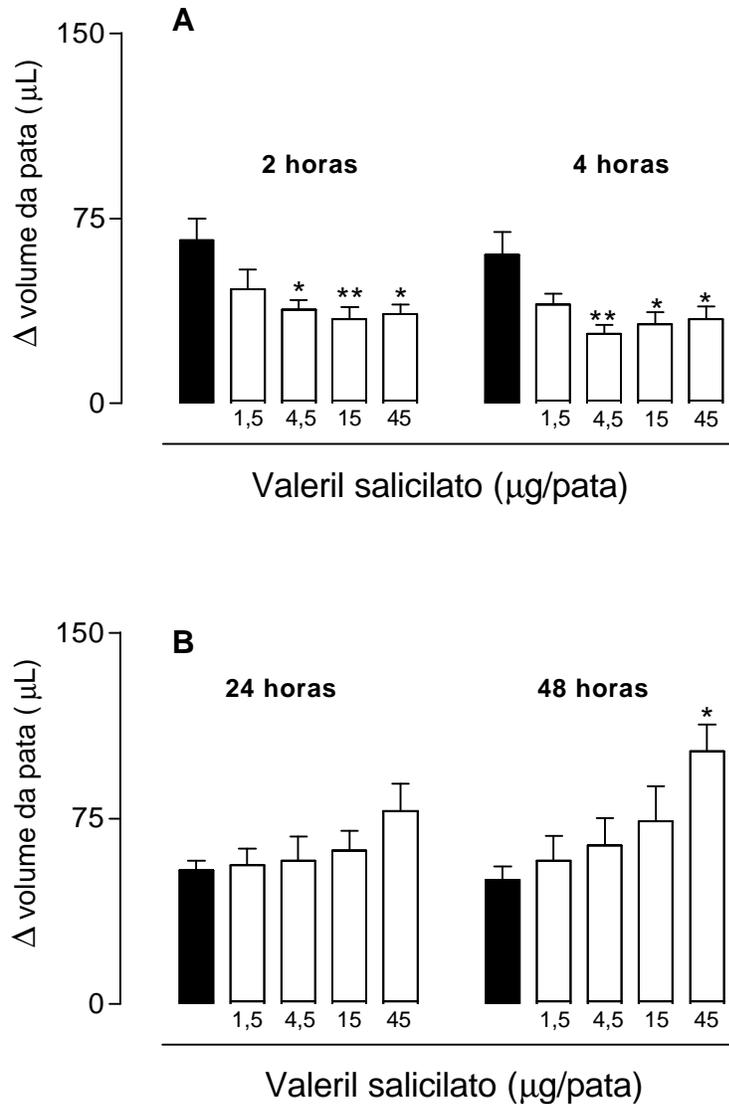


Figura 9. Efeito do tratamento profilático intraplantar com valeril salicilato nas doses de 1,5; 4,5; 15 e 45 µg/pata, sobre o edema de pata avaliado em 2 e 4 horas (A) e em 24 e 48 horas (B) após a indução com carragenina. Cada barra equivale à média ± EPM da diferença entre pata esquerda e direita de 6-8 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo ANOVA complementadas com o teste de Dunnett sendo indicadas por asteriscos: * p<0,05 e ** p<0,01.

4.6. Efeito do tratamento profilático pela via intraperitoneal com ácido acetilsalicílico, resveratrol e SC560.

Na tentativa de avaliar se outros antiinflamatórios que também inibem a COX-1, apresentariam o mesmo efeito observado com o valeril salicilato, vários grupos com n= 6 a 8 animais foram separados e tratados pela via intraperitoneal (30 minutos antes da indução do edema com o agente flogístico) com: ácido acetilsalicílico (AAS) 100 mg/kg, resveratrol (RESV) 30 mg/kg, valeril salicilato 30 mg/kg, SC560 30 mg/kg (subcutâneo) ou PBS (controle). Os resultados demonstraram que todos os tratamentos foram capazes de inibir de maneira significativa o edema de pata formado em 2 horas (Figura 10A), entretanto em 48 horas, apenas os animais tratados com resveratrol, não apresentaram um aumento no edema formado quando comparados ao grupo controle (Figura 10B).

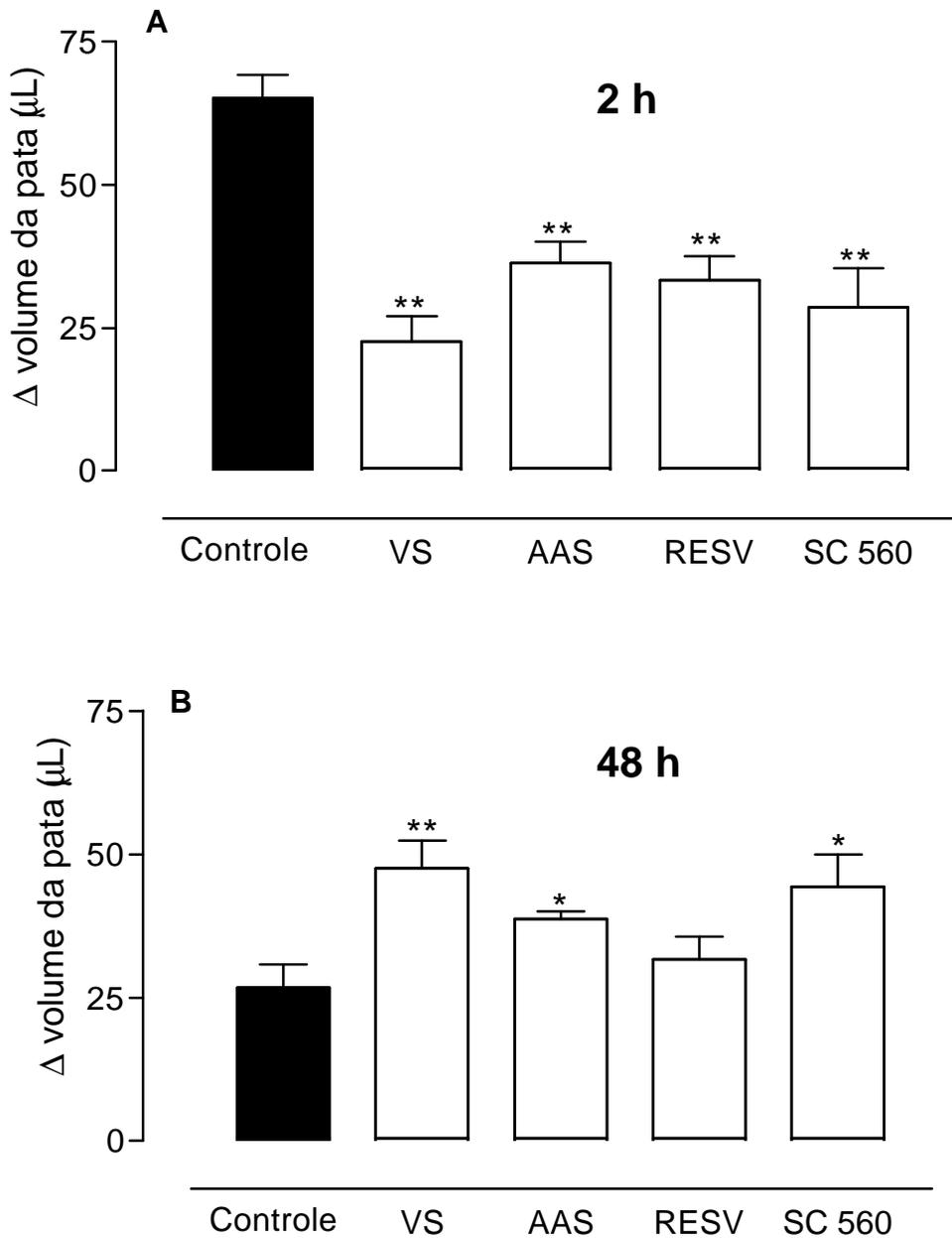


Figura 10. Efeito do tratamento profilático intraperitoneal com valeril salicilato (VS) na dose de 30 mg/kg, ácido acetilsalicílico (AAS) 100 mg/kg, resveratrol (RESV) 30 mg/kg e SC560 30 mg/kg (subcutâneo), sobre o edema de pata avaliado em 2 horas (A) e em 48 horas (B) após a indução com carragenina. Cada barra equivale à média \pm EPM da diferença entre pata esquerda e direita de 6-8 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA complementadas com o teste de Dunnett sendo indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.7. Efeito do tratamento tópico com valeril salicilato ou celecoxib sobre o edema de orelha induzido pela administração tópica de ácido araquidônico.

A administração tópica de ácido araquidônico (2 mg/orelha) induziu, uma hora após a sua administração, um edema equivalente a $423,60 \pm 14,12 \mu\text{m}$ (média \pm EPM de 6-8 animais), no grupo tratado apenas com a administração tópica do veículo (acetona) 1 hora antes da indução do processo. O pré-tratamento tópico com valeril salicilato nas doses de 1,5; 4,5; 15 e 45 μg /orelha, foi capaz de reduzir significativamente o edema formado no intervalo avaliado (Figura 11A). Nos animais tratados com a administração tópica de celecoxib não se observou inibição do edema em nenhuma das doses avaliadas (Figura 11B). Por serem considerados inibidores seletivos, os resultados indicam que a COX-1 possui maior relevância que a COX-2 neste modelo e no intervalo avaliado.

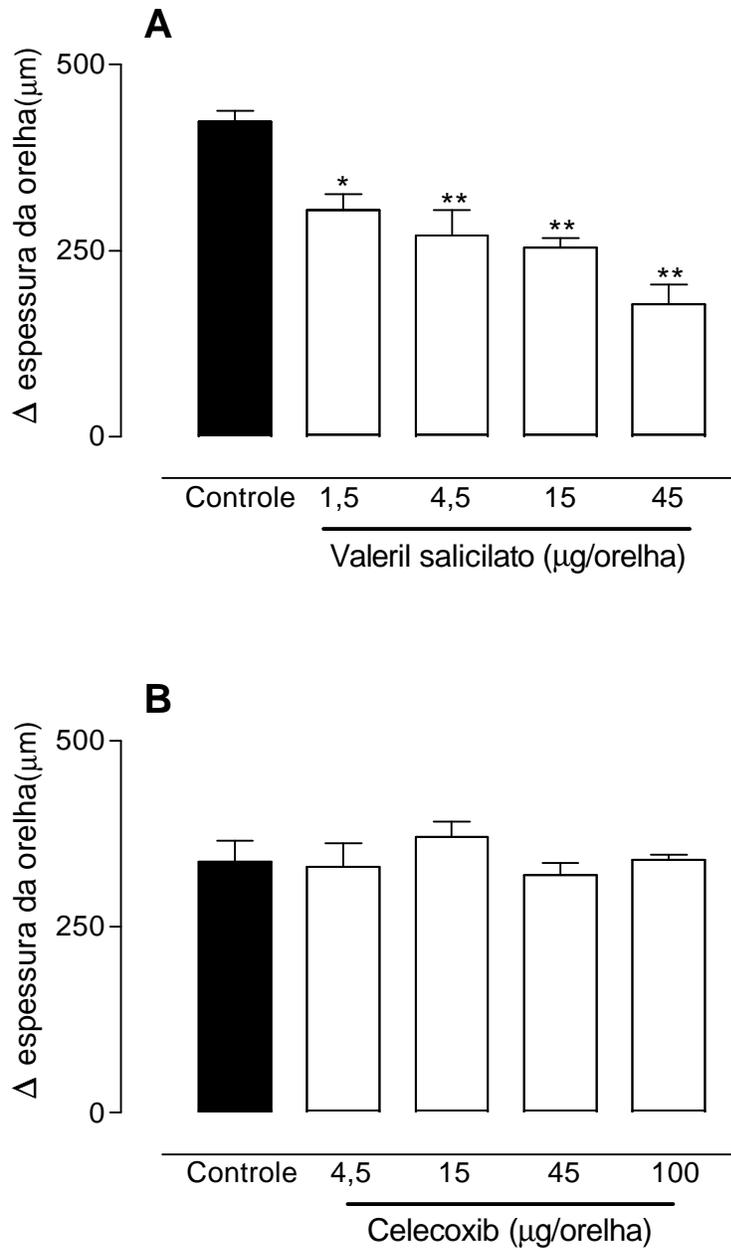


Figura 11. Efeito do tratamento tópico com (A) valeril salicilato nas doses de 1,5; 4,5; 15 e 45 µg/orelha, e (B) celecoxib nas doses de 4,5; 15; 45 e 100 µg/orelha, sobre o edema de orelha, avaliado 1 hora após a indução por ácido araquidônico. Cada barra equivale à média ± EPM da diferença entre as orelhas esquerda e direita de 6-8 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo ANOVA complementadas com o teste de Dunnett sendo indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.8. Efeito do tratamento tópico com valeril salicilato e celecoxib sobre o edema de orelha induzido pela administração tópica de óleo de cróton.

O tratamento tópico com valeril salicilato inibiu significativamente o edema formado seis horas após administração tópica de óleo de cróton (1 mg/orelha) apenas na dose de 45 µg/orelha em 37 % (controle = $366,60 \pm 20,59 \mu\text{m}$) (Figura 12A), enquanto que, o tratamento com celecoxib, neste modelo, foi capaz de inibir o edema formado em todas as doses avaliadas (Figura 12B). Os resultados demonstram que, neste modelo, que a COX-2 possui maior relevância que a COX-1 neste modelo e no intervalo avaliado.

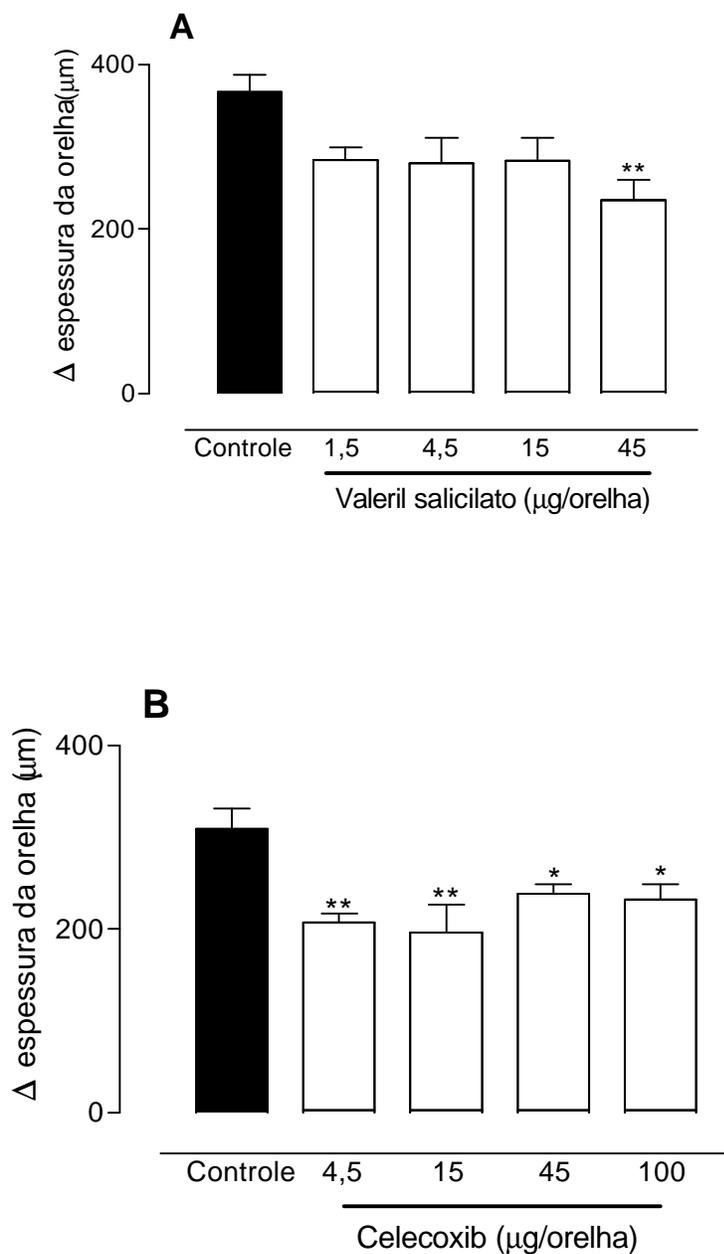


Figura 12. Efeito do tratamento tópico com (A) valeril salicilato nas doses de 1,5; 4,5; 15 e 45 µg/orelha, e (B) celecoxib nas doses de 4,5; 15; 45 e 100 µg/orelha, sobre o edema de orelha, avaliado 6 horas após a indução por óleo de cróton. Cada barra equivale à média ± EPM da diferença entre as orelhas esquerda e direita de 6-8 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA complementadas com o teste de Dunnett sendo indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.9. Efeito da reposição de prostaglandina E₂ sobre a atividade do valeril salicilato no modelo do edema de pata.

Os animais foram pré-tratados (30 min.) com valeril salicilato 30 mg/kg (barras abertas) e cinco minutos antes da injeção de carragenina, foi injetado em um volume de 10 µL, uma solução contendo PGE₂ (30 nmol/pata), sendo o edema avaliado nos intervalos de 2 e 48 horas após a injeção de carragenina. O grupo controle (barras fechadas) foi pré-tratado com PBS.

Os resultados obtidos demonstraram que a injeção de PGE₂ reverte a inibição do edema quando avaliado em 2 horas (Figura 13A). O mesmo efeito de reversão foi observado em 48 horas (Figura 13B) quando comparado ao grupo de animais tratado com apenas com VS (barras hachuradas).

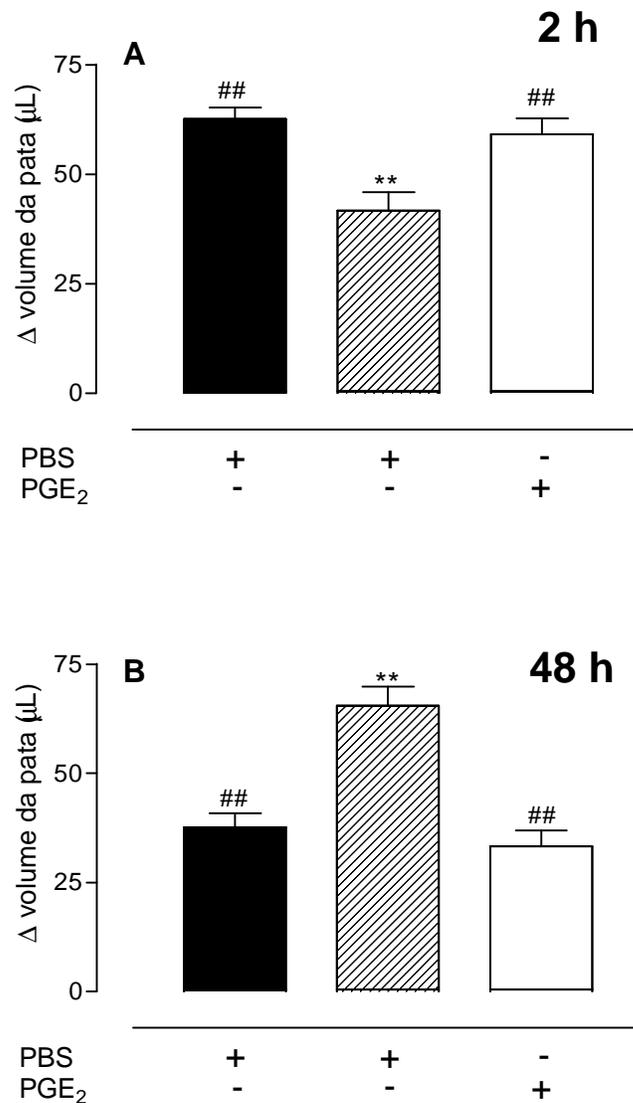


Figura 13. Efeito do tratamento profilático intraperitoneal com PBS ou valeril salicilato na dose de 30 mg/kg, sobre o edema de pata avaliado em 2 horas (A) e em 48 horas (B), após a indução com carragenina. Apenas o grupo controle (barras fechadas) foi tratado com PBS, sendo os demais grupos pré-tratados com VS. Abaixo de cada gráfico, o sinal (+) indica o grupo que recebeu injeção de PGE₂ ou PBS na pata. Cada barra equivale à média ± EPM da diferença entre pata esquerda e direita de 6-8 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo ANOVA complementadas com o teste de Dunnett sendo indicadas por asteriscos: * p<0,05 e ** p<0,01 quando comparados ao controle (barras negras); # p<0,05 e ## p<0,01 quando comparados ao VS (barras hachuradas).

4.10 Avaliação da participação da via do óxido nítrico sobre a atividade do valeril salicilato.

Na figura 14, estão representados os resultados obtidos nos animais pré-tratados com PBS (30 minutos) que, 5 minutos antes da injeção de carragenina, receberam uma injeção intraplantar de PBS, precursor do óxido nítrico, L-arginina (L-ARG) na concentração de 15 $\mu\text{mol/pata}$ ou o inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), L-nitroarginina (L-NOARG) na concentração de 2,5 $\mu\text{mol/pata}$, sendo avaliados nos tempos de 2 (Figura 14A) e 48 horas (Figura 14B) após a indução com o agente flogístico. Os resultados demonstraram que a injeção de carragenina no intervalo 2 horas promoveu um edema de $62,50 \pm 2,78 \mu\text{L}$. A injeção de L-ARG na mesma pata 5 minutos antes da carragenina foi capaz de promover um aumento para $81,67 \pm 7,50 \mu\text{L}$, sendo este aumento significativo quando comparado ao grupo controle. A injeção de L-NOARG, ao contrário do precursor de óxido nítrico, promoveu em 2 horas, uma diminuição significativa no edema para $36,67 \pm 4,22 \mu\text{L}$. Na avaliação em 48 horas, não houve diferenças estatísticas significantes. Nas figuras 14C e 14D, estão representados os resultados obtidos, desta vez, nos animais que foram pré-tratados (30 minutos) com valeril salicilato na dose de 30 mg/kg. O grupo controle (barras fechadas) recebeu um pré-tratamento com PBS. Cinco minutos antes da injeção de carragenina, os animais receberam injeções intraplantares de PBS, L-ARG ou L-NOARG nas mesmas concentrações descritas acima. Os resultados demonstraram que nos animais pré-tratados com VS que receberam injeção de PBS ou nos animais que receberam injeção de L-NOARG na pata, no intervalo de

2 horas, houve uma redução estatisticamente significativa para $41,67 \pm 4,23$ e $25,83 \pm 3,58 \mu\text{L}$, respectivamente. Entretanto, no mesmo intervalo avaliado, os animais pré-tratados com VS que receberam uma injeção de L-ARG na pata, não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados ao controle (barras fechadas; controle = $62,50 \pm 2,78 \mu\text{L}$) (Figura 14C).

Quando avaliados no intervalo de 48 horas após a injeção de carragenina, os mesmos animais que receberam injeção de PBS ou injeção de L-NOARG na pata, apresentaram um aumento no volume da pata em $65,46 \pm 4,34$ e $60,00 \pm 7,07 \mu\text{L}$, respectivamente, enquanto que, nos animais que receberam injeção de L-ARG, não houve diferença estatística significativa quando comparados ao controle (barras fechadas) ($31,67 \pm 3,22 \mu\text{L}$) (Figura 14D). Ao serem comparados ao grupo tratado somente com VS (com injeção de PBS na pata), os animais que receberam injeção de L-ARG na pata, exibiram uma redução significativa.

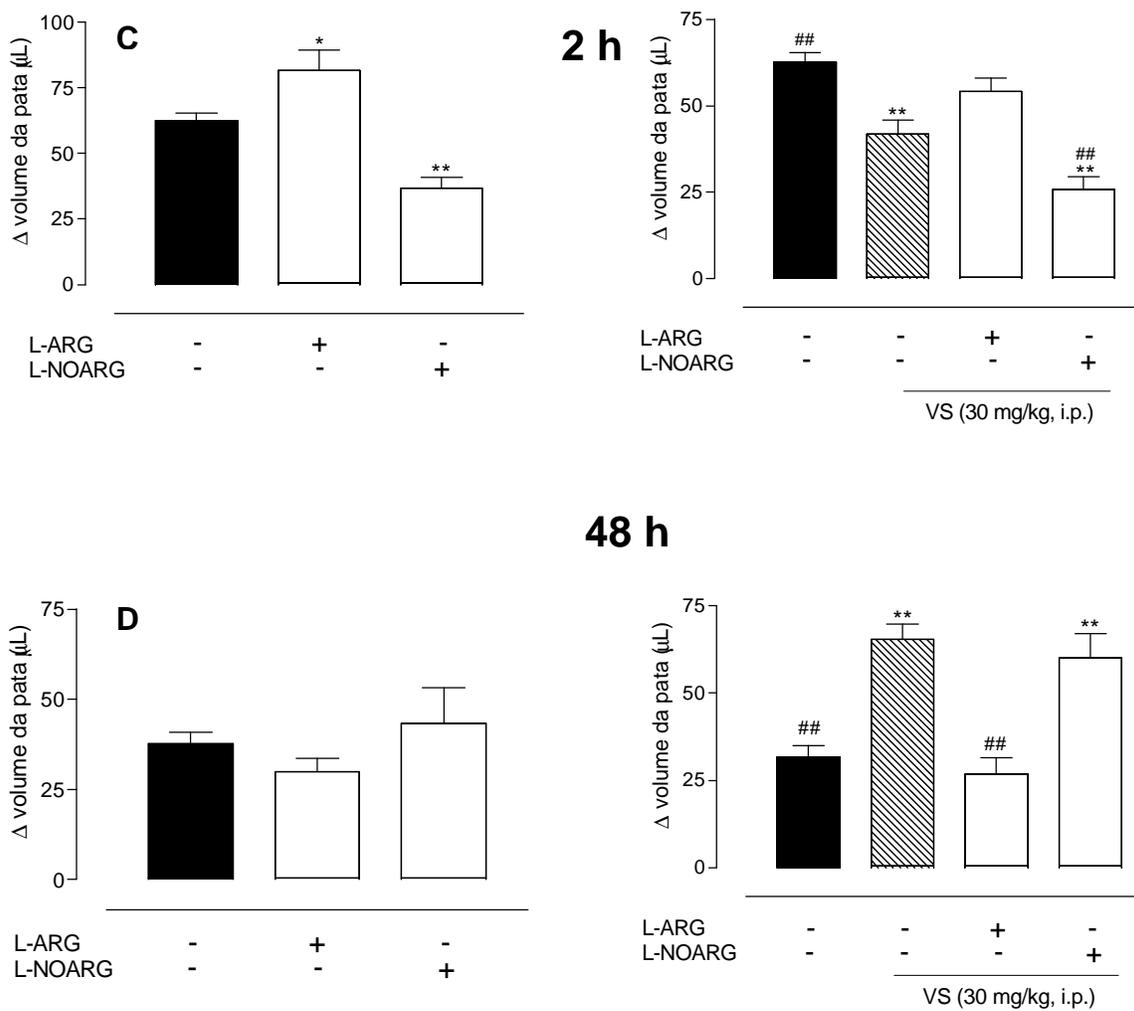


Figura 14. Efeito do tratamento profilático intraperitoneal com PBS ou valeril salicilato na dose de 30 mg/kg, sobre o edema de pata avaliado em 2 horas (A) e (C) e em 48 horas (B) e (D) após a indução com carragenina. Em (A) e (B), todos os grupos foram pré-tratados com PBS. Em (C) e (D), apenas o grupo controle (barras fechadas) foi tratado com PBS, sendo os demais grupos pré-tratados com VS. Abaixo de cada gráfico, o sinal (+) indica a substância injetada em cada grupo. Cada barra equivale à média \pm EPM da diferença entre pata esquerda e direita de 6-8 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA complementadas com o teste de Dunnett sendo indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparados ao controle (barras fechadas); # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ quando comparados ao VS (barras riscadas).

4.11. Efeito do tratamento com o inibidor da via da 5-lipoxigenase, REV5901.

As figuras 15A e 15B, demonstram os resultados obtidos com o tratamento com o inibidor da via da 5-lipooxigenase, REV5901 (30 mg/kg; 0,1 mL/animal, subcutâneo), que foi efetuado em associação com o VS onde um grupo recebeu VS + REV5901 30 minutos antes da injeção de carragenina e outros dois grupos previamente determinados receberam VS (30 min. antes) + REV5901 (24 horas após a injeção de carragenina) e VS (30 min. antes) + REV5901 (46 horas após a injeção de carragenina). Um outro grupo recebeu somente REV5901 30 minutos antes da injeção do agente flogístico.

O tratamento subcutâneo com REV5901, 30 minutos antes da injeção de carragenina, foi capaz de reduzir o edema formado para $41,42 \pm 2,68 \mu\text{L}$, sendo o controle (barras fechadas) igual a $65,00 \pm 2,89 \mu\text{L}$.

Os resultados demonstraram que, nos animais tratados com VS + REV5901 (30 min.), houve uma redução significativa para $21,43 \pm 2,60 \mu\text{L}$ no intervalo de 2 horas. (Figura 15A) No intervalo de 48 horas, todos os animais que foram pré-tratados com VS e receberam REV5901, não apresentaram aumento no edema quando comparados ao grupo controle, entretanto, quando comparados aos animais que receberam apenas VS, observou-se uma redução significativa (Figura 15B).

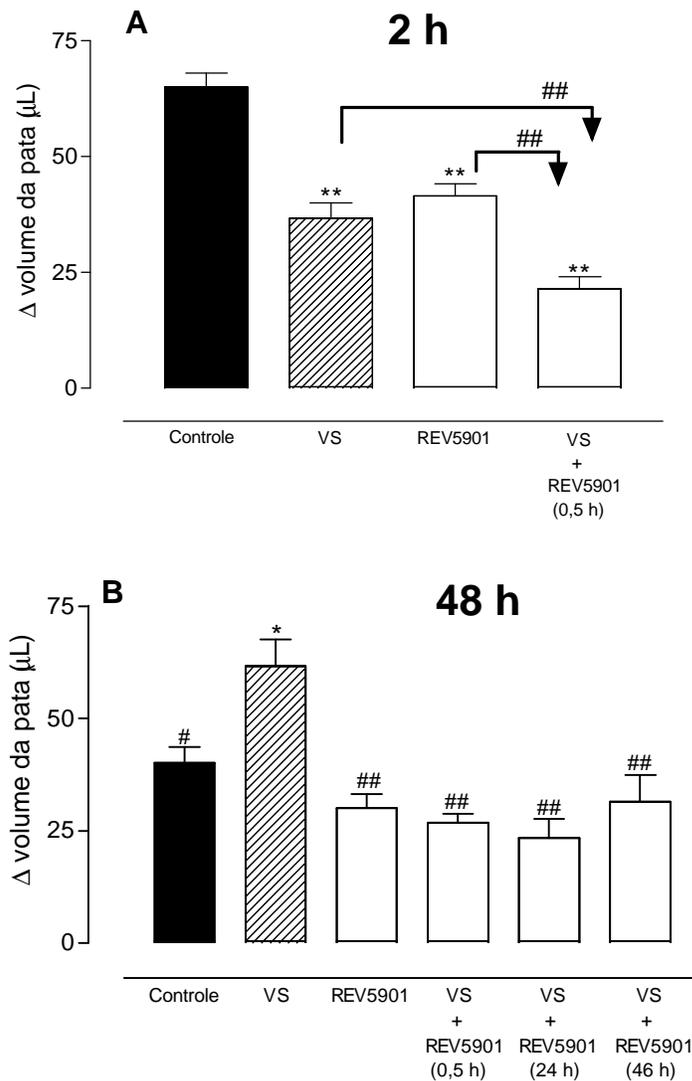


Figura 15. Efeito do tratamento profilático intraperitoneal com valeril salicilato (VS) na dose de 30 mg/kg, tratamento subcutâneo com REV5901 (30 mg/kg) ou associações de VS + REV5901 (administrados 30 min. antes da carragenina), VS + REV5901 (administrado em 24 h) e VS + REV5901 (administrado em 46 horas) sobre o edema de pata avaliado em 2 horas (A) e em 48 horas (B), após a indução com carragenina. Apenas o grupo controle (barras fechadas) foi tratado com PBS. Cada barra equivale à média \pm EPM da diferença entre pata esquerda e direita de 6-8 animais. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo ANOVA complementadas com o teste de Dunnett sendo indicadas por asteriscos: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparados ao controle (barras negras); # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ quando comparados ao VS ou REV5901.

5. DISCUSSÃO

O estudo de drogas antiinflamatórias tem contribuído não apenas para o descobrimento de fármacos que apresentem menos efeitos colaterais, mas também para uma melhor compreensão da resposta inflamatória.

O presente trabalho procurou avaliar o efeito antiinflamatório do valeril salicilato, um inibidor seletivo da COX-1, em modelos agudos de inflamação. Além disto, procurou-se contribuir para a compreensão da participação da COX-1 nas respostas aguda e tardia do processo inflamatório nos modelos de edema de pata e edema de orelha.

A injeção intraplantar de carragenina, em camundongos, produziu um edema que se desenvolveu no decorrer de duas fases características: a primeira entre 0 - 4 horas e a segunda, iniciando em 24 horas após a injeção da carragenina. Como foi demonstrado por Henriques et al. (1987), a primeira fase que compreende de 0 – 24 horas após injeção de carragenina, os neutrófilos são as células predominantes, enquanto que, durante a segunda fase, que se inicia 24 horas após a injeção de carragenina, há um intenso acúmulo de macrófagos, linfócitos e eosinófilos. Todas estas células são potencialmente capazes de liberar agentes inflamatórios como aminas vasoativas, fatores quimiotáticos, leucotrienos, fator ativador de plaquetas (PAF), componentes lipossomais e prostaglandinas.

Tem sido descrito na literatura que o edema de pata induzido pela carragenina, seria um modelo eficaz para o estudo de drogas antiinflamatórias, seletivas ou não para COX-2 (Higgs et al., 1980; Seibert et al., 1994; Chan et al., 1995). Vários estudos têm associado a COX-2 com o desenvolvimento do processo inflamatório. Por outro lado, a isoforma COX-1 seria a responsável pela manutenção de estados fisiológicos, como citoproteção gástrica e renal (Seibert et al., 1994; Smith et al., 1998). Por isso acreditava-se que a inibição da COX-1 pelos AINEs levaria ao aparecimento de reações adversas como lesões da mucosa gástrica. Por esta razão, um considerável esforço tem sido feito para o desenvolvimento de antiinflamatórios capazes de inibir seletivamente a COX-2 (Kalgutkar et al., 1998; Smith et al., 1998). No centro da estratégia da inibição seletiva da COX-2 está a suposição de que esta é a única enzima responsável pela produção de prostaglandinas em locais inflamados, entretanto, existem várias evidências sugerindo um importante componente da inflamação mediado pela COX-1.

Os resultados do presente trabalho corroboram com dados da literatura, e sugerem que, a atividade antiedematogênica parece não ser exclusividade de AINEs seletivos para a COX-2, mas também dos AINEs seletivos para a COX-1. Têm sido demonstrado que a COX-1 é expressa em locais de inflamação como articulações de pacientes com artrite reumatóide e osteoartrite, principalmente no invólucro sinovial (Siegle et al., 1998) e também, a COX-1 é responsável predominantemente pela síntese de prostaglandinas em casos de bursite em humanos (Gretzer et al., 1998). Em alguns modelos animais, a eficácia antiinflamatória dos inibidores seletivos para COX-2 só foi observada em doses

bem superiores às necessárias para inibir esta enzima (Seibert et al., 1994). Por exemplo, o inibidor seletivo para COX-2, SC58125, reduz significativamente a dor e a inflamação em ratos somente quando administrado em dose 100 vezes maior que a necessária para inibir a síntese de prostaglandinas derivadas da COX-2 (Wallace, 1999). De maneira semelhante, outros compostos com seletividade para COX-2 (NS398, nimesulide, dup697 e etodolac) reduzem significativamente a inflamação na pata de ratos em doses que inibem também a COX-1 (Wallace et al., 1998).

Bhattacharyya et al. (1995) demonstrou que o valeril salicilato (VS) apresentou um comportamento semelhante à aspirina, por promover uma inibição tempo-dependente da COX-1 com a participação de um sítio ativo ligado a serina 530. Seu mecanismo de inibição se caracteriza pela inserção do grupamento acil na hidroxila da cadeia lateral do sítio ativo desta enzima. Já a COX-2, praticamente não é inibida pelo VS, devido a diferenças na estrutura terciária da enzima, uma vez que, o seu sítio ativo é maior que o da COX-1. Além disso, sob condições apropriadas, (0.5 – 1.0 mM, 20 – 40 min. a 37 °C), VS possui a característica de inibidor irreversível de COX-1.

Os resultados obtidos demonstraram perfis diferentes na formação do edema de pata, onde o tratamento profilático com VS, ou seja, antes de iniciar o processo inflamatório, foi capaz de inibir o desenvolvimento do edema na primeira fase, indicando que esta droga possui efeito antiedematogênico neste modelo. O mesmo resultado foi observado com o pré-tratamento com outros antiinflamatórios seletivos ou não para COX-2, respectivamente o celecoxib (CEL) e indometacina (INDO). Entretanto, nos mesmos animais, quando avaliados em 48 após a injeção

da carragenina, somente os tratados com VS, apresentaram significativo aumento do edema formado em comparação ao grupo controle.

No tratamento terapêutico, duas horas após o início do processo inflamatório iniciado pelo agente flogístico, pôde-se observar que nos animais tratados com VS não houve alterações estatisticamente significantes na primeira fase do edema, enquanto que, nos animais tratados com CEL e INDO, foi observada redução significativa no intervalo de quatro horas. Nestes mesmos animais quando avaliados em 48 horas ao contrário do tratamento profilático, não apresentaram aumento no edema formado. Os resultados com os tratamentos profilático e terapêutico sugerem que no tratamento profilático com VS, descrito como um inibidor da COX-1, a alteração no perfil da resposta edematogênica em 48 horas seja decorrente do efeito do VS nos estágios iniciais da reação à carragenina.

Nantel e colaboradores (1999) no estudo sobre a distribuição e regulação da COX-2 em modelos de inflamação induzidos por carragenina observaram que, no modelo do edema de pata em ratos, a injeção de carragenina na pata, induziu um aumento na expressão do RNAm para a COX-2, bem como na produção de prostaglandina E₂ (PGE₂). Níveis máximos de COX-2 foram observados 1 hora após a injeção do agente flogístico, embora os níveis de PGE₂ apresentaram um pico em 2 horas.

Por ser expressa em altos níveis, a COX-2 passaria a ser a principal fonte de prostaglandinas em locais inflamados, e a COX-1, assumiria então, um papel secundário na síntese dos prostanóides. Com isso, o valeril salicilato, por atuar sobre a COX-1, seria pouco eficiente na inibição do edema. Estes relatos

poderiam explicar o efeito do CEL e INDO administrados duas horas após o processo iniciado.

Para avaliar se o efeito do tratamento com valeril salicilato exibido em 48 horas, seria decorrente de uma ação local, ou se seria derivado de alguma interação sistêmica, grupos de animais foram tratados por via intraplantar. Os resultados demonstraram que os animais que receberam este tratamento apresentaram em 48 horas, um perfil semelhante aos tratados por via sistêmica, sendo gradativo ao aumento da dose administrada, indicando que a atividade deste fármaco parece ser direta em alvos tissulares da pata.

O edema de orelha é um modelo para o estudo do processo inflamatório agudo, capaz de auxiliar no estudo de drogas seletivas para COX-1, COX-2 e 5-lipooxigenase (Opas et al., 1985; De Young et al., 1989). Como se pôde observar, o tratamento dos animais com VS, foi capaz de reduzir significativamente o edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico, ao contrário do tratamento dos animais com CEL. A aplicação tópica de AA na orelha de camundongos induz a síntese de PGE₂ e leucotrienos C₄ e D₄ e estas substâncias agem como principais mediadores neste modelo *in vivo* (Opas et al., 1985). Por ser a isoforma induzida, neste modelo, os níveis de PGE₂ derivados da COX-2, são mínimos ou praticamente não existem, sendo a COX-1, a isoforma responsável pela síntese deste mediador neste modelo.

No modelo do edema de orelha induzido por tetradecanoilforbol 13-acetato TPA (um produto derivado do óleo de cróton), há o desenvolvimento de um edema longo associado com um influxo de neutrófilos com pico de edema em 6 horas e pico de atividade da mieloperoxidase (marcador indireto para a migração de

neutrófilos) em 24 horas (De Young et al., 1989). No entanto, neste protocolo experimental o VS não promoveu mudanças significativas na formação do edema enquanto que o tratamento com CEL promoveu uma redução estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle.

Os resultados obtidos no edema de orelha demonstraram que o VS foi preferencialmente mais ativo no modelo induzido pelo AA (dirigido pela COX-1), sugerindo a seletividade *in vivo*, deste fármaco para a COX-1.

Para melhor compreender as contribuições relativas das isoformas da COX no processo inflamatório, Langenbach e colaboradores (1995), compararam as respostas inflamatórias de camundongos deficientes para a COX-1 e COX-2. Em estudos iniciais, foram utilizados, ácido araquidônico (AA) e tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) para induzir o edema na orelha de camundongos como uma medida do processo inflamatório. Nos animais deficientes para COX-1, mas não para a COX-2, o edema induzido por ácido araquidônico foi 70% menor, quando comparado ao grupo de animais controles. O edema de orelha em camundongos deficientes para COX-1 teve seu pico de formação entre 1-2 horas após o tratamento com AA. Similar aos animais controle, o edema foi reduzido aos níveis próximos ao normal em 6 horas, indicando que a indução da COX-2 não é um fator significativo no edema induzido por AA.

Para o TPA, têm sido descrito que este induziu a formação de edema tanto em animais deficientes para COX-1 e COX-2 quanto em animais controle. Esta reação foi inesperada, pois a COX-2 é induzida por TPA e acredita-se ser esta a resposta inflamatória mediada por este agente. Langenbach et al. (1995) demonstraram ainda que o edema de orelha induzido por TPA não apresentou

diferença entre os genótipos em 48 horas de monitoramento. Uma vez que os animais deficientes para COX-2 expressam COX-1, é possível que esta enzima contribua com níveis de prostaglandinas suficientes para que este processo inflamatório possa ocorrer.

Antes de avaliar a participação de outros sistemas na atividade exibida pelo valeril salicilato, houve a necessidade de observar se este efeito em 48 horas seria específico do tratamento com esta droga; outros fármacos como, por exemplo, ácido acetilsalicílico (AAS) - que inibe irreversivelmente a COX-1 por uma acetilação da porção ser530 no sítio ativo da enzima (DeWitt et al., 1990), resveratrol - um inibidor seletivo para a COX-1 que inibe a atividade de peroxidase desta enzima (Jang et al., 1997) e o SC560, um inibidor seletivo para a COX-1 que apresenta uma potencia cerca de 700 vezes maior em relação a COX-2 (Smith et al., 1998), foram avaliados, sendo administrados de forma profilática e observados nos intervalos de 2 e 48 horas após a injeção de carragenina. Os resultados demonstraram que os tratamentos com o AAS e com SC560, foram capazes de promover aumento significativo do edema quando avaliados em 48 horas. Estes resultados poderiam sugerir que os efeitos apresentados com o VS e com AAS poderiam ter componentes derivados de um efeito independente da inibição da ciclooxigenase, uma vez que são derivados do ácido salicílico (salicilatos) e, dentre seus efeitos antiinflamatórios independentes da atividade sobre a ciclooxigenase, tem sido descrito na literatura que estas drogas podem interferir com a expressão da COX-2. Entretanto, os relatos existentes são conflitantes, pois, alguns estudos têm demonstrado que podem inibir a expressão da COX em células isoladas, enquanto outros demonstram que não há qualquer atividade dos

salicilatos sobre a expressão das isoformas da ciclooxigenase (Amann e Peskar, 2002). Porém, ao observar o perfil de resposta exibido pelo tratamento com SC560, que dentre os inibidores da COX-1 avaliados é o mais seletivo, não sendo derivado de salicilatos, os indícios de que a inibição inicial da COX-1 seria o componente mais intrinsecamente relacionado ao edema observado em 48 horas, se tornaram mais evidentes.

Com a intenção de avaliar a importância da atividade enzimática da COX-1 no início do processo inflamatório, animais foram pré-tratados com valeril salicilato e 5 minutos antes da injeção de carragenina, receberam injeção de PGE₂ na pata (na tentativa de repor os níveis que deixariam de ser sintetizadas devido ao tratamento), sendo avaliados nos intervalos de 2 e 48 horas após a indução do processo. Os resultados demonstraram que a administração de PGE₂ foi capaz de reverter o efeito antiinflamatório observado com o tratamento com valeril salicilato, ocasionando em edema semelhante ao grupo controle (tratado com PBS). Os mesmos animais quando avaliados em 48 horas, também, apresentaram níveis semelhantes ao controle e estatisticamente diferentes quando comparados com os animais tratados com valeril salicilato. Estes resultados dão o indício de que no modelo avaliado, a atividade da COX-1 parece ser importante na fase inicial do processo e esta, de alguma maneira, interfere na fase tardia do edema de pata.

De acordo com os resultados apresentados, nos animais tratados com as drogas que inibem a COX-1 (VS, AAS e SC560), foi observado em 48 horas, um aumento no edema formado, no modelo do edema de pata em camundongos. Utilizando o precursor de óxido nítrico (NO) L-arginina (L-ARG) e o inibidor da óxido nítrico sintase (NOS) L-nitroarginina (L-NOARG), procurou-se avaliar a

participação da via do NO sobre o efeito apresentado pelo tratamento com valeril salicilato.

Os relatos que evidenciam participação da via do óxido nítrico na modulação da atividade das isoformas da ciclooxigenase são contraditórios, pois alguns trabalhos indicam que o NO inibe a produção de prostaglandinas, enquanto outros indicam o contrário. Clancy et al. (2000) relataram que há um “*cross-talk*”, ou seja, uma comunicação entre o NO e as isoformas da ciclooxigenase. Utilizando macrófagos e fibroblastos deficientes para a COX-1 ou para a COX-2 provenientes de camundongos, estes pesquisadores observaram que o NO aumentava a produção de PGE₂ nas células deficientes para a COX-2, mas não nas células deficientes para a COX-1. O mesmo efeito foi observado quando macrófagos deficientes para a COX-1 foram estimulados com LPS, indicando que o NO poderia inibir a produção de prostaglandinas (PGs) derivadas da COX-2 e aumentar a produção de PGs derivadas da COX-1. Os relatos apresentados por este grupo sugerem que a inibição da atividade da COX-2 é consequência da diminuição da expressão da COX-2, acompanhado por uma nitração no sítio catalítico da enzima, sendo responsáveis pela diminuição da síntese de prostanóides (Gunther et al., 1997; Goodwin et al., 1998). Em contraste aos efeitos do NO sobre a COX-2, os autores não observaram nenhuma evidência para a nitração da COX-1. Entretanto, a ativação da COX-1 poderia ocorrer por um efeito alostérico subsequente a S-nitrosilação nos resíduos de cisteína, que estimularia a atividade do sítio catalítico da enzima conforme relatado por Hajjar et al. (1995).

Com base nos relatos acima, os resultados deste trabalho sugerem que, nos animais pré-tratados com VS, a injeção de L-ARG antes da injeção de

carragenina, poderia contribuir para a produção de PGs através da modulação da atividade da COX-1, restaurando os níveis destas PGs à situações próximas da normalidade, e assim, fazendo com que exerçam seu papel fisiopatológico na inflamação. Porém, deve ser levado em consideração que o papel óxido nítrico não restringe somente ao seu efeito modulador sobre a atividade e expressão da COX. Seu envolvimento durante o processo inflamatório pode estar relacionado ao aumento da permeabilidade vascular e edema através de alterações no fluxo sanguíneo local. Além disso, o NO pode reagir com espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido) formando principalmente peroxinitrito (ONOO^-), uma potente molécula oxidante capaz de induzir peroxidação lipídica e dano celular (Salvemini et al., 1996). Outro fator que deve ser levado em consideração é a interferência principalmente do NO sobre a atividade de fatores de transcrição como, por exemplo, o NF- κ B. Lawrence et al. (2001) investigando o papel do NF- κ B na resolução do processo inflamatório, observaram que ativação deste fator de transcrição em leucócitos recrutados durante o início da inflamação, está associada com a expressão de genes pró-inflamatórios, enquanto que sua ativação durante a fase de resolução da inflamação está associada com a expressão de genes antiinflamatórios e indução de apoptose, necessária para que o processo de resolução ocorra, sugerindo com isso que o NF- κ B possui um papel antiinflamatório, estando envolvido na regulação da resolução inflamatória.

Recentemente, Zhang et al. (2002), relatou um efeito compensatório da expressão das isoformas da COX e, em macrófagos peritoneais provenientes de camundongos deficientes para a COX-1 e COX-2. Além disto, em células

deficientes para a COX-1, houve um aumento na expressão das enzimas fosfolipase A₂ (PLA_{2c}) e 5-lipooxigenase (5-LOX) marcante quando comparado ao controle ou às células deficientes para a COX-2. Diante destes fatos, procurou-se avaliar se a 5-LOX poderia contribuir para a formação do edema em 48 horas em animais tratados com VS. Sob esta hipótese foi utilizado um inibidor da 5-LOX (REV5901), onde foi observado que os grupos de animais que foram pré-tratados com VS e posteriormente tratados com REV5901, apresentaram redução no edema tanto em 2 quanto em 48 horas. A inibição da atividade enzimática da COX-1 em modelos de edema em camundongos, aparentemente, pode promover um desequilíbrio a favor da produção de leucotrienos, que possuem uma importante atividade como mediador da inflamação. Dentro de concentrações que variam de picomolar à micromolar, o leucotrieno B₄ promove: quimiotaxia para neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos; agregação de neutrófilos e eosinófilos; indução da degranulação de neutrófilos e liberação de enzimas lisossomais; modulação da dor induzida por reações inflamatórias e modulação de certas respostas imunes (para revisão ver Bertolini et al., 2001).

Apesar de estudos com AA, TPA e carragenina em animais deficientes para COX, indicarem que a COX-1 e a COX-2 podem contribuir com prostaglandinas para a fase aguda da resposta inflamatória, a contribuição de cada isoforma na produção de prostaglandinas pode depender do estímulo inflamatório, do tempo após o dano e dos níveis relativos de cada isoforma nos tecidos alvos (Langenbach et al., 1999).

De acordo com a literatura recente, o conceito de que a COX-1 seria responsável apenas pela produção de prostaglandinas relacionadas a eventos

fisiológicos e sua inibição relacionada aos efeitos adversos dos AINEs, parece estar sendo superado. Alguns trabalhos recentes relacionam o dano gástrico com a inibição de ambas as isoformas e não apenas à inibição da COX-1 (Wallace et al., 2000; Tanaka et al., 2001). Outros evidenciam a participação da COX-1 em eventos de nocicepção (Ochi et al., 2000).

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a COX-1 possui um importante papel no início do desenvolvimento do processo inflamatório e esta atividade inicial, parece ter grande influência na fase tardia.

6. CONCLUSÕES

De maneira geral, os resultados obtidos no modelo do edema de pata e no modelo do edema de orelha em camundongos indicam que:

- O tratamento profilático intraperitoneal com valeril salicilato (VS), foi capaz de reduzir o edema de pata formado na primeira fase (até quatro horas após a injeção de carragenina), indicando que a COX-1 produz substâncias biologicamente ativas neste modelo, com importante participação para a formação do edema no início do processo.
- Os mesmos animais avaliados na primeira fase (até quatro horas) foram avaliados na segunda fase do edema (24 – 72 horas após a injeção de carragenina) e, no intervalo de 48 horas, os resultados demonstraram que houve um aumento no edema formado, indicando que a inibição da COX-1, antes do início do processo, altera o perfil de formação do edema, promovendo um retardo na resolução do processo.
- Os resultados ainda demonstram que este não é um efeito específico do VS, uma vez que, tratamentos com ácido acetilsalicílico e SC560, apresentaram o mesmo perfil de resposta em 48 horas.
- O tratamento com VS foi capaz de reduzir o edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (AA), mas não pelo óleo de cróton (OC), enquanto que, o celecoxib, apresentou efeito contrário, indicando que a COX-1 é uma das enzimas chave para o processo edematogênico induzido por AA, enquanto

que a COX-2 teria maior participação no modelo induzido por OC. Além disso estes resultados também podem sugerir a seletividade do VS.

- A injeção de PGE₂ cinco minutos antes da injeção de carragenina, reverteu o efeito do VS na primeira fase do edema de pata, quando comparado ao controle. Isto indica que a produção inicial de prostaglandina parece ser essencial para o processo agudo da inflamação. Dentre outros fatores, há relatos na literatura que relacionam as PGE₂, principalmente derivadas da COX-1 à expressão da COX-2 (Nantel et al., 1999).
- O óxido nítrico (NO) parece modular, de alguma forma, a atividade da COX ou ainda a ativação de fatores de transcrição como o NF-κB, pois a injeção do precursor L-ARG, reverte o efeito do VS na primeira fase. Vale ressaltar, que o NO possui atividades sobre vasos sanguíneos e migração celular, o que deve ser levado em consideração.
- Relatos na literatura indicam que em macrófagos peritoneais deficientes para a COX-1, há um aumento da expressão da fosfolipase A₂ e da 5-lipooxigenase. Foi investigada a participação da via da 5-lipooxigenase utilizando o inibidor REV5901. Os resultados apresentados demonstraram que tanto o tratamento profilático, quanto os tratamentos feitos em 24 e 46 horas foram capazes de reduzir o edema formado em 48 horas. Isto indica que há a participação desta via no efeito edematogênico provocado pela inibição da COX-1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKARASEREENONT, P; MITCHEL, P; APPLETON, I; THIEMERMANN, C; VANE, JR. Involvement of tyrosine kinase in the induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by endotoxin in cultured cells. **Br. J. Pharmacol.** 1994; 113:1522-1528.
- AMANN, R; PESKAR, BA. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. **Eur. J. Pharmacol.** 2002; 447(1):1-9.
- ARIAS-NEGRETE, S; KELLER, K; CHADEE, K. Proinflammatory cytokine regulate cyclooxygenase-2 RNAm expression in human macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1995; 208:582-589.
- BERGSTRÖM S. The prostaglandins: from the laboratory to the clinic. Nobel Lecture. **Physiology or Medicine.** 1982, 8 dec:93 - 112.
- BERTOLINI, A; OTTANI, A; SANDRINI, M. Dual Acting Anti-Inflammatory Drugs: a reappraisal. **Pharmacological Research.** 2001; 6: 437-450.
- BHATTACHARYYA, DK; LECOMTE, M; DUNN, J; MORGANS, DJ; SMITH, WL. Selective inhibition of prostaglandins endoperoxide synthase-1 (cyclooxygenase-1) by Valerylsalicylic acid. **Arch. Biochem. Bioph.** 1995; 317(1): 19 - 24.
- BHATTACHARYYA, DK; LECOMTE, M; RIEKE, C; GARAVITO, RM; SMITH, WL. Involvement of arginine 120, glutamate 524, and tyrosine 355 in the binding of arachidonate and 2-phenylpropionic acid inhibitors to the cyclooxygenase active site of ovine prostaglandin endoperoxide H synthase-1. **J. Biol. Chem.** 1996; 271:2179 - 2184.
- BJARNASON, I; MACPHERSON, A; ROTMAN, H; SCHUPP, J; HAYLLAR, J. A randomized, double-blind, crossover comparative endoscopy study on the gastroduodenal tolerability of a highly specific cyclooxygenase2 inhibitor, flosulide, and naproxen. **Scand. J. Gastroenterol.** 1997; 32:126 - 130.

- CELOTTI, F; LAUFER, S. Anti-Inflammatory drugs: New multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacological Research*. 2001; 43(5):429 - 436.
- CHAN, CC; et al. In vivo pharmacology of L-745,337: a novel non-steroidal anti-inflammatory agent (NSAID) with an ulcerogenic sparing effect in rat and monkey stomach. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1994; 72, suppl. 1, 266.
- CHAN, CC; et al. Pharmacology of a selective cyclooxygenase 2 - inhibitor, L-745, 337: A novel nonsteroidal anti-inflammatory agent with an ulcerogenic sparing effect in rat and nonhuman primate stomach. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995, 274: 1531 - 1537.
- CHULADA, PC; THOMPSON, MB; MAHLER, JF; DOYLE, CM; GAUL, BW; LEE, C; TIANO, HF; MORHAM, SG; SMITHIES, O; LANGENBACH, R. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res.* 2000; 60(17): 4705 - 4708.
- CLANCY, R; VARENIKA, B; HUANG, W; BALLOU, L; ATTUR, M; AMIN, AR; ABRAMSON, SB. Nitric oxide synthase/COX cross-talk: Nitric oxide activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production. *J. Immunol.* 2000; 165:1582 - 1587.
- DE YOUNG, LM; KHEIFETS, JB; BALLARON, SJ; YOUNG, JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions.* 1989; 26 (3-4):335 – 341.
- DEWITT, DL; SMITH, WL. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85: 1412 - 1416.
- DEWITT, DL; EL-HARITH, EA; KRAEMER, SA; ANDREWS, MJ; YAO, EF; ARMSTRONG, RL; SMITH, WL. The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 5192 – 5198.
- DEWITT, DL. COX-2 selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol. Pharmacol.* 1999; 4: 625 – 631.

- DINCHUK, JE; et al. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase 2. **Nature**. 1995; 378: 406 – 409.
- DUBOIS, RN; ABRAMSON, SB; CROFFORD, L; GUPTA, RA; SIMON, LS; VAN DE PUTTE, LBA; LIPSKY, PE. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J**. 1998; 12: 1063 – 1073.
- GARAVITO, RM; DEWITT, DL. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. **Biochim. Biophys. Acta**. 1999; 1441: 278 – 287.
- GARAVITO, RM; MALKOWSKI, MG; DEWITT, DL. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and 2. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**. 2002; (68–69): 129 – 152.
- GIERSE ,J; MCDONALD, J; HAUSER, S; RANGWALA, S; KOBOLDT, C; SEIBERT, K. A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and 2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 inhibitors. **J. Biol. Chem**. 1996; 271: 15810–15814.
- GILROY, DW; COLVILLE-NASH, PR; WILLIS, D; CHIVERS, J; PAUL-CLARK, MJ; WILLOUGHBY, DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nature Med**. 1999; 5(6): 698 – 701.
- GOODWIN, DC; GUNTHER, MR; HIS, LC; CREWS, BC; ELING, TE; MASON, RP; MARNETT LJ. Nitric oxide trapping of tyrosyl radicals generated during prostaglandin endoperoxide synthase turnover. Detection of the radical derivative of tyrosine 385. **J. Biol. Chem**. 1998; 273(15): 8903 – 8909.
- GOODWIN, DC; LANDINO, LM; MARNETT, LJ. Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. **FASEB J**. 1999; (10):1121 – 1136.
- GRETZER, B; et al. Effects of diclofenac and L-745, 337, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on prostaglandin E₂ formation in tissue from human colonic mucosa and chronic bursitis. **Gastroenterology**. 1998; 114:A139. (Abstr.)

- GUNTHER, MR; HIS, LC; CURTIS, JF; GIERSE, JK; MARNETT, LJ; ELING, TE; MASON, RP. Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation. **J. Biol. Chem.** 1997; 272(27): 17086 – 17090.
- GUO, Q; WANG, LH; RUAN, KH; KULMACZ, RJ. Role of Val509 in time-dependent inhibition of human prostaglandin H synthase-2 cyclooxygenase activity by isoform-selective agents. **J. Biol. Chem.** 1996; 271: 19134 – 19139.
- HABIB, A; BERNARD, C; LEBRET, M; CREMINON, C; ESPOSITO, B; TEDGUI, A; MACLOUF, J. Regulation of the expression of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in rat peritoneal macrophages. **J. Immunol.** 1997; 158: 3845 – 3851.
- HAJJAR, DP; LANDER, HM; FRIEDA, S; PIERCE, A. Nitric oxide enhances prostaglandin-H-synthase-1 activity by a heme-independent mechanism: evidence for involvement of nitrosothiols. **J. Am. Chem. Soc.** 1995; 117: 33 – 40.
- HAWKEY, CJ. COX-2 inhibitors. **Lancet.** 1999; 353: 307 – 314.
- HEMPLE, SL; MONICK, MM; HUNNINGHAKE, GW. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase 2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. **J. Clin. Invest.** 1994; 93: 391-396.
- HENRIQUES, MGMO; SILVA, PMR; MARTINS, MA; FLORES CA; CUNHA FQ; ASSREUY-FILHO, J; CORDEIRO, RSB. Mouse paw oedema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Biol. Res.** 1987; 20(2): 243 - 249.
- HERSCHMANN, HR. Prostaglandin synthase 2. **Biochim. Biophys. Acta.** 1999; 1299: 125 - 140.
- HIGGS, GA; EAKINS, KE; MUGRIDGE, KG; MONCADA, S; VANE, JR. The effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on leukocyte migration in carrageenan-induced inflammation. **Eur. J. Pharmacol.** 1980; 66: 81 - 86.
- HLA, T; NIELSON, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1992, 89: 7384 - 7388.
- JANG, M; et al. Cancer chemopreventive activity of Resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science.** 1997; 275: 218 - 220.

- KALGUTKAR, AS; CREWS, BC; ROWLINSON, SW; GARNER, C; SEIBERT, K; MARNETT, LJ. Aspirin-like molecules that covalently inactivate cyclooxygenase-2. **Science**. 1998; 280: 1268 - 1270.
- KUJUBU, DA; HERCHMANN, HR. Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. **J. Biol. Chem.** 1992; 267: 7991 - 7994.
- LANE, NE. Pain management in osteoarthritis: the role of COX2 inhibitors. **J. Rheumatol.** 1997; 24: 20 - 24.
- LANGENBACH, R; et al. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. **Cell**. 1995; 83: 483 - 492.
- LANGENBACH, R; LOFTIN, C; LEE, C; TIANO, H. Cyclooxygenase Knockout mice – models for elucidating isoform-specific functions. **Biochem. Pharmacol.** 1999; 58: 1237 - 1246.
- LANZO, CA; BEECHMEN, JM; TALLEY, J; MARNETT, LJ. Investigation of the binding of isoform-selective inhibitors to endoperoxide synthase using fluorescence spectroscopy. **Biochemistry**. 1998; 37: 217 – 226.
- LOLL, P; PICOT, D; GARAVITO, R. The synthesis and use of iodinated non-steroidal antiinflammatory drug analogs as crystallographic probes of the prostaglandin H2 synthase cyclooxygenase active site. **Biochemistry**. 1996; 35: 7330 – 7340.
- MALKOWSKI, MG; GINELL, S; SMITH, WL; GARAVITO, RM. The X-ray structure of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 complexed with arachidonic acid. **Science**. 2000; 289: 1933 – 1937.
- MANCINI, J; RIENDEAU, D; FALGUEYRET, J; VICKERS, P; O'NEILL, G. Arginine 120 of prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. **J. Biol. Chem.** 1995; 270: 29372 – 29377.
- MARLETTA, MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.** 1993; 268: 12231 - 12234.

- MARNETT, LJ; KALGUTKAR, AS. Cyclooxygenase-2 inhibitors: discovery and future. **TIPS**. 1999; 20: 465 – 469.
- MASFERRER, JL; et al. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is anti-inflammatory and nonulcerogenic. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 1994; 91: 3228 - 3232.
- MORHAM, SG; et al. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. **Cell**. 1995; 83: 473 – 482.
- NANTEL, F; DENIS, D; GORDON, R; NORTHEY, A; CIRINO, M; METTERS, KM; CHAN CC. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Br. J. of Pharmacol**. 1999; 128: 853 - 859.
- O'BANNION, MK; SADOWSKI, HB; WINN, V. A serum-and glucocorticoid-regulated 4-kilo base mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. **J. Biol. Chem**. 1991; 266: 23261 - 23267.
- O'BANION, MK; WINN, VD; YOUNG, DA. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 1992; 89: 4888 - 4892.
- OCHI, T; MOTOYAMA, Y; GOTO, T. The analgesic effect profile of FR122047, a selective cyclooxygenase-1 inhibitor, in chemical nociceptive models. **Eur. J. Pharmacol**. 2000; 391: 49 – 54.
- OCHI, T; GOTO, T. Differential effect of FR122047, a selective cyclo-oxygenase-1 inhibitor, in rat chronic models of arthritis. **Br. J. Pharmacol**. 2002; 135: 782 - 788.
- OPAS, EE; BONNEY, RJ; HUMES, JL. Prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse ears inflamed by arachidonic acid. **J. Invest. Dermatol**. 1985; 84(4): 253 – 256.
- PAIRET, M; ENGELHARDT, G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. **Fundam. Clin. Pharmacol**. 1996; 10(1): 1 – 17.

- PILBEAM, CC; KAWAGUCHI, H; HAKEDA, Y; VOZNESENSKY, O; ALANDER, CB; RAISS, LG. Differential regulation of inducible and constitutive prostaglandin endoperoxide synthase in osteoblastic MC-3T3-E1 cells. **J. Biol. Chem.** 1993; 268: 25643-25649.
- RASKIN, JB. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory therapy. **Am. J. Med.** 1999; 106: 3S - 12S.
- RISTIMAKI, A; GARFINKEL, S; WESSENDORF, J; MACIAG, T; HLA, T. Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 α . **J. Biol. Chem.** 1994; 269: 11769 - 11775.
- SALVEMINI, D; MISKO, TP; MASFERRER, JL; SEIBERT, K; CURRIE, MG; NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenases enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1993; 7240 - 7244.
- SALVEMINI, D; et al. Nitric Oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.** 1996; 118: 829 - 838.
- SAMUELSSON, B. From studies of biochemical mechanisms to novel Biological mediators: Prostaglandin endoperoxides, thromboxanes and leukotrienes. Nobel Lecture. **Physiology or medicine.** 1982; 8 dec: 117 - 138.
- SEIBERT, K; ZHANG, Y; LEAHY, K; HAUSER, S; MASFERRER, J; PERKINS, W; LEE, L; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1994; 91(25): 12013-12017.
- SIEGLE, I; et al. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human synovial tissue. Differential elevation of cyclooxygenase-2 in inflammatory joint diseases. **Arthritis Rheum.** 1998; 41: 122-129.
- SMITH, WL. Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. **Ann. Rev. Physiol.** 1986; 48: 251-262.
- SMITH, WL; GARAVITTO, RM; DEWITT, DL. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and 2. **J. Biol. Chem.** 1996; 271(52): 33157 - 33160.

- SMITH, WL; LANGENBACH, R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. **J. Clin. Invest.** 2001; 107(12):1491 – 1495.
- SMITH, CJ; et al. Pharmacological analysis of cyclooxygenase1 in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1998; 95: 13313 – 13318.
- SPENCER, AG; et al. The membrane binding domains of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. Peptide mapping and mutational analysis. **J. Biol. Chem.** 1999; 274: 32936 – 32942.
- TANAKA, A; ARAKI, H; KOMOIKE, Y; HASE, S; TAKEUCHI, K. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal antiinflammatory drugs. **J. Physiol. Paris.** 2001; 95: 21 – 27.
- THURESSON, ED; LAKKIDES, KM; SMITH, WL. Different catalytically competent arrangements of arachidonic acid within the cyclooxygenase active site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 lead to the formation of different oxygenated products. **J. Biol. Chem.** 2000; 275: 8501 – 8507.
- THURESSON, ED; et al. Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1. The functions of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid, **J. Biol. Chem.** 2001; 276(13): 10347 – 10359.
- VANE, JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature (London).** 1971; 231: 232 – 235.
- VANE, JR; BOTTING, RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflamm. Res.** 1988; 47: 78S - 87S.
- VANE, JR; MITCHEL, JA; APPLETON, I; TOMLINSON, A; BISHOP-BALILEY, D; CROXYALL, J; WILLOUGHBY, DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and NO synthase in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1994; 91: 2046 - 2050.
- VANE, JR; BAKHLE, YS; BOTTING, JP. Cyclooxygenases 1 and 2. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 1998; 38: 97 - 120.
- VANE, JR; BOTTING, RM. Mechanism of action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. **Am. J. Med.** 1998; 104 (3A): 2s - 8s.

- WALLACE, JL; BAK, A; MCKNIGHT, W; ASFAHA, S; SHARKEY, KA; MACNAUGHTON, WK. Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. **Gastroenterology**. 1998; 115: 101- 109.
- WALLACE, JL. Distribution and expression of cyclooxygenase (COX) isoenzymes, their physiological roles, and the categorization of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Am. J. Med.** 1999; 107(6A): 11S – 17S.
- WALLACE, JL; MCKNIGHT, W; REUTER, BK; VERGNOLLE, N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. **Gastroenterology**. 2000; 119: 706 - 714.
- WHELTON, A. Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: physiologic foundations and clinical implications. **Am. J. Med.** 1999; 106: 13S – 24S.
- WONG, E; BAYLY, C; WATERMAN, HL; RIENDEAU, D; MANCINI, JA. Conversion of Prostaglandin G/H synthase-1 into an enzyme sensitive to PGHS-2 selective inhibitor by a double His⁵¹³ to Arg and Ile⁵²³ to Val mutation. **J. Biol. Chem.** 1997; 272: 9280 – 9286.
- WU, KK. Inducible cyclooxygenase and Nitric oxide synthase. In: Advances in pharmacology. August JT, Anders MW, Murad F, Coyle JT (eds), San Diego, California: Academic press Inc, pp: 179-198.
- YEDGAR, S; LICHTENBERG, D; SCHNITZER, E. Inhibition of phospholipase A₂ as a therapeutic target. **Biochim. Biophys. Acta**. 2000; 1488: 182 - 187.
- ZHANG, J; GOORHA, S; RAGHOW, R; BALLOU, LR. The tissue-specific, compensatory expression of cyclooxygenase-1 and -2 in transgenic mice. **Prostaglandins & Other Lipid Mediat**. 2002, 67(2): 121 – 135.
- ZIMMERMAN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. 1983; 16: 109-110.