

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

**MECANISMOS ADICIONAIS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES DOS
INIBIDORES SELETIVOS DA CICLOOXIGENASE-2, CELECOXIB E
ROFECOXIB, EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA EM RATOS**

Tese 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.

Orientador: Prof. Dr. João B. Calixto

**RAFAEL MOTA PINHEIRO
Florianópolis
2001**

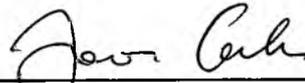
**“MECANISMOS ADICIONAIS ENVOLVIDOS NAS AÇÕES DOS
INIBIDORES DA CILCOOXIGENASE-2, CELECOXIB E
ROFECOXIB, EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA EM
RATOS ”**

POR

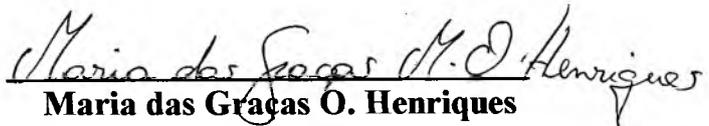
RAFAEL MOTA PINHEIRO

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

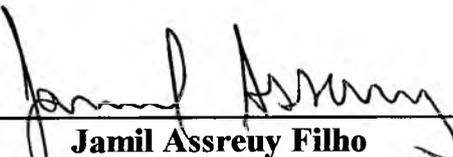
Banca Examinadora:



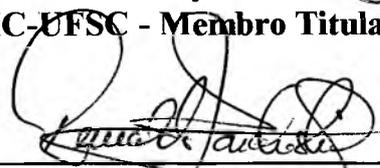
**João Batista Calixto(Orientador)
(FMC/UFSC - Membro Titular)**



**Maria das Graças O. Henriques
(FIOCRUZ/RIO - 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, 16 de fevereiro de 2001.

AOS MEUS PAIS PELO INCENTIVO E CONFIANÇA.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ii
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	19
MATERIAL E MÉTODOS	20
Animais	20
Procedimentos Experimentais	20
Indução da pleurisia e medida da resposta inflamatória	20
Indução do edema de pata	21
Drogas testadas	21
Determinação dos níveis de IL-1 β , PGE ₂ e TNF- α no exsudato pleural de ratos	22
Determinação dos níveis de IL-1 β e TNF- α na pata.....	23
Determinação dos níveis de TXB ₂	23
Determinação da concentração de nitrito/nitrato (NO _x) no exsudato pleural	24
Extração e medida da atividade da mieloperoxidase (MPO) na pata	25
Drogas e reagentes	26
Análise estatística	27
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	40
SUMMARY	55
RESUMO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pleurisia induzida por carragenina em ratos	29
Figura 2 – Edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	31
Figura 3 – Atividade de MPO no tecido da pata de ratos tratados com carragenina.....	33
Figura 4 – Níveis de TXB ₂ no sangue total de ratos.....	34
Figura 5 – Níveis de PGE ₂ no exsudato pleural de ratos tratados com carragenina.....	35
Figura 6 – Níveis de IL-1 β e de TNF- α no exsudato pleural de ratos tratados com carragenina	37
Figura 7 – Níveis de IL-1 β e de TNF- α no tecido da pata de ratos tratados com carragenina.....	38
Figura 8 – Níveis de NO _x no exsudato pleural de ratos tratados com carragenina.....	39

INTRODUÇÃO

A inflamação é a reação que o organismo apresenta em resposta à invasão de um agente agressor, e tem como principal função proteger o organismo contra infecções e reparar tecidos após lesão física (Haanen e Vermes, 1995). Existem, pelo menos cinco sinais básicos característicos da resposta inflamatória que são rubor, tumor, calor, dor e perda da função. Estes sinais ocorrem, pois as regiões inflamadas apresentam um influxo substancial de várias células inflamatórias, acompanhado por dilatação arterial, aumento do fluxo sanguíneo, extravasamento de proteínas plasmáticas e formação de edema (Haanen e Vermes, 1995; Cotran et al., 1996; McIntyre et al., 1997; Newton, 2000). O processo inflamatório é também acompanhado por aumento da expressão de múltiplas citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, e enzimas relacionadas a processos inflamatórios, além da enzima ciclooxigenase induzida (McIntyre et al., 1997; Barnes, 1998; Newton, 2000).

Desta maneira, para o desenvolvimento e a manutenção do processo inflamatório é importante a produção e a liberação de várias substâncias endógenas, conhecidas como mediadores da inflamação.

O primeiro passo enzimático na síntese de eicosanóides é a liberação do ácido araquidônico de fosfolípidos da membrana. Dependendo do tipo da célula e do estímulo, diferentes formas de fosfolipase A₂ (PLA₂), incluindo a forma citosólica (cPLA₂), o grupo II de

PLA₂ secretada (sPLA₂), ou a PLA₂ citosólica independente de cálcio (iPLA₂), exercem papel fundamental na liberação do ácido araquidônico (Yedgar et al., 2000). O ácido araquidônico é metabolizado pelas vias das enzimas, ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX) para produzir uma grande família de eicosanóides, particularmente prostaglandinas e leucotrienos (Wong e Dennis, 1990; Yedgar et al., 2000).

A ciclooxigenase, também conhecida como sintase da prostaglandina H₂ (PGHS), é uma enzima bifuncional que catalisa tanto a bis-oxigenação do ácido araquidônico para formar prostaglandina G₂ (PGG₂), quanto a subsequente redução peroxidativa da PGG₂ para formar prostaglandina H₂ (PGH₂) (Smith e Marnett, 1991; Smith e DeWitt, 1996). A PGH₂ é por sua vez transformada por uma grande variedade de enzimas ou por mecanismos não-enzimáticos, dependendo do tipo celular, ou do tecido em questão, nos prostanóides primários: prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina I₂ (PGI₂) e tromboxano A₂ (TXA₂).

A enzima ciclooxigenase foi purificada pela primeira vez a partir da vesícula seminal de bovinos e ovinos em 1976 (Miayamoto et al., 1976; Hemler et al., 1976). Seu DNA complementar foi clonado a partir da mesma fonte, em 1988, por três grupos de pesquisa diferentes (DeWitt e Smith, 1988; Merlie et al., 1988; Yokoyama et al., 1988). Como foi a primeira isoforma descoberta, foi designada COX-1 e está, de maneira geral,

constitutivamente expressa e presente na maioria dos tecidos, como por exemplo nas plaquetas, rins e no estômago (Funk et al., 1991; Kargman et al., 1996), onde parece ser a responsável por mediar processos fisiológicos.

Estudos recentes envolvendo a ação dos glicocorticóides sobre a atividade da COX em fibroblastos, monócitos e macrófagos, após a estimulação com o fator oncogênico *v-src*-, citocinas ou com lipopolissacarídeo (LPS), levaram a se pensar que existiriam dois “pools” de ciclooxigenase: um constitutivo (que não é regulado pelos glicocorticóides) e outro induzível, altamente sensível ao bloqueio pelos glicocorticóides (Raz et al., 1989; Fu et al., 1990; Han et al., 1990; Masferrer et al., 1990). As bases moleculares destas evidências foram estabelecidas em 1991 por 3 grupos de pesquisa, que relataram a clonagem de uma segunda isoforma da ciclooxigenase (Kujubu et al., 1991; O'Banion et al., 1991; Xie et al., 1991). Em todos os três casos, a COX-2, como foi denominada, foi identificada como um produto de expressão imediata relacionada com ativação mitogênica.

Esta segunda isoforma da COX não é normalmente expressa em condições fisiológicas, mas encontra-se aumentada durante processos inflamatórios, de maneira geral sob a ação de alguns estímulos, tais como, citocinas e endotoxinas bacterianas, entre outros. Além disso, foi também demonstrado em vários sistemas (*in vivo* e *in vitro*), que sua expressão é sensível ao tratamento com glicocorticóides (Fu et al., 1990; DeWitt, 1991;

Kujubu et al., 1991; Xie et al., 1991; Lee et al., 1992; Jones et al., 1993; Hempel et al., 1994).

Picot e colaboradores foram os primeiros a identificar a estrutura cristalina da COX-1 (Picot et al., 1994). Estes autores demonstraram que a COX-1 ovina existe como um homeodímero e está posicionada em uma das duas camadas da membrana celular. Análises da sua estrutura revelaram que há um longo canal hidrofóbico que constitui o sítio de ligação do substrato para a reação de ciclooxygenase, assim como o de ligação de alguns antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) (Picot et al., 1994). Uma segunda região parece ser responsável pela atividade de peroxidase.

A comparação das estruturas tridimensionais das enzimas COX-1 e COX-2, feita por estudos de sobreposição, demonstrou que as duas enzimas poderiam ser sobrepostas e que os resíduos que formam o canal por onde o substrato é ligado, o sítio catalítico, e os resíduos imediatamente adjacentes são idênticos com exceção de duas pequenas variações (Picot et al., 1994; Kurumbail et al., 1996; Luong et al., 1996). O aminoácido isoleucina (Ile) presente na COX-1 é substituído por valina (Val) na COX-2 nas posições 434 e 523 (Vane et al., 1998), fazendo com que esta seja a principal diferença entre as duas estruturas, formando um sítio de ligação para os AINEs muito maior na COX-2. Além disso, o canal que leva ao sítio ativo da COX-2 apresenta uma reentrância lateral hidrofóbica que não é observada na estrutura da COX-1.

As proteínas das COX-1 e -2 são aproximadamente do mesmo tamanho. A COX-1 apresenta 599 resíduos de aminoácidos em humanos e 602 no camundongo, enquanto que a COX-2 apresenta 603 e 604 resíduos de aminoácidos em camundongos e humanos, respectivamente (Xie et al., 1992). Para cada isoforma da COX existe uma identidade entre os resíduos de aminoácidos de aproximadamente 90% entre as espécies. Contudo a homologia entre a COX-1 e a COX-2 é da ordem de 59 a 62%, ao nível de ácidos nucléicos e da sequência de aminoácidos, respectivamente.

As ciclooxigenases são enzimas diméricas, sendo que cada monômero contém uma região de atividade ciclooxigenase, uma de peroxidase e um grupamento heme, formando assim domínios independentes. O grupamento heme é necessário tanto para a atividade ciclooxigenase quanto de peroxidase da enzima (Otto e Smith, 1995). O rearranjo espacial da enzima forma um canal hidrofóbico longo, que permite a ligação do ácido araquidônico (Blake, 1994), local onde vários aminoácidos parecem exercer um papel fundamental. Em um modelo estequiométrico racional, o ácido araquidônico apresenta uma conformação dobrada, com seu terminal carboxílico interagindo com o grupo guanidina da Arg¹²⁰ e o seu carbono número 13 na região da Tir³⁸⁵ (Picot et al., 1994).

As diferenças bioquímicas existentes entre as duas isoformas da enzima têm sido atribuídas a mudanças decorrentes da substituição da Ile por Val. Essa evidência é reforçada pelos estudos utilizando inibidores

seletivos da COX-2; uma mutação da Ile⁵²³ para Val na proteína da COX-1, permite que inibidores seletivos da COX-2 liguem-se à enzima e inibam a formação de PGH₂ sem alterar a K_m para o ácido araquidônico (Wong et al., 1997). O mutante reverso da COX-2, no qual a Val⁵²³ é substituída por Ile, demonstra um perfil de inibição e seletividade semelhante ao observado para a enzima COX-1 não modificada (Gierse et al., 1996; Guo et al., 1996). O menor tamanho da Val⁵²³ permite que o inibidor se ligue a uma extremidade lateral no canal principal da COX-2 — acesso impedido estereoquimicamente pela maior cadeia lateral formada pela Ile na COX-1.

Os inibidores seletivos da COX-2 não se ligam ao resíduo Arg¹²⁰ o qual é usado para a ligação do ácido carboxílico do ácido araquidônico e pelos AINEs seletivos para COX-1 e não-seletivos para as duas isoformas da COX (Mancini et al., 1995; Bhattacharyya et al., 1996).

Outra diferença importante existente entre as isoenzimas é o fato da COX-1 conter uma sequência de 17 aminoácidos na porção N-terminal, enquanto que a COX-2 apresenta uma inserção adicional de 18 aminoácidos na sua porção C-terminal (Otto e Smith 1995; Herschmann 1996). Diferenças na sequência de aminoácidos entre a COX-1 e a COX-2, particularmente na região C-terminal (Vane et al., 1998), sugerem que estas duas proteínas possam estar localizadas em compartimentos celulares diferentes. A inserção na região N-terminal da COX-2 não altera os últimos

4 resíduos de aminoácidos, que formam o sinal para ligação na membrana do retículo endoplasmático nas duas proteínas (Ren et al., 1995).

Os primeiros estudos sugeriram que a COX-1 e -2 eram ambas encontradas no retículo endoplasmático e no envelope nuclear (Regier et al., 1993). Estudos posteriores revelaram contudo, que a COX-2 é encontrada no retículo endoplasmático, porém está preferencialmente associada ao envelope nuclear (Morita et al., 1995), enquanto existem dados que ainda precisam ser confirmados, indicando que a COX-1 pode ser encontrada ligada somente à membrana do retículo endoplasmático (Spencer et al., 1998).

Os DNA complementares para a COX-1 e a COX-2 foram clonados em camundongos, ratos, humanos, galinhas, e todos possuem as mesmas características gerais. O gene da COX-2 clonado de camundongos, humanos e ratos, têm aproximadamente 8 quilobases (kb) de comprimento e contêm aproximadamente 10 éxons (Fletcher et al., 1992; Tazawa et al., 1994; Sirois et al., 1993). A região promotora do gene da COX-2 é semelhante em várias espécies e contém um domínio TATA e vários sítios de ligação para fatores de transcrição, que estão implicados na regulação da expressão da COX-2. Este achado é consistente com vários estudos que demonstram que a regulação transcricional é o mecanismo chave que permite o controle dos níveis de COX-2, através da ativação de genes de resposta rápida.

Ao contrário, o gene que codifica a COX-1 tem aproximadamente 22 kb de comprimento e não contém a sequência TATA (Yokoyama e Tanabe, 1989; Kraemer et al., 1992). Este fato é consistente com a expressão constitutiva da COX-1 em vários tipos de células. Os dois genes diferem tanto com relação aos agentes promotores quanto nos seus transcritos, o que confere grandes diferenças em sua regulação.

O RNAm transcrito a partir dos genes da COX-1 e da COX-2 diferem significativamente em tamanho e são de 2.8 a 3.6 kb para a COX-1 e de 4.0 a 4.1 kb para a COX-2 (Xie et al., 1992; Goppelt-Struebe, 1995; Herschman, 1996). Uma característica única do gene da COX-2 que deve ser ressaltada, é a presença de uma região 3' não traduzida. Esta região contém várias cópias da sequência Shaw-Kamen's, que é encontrada principalmente em genes de resposta imediata e que produz um aumento na degradação do RNAm (Caput et al., 1986; Shaw e Kamen, 1986), fazendo que os transcritos do gene da COX-2 sejam rapidamente degradados. A ação de citocinas pró-inflamatórias leva a uma estabilização dos transcritos, seguido de aumento dos níveis de COX-2 (Ristimäki et al., 1994; Lyons-Giordano et al., 1993; Srivastava et al., 1994). Ao contrário, os corticóides podem desestabilizar o RNAm da COX-2 e/ou interferir na tradução do gene da enzima (DeWitt e Meade 1993; Ristimäki et al., 1996), sem afetar contudo, a expressão basal de COX-1. O mecanismo de ação

dos glicocorticóides e de outros fatores inibitórios sobre a COX-2, ainda não foi completamente elucidado.

Entre os fatores que induzem a expressão da enzima COX-2 estão incluídos: fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias (especialmente interleucina 1- β e o fator de necrose tumoral- α), endotoxinas bacterianas, aumento do cálcio intracelular, fator ativador de plaquetas (PAF) e ésteres do forbol. Vários fatores antiinflamatórios, incluindo os glicocorticóides e as citocinas antiinflamatórias, IL-10 e IL-13, inibem a expressão da COX-2 (O'Banion et al., 1991; Kujubu e Herschmann, 1992; O'Banion et al., 1992; Onoe et al., 1996).

A identificação das regiões promotoras do gene da COX-1, confirma sua classificação como uma enzima constitutiva e com baixa inducibilidade (Goppelt-Struebe, 1995). Por outro lado, o gene que codifica a COX-2 contém diversas seqüências de consensos de fatores transcricionais com relevância funcional, tais como o fator nuclear da interleucina-6 (NF-IL-6) — seqüência para a indução da COX-2 em ratos (Sirois e Richards, 1993) — ou o elemento responsivo ao monofosfato cíclico de adenosina (CRE) — responsável pela indução da COX-2 em camundongos (Xie et al., 1994; Xie e Herschman 1996) e humanos (Inoue et al., 1994). Como a maioria destes fatores de transcrição possivelmente é superexpresso em resposta à estimulação celular por citocinas pró-

inflamatórias ou fatores de crescimento, parece lógico que a COX-2 seja expressa durante processo inflamatórios.

Como não existem elementos negativos responsivos a glicocorticóides na região promotora do gene da COX-2 (Appleby et al., 1994; Kosaka et al., 1994; Xie et al., 1993b), o efeito bloqueador da dexametasona provavelmente é mediado por um mecanismo indireto (Scheinman et al., 1995; Auphan et al., 1995). Em vista destes fenômenos moleculares, fica claro que a expressão da COX-1 é só marginalmente regulada enquanto a COX-2 envolve um sistema altamente induzível.

A distribuição tecidual da COX-1 e da COX-2 difere entre as espécies estudadas (Feng et al., 1993; O'Neill et al., 1993; Seibert et al., 1994) e pode ser heterogênea dentro do mesmo tecido (Yamagata et al., 1993; Iseki, 1995). Por exemplo, a COX-2 é a principal isoforma no cérebro de ratos (Yamagata et al., 1993) e de camundongos (Seibert et al., 1994; Breder e Saper, 1996), enquanto que níveis semelhantes das duas isoenzimas foram encontrados no cérebro humano. Estas discrepâncias podem estar relacionadas a problemas na preparação de tecido "post-mortem" do cérebro humano (O'Neill et al., 1993), ou pode ser resultado de uma heterogeneidade verdadeira da distribuição das ciclooxigenases no cérebro (Yamagata et al., 1993; Breder et al., 1995). Uma distribuição heterogênea foi também observada no rim (Seibert et al., 1994; Smith e

Wilkin, 1977; Harris et al., 1994), onde a COX-2 está localizada principalmente na mácula densa (Harris et al., 1994).

Na maioria dos tecidos onde é encontrada, a COX-2 não está normalmente expressa em condições normais. Entretanto, nos neurônios do sistema nervoso central e nas células da mácula densa do aparelho justaglomerular no córtex renal a COX-2 apresenta uma expressão basal de seu RNAm (Yamagata et al., 1993; Harris et al., 1994). É importante ressaltar que este fato não representa uma expressão *constitutiva*, mas níveis de COX-2 são dinamicamente regulados nestes tecidos. Assim, a COX-2 neuronal é induzida pela ativação dos receptores NMDA, sendo reduzida por glicocorticóides endógenos (Yamagata et al., 1993). Por outro lado, o RNAm para a COX-2 no aparelho justaglomerular está aumentado depois da restrição de sal (Harris et al., 1994; Maihöfner et al., 2000).

Atualmente, as funções das enzimas COX-1 e COX-2 têm sido investigadas utilizando-se técnicas de deleção gênica. Em dois estudos distintos, os camundongos nocautes para a COX-2 desenvolveram uma patologia renal severa, caracterizada por uma grande redução do número de glomérulos funcionais. Foi observada ainda nesses estudos, displasia renal em todos animais homozigotos causada aparentemente pela parada no desenvolvimento glomerular pós-natal (Dinchuk et al., 1995; Morham et al., 1995). Com o passar do tempo os animais nocaute para a COX-2 desenvolveram esclerose glomerular, seguida de atrofia tubular e fibrose

intersticial, sendo que muitos animais morreram por falência renal. Nenhuma outra patologia significativa foi observada. Curiosamente, os animais nocaute para a COX-2 demonstraram resposta inflamatória normal em diversos testes, tais como o edema de orelha induzido por éster de forbol ou ácido araquidônico e o edema de pata induzido pela carragenina (Morham et al., 1995). Estes resultados sugerem que os prostanóides gerados pela via da COX-1 parecem suficientes para desencadear o edema, já que a resposta inflamatória nestes modelos é revertida pelos AINEs. Como esperado, o LPS não induziu a produção de prostaglandinas em macrófagos peritoneais obtidos de animais nocaute para COX-2 (Morham et al., 1995).

Em camundongos nos quais o gene da COX-1 foi removido, o RNAm e a atividade enzimática da COX-1 estão ausentes (Langenbach et al., 1995). As plaquetas destes animais não são responsivas ao ácido araquidônico e os animais apresentam úlceras intestinais ou gástricas, ou ainda disfunção renal. A presença de sangramento gástrico ou de erosões nestes animais levaram os autores a concluir que talvez existam outros mecanismos citoprotetores, tais como a síntese de óxido nítrico (NO) ou do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que se sobrepõem na ausência das PGs. Deve-se ressaltar que a síntese de PGs através da via da COX-1 exerce um papel essencial na sobrevivência dos fetos, já que a

maioria dos filhotes nascidos de animais nocautes homocigotos para COX-1 não sobreviveram (Langenbach et al., 1995).

Desde a sua descoberta, há mais de 30 anos atrás, os prostanóides têm sido descritos como mediadores químicos, cuja produção é aumentada depois de lesão tecidual ou estimulação celular. Vários estudos fornecem evidências diretas de que a produção eicosanóides, tais como a PGE₂ através da via da COX-2, tem um papel importante no processo inflamatório. A COX-2 está expressa em tecidos inflamados, tais como a sinóvia de pacientes com artrite reumatóide (Crofford et al., 1994), bem como em vários modelos de inflamação como a bolsa de ar induzida por carragenina (Vane et al., 1994) e na artrite induzida por adjuvante em ratos (Anderson et al., 1996). Por outro lado, a PGE₂ pode também regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias em vários tipos celulares (Hinson et al., 1996; Fiebich et al., 1997; Williams e Shacter, 1997). Tem sido demonstrado que fatores envolvidos na remodelagem dos tecidos (metaloproteinases, e o gene $\alpha 1(I)$ do procolágeno) também podem ser regulados pela PGE₂ (Diaz et al., 1993; Mertz et al., 1994). Além disso, anticorpos seletivos para a PGE₂, são capazes de bloquear a inflamação, hiperalgesia, bem como a produção de interleucina-6 (IL-6) na inflamação induzida pela carragenina na pata e na artrite induzida por adjuvante de Freund em ratos (Portanova et al., 1996).

Finalmente, inibidores seletivos para a enzima COX-2, são capazes de inibir a inflamação bem como a hiperalgesia quando avaliados em vários modelos experimentais (Futaki et al., 1993a; Masferrer et al., 1994; Seibert et al., 1994; Anderson et al., 1996; Masaki et al., 1998) e são agentes terapêuticos importantes no tratamento da osteoartrite e na artrite reumatóide (Lane 1997; Lipsky e Isakson 1997). Em conjunto, estas evidências mostram o importante papel exercido pela enzima COX-2 e da produção de PGE₂ nos processos inflamatórios periféricos.

A PGE₂ é um prostanóide dotado de potente atividade dilatadora da musculatura lisa vascular, sendo portanto, uma das substâncias responsáveis pela vasodilatação e pelo eritema observados na inflamação aguda (Solomon et al., 1968). Como consequência, a PGE₂ é capaz de aumentar o fluxo sanguíneo através do tecido inflamado, e dessa forma promover o extravasamento de fluidos (edema) (Williams e Peck, 1977). Apesar de não induzir dor espontânea, a PGE₂ é capaz de sensibilizar receptores para dor (nociceptores) nos terminais nervosos aferentes (i.e. induzir hiperalgesia), para outros estímulos térmicos, mecânicos e químicos, como por exemplo para a bradicinina, taquicininas e histamina (Ferreira, 1972).

A PGE₂ é também um potente agente pirético, e o aumento da sua produção estimulada pela liberação de interleucinas em infecções virais

e bacterianas, contribui para o aumento da temperatura associado a estes estados patológicos (Saxena et al., 1979).

Além dos receptores transmembrana, existe ainda um membro da família dos receptores nucleares que funcionam como fatores de transcrição, o receptor PPAR- γ , que pode ser ativado pela ligação com derivados da PGD, tal como a 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J_2 (15d-PG J_2) que são consideradas prostaglandinas antiinflamatórias (Colville-Nash e Gilroy, 2000). O mecanismo de ação destas prostaglandinas ainda não é totalmente esclarecido, porém é possível que ocorra uma mudança nas sintases das prostaglandinas que atuam sobre a PGH $_2$, causando um “desligamento” de sistemas pró-inflamatórios. Estas vias podem incluir a ativação da sintase do óxido nítrico e a liberação de citocinas, ou ainda a estimulação de mecanismos antiinflamatórios endógenos (Colville-Nash e Gilroy, 2000). Os metabólitos da PGD são os principais produtos do metabolismo do ácido araquidônico em macrófagos (Urade et al., 1989) e tem sido demonstrado que reduzem a ativação de macrófagos, bem como a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Jiang et al., 1998; Ricote et al., 1998). Existem ainda algumas evidências de que alguns AINEs poderiam atuar como agonistas do receptor PPAR- γ (Lehmann et al., 1997; Jiang et al., 1998).

A maioria dos AINEs disponíveis no mercado, foi desenvolvida com base em dois tipos de ensaios: eficácia antiinflamatória e analgésica

em animais e em estudos clínicos envolvendo a inibição da ciclooxigenase, usando uma preparação de enzima purificada que consiste inteiramente de COX-1 (Mitchell et al., 1993). Em 1971, Vane propôs que os AINEs agiam como agentes antiinflamatórios e ulcerogênicos por inibirem a síntese de prostaglandinas (Vane, 1971). A descoberta de que a isoforma induzível da COX está aumentada durante a inflamação, levou os pesquisadores a considerarem a hipótese de que o bloqueio da COX-2 poderia ser o principal mecanismo de ação dos antiinflamatórios não-esteroidais, através do qual desempenham as suas conhecidas ações antiinflamatórias, analgésicas e antipiréticas. Ao contrário, a inibição da COX-1 poderia resultar em efeitos adversos gastrointestinais, renais entre outros (Bateman, 1994). Esses achados estimularam a indústria farmacêutica a desenvolver inibidores mais seletivos para a COX-2 visando especificamente o tratamento da dor e da inflamação (Seibert et al., 1994; Chan et al., 1995).

O desenvolvimento da primeira geração de inibidores seletivos da COX-2, é representada pelos compostos DuP697 e NS-398. Estes compostos apresentam potente atividade antiinflamatória, sem no entanto causar complicações gastrointestinais (Gans et al., 1990; Futaki et al., 1994). O composto NS-398 foi o primeiro AINEs descrito com propriedades antiinflamatórias e analgésicas similares a indometacina, mas que não apresentava efeitos sobre a produção de prostanóides pela mucosa

gástrica e sobre a integridade da mucosa gástrica e renal (Futaki et al., 1993a; 1993b; Masferrer et al., 1994). Mais tarde foi demonstrado que tal fato decorria de sua alta seletividade pela enzima COX-2 em relação a COX-1 (Futaki et al., 1994).

Com o passar do tempo inibidores mais seletivos da COX-2 foram desenvolvidos, e recentemente o celecoxib (Celebra[®]) e o rofecoxib (Vioxx[®]) foram aprovados pelas autoridades regulatórias de vários países e lançados no mercado para o tratamento da dor e de certos processos inflamatórios. O composto SC-58635, também conhecido como celecoxib, e o MK-966 ou rofecoxib são inibidores seletivos e potentes da COX-2 que têm se mostrado efetivos no tratamento dos sintomas da osteoartrite e no alívio da dor aguda (Scott e Lamb, 1999; Nicoll-Griffith et al., 2000).

O estudo da seletividade de vários inibidores pela enzima COX-2, tem que ser confirmado por dados tanto de experimentos *in vivo* quanto *in vitro*, sendo que vários sistemas experimentais geram dados diferentes. Dessa forma, é possível evitar resultados até certo ponto divergentes com relação à seletividade desses compostos pela COX-2, como pode ser observado com certa frequência na literatura.

Apesar da existência de alguns trabalhos *in vivo* recentes dedicados a estudar o mecanismo pelo qual os inibidores seletivos da COX-2 atuam em modelos agudos de inflamação, a contribuição da enzima COX-2 no controle do processo inflamatório ainda permanece pouco

estabelecida (Gilroy et al., 1999; Seibert et al., 1999; Wallace,1999; Wallace et al.,1999). Desta forma, estudos adicionais pré-clínicos são necessários para que se possa esclarecer os mecanismos pelos quais essas drogas exercem seus efeitos.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Avaliar alguns dos mecanismos envolvidos na ação antiinflamatória do celecoxib e do rofecoxib, dois inibidores seletivos da COX-2 atualmente disponíveis no mercado, em modelo de inflamação aguda em ratos. Serão estudados os efeitos dos inibidores seletivos da COX-2, celecoxib e rofecoxib, sobre os níveis de prostaglanina E₂ (PGE₂) e das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), concentração de nitrito/nitrato (NO_x) no sítio inflamatório, bem como sobre o nível de tromboxano B₂ (TXB₂) no sangue total, indicativo da atividade da COX-1.

2. Comparar os efeitos destas duas drogas, com os da dexametasona, um antiinflamatório esteroidal e com os da indometacina, um AINE inibidor não-seletivo das enzimas COX-1 e -2 nos mesmos modelos experimentais.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar machos pesando entre 160-190 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 claro-escuro de 12 horas (luzes acesas as 06:00 h) e com livre acesso à água e ração. Doze horas antes de qualquer experimento os animais foram privados de ração, mas não de água. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas de manejo com animais de laboratório e normas éticas para investigação em animais conscientes (Zimmermann, 1983).

Procedimentos experimentais

indução da pleurisia e medida da resposta inflamatória

A pleurisia foi induzida pela injeção intrapleural de carragenina (0.15 ml de uma solução 1% em salina estéril), de acordo com o método previamente descrito por Velo et al. (1973). Três horas depois da injeção de carragenina, os animais foram sacrificados e a cavidade pleural foi aberta. O exsudato pleural foi coletado por lavagem da cavidade com 2 ml de PBS (pH 7,4, composição: NaCl 137 mM, KCl 2,0 mM e sais de fosfato 10,0 mM) contendo heparina (10 UI ml^{-1}). Os exsudatos contaminados com sangue foram desprezados. O volume do exsudato formado foi medido.

gravimetricamente e uma alíquota foi utilizada para a quantificação do número de leucócitos totais, utilizando um contador automático Coulter Counter (modelo T890).

Indução do edema de pata

Os animais receberam injeção intradérmica (i.d.) de 0,1 ml de PBS contendo 300 μg de carragenina em uma das patas traseiras (pata direita). A pata contralateral (esquerda) recebeu o mesmo volume de PBS e serviu como controle. O edema foi avaliado em pletismômetro (Ugo Basile, Itália) de acordo com a metodologia citada por Tratsk e colaboradores em 1997, em vários intervalos de tempos (30, 60, 120 e 180 min) depois da injeção de carragenina. O edema da pata foi expresso em ml como a diferença entre as patas direita e esquerda (injetada com salina).

Drogas testadas

Uma hora antes da injeção de carragenina na cavidade pleural ou na pata, os ratos foram pré-tratados por via oral (p.o.) com indometacina (3 mg kg^{-1}), celecoxib (10 mg kg^{-1}) ou com rofecoxib (10 mg kg^{-1}). Outros grupos de animais foram tratados com dexametasona (0,5 mg kg^{-1}) por via subcutânea (s.c.), quatro horas antes da injeção de carragenina. Animais tratados com o veículo (carboximetilcelulose 0,5%) foram utilizados como controle.

As doses de celecoxib, rofecoxib, indometacina e dexametasona usadas neste estudo foram escolhidas com base em dados descritos na literatura (Kujubu e Herschman, 1992; Chan et al., 1999; Wallace et al., 1999; Muscará et al., 2000) e também com base em experimentos preliminares.

Determinação dos níveis de IL-1 β , PGE₂ e TNF- α no lavado pleural de ratos

Em um grupo de animais a pleurisia foi induzida pela administração da carragenina como descrito anteriormente. Decorridas 3 horas, os exsudatos pleurais foram coletados com 2 ml de PBS contendo heparina (10 UI ml⁻¹) e armazenados em freezer a - 70 °C até a realização dos experimentos. Nos experimentos para dosagem de PGE₂, foi adicionado às amostras 50 μ g ml⁻¹ de indometacina. As amostras do fluido pleural depois de retiradas foram imediatamente centrifugadas a 1300 x g à 4°C por 10 min (Moroney et al., 1988). O sobrenadante obtido foi rapidamente congelado e armazenado a - 70°C para medida posterior dos níveis de IL-1 β , PGE₂ e TNF- α usando kits específicos de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) de acordo com as instruções dos fabricantes. O período de armazenamento não ultrapassou 2 semanas.

Determinação dos níveis de IL-1 β e TNF- α na pata

Os níveis teciduais de IL-1 β e TNF- α foram medidos utilizando-se uma metodologia similar à descrita previamente (Francischi et al., 2000). Após a realização dos experimentos para medida do edema, os tecidos subcutâneos da pata direita traseira e o que circunda a junção tarsotibial dos animais foram removidos e homogeneizados com PBS contendo Tween 20 0,05%, fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,1 mM, cloreto de benzametônio 0,1 mM, EDTA 10 mM e aprotinina A (2 ng ml⁻¹). A solução formada foi centrifugada a 3000 x g por 10 min e o sobrenadante armazenado a - 70^oC por no máximo 2 semanas. Os níveis de IL-1 β e de TNF- α foram medidos utilizando-se kits específicos de ELISA de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Determinação dos níveis de TXB₂

A fim de avaliar o possível efeito do celecoxib e do rofecoxib e das drogas padrão nas doses utilizadas, sobre a atividade da COX-1, os níveis de TXB₂ (que nas condições deste experimento é derivado exclusivamente da COX-1 plaquetária - Brideau et al., 1996) foi dosado através de experimentos de ELISA específicos (Wallace et al., 1998).

Para tal, os animais foram anestesiados com éter etílico e uma amostra de sangue foi retirada da veia cava inferior, logo depois da medida final do volume da pata. Um ml de sangue de cada rato foi transferido para

um tubo de vidro e colocado em banho-maria à 37°C por 45 min. Transcorrido este intervalo, as amostras foram centrifugadas à 1000 x g por 10 min. O soro foi transferido para tubos Eppendorf e armazenado à - 20°C por no máximo 1 semana para medida posterior dos níveis de TXB₂.

Determinação da concentração de nitrito/nitrato (NO_x) no exsudato pleural

Em outra série de experimentos, foram analisados os efeitos dos inibidores da COX-2 e das drogas padrão sobre produção do óxido nítrico em processos inflamatórios agudo. Para tanto, a quantidade de NO_x presente no exsudato inflamatório foi medido de acordo com a metodologia descrita por Thomsen et al. (1991), com pequenas modificações. Resumidamente, as amostras de exsudato pleural foram coletadas a partir da lavagem da cavidade pleural, 3 horas após a administração da carragenina. As amostras foram inicialmente desproteinizadas com 10% de ZnSO₄. A quantidade de NO₃⁻ presente em 100 µl de cada amostra foi reduzida a NO₂⁻ por meio da adição de 10 µl de NaOH 1 N, 20 µl de formiato de amônio 2.4 M (pH 7.4), 10 µl de fosfato de sódio 0.5 M e 10 µl de *Escherichia coli* [EC ATCC 25922: diluída (1:7) em PBS]. As amostras foram encubadas por 3 horas à 37°C. O NO₂⁻ reage com o reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0.1% dihidroclorato de naftiletilediamina em

2.5% de H_3PO_4), formando um composto di-azo cuja absorvância foi medida em 540 nm.

Extração e medida da atividade da mieloperoxidase (MPO) na pata

A mieloperoxidase, é uma enzima encontrada primariamente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e em outras células de origem mielóide, e é utilizada como um indicativo indireto da quantidade de neutrófilos migrados para o sítio da inflamação (Miotla et al., 1998).

Com o objetivo de quantificar os neutrófilos que migraram e permaneceram no tecido após a injeção de carragenina na pata, utilizou-se a medida da atividade de mieloperoxidase (Williams et al., 1994) como descrito previamente por De Young e colaboradores (1989) e Miotla e colaboradores (1998), com pequenas modificações. Em um novo grupo de animais, a carragenina foi aplicada intradérmicamente na pata direita e depois de 180 minutos, os animais foram sacrificados e o tecido da pata foi retirado e homogeneizado com um tampão de NaCl 0,2% (pH 4.7) e então com um tampão gelado de NaCl 1,6% mais glicose 5%. A solução formada foi centrifugada à 10.000 rpm e 4°C por 15 min. O sedimento obtido foi resuspenso em um tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio 5% (pH 5.4) e amostras de 1 ml foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido e centrifugadas à 10.000 rpm e 4°C durante 15 min. A atividade de MPO foi dosada no sobrenadante através da mudança na

densidade ótica (D.O.) em 690 nm utilizando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,3 mM). Os resultados foram expressos em D.O. por mg de tecido.

Drogas e reagentes

Os kits de ELISA para a IL-1 β e TNF- α foram obtidos da Endogen Inc. (Woburn, MA, U.S.A.), e os de PGE₂ e de TXB₂ da Amersham Pharmacia Biotech UK Limited (England). Celebrex[®] é uma marca registrada da Searle/Pfizer (Chicago, IL, USA) e Vioxx[®] é uma marca registrada da Merck & Co. Inc. (West Point, PA, USA). Os compostos celecoxib e rofecoxib foram gentilmente doados pela Searle/Pfizer (U.S.A.) e pela Merck & Co. Inc. (U.S.A.), respectivamente.

Aprotinina A, carboximetilcelulose, dexametasona, EDTA, indometacina, carragenina lambda, tabletes de PBS, fluoreto de fenilmetilsulfonil e tetrametilbenzidina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). *Escherichia coli* (EC ATCC 25922) da American Type Cell Culture (U.S.A.). Formiato de amônio, cloreto de benzametônio, fosfato disódico de hidrogênio 12-hidratado, glicose, heparina, peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%), NaCl, NaOH, dihidroclorato de *N*-(1-naftil)etilenediamina, fosfato de sódio, sulfanilamida, Tween 20 e ZnSO₄ foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Análise estatística

Os resultados são expressos como a média \pm SEM. As porcentagens de inibição são apresentadas como média \pm SEM das inibições obtidas em cada experimento individual. A análise estatística dos dados foi realizada através de análise de variância (ANOVA) complementada com o teste de Dunnett quando necessário. Valores de P menores do que 0.05 ($p < 0.05$) foram considerados como indicativos de significância.

RESULTADOS

A quantidade de fluido pleural coletado 3 horas após a injeção intrapleural de carragenina foi de 1.11 ± 0.09 ml e o número total de leucócitos que migrou para cavidade foi de $22.19 \pm 0.77 \times 10^6$ células ml^{-1} .

O pré-tratamento dos animais com o glicocorticóide dexametasona (0.5 mg kg^{-1} , s.c., - 4 h) ou com indometacina (3 mg kg^{-1} , p.o., - 1 h) quase que suprimiu totalmente tanto o acúmulo de exsudato pleural ($84 \pm 2\%$ e $77 \pm 3\%$, respectivamente), quanto o influxo de células inflamatórias que migraram para a cavidade pleural ($66 \pm 8\%$ e $47 \pm 7\%$), respectivamente. O tratamento dos animais com celecoxib (10 mg kg^{-1} , p.o., - 1 h) ou com o rofecoxib (10 mg kg^{-1} , p.o., - 1 h) foi efetivo em reduzir significativamente o acúmulo de exsudato pleural induzido pela carragenina ($44 \pm 3\%$ e $40 \pm 6\%$, respectivamente). Por outro lado, o tratamento com celecoxib não foi capaz de inibir significativamente o influxo de células. Além disso, o pré-tratamento dos animais com rofecoxib aumentou o influxo de células para a cavidade pleural (Figuras 1A e 1B).

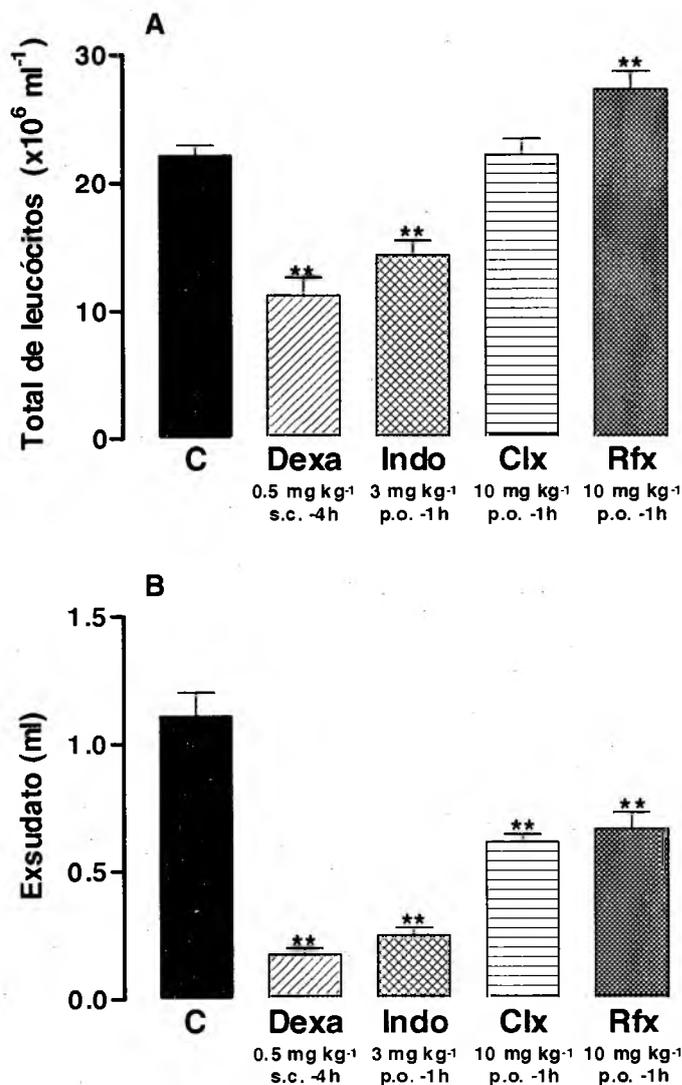


Figura 1: Efeito do tratamento prévio dos animais com dexametasona (0.5 mg kg^{-1} s.c. -4h), indometacina (3 mg kg^{-1} p.o. -1h), celecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) ou rofecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) sobre o conteúdo total de células (painel A) e sobre o volume de exsudato pleural (painel B), ambos medidos 3 h após administração de carragenina na cavidade pleural dos ratos. C = resposta controle obtida em animais tratados somente com o veículo. Cada coluna representa a média de 6-9 animais, e as barras verticais indicam o erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA e complementadas com o teste de Dunnett e são indicadas por asteriscos. ** $p < 0.01$.

A injeção intradérmica de carragenina na pata traseira do rato causou um aumento tempo-dependente do volume da pata (Figura 2A). Decorridos 180 min após a injeção de carragenina, o aumento do volume da pata foi de 0.77 ± 0.03 ml para os animais pré-tratados com o veículo. O tratamento dos animais com dexametasona (0.5 mg kg^{-1} , s.c.), indometacina (3 mg kg^{-1} , p.o.), celecoxib (10 mg kg^{-1} , p.o.) ou com rofecoxib (10 mg kg^{-1} , p.o.) reduziu significativamente o edema causado pela carragenina em $49 \pm 5\%$, $31 \pm 5\%$, 21 ± 4 e $21 \pm 4\%$, respectivamente (Figura 2B).

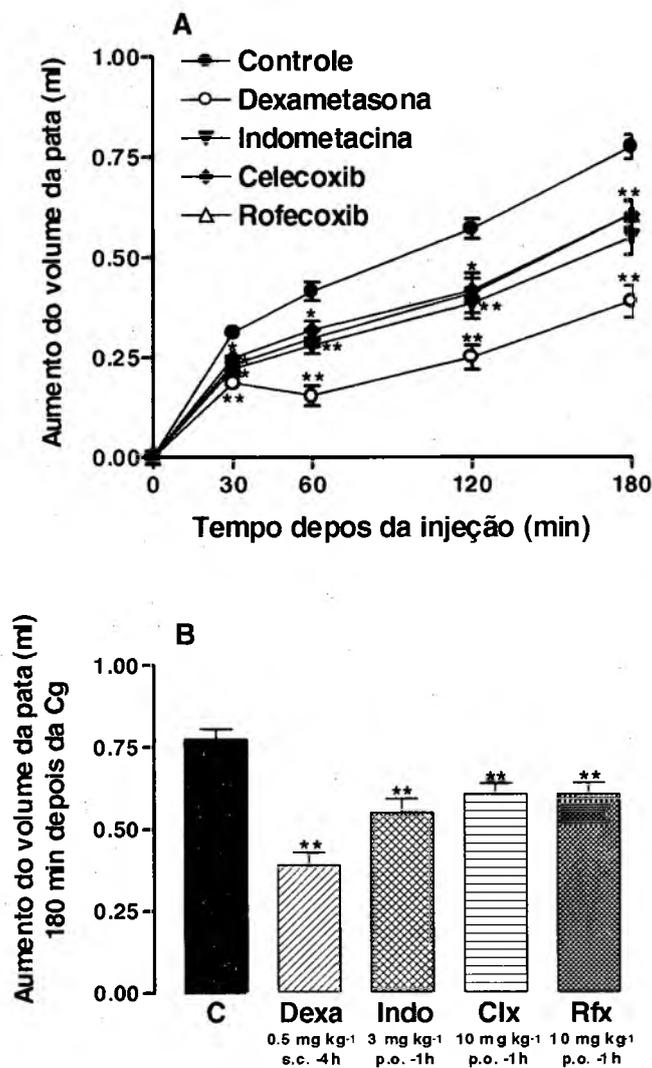


Figura 2: Efeito do tratamento prévio dos animais com dexametasona (0.5 mg kg^{-1} s.c. -4h), indometacina (3 mg kg^{-1} p.o. -1h), celecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) ou com rofecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) sobre o edema de pata induzido pela injeção de carragenina (painel A), e analisado 180 min depois da administração do irritante (painel B). C = resposta controle obtida de animais tratados somente com o veículo. Os resultados estão expressos como o aumento do volume das patas em ml e como a média de 6-9 animais \pm erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA e complementadas com o teste de Dunnet e são indicadas por asteriscos: * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$.

O possível envolvimento do sequestro de neutrófilos no tecido da pata de ratos em resposta à injeção de carragenina foi avaliado indiretamente através da medida da atividade da mieloperoxidase. A injeção intraplantar de carragenina causa um aumento da atividade da MPO, e os resultados da Figura 3 demonstram uma significativa inibição da atividade da MPO no tecido das patas dos animais tratados com dexametasona (0.5 mg kg^{-1} , s.c.) ou com indometacina (3 mg kg^{-1} , p.o.) ($71 \pm 0.5\%$ e $78 \pm 1.9\%$, respectivamente). Por outro lado, verificou-se que o tratamento dos animais com os inibidores seletivos da COX-2, celecoxib ou com rofecoxib (10 mg kg^{-1} , p.o.) causou um pequeno, porém significativo, aumento ($28 \pm 3\%$ e $16 \pm 5\%$, respectivamente) na atividade da MPO em relação aos valores observados nos animais tratados somente com o veículo.

A seletividade do celecoxib e do rofecoxib, nas doses utilizadas, pela enzima COX-2 foi confirmada pela falta de efeitos detectáveis na atividade da enzima COX-1, medida como a produção de TXB_2 pelas plaquetas. Somente o pré-tratamento dos animais com indometacina foi capaz de reduzir significativamente em cerca de $59 \pm 9\%$ os níveis de TXB_2 . Ao contrário, a dexametasona, o celecoxib e o rofecoxib não interferiram de maneira significativa nos níveis de TXB_2 (Figura 4).

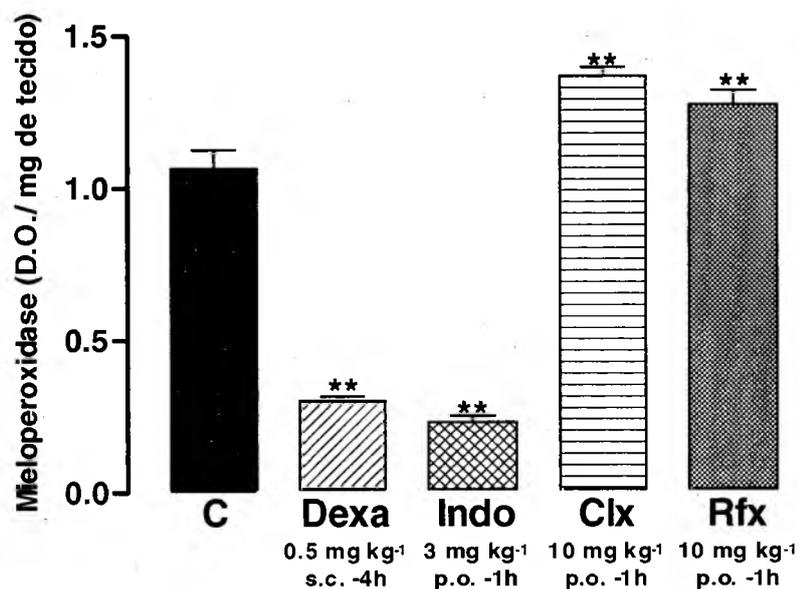


Figure 3: Efeito do tratamento prévio dos animais com dexametasona (0.5 mg kg^{-1} s.c. -4h), indometacina (3 mg kg^{-1} p.o. -1h), celecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) ou com rofecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) sobre a atividade de MPO 3 horas após a administração da carragenina. C = resposta controle obtida nos animais tratados somente com o veículo. Cada coluna representa a média de 6-9 animais e as barras verticais o erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA e complementadas com o teste de Dunnet e são indicadas por asteriscos. ** $p < 0.01$.

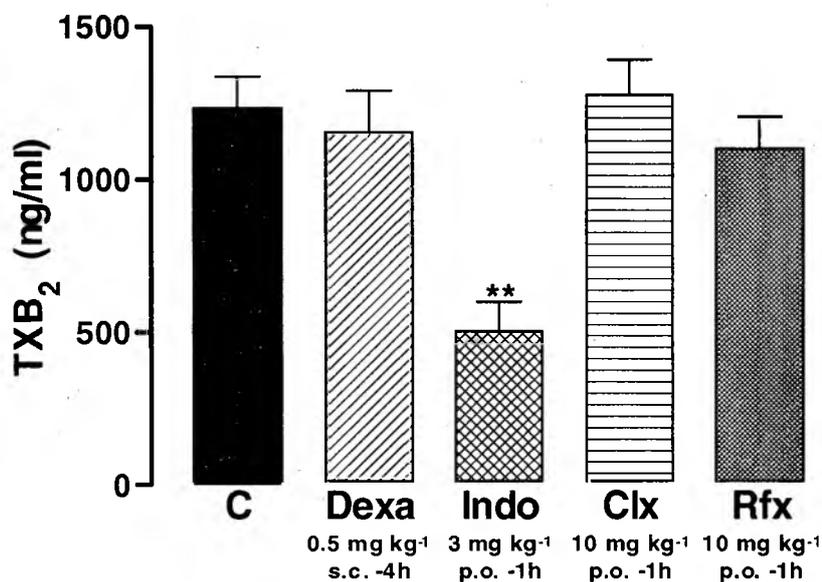


Figure 4: Determinação dos níveis de TXB₂ no sangue total de ratos tratados com o veículo (C) ou com dexametasona (0.5 mg kg⁻¹ s.c. -4h), indometacina (3 mg kg⁻¹ p.o. -1h), celecoxib (10 mg kg⁻¹ p.o. -1h) ou com rofecoxib (10 mg kg⁻¹ p.o. -1h). As amostras de sangue foram retiradas depois do fim da medida do edema da pata. Cada coluna representa a média de 5-6 animais e as barras verticais indicam o erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA e complementadas com o teste de Dunnet e são indicadas por asteriscos. ** $p < 0.01$.

A injeção intrapleural de carragenina causa um aumento na produção de PGE_2 , e os resultados mostrados na Figura 5 demonstram que a redução dos níveis de PGE_2 em exsudatos pleurais livres de células pelo tratamento dos animais com dexametasona (0.5 mg kg^{-1} , s.c.), indometacina (3 mg kg^{-1} , p.o.), celecoxib (10 mg kg^{-1} , p.o.) ou com rofecoxib (10 mg kg^{-1} , p.o.) foi significativamente igual, sendo que as porcentagens de inibições foram de $91 \pm 5\%$, $89 \pm 7\%$, $57 \pm 6\%$ e $65 \pm 12\%$, respectivamente, quando medidos 3 h depois da injeção de carragenina no modelo da pleurisia em ratos.

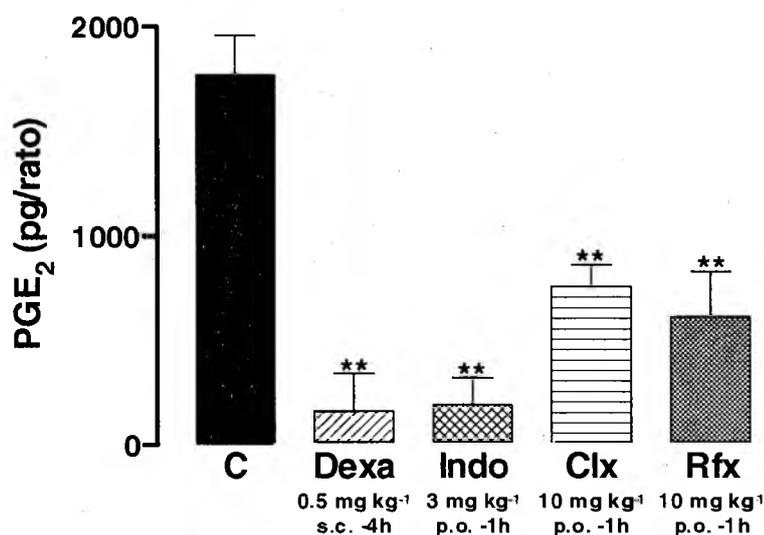


Figure 5: Efeito do tratamento prévio dos animais com dexametasona (0.5 mg kg^{-1} s.c. -4h), indometacina (3 mg kg^{-1} p.o. -1h), celecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) ou com rofecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) sobre os níveis de PGE_2 no exsudato pleural 3 horas após a administração da carragenina. C = resposta controle obtida de animais tratados somente com o veículo. Cada coluna representa a média de 5-6 animais e as barras verticais o erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA e complementadas com o teste de Dunnet e são indicadas por asteriscos. ** $p < 0.01$.

Foi observado que a carragenina administrada intrapleuralmente aumentava os níveis de IL-1 β e de TNF- α , e o pré-tratamento prévio dos animais com dexametasona (0.5 mg kg⁻¹, s.c.) foi capaz de reduzir em 11 \pm 2% e 44 \pm 4% os níveis de IL-1 β e de TNF- α no exsudato pleural causado pela injeção de carragenina (Figuras 6A e 6B). Da mesma forma, esses mesmos tratamentos reduziram em 88 \pm 1% e 16 \pm 3%, os níveis de IL-1 β e de TNF- α , respectivamente quando avaliado no tecido obtido das patas dos ratos (Figuras 7A e 7B). Por outro lado, o tratamento com indometacina (3 mg kg⁻¹, p.o.) aumentou significativamente (30 \pm 5% e 318 \pm 13%) os níveis de IL-1 β e de TNF- α no exsudato pleural livre de células e em 62 \pm 3% os níveis de TNF- α no tecido da pata dos ratos.

O tratamento prévio dos animais com celecoxib ou com rofecoxib não foi capaz de alterar os níveis de IL-1 β ou de TNF- α no exsudato pleural induzido pela carragenina. Entretanto, o tratamento dos animais com rofecoxib, mas não com celecoxib, causou aumento de 24 \pm 3% nos níveis de TNF- α quando medido nas patas tratadas com carragenina (Figura 7B).

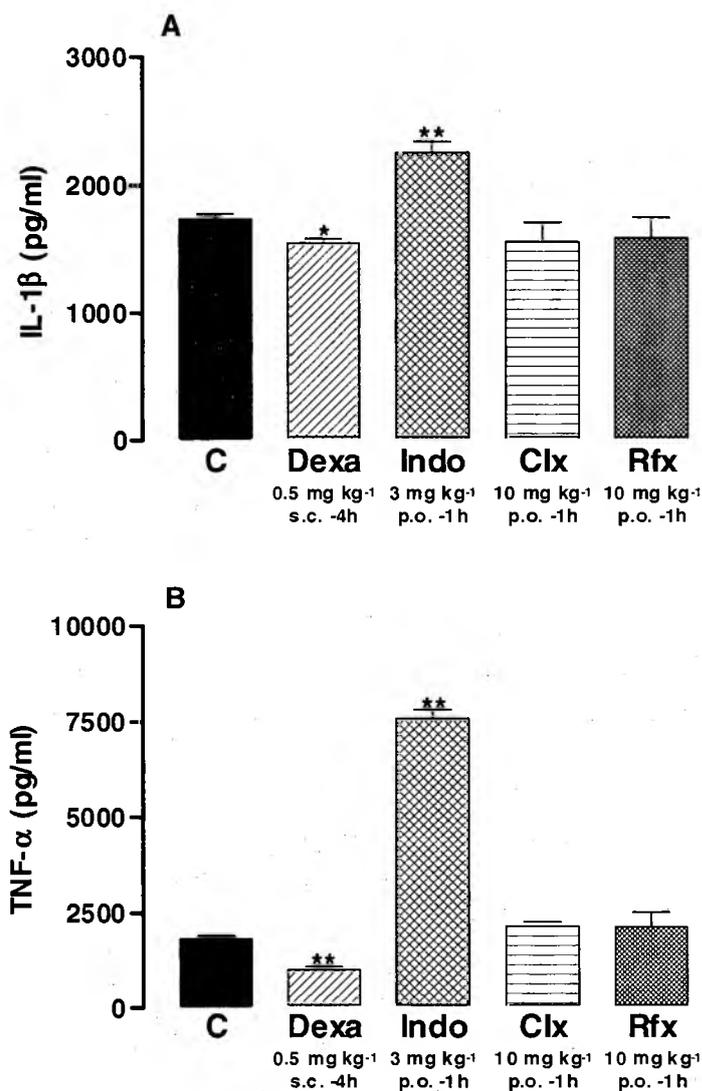


Figura 6: Efeito do tratamento prévio dos animais com dexametasona (0.5 mg kg^{-1} s.c. -4h), indometacina (3 mg kg^{-1} p.o. -1h), celecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) ou com rofecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) sobre os níveis de IL-1 β (painel A) e TNF- α (painel B) no exsudato pleural induzido por carragenina. C = resposta controle obtida de animais tratados somente com o veículo. Cada coluna representa a média de 4-6 animais e as barras verticais indicam o erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA e complementadas com o teste de Dunnet e são indicadas por asteriscos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

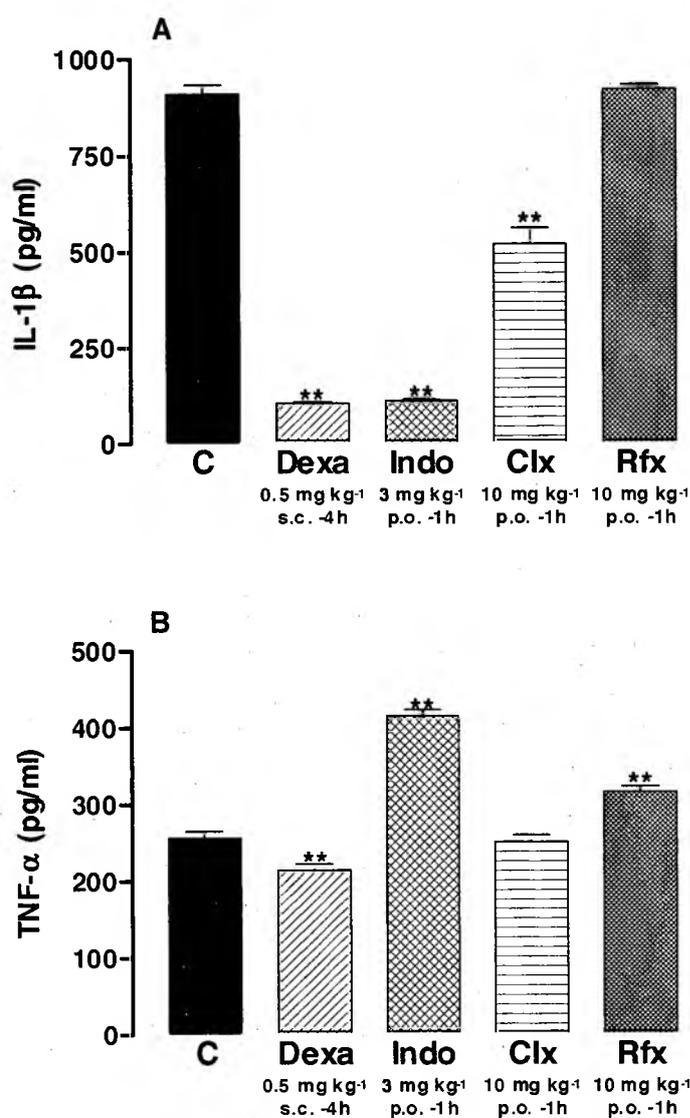


Figura 7: Efeito do tratamento prévio dos animais com dexametasona (0.5 mg kg^{-1} s.c. -4h), indometacina (3 mg kg^{-1} p.o. -1h), celecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) ou com rofecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) sobre os níveis de IL-1 β (painel A) e TNF- α (painel B) no tecido da pata de ratos avaliados 3 horas após a administração da carragenina. C = resposta controle obtida de animais tratados somente com o veículo. Cada coluna representa a média de 5-7 animais e as barras verticais o erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA e complementadas com o teste de Dunnet e são indicadas por asteriscos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Os níveis de NO_x avaliados no exsudato pleural induzido pela injeção de carragenina estão aumentados e foram significativamente reduzidos pelo tratamento com dexametasona (0.5 mg kg^{-1} , s.c., $76 \pm 3\%$) e com indometacina (3 mg kg^{-1} , p.o., $47 \pm 4\%$). Contudo, os níveis de NO_x foram somente levemente, mas não significativamente, reduzidos pelo tratamento prévio dos animais com celecoxib (10 mg kg^{-1} , p.o., $26 \pm 6\%$) ou com rofecoxib (10 mg kg^{-1} , p.o., $19 \pm 9\%$) (Figura 8).

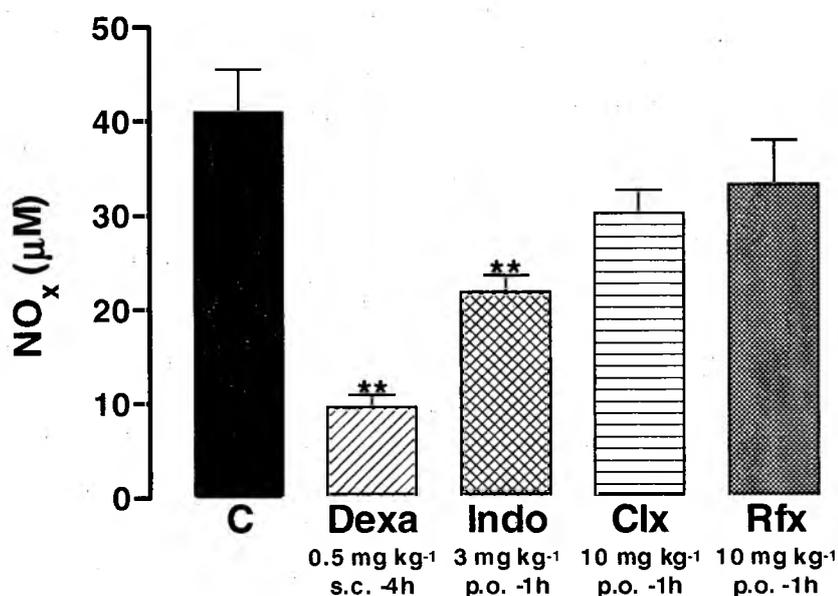


Figure 8: Efeito do tratamento prévio dos animais com dexametasona (0.5 mg kg^{-1} s.c. -4h), indometacina (3 mg kg^{-1} p.o. -1h), celecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) ou com rofecoxib (10 mg kg^{-1} p.o. -1h) sobre os níveis de nitrito/nitrato (NO_x) no exsudato pleural induzido por carragenina. C = resposta controle obtida de animais tratados somente com o veículo. Cada coluna representa a média de 4-5 animais e as barras verticais o erro padrão da média. As diferenças estatísticas foram determinadas pela ANOVA e complementadas com o teste de Dunnet e são indicadas por asteriscos. ** $p < 0.01$.

DISCUSSÃO

Relatos descritos na literatura indicam que a supressão da enzima COX-2 parece ser suficiente para desencadear efeitos antiinflamatórios e analgésicos (Boyce et al., 1994; Chan et al., 1999). Todavia, existem discordâncias a esse respeito. Alguns estudos demonstram que as doses dos inibidores da COX-2 necessárias para produzir efeitos antiinflamatórios e analgésicos, são muito maiores do que aquelas necessárias para a supressão da atividade da COX-2 (Seibert et al., 1994; Penning et al., 1997; Wallace et al., 1998). Talvez as ações destes inibidores estejam relacionadas com o bloqueio da síntese de COX-1 ou de outros mecanismos que não envolvam a COX-2 (Wallace et al., 1999). Outros estudos ainda sugerem o possível papel antiinflamatório exercido pela COX-2 em modelos inflamatórios crônicos (Willoughby et al., 2000a). Assim, apesar do grande interesse no desenvolvimento de novos inibidores da COX-2 e da explosão de estudos nesta área, ainda existem controvérsias com relação ao papel da COX-2 na modulação do processo inflamatório.

De acordo com a dosagem de TXB₂ no sangue total dos animais pré-tratados com as drogas testadas no nosso trabalho (um indicativo indireto da ativação da COX-1), os resultados demonstram claramente que o tratamento sistêmico por via oral com os dois inibidores seletivos da COX-

2, celecoxib e rofecoxib nas doses escolhidas, não foi capaz de interferir de forma significativa com a produção de TXB₂. Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com indometacina, um inibidor não seletivo das isoformas da COX, reduziu significativamente os níveis plasmáticos de TXB₂. Em conjunto, esses resultados demonstram a grande seletividade *in vivo* do celecoxib e do rofecoxib em inibir a enzima COX-2, nas doses utilizadas no presente trabalho, podendo-se excluir qualquer atividade relacionada a inibição da COX-1 nas suas ações.

A pleurisia e o edema de pata induzidos pela carragenina são modelos conhecidos de inflamação aguda, sendo largamente utilizados para investigar o mecanismo de ação de drogas antiinflamatórias esteroidais ou não-esteroidais (Velo et al., 1973; Willoughby, 1975; Almeida et al., 1980; Tomlinson et al., 1994; Tracey et al., 1995; Harada et al., 1996; Nakatsugi et al., 1996; Gilroy et al., 1998; 1999; Wallace et al., 1998; Nantel et al., 1999; Kawamura et al., 2000).

Estudos sobre a expressão da COX-1 e da COX-2 utilizando "Western blot" e imunocitoquímica em "pellets" de células obtidas da lavagem da cavidade pleural de ratos tratados com carragenina, demonstraram que os níveis de COX-1 permanecem relativamente estáveis durante o tempo analisado (Gilroy et al., 1999). Por outro lado, os níveis de COX-2, estão elevados depois de 2 horas da aplicação do agente inflamatório, diminuindo com o passar do tempo e aumentando novamente

em 48 horas (Gilroy et al., 1999). A fase inicial da resposta inflamatória está associada à expressão da COX-2, a um grande influxo de neutrófilos polimorfonucleares com a liberação de altos níveis de PGE₂ no exsudato pleural, enquanto que a expressão da COX-1 permanece constante ao longo do processo inflamatório (Gilroy et al., 1999). Estes achados sugerem que a enzima COX-2 parece exercer um papel pró-inflamatório no modelo da pleurisia durante a fase inicial da resposta evocada pela carragenina (Tomlinson et al., 1994).

O papel exercido pelas prostaglandinas formadas a partir da metabolização do ácido araquidônico por ação da enzima COX-2 em processos dolorosos, é bem descrito por alguns autores. Por exemplo, Portanova e colaboradores (1996) demonstraram que, no modelo da hiperalgesia induzida pela carragenina, a latência de retirada da pata tratada com carragenina frente a um estímulo doloroso é muito maior nos animais pré-tratados com um anticorpo altamente específico para a PGE₂. Estes achados demonstram o importante papel exercido pela PGE₂ nos processos hiperalgésicos. Além disso, o tratamento com AINEs não-seletivos para a COX-1 e -2, também causou aumento da latência de retirada da pata, sugerindo que os AINEs estariam reduzindo a dor por interferirem com a produção de PGE₂, que é largamente sintetizada pela via da COX-2 na pata inflamada (Bjorkman, 1995; Portanova et al., 1996).

Portanova e colaboradores (1996) também sugeriram que a PGE₂ parece estar intimamente envolvida na mediação da cascata inflamatória envolvida na formação do edema induzido pela injeção de carragenina na pata de ratos. Esses autores observaram que o tratamento dos animais com indometacina ou com o anticorpo monoclonal contra a PGE₂, produziu redução expressiva do edema de pata. Mais uma vez, esses resultados levaram os autores a sugerirem que AINEs estariam atenuando a inflamação por inibir a síntese de PGE₂ proveniente da via da COX-2.

Anderson e colaboradores (1996), demonstraram a importância da PGE₂ em um modelo de artrite induzida por adjuvante de Freund em ratos. Neste modelo, existem evidências sobre a formação de um infiltrado celular constituído basicamente de linfócitos T e monócitos, além de aumento da síntese de prostaglandinas. Todos estes sinais são indicativos de uma resposta inflamatória que resulta em edema de pata e por último na destruição da articulação. Os mesmos autores também demonstraram que ocorre uma mudança tempo-dependente do volume da pata dos animais tratados com adjuvante de Freund, que coincide com o aumento tecidual dos níveis de RNAm da COX-2 e dos níveis de PGE₂. Assim, o volume da pata era diminuído de maneira equivalente, pelo pré-tratamento dos animais tanto com indometacina, dexametasona ou ainda com SC-58125 (um inibidor seletivo da COX-2).

A eficácia dos inibidores da COX-2 (celecoxib e rofecoxib) e das drogas padrão (dexametasona e indometacina) testados no nosso trabalho, em inibir o edema da pata, a formação de exsudato na pleurisia e os níveis de PGE₂ induzidos pela aplicação de carragenina em ratos, é bastante semelhante àquela descrita por Anderson et al. (1996) na redução do edema e dos níveis de PGE₂ na pata de ratos injetados com adjuvante de Freund. Estes resultados claramente indicam o papel exercido pelos metabólitos do ácido araquidônico oriundos da via COX-2, particularmente a PGE₂, na modulação do processo inflamatório. Contudo, o bloqueio da síntese de PGE₂, não parece ser suficiente *per se* para produzir um amplo espectro de atividade antiinflamatória, já que em nosso estudo o pré-tratamento dos animais com os inibidores seletivos da COX-2, celecoxib e rofecoxib, apesar de reduzir os níveis de PGE₂ e a formação de edema, não foi capaz de produzir inibição significativa sobre a migração de leucócitos para a cavidade pleural e para a pata.

Além da PGE₂ outras prostaglandinas estão envolvidas no processo inflamatório agudo, como por exemplo, a PGD₂ e a 15-deoxi- Δ^{12-14} PGJ₂ (Gilroy et al., 1999). Estes mesmos autores sugeriram que 48 horas após a injeção intrapleural de carragenina em ratos (fase tardia), a COX-2 estaria envolvida na resolução do processo inflamatório. Assim, os níveis de PGE₂ no exsudato seriam mínimos e os níveis de prostaglandinas da série J (metabólitos da PGD₂) estariam elevados novamente, demonstrando

o efeito antiinflamatório da COX-2. Utilizando um inibidor seletivo da COX-2, o NS-398, Gilroy e colaboradores (1999) demonstraram que os níveis de PGD_2 e 15d-PGJ_2 , 48 horas após a aplicação intrapleural de carragenina em ratos, estava significativamente reduzido, e o processo inflamatório exacerbado, apresentando um aumento do volume de exsudato na cavidade pleural e um aumento influxo de células quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento. A reposição de PGD_2 e 15d-PGJ_2 uma hora antes do tratamento com o inibidor da COX-2 foi capaz de reverter o aumento do volume de exsudato e de células observado 48 horas após a aplicação da carragenina. De fato, tem sido sugerida a existência de uma terceira isoforma de COX, denominada de COX-3, que seria responsável pela síntese destes prostanóides com ação antiinflamatória, na fase de resolução do processo inflamatório (Willoughby et al., 2000b).

Dados da literatura (Ajuebor et al., 2000) demonstraram que, em um modelo de colite em ratos, a produção de PGD_2 , está elevada no início da indução da colite e precede a síntese de PGE_2 e o infiltrado leucocitário. Neste modelo, a reposição exógena de PGD_2 foi capaz de reduzir significativamente o infiltrado celular para o cólon, sugerindo que a PGD_2 exerce um papel importante na migração de leucócitos. Além disso, o bloqueio seletivo da COX-2 pelo celecoxib, resultou em uma completa inibição da síntese de PGD_2 no cólon, acompanhado por um aumento de

mais de duas vezes no infiltrado de leucócitos, como medido através da atividade de mieloperoxidase.

No nosso trabalho, demonstramos que o tratamento dos animais por via oral com os inibidores da COX-2, o celecoxib e o rofecoxib, não foram capazes de inibir a migração de células para a cavidade pleural 3 horas após a administração da carragenina. Resultados semelhantes foram obtidos por Waliace et al. (1999), no modelo da bolsa de ar em ratos, empregando outro inibidor seletivo da COX-2, o SC-58125. Gilroy e colaboradores (1998), utilizando um outro inibidor seletivo da COX o NS-398, chegaram as mesmas conclusões utilizando o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em ratos.

Com intuito de confirmar os dados observados na pleurisia utilizando o celecoxib e o rofecoxib, foram realizados os mesmos tratamentos em outro modelo de inflamação aguda em ratos; o edema de pata induzido pela carragenina. O tratamento com esses inibidores produziu uma redução significativa da formação de edema, mas não foi capaz de interferir com a migração de células para a pata, como demonstrado através da atividade da MPO. Ao contrário do que foi observado para os inibidores seletivos da COX-2, a dexametasona, um agente glicocorticóide, e o inibidor não seletivo da COX-1 e da COX-2 a indometacina, reduziram de maneira significativa a atividade da MPO no tecido da pata do rato, bem

como a migração de leucócitos para a pleura, explicando desta forma suas ações antiinflamatórias.

Os resultados do presente trabalho, fornecem novas evidências acerca do mecanismo de ação dos inibidores da COX-2, celecoxib e rofecoxib, e demonstram que estas drogas não são capazes de interferir com a migração de células induzida pela carragenina. Como observado no modelo de colite em ratos (Ajuebor et al., 2000), podemos sugerir também que, no modelo de inflamação aguda induzida por carragenina, os metabólitos da PGD_2 estejam exercendo papel fundamental sobre a migração de células. Além disso, uma vez que a via de metabolização do ácido araquidônico via ciclooxigenase está inibida pelo tratamento dos animais com os inibidores seletivos da COX-2, é possível que haja a participação de leucotrieno B_4 (LTB_4), um produto da via da lipooxigenase, conhecido como um dos fatores quimiotáticos endógenos mais potentes (Ford-Hutchinson et al., 1980). Ainda não foi confirmado se as alterações observadas na atividade de MPO poderiam ou não estar relacionadas com o aumento local de LTB_4 .

Existem evidências controversas quanto à regulação coordenada da sintase do óxido nítrico (NOS) e a ciclooxigenase (COX); quanto à influência direta do óxido nítrico (NO) na atividade da ciclooxigenase; e sobre os efeitos das prostaglandinas sobre a produção de NO, devido a grande multiplicidade de sistemas experimentais (Clancy et al., 2000).

A sintase do óxido nítrico e a COX são componentes importantes na manutenção da homeostase tecidual, assim como participam de processo patofisiológicos. Assim como a ciclooxigenase, a sintase do óxido nítrico apresenta tanto a forma constitutiva quanto a isoforma induzida (Nathan e Xie 1994). A forma induzida da sintase do óxido nítrico (iNOS) foi pela primeira vez clonada de macrófagos murinos onde se mostrou ser dramaticamente aumentada por estímulos inflamatórios, particularmente em combinação com interferon- γ (INF- γ). A região promotora do gene codificador da INOS compartilha muitas características com o promotor da COX-2, o que inclui a sequência TATA e elementos de resposta ao NF- κ B e NF-IL-6 (Lowenstein et al., 1993; Xie et al., 1993a). Além disso, a expressão da INOS é reduzida por hormônios glicocorticóides e citocinas antiinflamatórias como a IL-10 (Radomski et al., 1990; Gazzinelli et al., 1992; Szabó et al., 1994). Desta forma, é possível que a COX-2 e a iNOS sejam reguladas coordenadamente durante o processo inflamatório (Vane et al., 1994; Swierkosz et al., 1995).

Apesar de várias evidências sugerindo a interação entre os produtos resultantes das vias da COX e NOS, os dados existentes na literatura ainda são controversos (Clancy et al., 2000). Assim, alguns trabalhos demonstram que as respostas inflamatórias causadas pela carragenina, tanto na pleurisia quanto no edema de pata em ratos, são mediadas também pelo aumento de óxido nítrico (NO), principalmente

através da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (NOS), quanto avaliado pelos níveis de nitrato/nitrito (NO_x) liberados de células inflamatórias (Tomlinson et al., 1994; Salvemini et al., 1996; Sautebin et al., 1998). Tracey e colaboradores em 1995 demonstraram o papel do óxido nítrico na resposta inflamatória induzida pela carragenina na cavidade pleural de ratos, e a atividade da sintase do óxido nítrico induzida está aumentada nas células inflamatórias da cavidade pleural de ratos. Outros autores também relataram que as respostas inflamatórias, assim como o aumento da produção de óxido nítrico e dos níveis de PGE_2 que se sequeem à administração da carragenina, são inibidos após tratamento com inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS) (Tomlinson et al., 1994; Salvemini et al., 1996; Sautebin et al., 1998). Hajjar e col. (1995) descreveram que o NO também pode aumentar a síntese de prostanóides, por meio de reações de nitrosilação do resíduo de cisteína existente no domínio catalítico da COX. A estimulação ou a inibição da produção de óxido nítrico, em tecido pulmonar de ratos, está associada ao aumento ou a redução dos metabólitos da via do ácido araquidônico, sugerindo desta forma que o óxido nítrico possa modular a produção de prostanóides, resultando na amplificação da resposta inflamatória (Sautebin e DiRosa, 1994).

Nossos resultados confirmam e ampliam essas observações, e demonstram que 3 horas após a injeção intrapleural de carragenina, os

níveis de NO_x no exsudato pleural estão significativamente elevados, sendo este aumento marcadamente reduzido após pré-tratamento dos animais com dexametasona ou com indometacina. Todavia, os inibidores seletivos da COX-2 testados, o celecoxib e o rofecoxib, nas doses em que inibiram significativamente a formação do edema na pata e o exsudato pleural em resposta a carragenina, não foram capazes de reduzir os níveis de NO_x no exsudato pleural. Tal fato pode ser correlacionado com a falta de inibição da migração de células para a cavidade pleural. Tais resultados podem contribuir para explicar a razão pela qual os inibidores da COX-2 estudados apresentaram propriedades antiinflamatórias limitadas.

O papel das citocinas pró-inflamatórias interleucina- 1β e o fator de necrose tumoral- α foram estudados no modelo da pieurisia e do edema de pata. Na literatura, existem trabalhos descrevendo que a IL- 1β é secretada por uma variedade de células em resposta a infecção, produtos de linfócitos ativados, toxinas microbianas e estímulos inflamatórios (Dinarello, 1996). Além disso, a IL- 1β é capaz de aumentar a produção de PGE_2 em culturas de astrócitos de camundongos como consequência da indução da COX-2 (Molina-Holgado et al., 2000). Foi demonstrado que a ação estimulatória da IL- 1β sobre a produção de PGE_2 pode ser abolida pelo tratamento com o inibidor seletivo da COX-2, o NS-398 e pela dexametasona. Além disso, a liberação de PGE_2 induzida pela IL- 1β é dependente da transcrição e síntese

protéica, já que o tratamento com actinomicina D e com cicloheximida bloqueiam esta resposta (Molina-Holgado et al., 2000).

Estudos demonstram que os macrófagos são as principais fontes de liberação de IL-1 β (Dinarello, 1988), porém outras células residentes também são capazes de produzir esta citocina após estimulação pela carragenina. A IL-1 β é capaz de induzir a liberação de outras citocinas, bem como metabólitos da via do ácido araquidônico, amplificando a resposta inflamatória (Dinarello, 1988; Dozen et al., 1988). O TNF- α também é uma citocina pró-inflamatória e exerce efeitos similares aos produzidos pela IL-1 β em vários tipos celulares. Perreti et al. (1993) demonstraram que o antagonista natural do receptor da IL-1 foi efetivo em inibir a migração de neutrófilos induzida pela IL-1 β no modelo de bolsa de ar em camundongos. Schadlich e colaboradores (1999), também demonstraram que o pré-tratamento com anticorpo anti-TNF- α inibe o edema e o influxo celular no modelo de artrite induzida em ratos.

Em relação à ação do celecoxib e do rofecoxib sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , o presente estudo revela que os inibidores da COX-2 apresentam efeitos distintos no sítio inflamatório. De um lado uma inibição de aproximadamente 40% nos níveis de IL-1 β foi observada no tecido da pata dos animais tratados com celecoxib. Ao contrário, quando avaliado no tecido da pata retirado dos animais

previamente tratados com rofecoxib, foi observado um pequeno aumento dos níveis de TNF- α .

Os níveis de IL-1 β e de TNF- α , em ambos os modelos de inflamação aguda, só foram significativamente reduzidos pelo pré-tratamento com dexametasona. Por outro lado, a indometacina apresentou um papel duplo, inibindo marcadamente os níveis de IL-1 β no tecido da pata, mas causando aumento dos níveis de TNF- α tanto no exsudato pleural quanto no tecido da pata dos ratos e os níveis de IL-1 β no exsudato pleural. Existem estudos demonstrando que a indometacina é capaz de aumentar a produção de IL-1 β e de TNF- α *in vitro* e *in vivo* (Utsunomiya *et al.*, 1994; Kunkel *et al.*, 1986). Uma explicação proposta por Utsunomiya *et al.* (1994) para este efeito é a de que a produção destas citocinas pró-inflamatórias possa ser regulada pela PGE₂ no sítio da inflamação, fato que não foi totalmente confirmado por nossos estudos, já que os níveis de PGE₂ foram reduzidos pelo tratamento com os inibidores da COX-2, enquanto que os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α foram somente levemente alterados ou permaneceram inalterados.

A pronunciada ação antiinflamatória da dexametasona observada nos dois modelos estudados era esperada, considerando que os glicocorticóides exercem suas funções por interferirem em várias vias envolvidas no processo inflamatório. Existem evidências de que os glicocorticóides atuam interagindo com a expressão da maioria das

citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, além de serem capazes de inibir a expressão de enzimas induzíveis como a NOS (iNOS) e a COX (COX-2) e atuarem na via da fosfolipase, entre outras. A maioria destas ações exercida pelos corticóides é mediada em nível transcricional pela inibição da atividade do fator nuclear- κ B (NF- κ B) (Barnes e Karin, 1997).

Apesar de dados da literatura indicarem que os inibidores da COX-2 exerçam ações antiinflamatórias, dados de ensaios clínicos parecem sugerir, que os maiores efeitos destes fármacos estão associados com o alívio da dor e dos sintomas da osteoartrite (Hubard et al., 1996; Crofford, 2000). Apesar de possuírem efeitos adversos atenuados quando comparados com os da terapia com antiinflamatórios não-esteroidais, os inibidores da COX-2 podem não ser a revolução no tratamento da inflamação, e talvez um inibidor dual da COX-1 e -2, com tolerância gástrica melhorada seja a escolha mais adequada.

Em resumo, os resultados apresentados neste estudo indicam que o tratamento oral com o celecoxib e o rofecoxib inibem seletivamente a COX-2, mas não apresentam propriedades antiinflamatórias importantes quando avaliados em dois modelos de inflamação aguda: a pleurisia e o edema de pata induzidos por carragenina. Interessantemente, nos modelos estudados esses dois compostos causaram marcada inibição dos níveis de PGE₂ no sítio inflamatório e da formação de edema.

Os dados apresentados no presente trabalho demonstram que durante a inflamação aguda induzida pela carragenina em ratos, os inibidores altamente seletivos da enzima COX-2, celecoxib e rofecoxib, exibiram um perfil antiinflamatório distinto e limitado quando comparado aos efeitos daquele descrito para drogas como a indometacina (um AINEs considerado inibidor não seletivo da COX-1 e da COX-2), e com a dexametasona (um antiinflamatório esteroideal). A explicação mais plausível para estes achados é de que tanto metabólitos do ácido araquidônico derivados da COX-1 quanto os derivados da COX-2 parecem exercer um papel fundamental no controle da resposta inflamatória aguda.

SUMMARY

- 1- This study evaluates further some of the mechanisms involved in the anti-inflammatory action of celecoxib and rofecoxib, two selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors, in acute models of inflammation, carrageenin-induced pleurisy and paw oedema formation in the rat. Dexamethasone and indomethacin were used as positive control drugs.
- 2- Dexamethasone (0.5 mg kg^{-1} , s.c., - 4 h) and indomethacin (3 mg kg^{-1} , p.o., - 1 h) inhibited carrageenin-induced pleural exudate accumulation by 84 and 77% and inflammatory cell influx by 66 and 47%, respectively. Celecoxib (10 mg kg^{-1} , p.o., -1 h) and rofecoxib (10 mg kg^{-1} , p.o., -1 h) reduced the carrageenin-induced pleural exudate volume by 44 and 40%, respectively. At the same doses used for pleurisy, dexamethasone, indomethacin, celecoxib and rofecoxib, inhibited the carrageenin-induced paw oedema by 49, 31, 21 and 21%, respectively.
- 3- The possible involvement of neutrophil sequestration in rat paw tissue in response to carrageenin injection was assayed by measuring myeloperoxidase (MPO) activity. Dexamethasone or indomethacin reduced the levels of MPO by 71 and 78%, while

celecoxib or rofecoxib produced small, but significant, increases (28 or 16%) in MPO activity.

- 4- In the rat model of pleurisy, prostaglandin E₂ (PGE₂) levels in cell-free exudates were significantly attenuated by 91, 89, 57 and 65% in animals treated with dexamethasone, indomethacin, celecoxib or rofecoxib, when assessed three hours after administration of carrageenin. In contrast, only indomethacin reduced significantly (59%) whole blood thromboxane B₂ (TXB₂) synthesis.
- 5- Treatment of animals with celecoxib or rofecoxib did not alter the content of pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β) or tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the pleural exudate, but celecoxib reduced IL-1 β levels in the rat paw tissue and rofecoxib increased TNF- α in this tissue. In this condition, dexamethasone inhibited both exudate and paw levels of IL-1 β and TNF- α , while indomethacin markedly increased these cytokine levels with the exception of the IL-1 β content in the paw. However, only dexamethasone and indomethacin reduced the pleural content of nitrite/nitrate (NO_x) significantly.
- 6- According to assessment in acute models of inflammation in comparison with the dual COX-1 and COX-2 inhibitor indomethacin and with dexamethasone, these results provide consistent evidence

indicating that the selective COX-2 inhibitors celecoxib and rofecoxib, despite reducing greatly the carrageenin-induced exudation and paw oedema and the PGE₂ content in the pleural exudate, have limited anti-inflammatory properties.

RESUMO

1. O presente trabalho avalia alguns mecanismos adicionais envolvidos nas ações dos inibidores seletivos da COX-2, celecoxib e rofecoxib, em modelos de inflamação aguda em ratos; a pleurisia e o edema de pata induzidos pela carragenina. A dexametasona e indometacina foram usadas como drogas controle.
2. A dexametasona (0.5 mg kg^{-1} , s.c., - 4 h) e a indometacina (3 mg kg^{-1} , p.o., - 1 h) reduziram a formação de exsudato pleural induzido pela carragenina em 84 e 77% e o influxo de células em 66 e 47%, respectivamente. O celecoxib (10 mg kg^{-1} , p.o., -1 h) e o rofecoxib (10 mg kg^{-1} , p.o., -1 h) reduziram o volume do exsudato pleural em 44 e 40%, respectivamente. Nas mesmas doses utilizadas na pleurisia, a dexametasona, a indometacina, o celecoxib e o rofecoxib, inibiram o edema de pata induzido pela carragenina em 49, 31, 21 e 21%, respectivamente.
3. O possível envolvimento do sequestro de neutrófilos no tecido da pata em resposta a injeção de carragenina foi medido através da atividade da mieloperoxidase (MPO). A dexametasona e a indometacina reduziram os níveis de MPO em 71 e 78%, enquanto o celecoxib ou o rofecoxib produziram um pequeno, porém significativo aumento (28 ou 16%) na atividade de MPO.

4. No modelo da pleurisia em ratos, os níveis de prostaglandina E_2 (PGE_2) no exsudato livre de células foram significativamente atenuados em 91, 89, 57 e 65% nos animais tratados com dexametasona, indometacina, celecoxib ou com rofecoxib, quando avaliado três horas depois da administração da carragenina. Ao contrário, somente o tratamento com indometacina foi capaz de reduzir significativamente (59%) os níveis de tromboxano B_2 (TXB_2) no sangue total.
5. O tratamento dos animais com celecoxib ou com rofecoxib não alterou o conteúdo das citocinas pró-inflamatórias interleucina- 1β ($IL-1\beta$) ou do fator de necrose tumoral- α ($TNF-\alpha$) no exsudato pleural induzido pela carragenina, porém o celecoxib reduziu os níveis de $IL-1\beta$ no tecido da pata de ratos e o tratamento com rofecoxib aumentou os níveis de $TNF-\alpha$ neste mesmo tecido. Nestas condições, o tratamento com dexametasona inibiu os níveis de $IL-1\beta$ e de $TNF-\alpha$ tanto do exsudato pleural quanto do tecido da pata, enquanto a indometacina aumentou os níveis destas citocinas com exceção dos níveis de $IL-1\beta$ na pata. Além disso, somente o tratamento com a dexametasona e com a indometacina reduziu o conteúdo de nitrito/nitrato (NO_x) no exsudato pleural induzido pela carragenina.

6. De acordo com os resultados obtidos nos dois modelos de inflamação aguda induzida pela carragenina em ratos, o tratamento dos animais com os inibidores seletivos da COX-2, celecoxib e rofecoxib, ao contrário do que foi observado para a indometacina e a dexametasona, indicam que os inibidores da COX-2 estudados apesar de reduzirem significativamente os níveis de PGE₂ do exsudato pleural, a formação de edema na pleura e na pata tratadas com carragenina, seus efeitos antiinflamatórios são limitados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJUEBOR, M.N.; SINGH, A.; WALLACE, J.L. Cyclooxygenase-2 derived prostaglandin D₂ is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, 279: 238-244, 2000.
- ALMEIDA, A.P.; BAYER, B.M.; HORAKOVA, Z.; BEAVEN, M.A. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenin-induced inflammation in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 214: 74-79, 1980.
- ANDERSON, G.D.; HAUSER, S.D.; MCGARITY, K.L.; BREMER, M.E.; ISAKSON, P.C.; GREGORY, S.A. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin-6 in rat adjuvante arthritis. **J. Clin. Invest.**, 97: 2672-2679, 1996.
- APPLEBY, S.B.; RISTIMÄKI, A.; NEILSON, K.; NARKO, K.; HLA, T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. **Biochem. J.**, 302: 723-727, 1994.
- AUPHAN, N.; DIDONATO, J.A.; ROSETTE, C.; HELMBERG, A.; KARIN, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. **Science**, 270: 286-289, 1995.
- BARNES, P.J. Pathophysiology of asthma. In: Barnes, P.J., Rodger, I.W., Thompson, N.C., eds. **Asthma: Basic mechanisms and clinical management**. London: Academic Press, 487-506, 1998.
- BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.**, 336: 1066-1071, 1997.
- BATEMAN, D.N. NSAIDs: time to re-evaluate gut toxicity. **Lancet**, 343: 1051-1052, 1994.
- BHATTACHARYYA, D.K.; LECOMTE M.; RIEKE, C.J.; GARAVITO R.M.; SMITH, W.L. 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.**, 271: 2179-2184, 1996.

- BJORKMAN, R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. **Acta anaesthesiol. Scand.**, Suppl, 103:1-44, 1995.
- BLAKE, C. Prostaglandin synthase: at the heart of the matter. **Curr. Biol.**, 4: 452-454, 1994.
- BOYCE, S.; CHAN, C.C.; GORDON, R.; LI, C.S.; RODGER, I.W.; WEBB, J.K.; RUPNIAK, N.M.J.; HILL, R.G. L-745,337: a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 elicits antinociception but not gastric ulceration in rats. **Neuropharmacology**, 33: 1609-1611, 1994.
- BREDER, C.D.; DeWITT, D.L.; KRAIG, R.P. Characterization of inducible cyclooxygenase in the rat brain. **J. Comp. Neurol.**, 355: 296-315, 1995.
- BREDER, C.D.; SAPER, C.B. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. **Brain Res.**, 713: 64-69, 1996.
- BRIDEAU, C.; KARGMAN, S.; LIU, S.; DALLOB, A.L.; EHRICH, E.W.; RODGER, I.W.; CHAN, C-C. A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. **Inflamm. Res.**, 45: 68-74, 1996.
- CAPUT, D.; BEUTLER, B.; HARTOG, K.; THAYER, R.; BROWN-SHIMER, S.; CERAMI, A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 83: 1670-1674, 1986.
- CHAN, C-C.; BOYCE, S.; BRIDEAU, C.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; GORDON, R.; GUAY, D.; HILL, R.G.; LI, C.S.; MANCINI, J.; PENNETON, M.; PRASIT, P.; RASORI, R.; REINDEAU, D.; ROY, P.; TAGARI, P.; VICKERS, P.; WONG, E.; RODGER, I.W. 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. Pharmal. Exp. Ther.**, 274: 1531-1537, 1995.
- CHAN, C-C.; BOYCE, S.; BRIDEAU, C.; CHARLESON, S.; CROMLISH, W.; ETHIER, D.; EVANS, A.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; FORREST, M.J.; GAUTHIER, J.Y.; GORDON, R.; GRESSER, M.; GUAY, J.; KARGMAN, S.; KENNEDY, B.; LEBLANC, Y.; LEGER, S.; MANCINI, J.; O'NEILL, G.P.; OUELLET, M.; PATRICK, D.; PERCIVAL, M.D.; PERRIER, H.; PRASIT, P.; RODGER, I.; TAGARI, P.; THERIEN, M.; VICKERS, P.;

- VISCO, D.; WANG, Z.; WEBB, J.; WONG, E.; XU, L.J.; YOUNG, R.N.; ZAMBONI, R.; RIENDEAU, D. Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-Methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5*H*)-furanone]: A potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 290: 551-560, 1999.
- CLANCY, R.; VARENIKA, B.; HUANG, W.; BALLOU, L.; ATTUR, M.; AMIN, A.R.; ABRAMSON, S.B. Nitric oxide synthase/COX Cross-Talk: Nitric Oxide Activates COX-1 but inhibits COX-2-derived prostaglandin production. **J. Immunol.**, 165: 1582-1587, 2000.
- COLVILLE-NASH, P.R.; GILROY, D.W. COX-2 and the cyclopentenone prostaglandins – a new chapter in the book of inflammation? **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, 62: 33-43, 2000.
- COTRANM, R.I.; KUMAR, Z.; ROBBINS, S.L. Inflamação e reparo. In: Robbins Patologia Estrutural e funcional. COTRAN, R.I.; KUMAR, Z.; ROBBINS, S.L. (eds), Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, pp: 39-86, 1996.
- CROFFORD, L.J. Clinical experience with specific COX-2 inhibitors in arthritis. **Curr. Pharm. Des.**, 6: 1725-1736, 2000.
- CROFFORD, L.J.; WILDER, R.L.; RISTIMÄKI, A.P.; SANO, H.; REMMERS, E.F.; EPPS, H.R.; HLA, T. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues: effects of interleukin-1 β , phorbol ester, and corticosteroids. **J. Clin. Invest.**, 93: 1095-1101, 1994.
- De YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, 26: 335-341, 1989.
- DeWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. **Biochem. Biophys. Acta**, 1083: 121-134, 1991.
- DeWITT, D.L.; SMITH, W.L. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 85: 1412-1416, 1988.
- DeWITT, D.L.; MEADE, E. Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isoenzymes. **Arch. Biochem. Biophys.**, 306: 94-102, 1993.

- DIAZ, A.; MUNOZ, E.; JOHNSTON, R.; KORN, J.H.; JIMENEZ, S.A. Regulation of human lung fibroblast $\alpha 1(I)$ procollagen gene expression by tumor necrosis factor α , interleukin- 1β , and prostaglandin E_2 . **J. Biol. Chem.**, 268: 10364-10371, 1993.
- DINARELLO, C.A. Interleukin-1. **Ann. NY. Acad. Sci.**, 546: 122-132, 1988.
- DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, 87:2095-2147, 1996
- DINCHUK, J.E.; CAR, B.D.; FOCHT, R.J.; JOHNSTON, J.J.; JAFEE, B.D.; COVINGTON, M.B.; CONTEL, N.R.; ENG, V.M.; COLLINS, R.J.; CZERNIAK, P.M.; GORRY, S.A.; TRZASKOS, J.M. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. **Nature**, 378: 406-409, 1995.
- DOZEN, M.; YAMAKI, K.; OH-ISHI, S. Captopril uncovers kinin-dependent release of arachidonic acid metabolites in carrageenin-induced rat pleurisy. **Jpn. J. Pharmacol.**, 51: 101-105, 1988.
- FENG, L.; SUN, W.; XIA, Y.; Tang WW, CHANMUGAM, P.; SOYOOLA, E.; WILSON, C.B.; HWANG, D. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. **Arch. Biochem. Biophys.**, 307: 169-177, 1993.
- FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature**, 240: 200-203, 1972.
- FIEBICH, B.L.; HULL, M.; LIEB, K.; GYUFKO, K.; BERGER, M.; BAUER, J. Prostaglandin E_2 induces interleukin-6 synthesis in human astrocytoma cells. **J. Neurochem.**, 68: 704-709, 1997.
- FLETCHER, B.S.; KUJUBU, D.A.; PERRIN, D.M.; HERSCHMANN, H.R. Structure of the mitogen-inducible TS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. **J. Biol. Chem.**, 267: 4338-4344, 1992.
- FORD-HUTCHINSON, A.W.; BRAY, M.A.; DOIG, M.V.; SHIPLEY, M.E.; SMITH, M.J. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature**, 286: 264-265, 1980.

- FRANCISCHI, J.N.; YOKORO, C.M.; POOLE, S.; TARUFI, W.L.; CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis. **Eur. J. Pharmacol.**, 399: 243-249, 2000.
- FU, J.Y.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; RAZ, A.; NEEDLEMAN, P. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. **J. Biol. Chem.**, 265: 16767-16740, 1990.
- FUNK, C.D.; FUNK, L.B.; KENNEDY, M.E.; PONG, A.S.; FITZGERALD, G.A. Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. **FASEB J.**, 5: 2304-2312, 1991.
- FUTAKI, N.; ARAI, I.; HAMASAKA, Y.; TAKAHASHI, S.; HIGUCHI, S.; OTOMO, S. Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carrageenan-air-pouch inflammation. **J. Pharm. Pharmacol.**, 45: 753-755, 1993a.
- FUTAKI, N.; YOSHIKAWA, K.; HAMASAKA, Y.; ARAI, I.; HIGUCHI, S.; IIZUKA, H.; OTOMO, S. NS-398, a novel nonsteroidal anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions. **Gen. Pharmacol.**, 24: 105-110, 1993b.
- FUTAKI, N.; TAKAHASHI, S.; YOKOYAMA, M.; ARAI, I.; HIGUCHI, S.; OTOMO, S. NS-398, a new anti-inflammatory agent selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. **Prostaglandins**, 47: 55-59, 1994.
- GANS, K.R.; GALBRAITH, W.; ROMAN, R.J.; HABER, S.B.; KERR, J.S.; SCHMIDT, W.K.; SMITH, C.; HEWES, W.E.; ACKERMAN, N.R. Anti-inflammatory and safety profile of DuP 697, a novel orally effective prostaglandin synthesis inhibitor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 254: 180-187, 1990.
- GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; JAMES, S.L.; SHER, A. IL-10 inhibits cell killing and nitrogen oxide production by INF-gamma-activated macrophages. **J. Immunol.**, 148: 1792-1796, 1992.
- GIERSE, J.K.; McDONALD, J.J.; HAUSER, S.D.; RANGWALA, S.H.; KOBOLDT, C.M. ET AL. A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. **J. Biol. Chem.**, 271: 15810-15814, 1996.

- GILROY, D.W.; TOMLINSON, A.; WILLOUGHBY, D.A. Differential effects of inhibitors of cyclooxygenase (cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2) in acute inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, 355: 211-217, 1998.
- GILROY, D.W.; COLVILLE-NASH, P.R.; WILLIS, D.; CHIVERS, J.; PAUL-CLARK, M.J.; WILLOUGHBY, D.A. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nat. Med.**, 5: 698-701, 1999.
- GOPPELT-STRUEBE, M. Molecular mechanisms involved in the regulation of prostaglandin biosynthesis by glucocorticoids. **Biochem. Pharmacol.**, 53: 1389-1395, 1995.
- GOPPELT-STRUEBE, M. Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isoenzyme expression. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, 52: 213-222, 1995.
- GUO, Q.; WANG, L.; RUAN, K.; KULMACZ, R.J. Role of Val⁵⁰⁹ in time-dependent inhibition of human prostaglandin H synthase-2 cyclooxygenase activity by isoform-selective agents. **J. Biol. Chem.**, 271: 19134-19139, 1996.
- HAANEN, C.; VERMES, I. Apoptosis and inflammation. In: Mediators of inflammation. Haanen, C; Vermes, I (eds), Oxford, London: Rapid Communications of Oxford Ltd., pp: 5-15, 1995.
- HAJJAR, D.P.; LANDER, H.M.; PEARCE, F.S.; UPMACIS, R.K.; POMERANZ, K.B. Nitric oxide enhances prostaglandin-H-synthase activity by a heme-independent mechanism: evidence implicating nitrosothiols. **J. Am. Chem. Soc.**, 117: 3340-3346, 1995.
- HAN, J.W.; SADOWSKI, H.; YOUNG, D.A.; MACARA, I.G. Persistent induction of cyclooxygenase in p 60^{v-src}-transformed 3T3 fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 87: 3373-3377, 1990.
- HARADA, Y.; HATANAKA, K.; KAWAMURA, M.; SAITO, M.; OGINO, M.; MAJIMA, M.; OHNO, T.; OGINO, K.; YAMAMOTO, K.; TAKETANI, Y.; YAMAMOTO, S.; KATORI, M. Role of prostaglandin H synthase-2 in prostaglandin E2 formation in rat carrageenin-induced pleurisy. **Prostaglandins**, 51: 19-33, 1996.
- HARRIS, R.C.; MCKANNA, J.A.; AKAI, Y. JACOBSON, H.R.; DuBOIS, R.N.; BREYER, M.D. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa

- of rat kidney and increases with salt restriction. **J. Clin. Invest.**, 94: 2504-2510, 1994.
- HEMLER, M.; LANDS, W.E. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins: demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. **J. Biol. Chem.**, 251: 5575-5579, 1976.
- HEMPEL, S.L.; MONICK, M.M.; HUNNINGHAKE, G.W. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. **J. Clin. Invest.**, 93: 391-396, 1994.
- HERSCHMAN, H.R. Prostaglandin synthase 2. **Biochim. Biophys. Acta**, 1299: 125-140, 1996.
- HINSON, R.M.; WILLIAMS, J.A.; SHACTER, E. Elevated interleukin-6 is induced by prostaglandin E₂ in a murine model of inflammation: possible role of cyclooxygenase-2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 93: 4885-4890, 1996.
- HUBBARD, R.C.; MEHLISCH, D.R.; JASPER, D.R.; NUGENT, M.J.; YU, S.; ISAKSON, P.C. SC-58125, a highly selective inhibitor of COX-2, is an effective analgesic in an acute pos-surgical pain model. **J. Invest. Med.**, 44: 293, 1996.
- INOUE, H.; NANAYAMA, T.; HARA, S.; YOKOYAMA, C.; TANABE, T. The cyclic AMP response element plays an essential role in the expression of the human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene in differentiated U937 monocytic cells. **FEBS Lett.**, 350: 51-54, 1994.
- ISEKI, S. Immunocytochemical localization of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat stomach. **Histochem. J.**, 27: 323-328, 1995.
- JIANG, C.; TING, A.T.; SEED, B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, 391: 82-86, 1998.
- JONES, D.A.; CARLTON, D.P.; MCINTYRE, T.M.; ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOTT, S.M. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. **J. Biol. Chem.**, 268: 9049-9054, 1993.
- KARGMAN, S.; CHARLESON, S.; CARTWRIGHT, M.; FRANK, J.; RIENDEAU, D.; MANCINI, J.; EVANS, J.; O'NEILL, G. Characterization

of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. **Gastroenterology**, 111: 445-454, 1996.

KAWAMURA, M.; HATANAKA, K.; SAITO, M.; OGINO, M.; ONO, T.; OGINO, K.; MATSUO, S.; HARADA, Y. Are the anti-inflammatory effects of dexamethasone responsible for inhibition of the induction of enzymes involved in prostanoid formation in rat carrageenin-induced pleurisy? **Eur. J. Pharmacol.**, 400: 127-135, 2000.

KOSAKA, T.; MIYATA, A.; IHARA, H.; HARA, S.; SUGIMOTO, T.; TAKEDA, O.; TAKAHASHI, E.; TANABE, T. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. **Eur. J. Biochem.**, 221: 889-897, 1994.

KRAEMER, S.A.; MEADE, E.A.; DeWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. **Arch. Biochem. Biophys.**, 293: 391-400, 1992.

KUJUBU, D.A.; FLETCHER, B.S.; VARNUM, B.C.; LIM, R.W.; HERSCHMAN, H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. **J. Biol. Chem.**, 266: 12866-12872, 1991.

KUJUBU, D.A.; HERSCHMAN, H.R. Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. **J. Biol. Chem.**, 267: 7991-7994, 1992.

KUNKEL, S.L.; WIGGINS, R.C.; CHENSUE, S.W.; LARRICK, K. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 134: 404-410, 1986.

KURUMBAIL, R.G.; STEVENS, A.M.; GIERSE, J.K.; McDONALD, J.J.; STEGEMAN, R.A.; PAK, J.Y.; GILDEHAUS, D.; MIYAHIRO, J.M.; PENNING, T.D.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C.; STALLINGS, W.C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. **Nature**, 384: 644-648, 1996.

LANE, N.E. Pain management in osteoarthritis: the role of COX-2 inhibitors. **J. Rheumatol.**, 24 (Suppl. 49): 20-24, 1997.

LANGENBACH, R.; MORHAM, S.G.; TIANO, H.F.; LOFTIN, C.D.; GHANAYEM, B.I.; CHULADA, P.C.; MAHLER, J.F.; LEE, C.A.;

- GOULDING, E.H.; KLUCKMAN, K.D.; et al. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. **Cell**, 83: 483-492, 1995.
- LEE, S.H.; SOYOOLA, E.; CHANMUGAM, P.; HART, S.; SUN, W.; ZHONG, H.; LIOU, S.; SIMMONS, D.; HWANG, D. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.**, 267: 25934-25938, 1992.
- LEHMANN, J.M.; LENHARD, J.M.; OLIVER, B.B., RINGOLD, G.M., KLEIWER, S.A. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma are activated by indomethacin and other nonsteroidal antiinflammatory drugs. **J. Biol. Chem.**, 272: 3406-3410, 1997.
- LIPSKY, P.E.; ISAKSON, P.C. Outcome of specific COX-2 inhibition in rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, 24: 9-14, 1997.
- LOWENSTEIN, C.J.; ALLEY, E.W.; RAVAL, P.; SNOWMAN, A.M.; SNYDER, S.H.; RUSSELL, S.W.; MURPHY, W.J. Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon- γ and lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 90: 9730-9734, 1993.
- LUONG, C.; MILLER, A.; BARNETT, J.; CHOW, J.; RAMESHA, C.; BROWNER, M.F. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. **Nature Struct. Biol.**, 3: 927-933, 1996.
- LYONS-GIORDANO, B.; PRATTA, M.A.; GALBRAITH, W.; DAVIS, G.L.; ARNER, E.C. Interleukin-1 differentially modulates chondrocyte expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. **Exp. Cell Res.**, 206: 58-62, 1993.
- MAIHÖFNER, C.; TEGEDER, I.; EUCHENHOFER, D.; DEWITT, D.; BRUNE, K.; BANG, R.; NEUHUBER, W.; GEISSLINGER, G. Localization and regulation of cyclo-oxygenase-1 and -2 and neuronal nitric oxide synthase in mouse spinal cord. **Neuroscience**, 101:1093-1108, 2000.
- MANCINI, J.A.; RIENDEAU, D.; FAKGUEYRET, J.P.; VICKERS, P.J.; O'NEILL, G.P. 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.**, 270: 29372-29377, 1995.

- MASAKI, M.; MATSUSHITA, M.; WAKITANI, K. Inhibitory effects of JTE-552, a novel prostaglandin H synthase-2 inhibitor, on adjuvant-induced arthritis and bone changes in rats. **Inflamm. Res.**, 47: 187-192, 1998.
- MASFERRER, J.L.; ZWEIFEL, B.S.; SEILBERT, K.; NEEDLEMAN, P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. **J. Clin. Invest.**, 86: 1375-1379, 1990.
- MASFERRER, J.L.; ZWEIFEL, B.S.; MANNING, P.T.; HAUSER, S.D.; LEAHY, K.M.; SMITH, W.G.; ISAKSON, P.C.; SEIBERT, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is anti-inflammatory and nonulcerogenic. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 91: 3228-3232, 1994.
- MCINTYRE, T.M.; MODUR, V.; PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A. Molecular mechanisms of early inflammation. **Thrombosis and Haemostasis**, 78: 302-305, 1997.
- MERLIE, J.P.; FAGAN, D.; MUDD, J.; NEEDLEMAN, P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). **J. Biol. Chem.**, 263: 3550-3553, 1988.
- MERTZ, P.M.; DeWITT, D.L.; STETLER-STEVENSON, W.G.; WAHL, L.M. Interleukin-10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. **J. Biol. Chem.**, 269: 21322-21329, 1994.
- MIYAMOTO, T., OGINO, N.; YAMAMOTO, S.; HAYAISHI, O. Purification of prostaglandin endoperoxide synthase from bovine vesicular gland microsomes. **J. Biol. Chem.**, 251: 2629-2636, 1976.
- MIOTLA, J.M.; TEIXEIRA, M.M.; HELLEWELL, P.G. Suppression of acute lung injury in mice by an inhibitor of phosphodiesterase type 4. **Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.**, 18: 411-420, 1998.
- MITCHELL, J.A.; AKARASEREENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 90: 11693-11697, 1993.
- MOLINA-HOLGADO, E.; ORTIZ, S.; MOLINA-HOLGADO, F.; GUAZA, C. Induction of COX-2 and PGE₂ biosynthesis by IL-1 β is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes. **Br. J. Pharmacol.**, 131: 152-159, 2000.

- MORHAM, S.G.; LANGENBACH, R.; LOFTIN, C.D.; TIANO, H.F.; VOULOUMANOS, N.; JENNETTE, J.C.; MAHLER, J.F.; KLUCKMAN, K.D.; LEDFORD, A.; LEE, C.A. et al. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. **Cell**, 83: 473-482, 1995.
- MORITA, I., SCHINDLER, M.; REGIER, M.K.; OTTO, J.C.; HORI, T.; DeWITT, D.L.; SMITH, W.L. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. **J. Biol. Chem.**, 270: 10902-10908, 1995.
- MORONEY, M.A.; ALCARAZ, M.J.; FORDER, R.A.; CAREY, F.; HOULT, J.R.S. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. **J. Pharm. Pharmacol.**, 40: 787-792, 1988.
- MUSCARÁ, M.N.; VERGNOLLE, N.; LOVREN, F.; TRIGGLE, C.R.; ELLIOT, S.N.; ASFAHA, S.; WALLACE, J.L. Selective cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib elevates blood pressure and promotes leukocyte adherence. **Br. J. Pharmacol.**, 129: 1423-1430, 2000.
- NAKATSUGI, S.; TERADA, N.; YOSHIMURA, T.; HORIE, Y.; FURUKAWA, M. Effects of nimesulide, a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor, on carrageenin-induced pleurisy and stress-induced gastric lesions in rats. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, 55: 395-402, 1996.
- NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K.M.; CHAN, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenin-induced inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, 128: 853-859, 1999.
- NATHAN, C.; XIE, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, 269: 13725-13728, 1994.
- NEWTON, R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?. **Thorax**, 55: 603-613, 2000.
- NICOLL-GRIFFITH, D.A.; YERGEY, J.A.; TRIMBLE, L.A.; SILVA, J.M.; LI, C.; CHAURET, N.; GAUTHIER, J.Y.; GRIM, E.; LÉGER, S.; ROY, P.; THÉRIEN, M.; WANG, Z.; PRASIT, P.; ZAMBONI, R.; YPUNG, R.N.; BRIDEAU, C.; CHAN, C-C.; MANCINI, J.; RIENDEAU, D. Synthesis, characterization, and activity of metabolites derived from

- cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (MK-0966, VioxxTM). **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 10: 2683-2686, 2000.
- O'BANION, M.K.; SADOWSKI, H.B.; WINN, V.; YOUNG, D.A. A serum- and glucocorticoid-regulated 4 kb mRNA encodes a cyclooxygenase related protein. **J. Biol. Chem.**, 266: 23261-23267, 1991.
- O'BANION, M.K.; WINN, V.D.; YOUNG, D.A. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 89: 4888-4892, 1992.
- O'BANION, M.K. Cyclooxygenase-2: Molecular biology, pharmacology, and neurobiology. **Crit. Rev. Neurobiol.**, 13: 45-82, 1999.
- O'NEILL, G.P.; FORD-HUTCHINSON, A.W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. **FEBS Lett.**, 330: 156-160, 1993.
- ONOE, Y.; MIYAURA, C.; KAMINAKAYASHIKI, T.; NAGAI, Y.; NOGUCHI, K.; CHEN, Q.R.; SEO, H.; OHTA, H.; NOZAWA, S.; KUDO, I.; SUDA, T. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblast. **J. Immunol.**, 156: 758-764, 1996.
- OTTO, J.C.; SMITH, W.L. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. **J. Lipid. Mediat. Cell Signal.**, 12: 139-156, 1995.
- PENNING, T.D.; TALLEY, J.J.; BERTENSHAW, S.R.; CARTER, J.S.; COLLINS, P.W.; DOCTER, S.; GRANETO, M.J.; LEE, L.F.; MALECHA, J.W.; MIYASHIRO, J.M.; ROGERS, R.S.; ROGIER, D.J.; YU, S.S.; ANDERSON, G.D.; BURTON, E.G.; COGBURN, J.N.; GREGORY, S.A.; KOBOLDT, C.M.; PERKINS, W.E.; SEIBERT, K.; VEENHUIZEN, A.W.; ZHANG, Y.Y.; ISAKSON, P.C. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzene nesulfonamide (SC-58635, celecoxib). **J. Med. Chem.**, 40: 1347-1365, 1997.
- PERRETI, M.; APPLETON, I.; PARENTE, L.; FLOWER, R.J. Pharmacology of interleukin-1-induced neutrophil migration. **Agents Action**, 38: 64-65, 1993.

- PICOT, D.; LOLL, P.J.; GARAVITO, R.M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H synthase-1. **Nature**, 367: 243-249, 1994.
- PORTANOVA, J.P.; ZHANG, Y.; ANDERSON, G.D.; HAUSER, S.D.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; GREGORY, S.A.; ISAKSON, P.C. Selective neutralization of prostaglandin E₂ blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin-6 production *in vivo*. **J. Exp. Med.**, 184: 883-891, 1996.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible but not the constitutive NO synthase in vascular endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 87: 10043-10047, 1990.
- RAZ, A.; WYCHE, A.; NEEDLEMAN, P. Temporal and pharmacological division of fibroblast cyclooxygenase expression into transcriptional and translational phases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 86: 1657-1661, 1989.
- REGIER, M.K.; DeWITT, D.L.; SCHINDLER, M.S.; SMITH, W.L. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in murine 3T3 cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, 301: 439-444, 1993.
- REN, Y.; LOOSE-MITCHELL, D.S.; KULMACZ, R.J. Prostaglandin H synthase-1: evaluation of C-terminus function. **Arch. Biochem. Biophys.**, 316: 751-757, 1995.
- RICOTE, M.; LI, A.C.; WILLSON, T.M.; KELLY, C.J.; GLASS, C.K. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, 391: 79-82, 1998.
- RISTIMÄKI, A.; GARFINKEL, S.; WESSENDORF, J.; MACIAG, T.; HLA, T. Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 α . **J. Biol. Chem.**, 269: 11769-11775, 1994.
- RISTIMÄKI, A.; NARKO, K.; HLA, T. Down-regulation of cytokine-induced cyclo-oxygenase-2 transcript isoforms by dexamethasone: evidence for post-transcriptional regulation. **Biochem. J.**, 318: 325-331, 1996.
- SALVEMINI, D.; WANG, Z.Q.; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINO, M.H.; MANNING, P.T; CURRIE, M.G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, 118: 829-838, 1996.

- SAUTEBIN, L.; DIROSA, M. Nitric oxide modulates prostacyclin biosynthesis in the lung of endotoxin-treated rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 262: 193-196, 1994.
- SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DIROSA, M. Relationship between nitric oxide and prostaglandins in carrageenin pleurisy. **Biochem. Pharmacol.**, 55: 1113-1117, 1998.
- SAXENA, P.N.; BEG, M.M.; SINGHAL, K.C.; AHMAD, M. Prostaglandin-like activity in the cerebrospinal fluid of febrile patients. **Indian J. Med. Res.**, 79: 495-498, 1979.
- SCHADLICH, H.; ERMANN, J.; BISKOP, M.; FALK, W.; SPERLING, F.; JUNGEL, A.; LEHMANN, J.; EMMRICH, F.; SACK, U. Anti-inflammatory effects of systemic anti-tumor necrosis factor alpha treatment in human/murine SCID arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, 58: 428-434, 1999.
- SCHEINMAN, R.I.; COGSWELL, P.C.; LOFQUIST, A.K.; BALDWIN, A.S. Jr. Role of transcriptional activation of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science**, 270: 283-286, 1995.
- SCOTT, L.J.; LAMB, H.M. Rofecoxib. **Drugs**, 58:499-505, 1999.
- 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. U.S.A.**, 91: 12013-12017, 1994.
- SEIBERT, K.; LEFKOWITH, J.; TRIPP, C.; ISAKSON, P.; NEEDLEMAN P. COX-2 inhibitors – Is there a cause for concern? **Nat. Med.**, 5: 621-622, 1999.
- SHAW, G; KAMEN, R.A. A conserved AU sequence from the 3'-untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. **Cell**, 46: 659-667, 1986.
- SIROIS, J.; RICHARDS, J.S. Transcriptional regulation of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. **J. Biol. Chem.**, 268: 21931-21938, 1993.
- SMITH, W.L.; DeWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Adv. Immunol.**, 62: 167-215, 1996.

- SMITH, W.L.; WILKIN, G.P. Immunochemistry of prostaglandin endoperoxide forming cyclooxygenases: the detection of cyclooxygenase in rat, rabbit, and guinea pig kidneys by immunofluorescence. **Prostaglandins**, 13: 873-892, 1977.
- SMITH, W.L.; MARNETT, L.J. Prostaglandin endoperoxidase synthase: structure and catalysis. **Biochim. Biophys. Acta**, 1083: 1-17, 1991.
- SOLOMON, L.M.; JUHLIN, L.; KIRCHENBAUM, M.B. Prostaglandin on cutaneous vasculature. **J. Invest. Derm.**, 51: 280-282, 1968.
- SPENCER, A.G.; WOODS, J.W.; ARAKAWA, T.; SINGER, I.I.; SMITH, W.L. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. **J. Biol. Chem.**, 273: 9886-9893, 1998.
- SRIVASTAVA, S.K.; TETSUKA, T.; DAPHNA-IKEN, D.; MORRISON, A.R. IL-1 β stabilizes COX II mRNA in renal mesangial cells: role of 3'-untranslated region. **Am. J. Physiol.**, 264: 504-508, 1994.
- SWIERKOSZ, T.A.; MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D.; BOTTING, R.M.; VANE, J.R. Coinduction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase: interactions between nitric oxid and prostanoids. **Br. J. Pharmacol.**, 114: 1335-1342, 1995.
- SZABÓ, C.; THEIMERMANN, C.; WU, C.C.; RERRETTI, M.; VANE, J.R. Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 91: 271-275, 1994.
- TAZAWA, R.; XU, X.M.; WU, K.K.; WANG, L.H. Characterization of the genomic structure, chromosomal location, and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 203: 190-199, 1994.
- THOMSEN, L.L.; CHING, L.M.; ZUANG, L.; GAVIN, J.B.; BAGULEY, B.C. Tumor-dependent increased plasma nitrate concentrations as an indication of the antitumor effect of flavone-8-acetic acid and analogues in mice. **Cancer Res.**, 51: 71-81, 1991.
- TOMLINSON, A.; APPLETON, I.; MOORE, A.R.; GILROY, D.W.; WILLIS, D.; MITCHELL, J.A.; WILLOUGHBY, D.A. Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. **Br. J. Pharmacol.**, 113: 693-698, 1994.

- TRACEY, W.R.; TSE, J.; CARTER, G. Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 272: 1011-1015, 1995.
- TRATSK, K.S.; CAMPOS, M.M.; VAZ, Z.R.; FILHO, V.C.; SCHLEMPER, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drymis winteri*. **Inflamm. Res.** 46: 509-514, 1997.
- URADE, Y.; UJIHARA, M.; HORIGUCHI, Y.; IKAI, K.; HAYAISHI, O. The major source of endogenous prostaglandin D₂ is likely antigen-presenting cell. **J. Immunol.**, 143: 2982-2989, 1989.
- UTSUNOMIYA, I.; NAGAI, S.; OH-ISHI, S. Differential effects of indomethacin and dexamethasone on cytokine production in carrageenin-induced rat pleurisy. **Eur. J. Pharmacol.**, 252: 213-218, 1994.
- VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirin-like drugs. **Nature**, 231: 232-235, 1971.
- VANE, J.R.; MITCHELL, J.A.; APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; BISHOP-BAILEY, D.; CROXTALL, J.; WILLOUGHBY, D.A. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 91: 2046-2050, 1994.
- VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 38: 97-120, 1998.
- VELO, G.P.; DUNN, C.J.; GIROUD, J.P.; TIMSIT, J.; WILLOUGHBY, D.A. Distribution of prostaglandins in inflammatory exudate. **J. Pathol.**, 111: 149-158, 1973.
- WALLACE, J.L. Selective COX-2 inhibitors: is the water becoming muddy? **Trends Pharmacol. Sci.**, 20: 4-6, 1999.
- WALLACE, J.L.; BAK, A.; MCKNIGHT, W.; ASFAHA, S.; SHARKEY, K.A.; MACNAUGHTON, W.K. Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: Implications for gastrointestinal toxicity. **Gastroenterology**, 115: 101-109, 1998.

- WALLACE, J.L.; CHAPMAN, K.; MCKNIGHT, W. Limited anti-inflammatory efficacy of cyclooxygenase-2 inhibition in carrageenin-airpouch inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, 126: 1200-1204, 1999.
- WILLIAMS, F.M.; KUS, M.; TANDA, K.; WILLIAMS, T.J. Effect of duration of ischaemia on reduction of miocardial infarct size by inhibition of neutrophil accumulation using an anti-CD18 monoclonal antibody. **Br. J. Pharmacol.**, 111: 1123-1128, 1994.
- WILLIAMS, J.A.; SHACTER, E. Regulation of macrophage cytokine production by prostaglandin E₂: distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2. **J. Biol. Chem.**, 272: 25693-25699, 1997.
- WILLIAMS, T.J.; PECK, M.J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature**, 270: 530-532, 1977.
- WILLOUGHBY, D.A. Human arthritis applied to animal models: towards a better therapy. Heberden oration. **Annals Rheumatic Diseases**, 34: 471-478, 1975.
- WILLOUGHBY, D.A.; MOORE, A.R.; COLVILLENASH, P.R.; GILROY, D. Resolution of inflammation. **Int. J. Immunopharmacol.**, 22:1131-1135, 2000a.
- WILLOUGHBY, D.A.; MOORE, A.R.; COLVILLENASH, P.R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. **Lancet**, 355:646-648, 2000b.
- WONG, E.; BAYLY, C.; WATERMAN, H.L.; RIENDEAU, D.; MANCINI, J.A. Conversion of prostaglandin G/H synthase-1 into an enzyme sensitive to PGDHS-2-selective inhibitors by a double His⁵¹³ to Arg and Ile⁵²³ to Val mutation. **J. Biol. Chem.**, 272: 9280-9286, 1997.
- WONG, P.Y.K.; DENNIS, E.D. Phospholipase A₂: Role and function in inflammation. WONG, P.Y.K.; DENNIS, E.D. (eds). Plenum Press, New York, 1990.
- XIE, Q.W.; WHISNAUT, R.; NATHAN, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent NO synthase confers inducibility by interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, 177: 1779-1784, 1993a.
- XIE, W.; CHIPMAN, J.G.; ROBERTSON, D.L.; ERIKSON, R.L.; SIMMONS, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin

- synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 88: 2692-2696, 1991.
- XIE, W.; ROBERTSON, D.L.; SIMMONS, D.L. Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a new target for nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Drug Dev. Res.**, 25: 249-265, 1992.
- XIE, W.; MERRILL, J.R.; BRADSHAW, W.S.; SIMMONS, D.L. Structural determination and promoter analysis of the chicken mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase gene and genetic mapping of the murine homologue. **Arch. Biochem. Biophys.**, 300: 247-252, 1993b.
- YAMAGATA, K.; ANDERASSON, K.I.; KAUFMANN, W.E.; BARNES, C.A.; WORLEY, P.F. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neuron: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. **Neuron**, 11: 371-386, 1993.
- YEDGAR, S.; LICHTENBERG, D.; SCHNITZER, E. Inhibition of phospholipase A₂ as a therapeutic target. **Biochim. Biophys. Acta**, 1488: 182-187, 2000.
- YOKOYAMA, C.; TAKAI, T.; TANABE, T. Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequences. **FEBS Lett.**, 231: 347-351, 1988.
- YOKOYAMA, C.; TANABE, T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 165: 888-894, 1989.
- ZIMMERMAN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16: 109-110, 1983.