

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**ESTUDO SOBRE OS MECANISMOS ANTINOCICEPTIVOS
PERIFÉRICOS INDUZIDOS PELO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
(H₂O₂)**

WALACE CÁSSIO PINTO BARRA

BELO HORIZONTE

2021

Wallace Cássio Pinto Barra

ESTUDO SOBRE OS MECANISMOS ANTINOCICEPTIVOS
PERIFÉRICOS INDUZIDOS PELO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
(H₂O₂)

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia como parte dos requisitos exigidos par a obtenção do título de Mestre.
Área de Concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte
Co-Orientadora: Dr. Renata Cristina Mendes
Ferreira

043

Barra, Wallace Cássio Pinto.

Estudo sobre os mecanismos antinociceptivos periféricos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) [manuscrito] / Wallace Cássio Pinto Barra. – 2021.

100 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte. Co-Orientadora: Dr. Renata Cristina Mendes Ferreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Peróxido de Hidrogênio. 3. Analgésicos. 4. Óxido Nítrico. 5. Canais de Potássio. I. Duarte, Igor Dimitri Gama. II. Ferreira, Renata Cristina Mendes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 547 DE WALACE CÁSSIO PINTO BARRA

*"Estudo Sobre Os Mecanismos Antinociceptivos Periféricos
Induzidos Pelo Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)"*

WALACE CÁSSIO PINTO BARRA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **14 de dezembro de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Andrea de Castro Perez, ICB/UFMG
Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos, ICB/UFMG
Dra. Renata Cristina Mendes Ferreira, ICB/UFMG - Coorientadora
Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 14 de dezembro de 2021

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Igor Dimitri Gama Duarte**, **Membro de comissão**, em 15/12/2021, às 14:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Cristina Mendes Ferreira**, **Usuário Externo**, em 15/12/2021, às 14:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Virgínia Soares Lemos**, **Professora do Magistério Superior**, em 16/12/2021, às 14:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andrea de Castro Perez**, **Professora do Magistério Superior**, em 16/12/2021, às 18:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1118981** e o código CRC **6F242CD7**.

“Só sei que nada sei, e o fato de saber isso, me coloca em vantagem sobre aqueles que acham que sabem alguma coisa.”

- Sócrates

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Igor Dimitri Gama Duarte, meus mais sinceros agradecimentos por ter me acolhido no Laboratório de Dor e Analgesia e ter me agraciado com sua orientação, não só dentro da área de conhecimento que escolhi, mas também toda sua sabedoria.

A minha coorientadora, Renata Cristina Mendes Ferreira, que não só colaborou incansavelmente com meu projeto, mas me permitiu formar uma amizade com uma pessoa a quem tanto admiro, mesmo antes do mestrado.

Aos professores do Laboratório de Dor e Analgesia, Prof. Thiago Roberto Lima Romero e Profa. Andrea de Castro Perez por estarem presentes e contribuírem sempre que preciso.

À técnica do Laboratório de Dor e Analgesia, Adriane Aparecida Pereira, pela sua incansável disposição em ajudar nosso laboratório e também em me alegrar.

Aos funcionários da UFMG, bioteristas, funcionários do CEBIO, da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia e demais funcionários.

Aos companheiros do Laboratório de Dor e Analgesia e do Departamento de Farmacologia, Amanda Gonzaga, Cecília Moreira, Daniel Portela, Danielle Diniz, Flávia Fonseca, Marla Calazans, Raquel Rodrigues, Thaís de Menezes Noronha, Sandro Dias, Vanessa Kaiser e Willian Valadares e, em especial à Bárbara Berg, Barbara Queiroz e Douglas Almeida, por sempre encontrarem um tempo para sanar minhas dúvidas, contribuírem no meu trabalho e também tomar um cafezinho e ~~fofocar~~ discutir sobre incontáveis assuntos, quando necessário.

Aos órgãos de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos meus pais, Leila e João Carlos, **meus irmãos**, Guilherme e Tainá, **minhas tias**, Márcia e Sueli e também **meus avós**, Conceição e Roberto, os quais não mediram esforços em me apoiar durante toda minha vida e me fizeram chegar até aqui com seu amor incondicional.

Aos meus amigos, Augusto, João, Lucas, Vitor, Nathália, Vanessa e ao grupo Desaforados, por serem minha segunda família, sendo merecedores de um amor que jamais morrerá, além de estarem sempre dispostos a me escutar falando sobre meus experimentos, que apesar dos percalços, me trouxeram até aqui!

RESUMO

RESUMO

INTRODUÇÃO: A dor é um fenômeno sensorial vital para a proteção dos tecidos e consequente sobrevivência do organismo. Apesar de essencial, em algumas situações a dor necessita ser atenuada para o bem-estar do organismo, seja de forma endógena ou exógena. É descrito na literatura que moléculas que produzem hiperpolarização da membrana neuronal possuem potencial para causar antinocicepção através deste mecanismo. Estudos prévios demonstraram que a administração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) exógeno podia causar hiperpolarização através da ativação dos canais para K^+ em uma variedade de células, incluindo células do sistema nervoso. **OBJETIVO:** Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação antinociceptiva do H_2O_2 , a nível periférico, frente a hiperalgesia causada pela prostaglandina E_2 , investigando eventuais mecanismos de ação envolvendo as vias dos sistemas opioide, canabinoide, nitrérgico e dos canais para K^+ . **MÉTODOS:** Para isso foi utilizado o teste de retirada de pata submetido à compressão mecânica em camundongos (Swiss, machos, 30-40 g, n = 5 / Protocolo CEUA: 212/2020) que apresentaram hiperalgesia causada pela administração de PGE_2 . O estudo foi conduzido com o uso de ferramentas farmacológicas e, todos os fármacos foram administrados por via subcutânea na pata (intraplantar), no volume de 20 μ l. **RESULTADOS:** A administração de PGE_2 (2 μ g/pata) diminuiu o limiar nociceptivo dos animais de forma eficiente. H_2O_2 (0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 μ g/pata) promoveu efeito antinociceptivo, de forma dose-dependente, em animais pré-tratados com PGE_2 . Este efeito não foi revertido pelo antagonista não seletivo dos receptores opioides, Naloxona (50 μ g/pata). A reversão também não ocorreu com os antagonistas seletivos dos receptores CB_1 e CB_2 da via canabinoidérgica, AM251 (80 μ g/pata) e AM630 (100 μ g/pata), respectivamente. Entretanto, o envolvimento do óxido nítrico (NO) foi observado pela reversão da antinocicepção mediada pelo H_2O_2 quando utilizado o inibidor não seletivo das óxido nítrico sintases LNOarg (6, 12 e 24 μ g/pata). Adicionalmente, para avaliar qual ou quais isoformas participavam do mecanismo, administraram-se L-NIO (24 μ g/pata), L-NPA (24 μ g/pata) e L-NIL (24 μ g/pata), inibidores seletivos da NOS ϵ ; NOS δ e NOS α , respectivamente. A reversão da antinocicepção causada pelo H_2O_2 ocorreu com a inibição das três isoformas, sendo total para a NOS α e parcial

para NO_{Se} e NO_{Sn}. A antinocicepção causada pelo H₂O₂ parece estar envolvida com a abertura dos canais para K⁺, uma vez que o tetraetilamônio, bloqueador seletivo dos canais para K⁺ voltagem dependente (15, 30 e 60 µg/pata) reverteu completamente a antinocicepção, de forma dose-dependente e, os bloqueadores seletivos dos canais para K⁺ ativados por ATP, glibenclamida (40, 80 e 160 µg/pata), ativados por Ca²⁺ de alta condutância, paxilina (10, 20 e 40 µg/pata) e baixa condutância, dequalínio (12,5; 25 e 50 µg/pata), também foram capazes de reverter a antinocicepção do H₂O₂. Apenas o dequalínio apresentou reversão total da antinocicepção. A paxilina não agiu de forma dose-dependente, diferentemente da glibenclamida e dequalínio, que tiveram efeito dose-dependente. **CONCLUSÃO:** O H₂O₂ possui efeito antinociceptivo periférico frente a dor aguda mediada pela administração de PGE₂. Foi demonstrado o envolvimento da via do NO e dos canais para potássio voltagem dependentes, ativados por ATP e os ativados por Ca²⁺ de baixa e alta condutância, no mecanismo antinociceptivo do H₂O₂. Não foi observada participação dos sistemas opioidérgico e canabinoidérgico no mecanismo antinociceptivo da droga.

PALAVRAS-CHAVES: peróxido de hidrogênio, antinocicepção periférica, óxido nítrico, canais para potássio.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Pain is a vital sensory phenomenon to the protection of tissues and the survival of the organism. Besides being essential in some cases, pain must be attenuated when it affects the system's welfare. Data from the literature describe different molecules with the ability to hyperpolarize the neuronal membrane potential to cause antinociception. Previously studies have shown that the administration of hydrogen peroxide (H_2O_2) can cause hyperpolarization in a variety of cells through opening the K^+ channels, including neuronal cells. **AIM:** Thus, this study aimed to evaluate the peripheral antinociceptive effect of hydrogen peroxide in a prostaglandin E_2 model of acute pain, and determine if the opioidergic and cannabinoidergic systems, as well as the nitric oxide pathway and potassium channels, are involved in the antinociceptive effect mediated by H_2O_2 . **METHODS:** The paw compression test was used to measure the nociceptive threshold in mice (Swiss, male, 30-40 g, n = 5 / CEUA protocol: 212/2020). Acute pain was induced by PGE_2 administration, and the study was conducted using pharmacological tools. All drugs were administered intraplantar in a volume of 20 μ l. **RESULTS:** The administration of PGE_2 at 2 μ g/paw efficiently decreased the nociceptive threshold of the animals. H_2O_2 (0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 μ g/paw) promotes dose-dependent antinociceptive effect in a PGE_2 model of acute pain. This antinociceptive effect was not reversed by Naloxone (Nx - 50 μ g/paw) a non-selective opioid receptor antagonist. The reversion did not occur by antagonizing the CB_1 and CB_2 receptors using the selective antagonists AM 251 (80 μ g/paw) and AM 630 (100 μ g/paw) respectively. The non-selective inhibition of nitric oxide synthase enzymes with L-NOarg (6, 12 e 24 μ g/paw), dose-dependently reversed the H_2O_2 -mediated antinociception. Thus, to evaluate which isoforms were responsible for the reversion was administered L-NIL (24 μ g/paw), L-NPA (24 μ g/paw) e L-NIO (24 μ g/paw). Selective inhibitors of iNOS, nNOS and eNOS respectively. The antinociceptive reversion occurs with the inhibition of the three isoforms, being total for iNOS and partial to nNOS and eNOS. The antinociception caused by H_2O_2 demonstrated to be involved with the potassium channels, given that tetraethylammonium (TEA), a selective voltage-gated potassium channel blocker (15, 30 e 60 μ g/paw) fully reversed the H_2O_2 antinociception in a dose-dependent manner. The ATP-

sensitive K⁺ channels selective blockers glibenclamide (40, 80 e 160 µg/paw), large and small conductance calcium-activated potassium channels paxiline (10, 20 e 40 µg/paw) and dequalinium (12,5; 25 e 50 µg/paw) respectively reversed the H₂O₂-mediated antinociception. Nonetheless, only dequalinium fully reversed the antinociception, and only paxiline didn't have a dose-dependent response. **CONCLUSION:** H₂O₂ has a peripheral antinociceptive effect on the acute pain model induced by PGE₂ administration. It was demonstrated that the NO pathway and voltage-gated K⁺ channel, ATP-sensitive K⁺ channels, large and small conductance calcium-activated potassium channels take part in the antinociceptive mechanisms of H₂O₂. The role of the opioid and cannabinoid systems was not evidenced in this study.

KEYWORDS: hydrogen peroxide, peripheral antinociception, nitric oxide, potassium channels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Noção histórica do estudo da dor – Parte 1	22
Figura 2. Noção histórica do estudo da dor – Parte 2	23
Figura 3. Dor nociceptiva e dor inflamatória	25
Figura 4. Dor neuropática e dor disfuncional	26
Figura 5. Morfologia das fibras aferentes primárias.....	27
Figura 6. Mecanismo de sinalização e transmissão das fibras nociceptivas ...	29
Figura 7. Teoria do portal da dor	31
Figura 8. Síntese e metabolização do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	32
Figura 9. Fatores hiperpolarizantes derivado do endotélio vascular (EDHF) ..	36
Figura 10. Administração intraplantar dos fármacos	46
Figura 11. Aparelho algésímetro e sua medição	47
Figura 12. Delineamento experimental – Parte 1	48
Figura 13. Delineamento experimental – Parte 2	49
Figura 14. Curva de desenvolvimento temporal da administração intraplantar de diferentes doses de PGE ₂	52
Figura 15. Curva de desenvolvimento temporal da antinocicepção por diferentes doses de H ₂ O ₂	54
Figura 16. Exclusão do efeito antinociceptivo sistêmico do H ₂ O ₂	55
Figura 17. Efeito da Naloxona sobre a antinocicepção periférica mediada pelo H ₂ O ₂	57
Figura 18. Efeito do AM251 na antinocicepção periférica mediada pelo H ₂ O ₂	58
Figura 19. Efeito do AM630 na antinocicepção periférica mediada pelo H ₂ O ₂	59
Figura 20. Efeito do L-NOArg na antinocicepção periférica mediada pelo H ₂ O ₂	61
Figura 21. Efeito do L-NIL na antinocicepção periférica mediada pelo H ₂ O ₂ ...	62
Figura 22. Efeito do L-NPA na antinocicepção periférica mediada pelo H ₂ O ₂ .	63

Figura 23. Efeito do L-NIO na antinocicepção periférica mediada pelo H ₂ O ₂ ..	64
Figura 24. Efeito do TEA na antinocicepção periférica mediada pelo H ₂ O ₂	66
Figura 25. Efeito da Glib na antinocicepção periférica mediada pelo H ₂ O ₂	67
Figura 26. Efeito do Dq na antinocicepção periférica mediada pelo H ₂ O ₂	68
Figura 27. Efeito da Px na antinocicepção periférica mediada pelo H ₂ O ₂	69
Figura 28. Mecanismos de antinocicepção periférica induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂):	80

LISTA DE ABREVIATURAS

μ - mu

μg – micrograma

μM – micromolar

μMoles - micro moles

5-HT - Serotonina

ACh – Acetilcolina (do inglês *acetylcholine*)

AEA - N-araquidonoyletanolamina

AEC – antes da era comum

AKT – proteína kinase B

ANOVA - análise de variância (do inglês *analysis of variance*)

ATP - adenosina trifosfato

BK_{Ca} – canais para K⁺ ativados por Ca²⁺, de alta condutância (do inglês

Ca²⁺ - íon cálcio

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CB₁ – receptor canabinoide tipo 1

CB₂ – receptor canabinoide tipo 2

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês *calcitonin gene-related peptide*)

DMSO – dimetilsulfóxido

Dq – dequalínio

EC – era comum

EDHF – fator hiperpolarizante derivado do endotélio (do inglês *endothelium derived hyperpolarizing factor*)

e.p.m. - erro padrão da média

NOSe – óxido nítrico-sintase endotelial

EUA – Estados Unidos da América

GABA - Ácido gama-aminobutírico (do inglês *Gamma-AminoButyric Acid*)

Glib – glibenclamida

GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina

GRD – gânglio da raiz dorsal

GTP - Trifosfato de guanosina (do inglês *guanosine triphosphate*)

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HO-1 – hemeoxigenase-1

h – hora

i.pl. – intraplantar

IASP – Associação internacional do estudo da dor (do inglês *International Association for the Study of Pain*)

IL-6 – interleucina-6

NOS_i – óxido nítrico-sintase induzível

k - kappa

K⁺ - íon potássio

K_{ATP} – canais para K⁺ ativados por ATP

K_{ir} - canais para K⁺ retificador de entrada

Kg - quilograma

LNRP – Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata

M – molaridade

min – minuto

mg - miligrama

ml – mililitro

mM – milimolar

Na⁺ - íon sódio

NaCl – cloreto de sódio

NADP⁺ – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH – forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF-κB – fator nuclear kappa B (do inglês *factor nuclear kappa B*)

NKA – neurocinina A

NKB – neurocinina B

nM – nanomolar

nMoles – nano moles

NOS_n – óxido nítrico-sintase neuronal

NO – óxido nítrico

NOX – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidases

Nx – naloxona

O₂⁻ - ânion superóxido

OH- - grupo hidroxila

PG – prostaglandinas

PGE₂ – prostaglandina E₂

PI3k - Fosfoinosítídeo 3-quinase

Px – paxilina

ROS – espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)

Sal – salina

s – segundo

SK_{Ca} – canais para K⁺ ativados por Ca²⁺, de baixa condutância

SNC – sistema nervoso central

SP – substância P

TEA – tetraetilamônio

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*)

TRPA1 – Receptor de Potencial Transiente Ankyrin 1 (do inglês *potential receptor ankyrin 1*)

WDR - neurônios de ampla faixa dinâmica (do inglês *wide dynamic range*)

α - alfa

β - beta

δ – delta minúsculo

Δ – delta maiúsculo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Considerações sobre o estudo da dor	21
1.2 Classificações de dor	24
1.3 Transmissão ascendente da dor	26
1.4 Sistemas analgésicos	29
1.5 Peróxido de hidrogênio(H₂O₂)	31
1.5.1 Síntese e metabolização do H ₂ O ₂	31
1.5.2 Ação pró-inflamatória e hiperalgésica do H ₂ O ₂	34
1.5.3 Ação hiperpolarizante do H ₂ O ₂	35
1.5.4 Hiperpolarização relacionada a atividade antinociceptiva	36
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivos gerais	41
3.2 Objetivos específicos	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Animais para experimentação	43
4.1.1. Grupo amostral.....	43
4.1.2. Eutanásia dos animais	44
4.2 Drogas e solventes	44
4.2.1. Agente hiperalgésico	44
4.2.2. Substância sob teste	44
4.2.3. Fármacos envolvidos na via opioidérgica	45
4.2.4. Fármacos envolvidos na via canabinoidérgica	45
4.2.5. Fármacos envolvidos na via nitrérgica	45
4.2.6. Fármacos envolvidos com canais para potássio	45
4.3 Administração das droga	45

4.4 Teste algesímetro.....	46
4.5 Protocolo experimental	47
4.6 Análise estatística	49
5. RESULTADOS	51
5.1 Hiperalgia induzida pela administração intraplantar de diferentes doses de prostaglandina E ₂ (PGE ₂).....	51
5.2 Efeito da administração intraplantar do peróxido de hidrogênio sobre a hiperalgia induzida por PGE ₂	53
5.2.1 Efeito antinociceptivo dose-dependente do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	53
5.2.2 Exclusão do efeito antinociceptivo sistêmico do peróxido de hidrogênio na dose de 0,2 µg	53
5.3 Avaliação da participação dos receptores opioidérgicos no efeito antinociceptivo periférico do peróxido de hidrogênio	56
5.4 Avaliação da participação dos receptores canabinoidérgicos no efeito antinociceptivo periférico do peróxido de hidrogênio	56
5.5 Avaliação da participação da via do óxido nítrico (NO) no efeito antinociceptivo periférico do peróxido do hidrogênio	60
5.6 Avaliação da participação dos canais para potássio (K ⁺) no efeito antinociceptivo periférico do peróxido de hidrogênio	65
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
Anexo I	99

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre o estudo da dor

O estudo sobre a dor possui um legado que se perpetua desde tempos muito antigos. Aristóteles (384–322 AEC) considerava que o coração era o abrigo dos sentimentos. Devido ao fato de que a dor afetava a disposição do indivíduo, ele argumentava que ela seria de fato um sentimento. Nem todos os filósofos da época concordaram, no entanto, as influências filosóficas de Aristóteles perduraram para que futuramente aprofundassem as hipóteses e os estudos (Dallenbach, 1939).

Séculos depois, Galeno (130–201 EC), um importante cirurgião de Alexandria, executou estudos experimentais e descreveu que o cérebro seria o órgão responsável pelos sentimentos, incluindo a dor. Posteriormente, Avicenna (980–1037 EC), um renomado filósofo e físico mulçumano, percebeu que, quando afetado pela dor, podia-se desassociar a sensação dolorosa de toques ou mudanças de temperatura, propondo que a dor seria uma sensação independente. No entanto, durante décadas ainda se considerou que os sentimentos necessitavam de um agente exógeno que era carregado ao coração ou ao cérebro. Este conceito foi então reestruturado no século XVIII devido aos estudos da física, propostos em grande parte por Newton (1642–1727) e Hartley (1705–1757), que apresentaram hipóteses de que existia um fluxo, ainda não descrito precisamente, que percorria o sistema nervoso (Dallenbach, 1939; Perl, 2007).

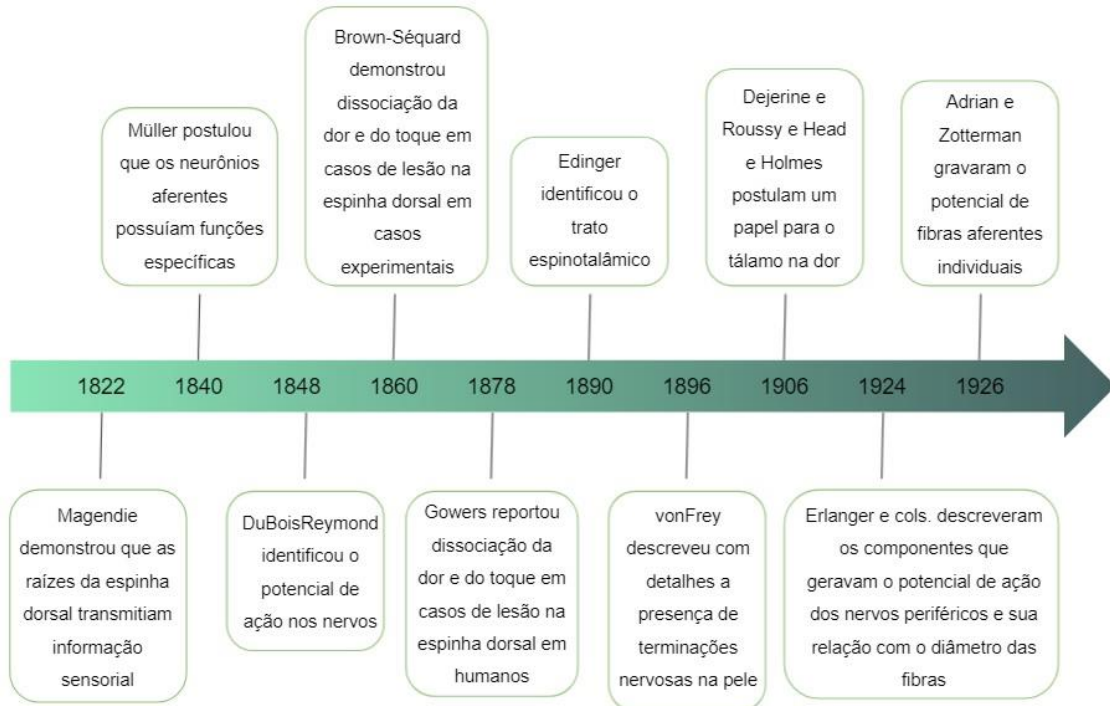


Figura 1. Linha histórica do estudo da dor – Parte 1: Principais acontecimentos que marcaram o estudo da dor entre os anos de 1822 à 1926, permitindo o avanço das descobertas de analgésicos e mecanismos fisiológicos moduladores da via nociceptiva (adaptada de Perl, E. R., 2007).

O estudo da dor continuou a se desenvolver nas décadas seguintes (Figuras 1 e 2) e assim, baseando-se no intenso estudo da dor de John J. Bonica, em 1973, fundou-se a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), que em 1979 publicou pela primeira vez uma definição mais abrangente e que fosse padronizada para o termo “dor”. Desde então, atualizações e modificações foram realizadas e em 2020 a IASP revisou o termo para sua versão mais atual definindo a dor como “Uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada a uma lesão, ou semelhante àquela associada”.

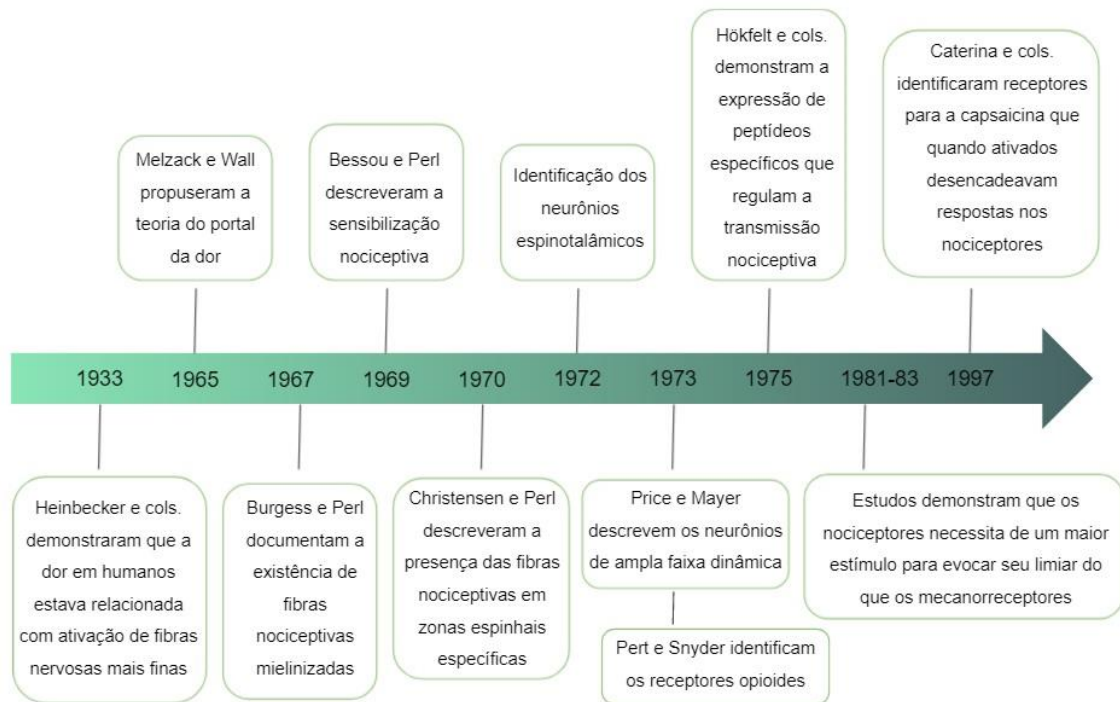


Figura 2. Linha histórica do estudo da dor – Parte 2: Principais acontecimentos que marcaram o estudo da dor entre os anos de 1933 à 1997, permitindo o avanço das descobertas de analgésicos e mecanismos fisiológicos moduladores da via nociceptiva (adaptada de Perl, E. R., 2007).

A dor é um fenômeno sensorial vital para a proteção dos tecidos e consequente sobrevivência do organismo. Animais e humanos que por razões genéticas são incapazes de sentir dor são propensos a morrer precocemente, uma vez que não podem notar e reportar o dano real ou potencial que estão sofrendo (Ahmad e cols., 2007).

A sinalização dolorosa desencadeia uma série de reações de adaptação: psicológicas, autonômicas e motoras, como uma forma de repelir a agressão ao organismo (Millan, 1999). Estas reações tem como objetivo evitar ou reduzir os estímulos que a estejam causando e, conseqüentemente, minimizar possíveis danos ao organismo (Woolf e Salter, 2000; Le Bars e cols., 2001; Almeida e cols., 2004). Apesar da essencialidade da dor como componente protetor para a autopreservação dos organismos vivos, a sua persistência pode causar danos, extrapolando sua função como resposta adaptativa. Estados dolorosos prolongados podem se categorizar como patologias e comprometerem a qualidade de vida do indivíduo (van Hecke e cols., 2013; Anastas e cols., 2018).

O termo “dor” em si compreende os componentes fisiológicos, psicológicos, emocionais e sociais enquanto o termo “nociceção” refere-se ao processo neural de

transdução, transmissão e processamento do estímulo pelas terminações nervosas livres, denominadas nociceptores, que se estendem em fibras nervosas que transmitem a informação nociceptiva da periferia ao sistema nervoso central (SNC) (Julius e Basbaum, 2001).

Em humanos, os componentes acima citados possuem forte expressividade e influência, tornando a sensação da dor de difícil, porém possível detecção e avaliação. Entretanto, em animais, como a comunicação verbal não é uma forma viável de avaliação, realiza-se a leitura da nocicepção com diferentes algosímetros, para exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em seres humanos (Julius e Basbaum, 2001). Portanto, para se referir a animais de experimentação, a terminologia mais adequada seria “nocicepção” quando o processo doloroso está ocorrendo e “antinocicepção” quando ele está sendo minimizado ou interrompido.

1.2 Classificações de dor

Em uma perspectiva neurobiológica pode-se diferenciar três classificações de dor. A primeira está envolvida na ação protetiva do corpo como um evento primário para demonstrar que está havendo estímulo nocivo ao organismo. Esta é a dor descrita em casos de queimaduras pelo calor ou frio por exemplo e, justamente por sinalizar nocividade é chamada de dor nociceptiva (Woolf, 2010).

A segunda classe é protetiva, mas também adaptativa, e ocorre através do aumento da sensibilidade sensorial após o dano no tecido. Ela colabora com a melhora do corpo injuriado, criando uma situação que evita que a área afetada seja utilizada, e poupando para que o dano seja reparado o mais rápido possível. Esta classe de dor é causada pela ativação do sistema imune e de diferentes mediadores, sendo denominada dor inflamatória (Woolf, 2010) (Figura 3).

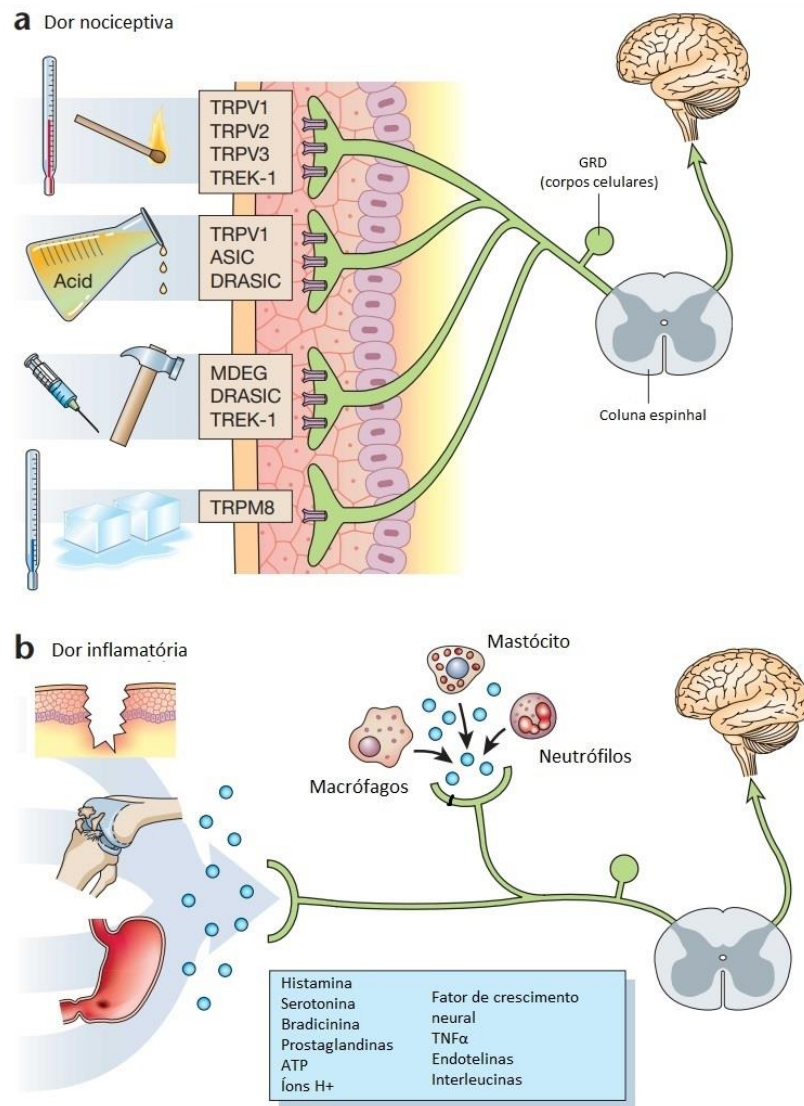


Figura 3. Dor nociceptiva e dor inflamatória: Estímulos causadores das dores nociceptiva (a) e inflamatória (b) (adaptado de Scholz e Woolf, 2002).

Em contraste, a dor neuropática persiste por um longo período, sendo iniciada por um dano ou lesão diretamente no sistema nervoso em que o estímulo doloroso é, portanto, gerado de forma espontânea. E, por último, existe a dor nomeada funcional, que é classificada como uma hipersensibilidade resultada pelo processamento central anormal da dor, mesmo sem um processo estimulante perceptível clinicamente (Clifford e Woolf, 2004) (Figura 4).

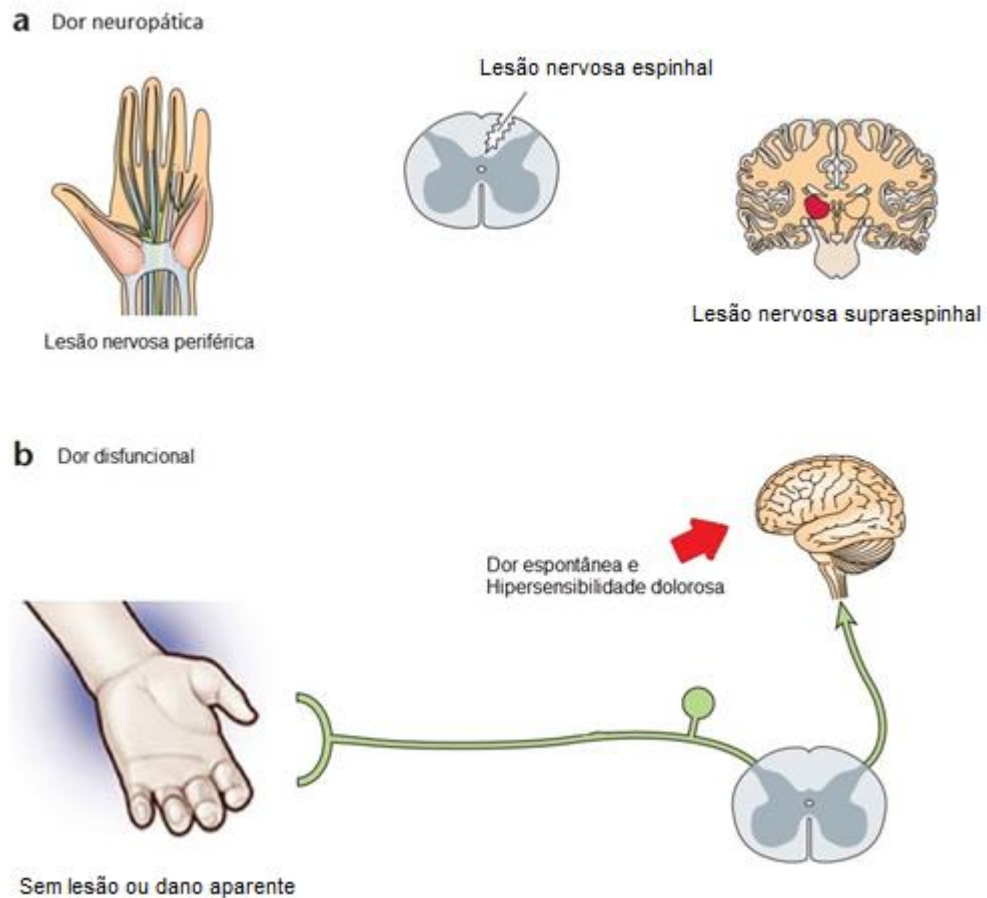


Figura 4. Dor neuropática e dor disfuncional: Estímulos causadores das dores neuropática (a) e disfuncional (b) (adaptado de Scholz e Woolf, 2002 e Bourne e cols., 2014).

1.3 Transmissão ascendente da dor

A dor é iniciada com a ativação de receptores periféricos chamados nociceptores, que são comuns em tecidos como a pele, mucosas, membranas, fâscias musculares, entre outros tecidos incluindo os viscerais e ósseos. Em descrições morfológicas, estes nociceptores são terminações nervosas livres e representam a parte mais distal das fibras dos neurônios primários, apresentando pouca ou nenhuma mielina, além de serem de pequeno calibre. Essas são classificadas como tipo A δ e C respectivamente (Mense, 1983).

Normalmente, a sensação dolorosa é resultado da ativação destes nociceptores por um estímulo mecânico, térmico ou químico de alta intensidade, mas não por estímulos de outras classes sensoriais que compreendem fibras mielinizadas de maior calibre, como a A β (Mense, 1983; Millan, 1999) (Figura 5).





Axônios da pele	A α	A β	A δ	C
Axônios vindos dos músculos	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
				
Diâmetro (μm)	13 a 20	6 a 12	1 a 5	0,2 a 1,5
Velocidade (m/s)	80 a 120	35 a 75	5 a 30	0,5 a 2
Receptores sensoriais	Proprioceptores do músculo esquelético	Mecanorreceptores da pele	Dor, temperatura	Temperatura, dor, prurido (coceira)

Figura 5. Características das fibras aferentes primárias: aspectos morfológicos e principais características fisiológicas e neurobiológicas (adaptada de Curi, 2009).

Os corpos dos neurônios sensoriais primários estão localizados no gânglio da raiz dorsal da coluna espinal (GRD). Este grupo de neurônios são classificados como pseudounipolares, pois um ramo do nervo se dirige a periferia e o outro em direção a medula espinal. Cada GRD contém milhares de corpos celulares neuronais sensoriais que são capazes de codificar e transmitir informação específica referente aos estímulos nocivos externos (Devor, 1999).

O conjunto de neurônios do GRD sintetiza e transporta substâncias essenciais para a função neuronal, tanto das terminações periféricas, quanto das centrais. Dentre eles pode-se citar os canais iônicos que são os responsáveis pela transdução do estímulo externo para o estímulo nociceptivo, e o glutamato liberado pela sinapse dos neurônios primários a medula (Devor, 1999). Além desse neurotransmissor o GDR

também expressa síntese de substância P e outras substâncias facilitadoras da transmissão nociceptiva, como o glutamato (Rosenow e Henderson, 2003).

No corno da raiz dorsal, as fibras aferentes primárias através do GRD estabelecem sinapses com os neurônios de segunda ordem, também chamados de neurônios secundários. O corno dorsal, na medula, se divide em lâminas, nas quais ocorrem as complexas interações entre os interneurônios excitatórios e inibitórios, além do controle da dor pela via descendente (Steeds, 2009).

Os neurônios de segunda ordem, presentes nas lâminas Rexed I e V são compostas por diferentes tipos celulares: neurônios nociceptivos específicos e neurônios de ampla faixa dinâmica (WDRs). Neurônios nociceptivos específicos respondem a estímulos nocivos e expressam neuropeptídeos endógenos para a transmissão da dor, enquanto os WDRs transmitem informação não-nociceptiva e nociceptiva. Os WDR exibem respostas proporcionais a intensidade do estímulo, atingindo uma frequência maior para estímulos nociceptivos (Rosenow e Henderson, 2003). A maior amplitude dos campos receptivos dos neurônios WDR refletem sua função integrativa, que pode contribuir para a alodínia por meio da responsividade aumentada e desproporcional a estímulos não nocivos, uma vez que, quando esta faixa se expande muito, ocorre o disparo dos neurônios nociceptivos específicos (Willis e Westlund, 1997; Le Bars e Cadden, 2008).

As fibras secundárias, então, carregam a informação nociceptiva e realizam neurotransmissão no tálamo. Esse por sua vez projeta os neurônios de terceira ordem que levam a informação até o córtex somatossensorial, responsável pelo processamento e interpretação do estímulo considerado doloroso (Steeds, 2016) (Figura 6).

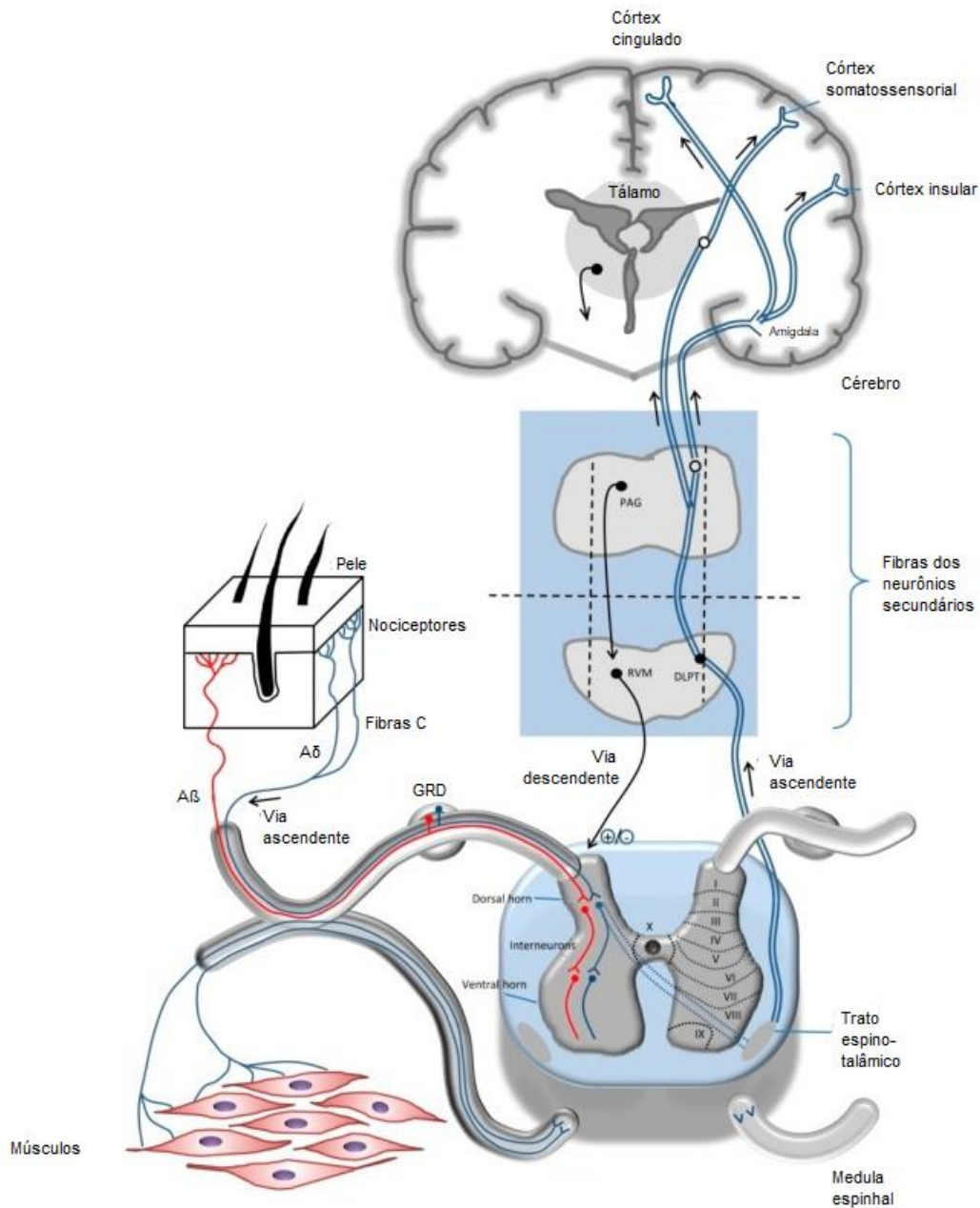


Figura 6. Substrato Neural da dor e sua modulação: Via aferente da dor para centros superiores de processamento no sistema nervoso central representado pelas linhas em vermelho e azul e vias descendente da dor com seus principais pontos de controle, representada pelas linhas em preto (adaptado de Yam e cols., 2018).

1.4 Sistemas analgésicos

Há cerca de 50 anos atrás foi definido que a informação nociceptiva chegava da pele, vísceras e outros tecidos até o corno dorsal da medula espinal, mas não era transmitida diretamente aos centros encefálicos. Logo, a ideia evoluiu e surgiram hipóteses que descreviam um possível “portal da dor” (Melzack e Wall, 1965).

Quando a teoria do portal da dor foi formulada, a grande diversidade de mecanismos envolvidos na modulação da transmissão nociceptiva no corno dorsal, ou em outras áreas reguladoras, dificilmente poderiam ser previstas. No entanto, hoje, é descrito que existem classes de fibras dos neurônios primários no corno dorsal e fibras eferentes do encéfalo que exercem uma influência moduladora poderosa sobre a nocicepção (Millan, 2002).

Uma das propostas da teoria do portal da dor de Melzack e Wall é que a substância gelatinosa, que é basicamente a segunda lâmina de Rexed, participa da modulação das projeções neuronais, uma vez que é nesta lâmina que ficam os interneurônios inibitórios que liberam GABA. Os interneurônios inibitórios são ativados quando há estímulo tátil pelas fibras A β , ocorrendo modulação inibitória da dor (Figura 7) (Gobel, 1978; Rosenow e Henderson, 2003).

De uma forma simplista pode-se exemplificar a situação em que se esfrega uma área lesionada e a ativação da propriocepção com o tato (ativação de fibras A α e A β) reduz a sensação dolorosa. Além do mecanismo de controle modulador ascendente, o controle descendente destaca-se pela ativação de inúmeros sistemas endógenos, como opioides, canabinoides e as aminas (Melzack e Wall, 1965).

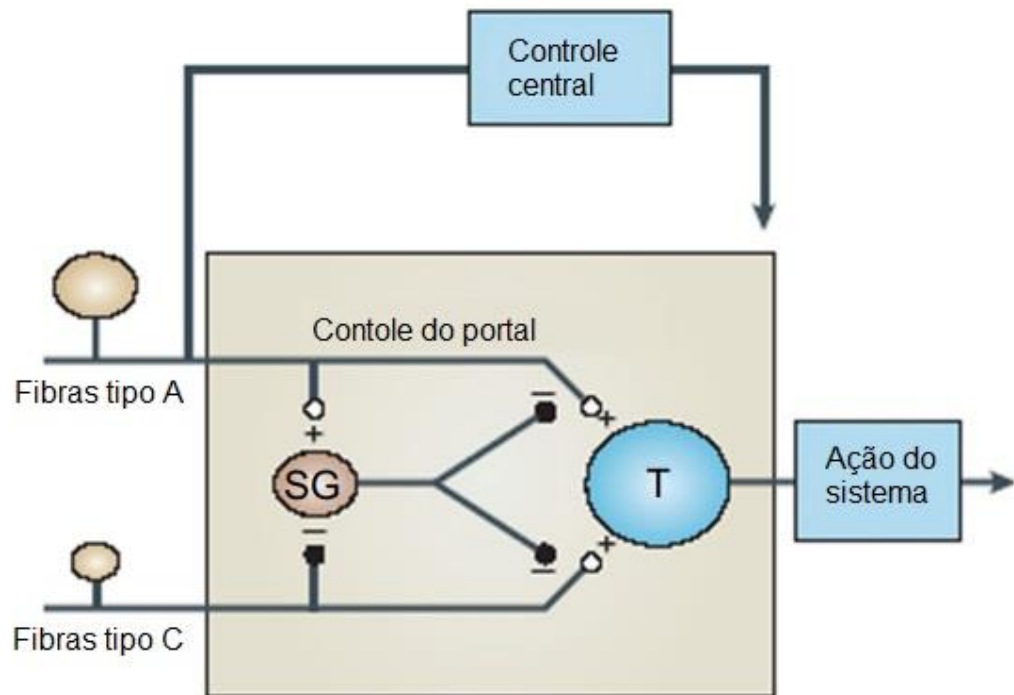


Figura 7. Teoria do portal da dor: Teoria desenvolvida por Melzack e Wall, 1965 na qual explica-se que as fibras tipo A β teriam influência sobre a sinalização nociceptiva. As fibras tipo A ativam neurônios inibitórios da substância gelatinosa (SG) na lâmina Rexed II, que por sua vez inibem as células de transmissão (T), atenuando a sensação dolorosa (adaptada de Moayedí e Davis, 2013)

1.5 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

1.5.1 Síntese e metabolização do H₂O₂

Um atributo muito reconhecido do metabolismo aeróbico em células eucariotas é a produção de espécies reativas de oxigênio. A oxidação de alguns componentes celulares que ocorre durante a respiração mitocondrial resulta na formação de ânions superóxido (O₂⁻) que são convertidos em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Turrens e Boveris, 1980).

O peróxido de hidrogênio é um líquido, livremente miscível em água e capaz de atravessar membranas biológicas de organismos vivos, estando as possíveis vias específicas de transporte ainda não claramente elucidadas (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Essa molécula é gerada *in vivo* no interior das mitocôndrias, sendo descrita sua presença em células do sistema nervoso, coração, rins, fígado e endotélio vascular.

O H_2O_2 é sintetizado por diversas vias que realizam a dismutação do radical superóxido O_2^- , que se agrega a doadores de hidrogênio como etanol ou o NADPH, através de processos não enzimáticos e enzimáticos (Figura 8). A principal via de síntese é realizada pela enzima superóxido dismutase (SOD). No entanto, a molécula também pode ser produzida por reações de enzimas oxidativas incluindo glicolato e monoaminas oxidases, através de reações pela via de β -oxidações de ácidos graxos, pela tioredoxina ou mesmo dependente das concentração dos grupos tióis (Chance e cols., 1979; de Groot e Littauer, 1989; Reddy e Rao, 1989; Rhee e cols., 2001; Hofmann e cols., 2002; Halliwell e Gutteridge, 2015). Outra via importante na formação de espécies reativas de oxigênio pertence à família das enzimas nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidases, mais conhecidas por NOX ou NADP oxidases (Geiszt, 2006). Estas enzimas atuam como fonte de transferência de elétrons, sendo moduladas pela presença de NADP^+ , NADPH e O_2 , gerando no final do processo ânions superóxidos e H_2O_2 (Martin-Serrano e cols., 2003; Lambeth, 2004).

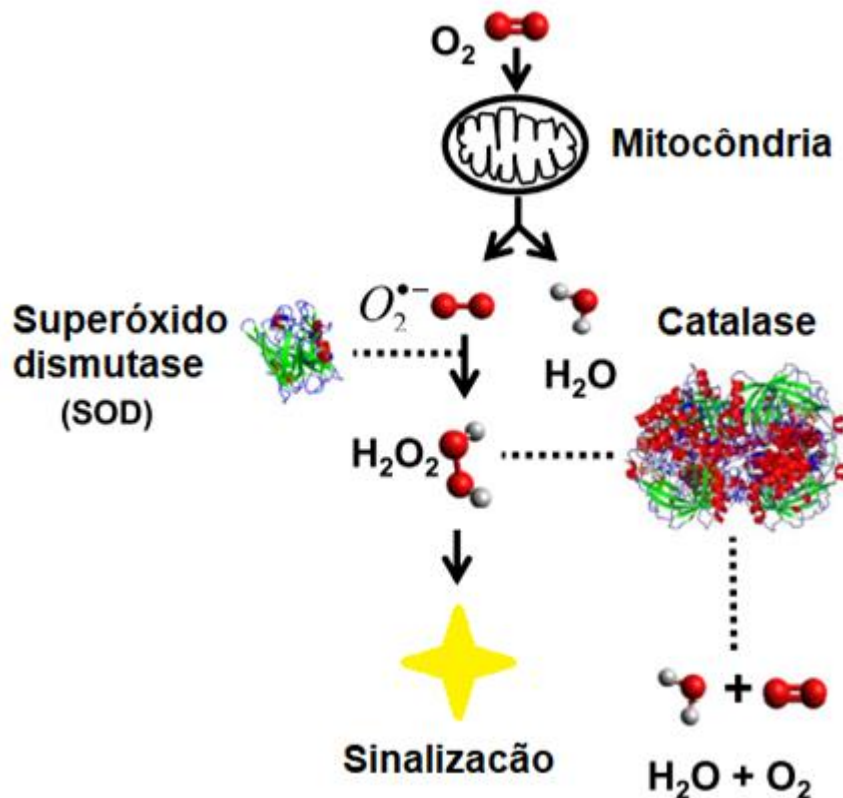


Figura 8. Síntese e metabolização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2): Esquema geral das vias da superóxido dismutase, dismutando o ânion superóxido O_2^- em H_2O_2 e da catalase degradando o H_2O_2 em H_2O e O_2 (adaptado de Sepasi Tehrani e Moosavi-Movahedi, 2018).

A fórmula química do peróxido de hidrogênio permite que ele aceite dois elétrons, sendo portador de grande potencial redutivo (Winterbourn, 2013). Assim, as moléculas e os mecanismos aos quais as peroxidases agem para reduzir o H_2O_2 em H_2O se diferem de acordo com sua classificação e com o tecido em questão. Na reação, um oxigênio se mantém na molécula que é convertida em H_2O e a outra permanece como um íon de fácil redução. Este íon geralmente se agrega às reações com outros íons metálicos (Tejero, 2016).

Especificamente, no ciclo da enzima catalase o H_2O_2 age como molécula oxidante e redutiva, uma vez que duas moléculas de H_2O_2 reagem entre si, sendo convertidas em água (H_2O) e gás oxigênio (O_2). Este ciclo pode inclusive gerar altas taxas de oxigênio intracelular (Chelikani e cols., 2005).

Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio formados através da atividade da NOX contribuem com modificações de moléculas envolvidas na síntese hormonal, no sistema imune e mediando outros eventos que necessitam de sinalização através de oxirreduções (Bedard, e Krause, 2007).

A concentração de H_2O_2 intracelular e sua viabilidade de agir como um mensageiro é determinado pelo balanço entre estes processos de síntese e o processo competitivo de sua remoção pelas enzimas antioxidantes (Cohen, 1994; Peuchen e cols., 1997). O equilíbrio deste processo também é regulado pela disponibilidade de íons metálicos, como ferro e cobre, uma vez que esta disponibilidade de traços metálicos pode colaborar para síntese de grupos hidroxila (OH^\cdot), que é considerado um radical agressivo às células (Cohen, 1994).

É de amplo conhecimento o potencial tóxico que H_2O_2 possui e por isso após sua síntese ou entrada exógena a molécula necessita de metabolização e eliminação eficazes (Chance e cols., 1979; Bai e cols., 1999; Matsumoto e cols., 1999; Takagi e cols., 1999; Adimora e cols., 2010; Mishina e cols., 2011; Halliwell e Gutteridge, 2015). No entanto, a mitocôndria, na maioria dos tecidos, aparenta ter capacidade limitada de remover H_2O_2 , apesar de gerarem prontamente quantidades substanciais desta molécula *in vitro* e *in vivo* (de Groot e Littauer, 1989; Kwong e Sohal, 1998).

Ho e colaboradores (2004) mostraram que camundongos nocaute para o gene da catalase, que são completamente deficientes na expressão da enzima, se desenvolveram e cresceram normalmente, sem anormalidades perceptíveis ao estudo. Em contrapartida, animais nocaute para as peroxirredoxinas demonstraram um aumento significativo em diversas patologias: aumento de casos de cânceres,

severas anemias hemolíticas, processos isquêmicos, arteriosclerose, entre diversas outras. Estes resultados sugerem que para as diferentes peroxidases existem funções fortemente específicas, tanto nos tecidos, quanto em diferentes organelas (Lee, 2020).

Por outro lado, inibir a síntese do H_2O_2 também pode levar a danos no organismo. É descrito pela literatura que camundongos transgênicos que não produzem a superóxido dismutase mitocondrial sofrem de severos danos pulmonares e neurológicos indicando a necessidade de remoção de O_2^- intramitocondrial nos organismos através da formação de H_2O_2 (Lebovitz e cols., 1996; Melov e cols., 1998; Williams e cols., 1998).

Níveis de $H_2O_2 \leq 300 \mu M$ parecem ter efeito citotóxico limitado na maioria dos tipos celulares. Há um crescente número de artigos mostrando que o H_2O_2 apesar de exercer efeito tóxico a partir de certa concentração, participa da sinalização inter e intracelular possuindo efeitos fisiológicos relacionados à sobrevivência e crescimento celular, relaxamento vascular através de hiperpolarização, entre outros (Wang e cols., 1998; Dalton e cols., 1999; Taniyama e Griendling, 2003; Ungvari e cols., 2007).

1.5.2 Ação pró-inflamatória e hiperalgésica do H_2O_2

Em sistemas biológicos, o ânion superóxido, em conjunto com o H_2O_2 , radicais hidroxilas e outras espécies reativas de oxigênio são liberados por leucócitos ativos e por células de áreas que se encontram inflamadas (Kanofsky, 1989). O H_2O_2 pode ser produzido como um metabólico para a defesa do organismo por neutrófilos, monócitos e macrófagos e existem estudos que sugerem que ele possui a mesma função na mucosa gastrointestinal e nos pulmões (Kim e cols., 2003; El Hassani e cols., 2005).

Após a liberação de H_2O_2 , ocorre um processo de modulação da atividade inflamatória. Este efeito foi confirmado observando-se que $12,5 \mu M$ de H_2O_2 , *in vitro*, aumentava a expressão de genes dependentes do NF- κB que, por sua vez, pode ser induzido também pelo TNF- α . Ao mesmo tempo, essa mesma concentração, pode simultaneamente induzir o gene anti-inflamatório que codifica a heme oxigenase-1 (HO-1) e interleucina-6 (IL-6). Na literatura, também existem sugestões que o aumento dos níveis de H_2O_2 atua como um recrutador de mais células imunes, mobilizando a defesa do organismo. Dessa forma, propõe-se que o H_2O_2 possui uma complexa via regulatória, composta por controles pró e anti-inflamatórios (de Oliveira-Marques e cols., 2007; Niethammer e cols., 2009).

In vivo, o efeito inflamatório e hiperalgésico do H_2O_2 foi demonstrado por Keeble e colaboradores (2009), uma vez que, após injeção intraplantar com doses de 2,2 μmol a 4,4 μmol houve significativa hiperalgesia mecânica e térmica em camundongos, além da formação de edema. Assim, o estudo propôs que esta molécula poderia ser um potencial alvo para o tratamento de dores inflamatórias.

1.5.3 Ação hiperpolarizante do H_2O_2

O endotélio participa de importantes vias na homeostase vascular por realizar modificações através de sinalizações com moléculas como prostaciclina, óxido nítrico e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) os quais promovem a chamada vasodilatação endotélio mediada (Shimokawa, 1999). A natureza molecular bem como os mecanismos pelos quais os EDHF funcionam, ainda vem sendo elucidados, embora o H_2O_2 já esteja incluso dentro do grupo classificado como EDHF (Chen e cols., 1988; Félétou e Vanhoutte, 2009).

A hiperpolarização da membrana da musculatura lisa dos vasos é um fenômeno realizado através das respostas mediadas pelo EDHF, sendo definido classicamente como um relaxamento que não pode ser inibido pelo bloqueio de ciclooxigenases e NO sintase endotelial (NOS_e). Esse efeito é sensível à inibição da condutância ao potássio (K^+), tanto pelos altos níveis de potássio extracelular quanto pelo bloqueio de seus canais. Como já dito, o H_2O_2 está incluso dentro do grupo classificado como EDHF. Assim, é definido que H_2O_2 e os outros EDHFs causam hiperpolarização da musculatura lisa do endotélio vascular por ativarem a bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+) e realizarem o efluxo de K^+ (Matoba e Shimokawa, 2003). Adicionalmente, a ativação dos canais K_{ATP} ou mesmo o aumento do influxo de Ca^{2+} devido a ativação dos TRPs pelos EDHFs também estão relacionados com a hiperpolarização, uma vez que o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular ativam os canais para K^+ sensíveis ao Ca^{2+} que auxiliam no vasorelaxamento da musculatura (Félétou e Vanhoutte, 2009).

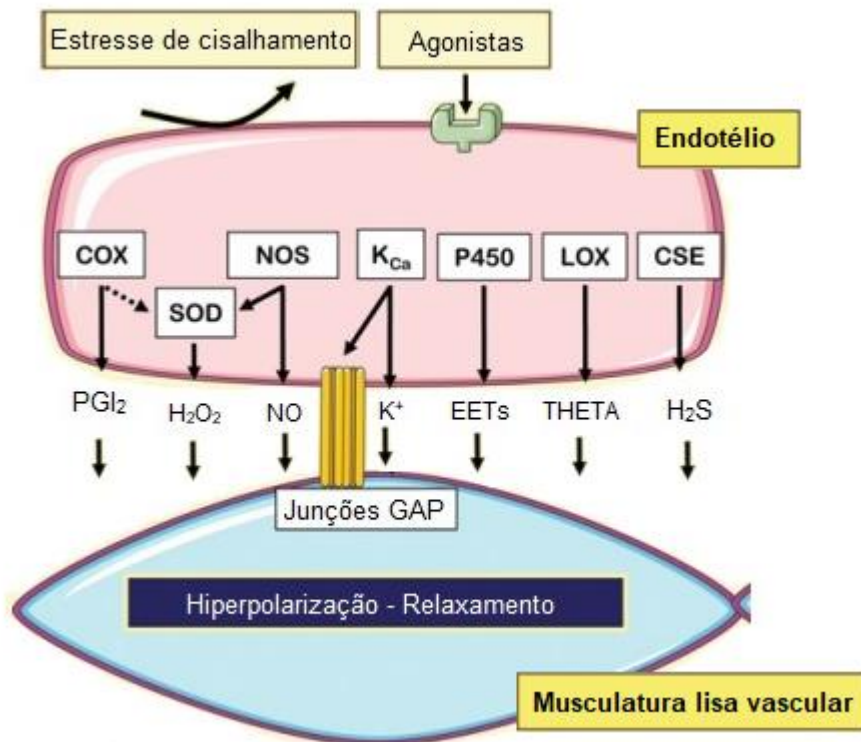


Figura 9. Fatores relaxadores derivados do endotélio, incluindo os hiperpolarizantes (EDHF): produzidos no endotélio e sinalizam seus mecanismos através da musculatura lisa dos vasos afim de causar relaxamento com a abertura dos canais para K⁺ (adaptado de Féléto e Vanhoutte, 2009).

Estudos fisiológicos prévios demonstraram que a administração de H₂O₂ exógeno pode causar hiperpolarização, através da ativação dos canais pra K⁺ em uma variedade de células, que não só o endotélio, incluindo as células β pancreáticas (Krippeit-Drews e cols., 1999) e neurônios do hipocampo (Seutin e cols., 1995). Curiosamente, quando os níveis de H₂O₂ são aumentados com a inibição farmacológica da catalase, a principal peroxidase do sistema nervoso central, houve hiperpolarização dos neurônios dopaminérgicos, que foi revertida pelo bloqueio dos canais para K⁺_{ATP} sensíveis, pela glibenclamida (Hung e Lee 1998).

1.5.4 Hiperpolarização relacionada a atividade antinociceptiva

É descrito na literatura que moléculas que produzem hiperpolarização da membrana neuronal possuem potencial para causar a diminuição da transmissão excitatória primariamente realizada pelas fibras aferentes nociceptivas e aumentam a transmissão inibitória neural reduzindo a sinalização nociceptiva (Kato e cols., 2004).

No geral, moléculas que possuem esse efeito inibitório possuem efeitos e mecanismos análogos (Yoshimura e Furue, 2006).

Assim como o H_2O_2 , o óxido nítrico (NO) está entre as moléculas que são liberadas pelo endotélio vascular e que apresentam o efeito hiperpolarizante. De fato, o NO é capaz de ativar canais para K^+ dos tipos sensíveis ao ATP (K_{ATP}), sensíveis ao Ca^{2+} e o retificador de entrada (K_{ir}) (Kawano e cols., 2009). No entanto, apesar do mecanismo de hiperpolarização, que leva a antinocicepção, o NO apresenta duplo efeito, podendo reduzir a sensação dolorosa através deste mecanismo, ou aumentar por meio de outros (Duarte e cols., 1990; Chaplan e cols., 2003; Abramson, 2008).

A definição do NO como agente antinociceptivo foi primeiro demonstrado por Duarte e colaboradores (1990), que associaram a analgesia causada pela Acetilcolina (ACh) com o NO, uma vez que, ao administrar ACh juntamente a uma droga inibidora da formação de óxido nítrico, não houve analgesia. Novos estudos demonstraram o mesmo padrão de mecanismos em algumas drogas analgésicas, que modulavam as vias do NO e dos canais pra K^+ para causarem antinocicepção, como no caso do diclofenaco, fentanil, AEA, noradrenalina e angiotensina 1-7 (Alves e cols., 2004; Rodrigues e cols., 2005; Reis e cols., 2011; Romero e cols., 2012; Costa e cols., 2014)

Dessa forma, considerando a escassa literatura acerca da relação do H_2O_2 em mecanismos farmacológicos envolvidos na via nociceptiva, o presente estudo avaliou seu efeito antinociceptivo e a participação de diferentes vias nesse evento.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Atribui-se a Hipócrates (400 AEC), considerado o pai da medicina, a famosa frase: “Sedare dolorem opus divinum est” (amenizar a dor é obra divina), que coloca o alívio da dor no patamar mais alto da importância médica.

A sensação de dor participa de um importante controle de alerta aos organismos vivos trazendo proteção contra estímulos e danos mecânicos, químicos e térmicos. No entanto, apesar do papel protetivo, a severidade da sensação da dor pode ser controlada por fatores endógenos e exógenos de inibição como uma forma de atenuação do sofrimento e de bem-estar dos pacientes (Ahmad e cols., 2007; Van Hecke e cols., 2013).

A hiperpolarização, através da abertura dos canais para potássio, é descrita pela literatura como uma via que pode modular mecanismos da dor e levar a antinocicepção, podendo ser estimulada de maneira exógena. As moléculas denominadas fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio vascular (EDHF) como o H_2O_2 , já se mostraram como eficientes hiperpolarizantes da musculatura lisa vascular. Paralelamente, diversas drogas antinociceptivas têm como mecanismo comum a hiperpolarização de fibras nervosas causando o aumento do limiar nociceptivo, levando a redução da sensação dolorosa (Duarte e cols., 1990; Alves e cols., 2004; Rodrigues e cols., 2005; Reis e cols., 2011; Romero e cols., 2012; Costa e cols., 2014).

Os avanços nos estudos sobre os mecanismos de controle da dor e novos potenciais fármacos analgésicos são responsáveis por uma significativa melhora do bem-estar populacional e no auxílio ao retorno rápido das funções fisiológicas. Entender estes mecanismos fisiopatológicos é o principal fator que leva ao desenvolvimento de terapêuticas cada vez mais eficazes para que continue o progresso da área.

Assim, nosso estudo visa elucidar se o H_2O_2 , uma molécula que até então não foi descrita como antinociceptiva, possui potencial para agir como tal, e se quatro importantes mecanismos analgésicos: via opioidérgica, canabinoidérgica, via do óxido nítrico e os canais para K^+ , participam deste mecanismo.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito antinociceptivo periférico do peróxido de hidrogênio, e possíveis mecanismos envolvidos neste evento no modelo de hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂) em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar se o efeito antinociceptivo da administração intraplantar de peróxido de hidrogênio ocorre de forma dose-dependente, definindo o pico de ação e tempo de efeito, através da avaliação de curvas dose-resposta ao longo do tempo.
- Verificar se o peróxido de hidrogênio, administrado perifericamente, na dose analgésica, induz efeito sistêmico.
- Investigar se há a participação da via opioidérgica no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo peróxido de hidrogênio.
- Investigar se há a participação da via canabinoidérgica no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo peróxido de hidrogênio.
- Investigar se há a participação da via nitrérgica no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo peróxido de hidrogênio.
- Investigar se há a participação dos canais para K⁺ no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo peróxido de hidrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais para experimentação

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 30 e 40 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO-ICB/UFMG). Os animais foram alojados em caixas plásticas de dimensões 38x30x17 centímetros com cama de forragem, mantidos em temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro (6h – 18h) e escuro (18h – 6h) de 12 horas cada, com livre acesso à água e à ração. O projeto, contendo a metodologia para o desenvolvimento deste trabalho, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob o número 212/2020 (Anexo I).

4.1.1. Grupo amostral

Para o cálculo do n amostral foi utilizada a seguinte formula:

$$n = \frac{2 \cdot \sigma^2 \cdot (Z_\beta + Z_\alpha)^2}{E^2}$$

n = número amostral

σ = desvio padrão

Z_β = poder de teste de 80%

Z_α = nível de significância alfa = 0,05

E = erro absoluto

As variáveis em estudo são contínuas e se distribuem normalmente e, portanto, comparou-se as médias entre os grupos controle e tratados usando *one-way ANOVA* seguido de um pós-teste de *Bonferroni*, sendo as variâncias iguais para os grupos comparados. Assume-se para o teste de hipóteses:

$H_0: \mu_0 = \mu_1$

$H_1: \mu_0 < \mu_1$

Logo, a distribuição é unicaudal à direita. Assumindo um poder de teste de 80% ($Z_\beta = 0,84$) e nível de significância alfa = 0,05 ($Z_\alpha = 1,64$), derivou-se os tamanhos amostrais para os grupos, considerando grupos de mesmo tamanho, porém amostras não

pareadas (razão = 1). A margem de erro E foi assumida como sendo 20 g, um consenso entre experimentadores experientes que realizam a técnica rotineiramente. A partir de estudos prévios, o desvio padrão das médias foi calculado como sendo igual a 12,688g.

$$n = \frac{2 \cdot (12,688)^2 \cdot (0,84 + 1,64)^2}{20^2}$$

n = 4,9506

n = 5

$\sigma = 12,688$

$Z_{\beta} = 0,84$

$Z_{\alpha} = 1,64$

E = 20

É importante ressaltar que os valores de confiabilidade e de erro absoluto foram selecionados de modo a atender os parâmetros estatísticos sem, entretanto, permitir que o valor do n amostral se apresentasse elevado, inviabilizando, assim, a realização do projeto.

4.1.2. Eutanásia dos animais

A eutanásia dos animais foi realizada, após o término dos experimentos, com sobredose de anestésico contendo solução de ketamina (300 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg), administrada por via intraperitoneal.

4.2 Drogas e solventes

4.2.1. Agente hiperalgésico

– Prostaglandina E₂ (Sigma, EUA) dissolvida em etanol. Antes das injeções, a PGE₂ foi diluída em solução salina (0,9% de NaCl), obtendo-se a concentração de etanol 10% em salina.

4.2.2. Substância sob teste

– Peróxido de hidrogênio (NEON, Brasil) em solução salina (0,9% de NaCl).

4.2.3. Fármacos envolvidos na via opioidérgica

– Naloxona (Sigma, EUA), antagonista não seletivo de receptores opioides em solução salina (0,9% de NaCl).

4.2.4. Fármacos envolvidos na via canabinoidérgica

– AM251 (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores CB₁ canabinoides em solução DMSO 10% diluída em salina (0,9% de NaCl).

– AM630 (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores CB₂ canabinoides em solução DMSO 10% diluída em salina (0,9% de NaCl).

4.2.5. Fármacos envolvidos na via nitrérgica

– L-NOArg (RBI, EUA), inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) em solução salina (0,9% de NaCl).

– L-NPA (Sigma, EUA), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOS_n) em solução salina (0,9% de NaCl).

– L-NIO (Sigma, EUA), inibidor semi-seletivo da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOS_e) em solução salina (0,9% de NaCl).

– L-NIL (Sigma, EUA), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS_i) em solução salina (0,9% de NaCl).

4.2.6. Fármacos envolvidos com canais para potássio

– Tetraetilamônio (Sigma, EUA), bloqueador seletivo dos canais para K⁺ voltagem dependentes em solução salina (0,9% de NaCl).

– Glibenclamida (Sigma, EUA), bloqueador seletivo dos canais para K⁺ ativados por ATP (K_{ATP}) em solução DMSO 10% diluída em salina (0,9% de NaCl).

– Cloreto de dequalínio (Santa Cruz, EUA), bloqueador seletivo dos canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ de baixa condutância (SK_{Ca}) em solução salina (0,9% de NaCl).

– Paxilina (Sigma, EUA), bloqueador seletivo dos canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ de alta condutância (BK_{Ca}) em solução salina (0,9% de NaCl).

4.3 Administração das drogas

As drogas foram administradas em um volume de 20 µL, na camada subcutânea, na superfície plantar da pata posterior direita dos animais (via

intraplantar; i.pl.) (Figura 10), exceto para o teste de exclusão do efeito sistêmico, para o qual a prostaglandina E₂ foi injetada em ambas as patas posteriores.



Figura 10. Administração intraplantar dos fármacos: Todos os fármacos utilizados foram administrados por via subcutânea, na superfície plantar da pata posterior direita dos camundongos (ou em ambas no caso da exclusão do efeito sistêmico), em solução cujo volume era de 20 μ L.

4.4 Teste algométrico

O modelo experimental originalmente descrito por Randall e Selitto (1957) para ratos e, posteriormente, adaptado para camundongos por Kawabata e colaboradores (1992), foi o método utilizado para mensuração do limiar nociceptivo periférico. O teste consiste na aplicação de uma pressão uniformemente crescente na pata do animal para avaliar a resposta inicial à dor.

A técnica para medir o limiar mecânico se baseia no princípio de que a PGE₂ aumenta a sensibilidade ao estímulo doloroso (hiperalgesia) e que essa sensibilidade, que pode ser mensurada pelo teste, é susceptível de ser modificada por drogas.

O animal é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, enquanto a pata, sob teste, é posicionada, por sua superfície plantar, à parte compressora do aparelho (Figura 11 A), que consiste em duas superfícies: uma plana, sobre a qual se coloca a pata do animal, e outra cônica, com uma área de 1,75 mm² na extremidade, por meio da qual é aplicada uma pressão crescente na superfície plantar da pata do animal. A intensidade da pressão que causa uma reação de retirada de pata é definida como o limiar nociceptivo, e expresso em gramas (Figura 11 B). O

Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata (LNRP) foi avaliado antes (tempo zero) e após a administração do estímulo hiperalгésico e das drogas sob teste.

Quando há diminuição no limiar de retirada (estatisticamente relevante), em relação ao limiar basal, significa que o animal apresenta hiperalgesia e quando este limiar de retirada se encontra igual ao tempo zero (estatisticamente sem diferença), pode-se considerar que houve antinocicepção.

Os valores encontrados são resultado da média aritmética de três medidas realizadas consecutivamente, com intervalo de 30 a 60 segundos (s). Com exceção das curvas tempo-resposta (Figuras 14 e 15), os resultados, foram expressos pelo Δ , que representa a diferença entre a média dos limiares nociceptivos obtido antes da administração das drogas (tempo zero) e a média dos limiares nociceptivos medido na terceira hora após a injeção das drogas sob teste.

Para que houvesse a viabilização do teste, os animais eram previamente ambientalizados à sala de experimentação e ao algesímetro durante o período de dois dias. Esse processo é necessário para a aprendizagem do animal frente ao aparelho do teste e também evita que o animal desenvolva resposta aversiva ao ambiente, experimentador ou à manipulação.

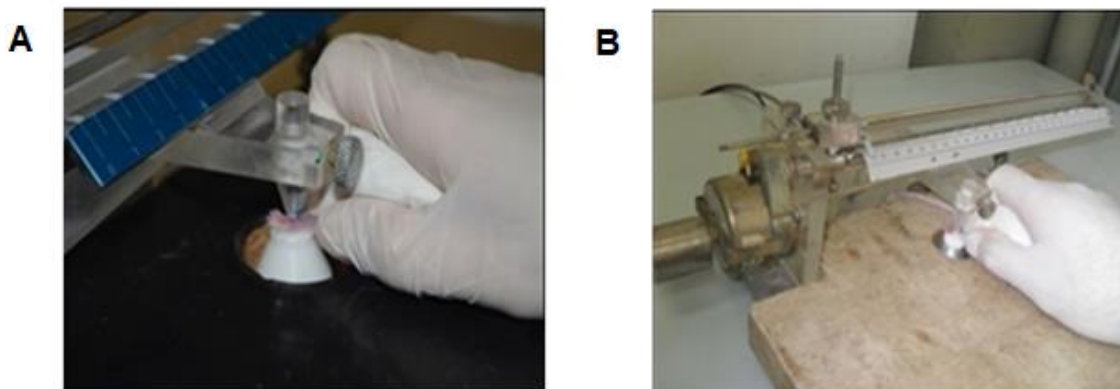


Figura 11. Aparelho algesimétrico e sua utilização: Detalhe para a superfície compressora realizando pressão na pata do camundongo (A). Posicionamento do animal sob a contenção do experimentador e visualização da escala do aparelho para aferição do limiar nociceptivo (B).

4.5 Protocolo experimental

As doses das drogas e seus tempos de administração foram baseados em experimentos anteriores do grupo de pesquisa e em dados da literatura. Para a realização da curva do efeito antinociceptivo, H_2O_2 ou seu veículo (salina) foram

administrados 5 min antes da 3ª h da injeção de PGE₂ (pico da ação hiperalgésica). As medidas do limiar nociceptivo foram feitas na 3ª h (180 min) e consecutivamente nos momentos 185, 190, 205, 235 e 250 (5, 10, 15, 30, 60 e 75 minutos após a administração do H₂O₂) (Figura 12).

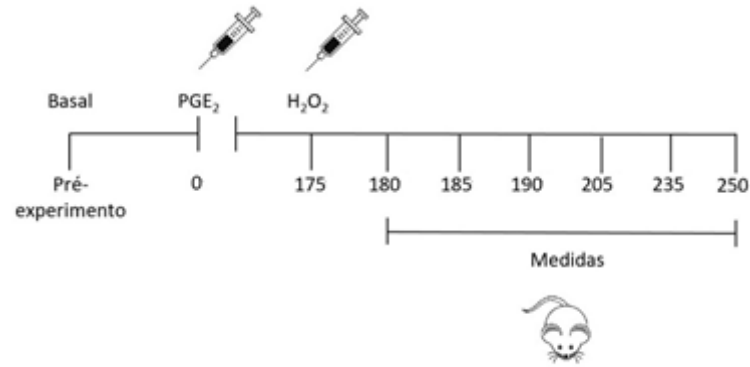


Figura 12. Delineamento experimental – Parte 1: Delineamento experimental para a avaliação do desenvolvimento temporal da antinocicepção do H₂O₂ frente a hiperalgesia induzida por PGE₂.

O antagonista não seletivo dos receptores μ , δ e κ opioides (naloxona) foi administrado 30 minutos antes do H₂O₂. Os antagonistas dos receptores canabinoides CB₁ e CB₂ (AM251 e AM630, respectivamente) foram administrados 10 minutos antes do H₂O₂. O inibidor não seletivo das isoformas das enzimas NO-sintase (L-NOArg) e os inibidores seletivos das isoformas NOS_i, NOS_e e NOS_n (LNIL, LNIO e LNPA, respectivamente), foram administrados 30 minutos antes do H₂O₂. O bloqueador seletivo dos canais para potássio dependentes a voltagem (tetraetilamônio) foi administrado 30 minutos antes da administração do H₂O₂. Os bloqueadores dos demais canais para potássio ativados por ATP, ativados por Ca²⁺ de baixa e alta condutância (glibenclâmida, dequalínio e paxilina, respectivamente) foram administrados 5 minutos antes da administração do H₂O₂ (Figura13). Os protocolos de administração foram registrados nas legendas de todos os gráficos.

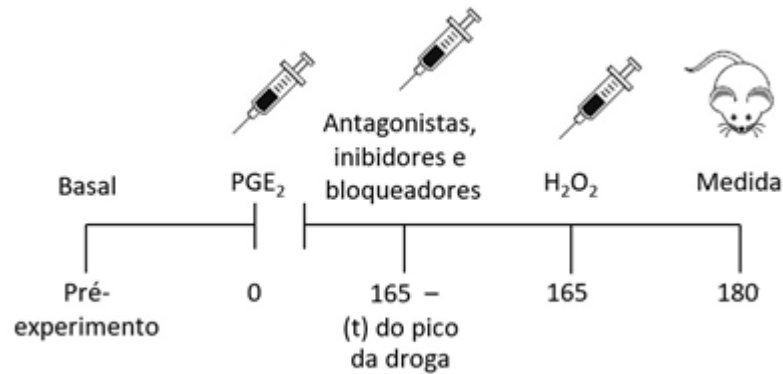


Figura 13. Delineamento experimental – Parte 2: Delineamento experimental para a avaliação das vias envolvidas na antinocicepção do H₂O₂ frente a hiperalgesia induzida por PGE₂

4.6 Análise estatística

Para construção dos gráficos e análise estatística dos dados obtidos foi utilizado o programa GraphPad Prism 8.00. Os resultados foram expressos por meio da média \pm erro padrão da média (e.p.m.) para cada protocolo experimental. Nos gráficos das figuras 14 e 15, utilizou-se o teste de análise de variância *one-way* ANOVA, uma vez que a variável presente era apenas o tempo, enquanto nos outros gráficos as diferenças entre grupos foram determinadas utilizando-se o teste de análise de variância *Two-way* ANOVA, já que nestes resultados haviam duas variáveis: o Δ do limiar nociceptivo e o tempo de registro. Em ambos os casos, a primeira análise foi seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Hiperalgisia induzida pela administração intraplantar de diferentes doses de prostaglandina E₂ (PGE₂)

A administração de prostaglandina E₂ (PGE₂), nas doses de 0,5; 1 e 2 µg, na superfície plantar da pata posterior direita dos camundongos induziu a diminuição do limiar nociceptivo, de maneira dose-dependente, comparado ao grupo controle (veículo + etanol 2%), como observado no Figura 14. A dose utilizada nos demais experimentos foi de 2 µg/pata (dose máxima de hiperalgisia). Também se considerou seu pico de ação durante à terceira hora após a administração da droga como o horário a ser testado o H₂O₂.

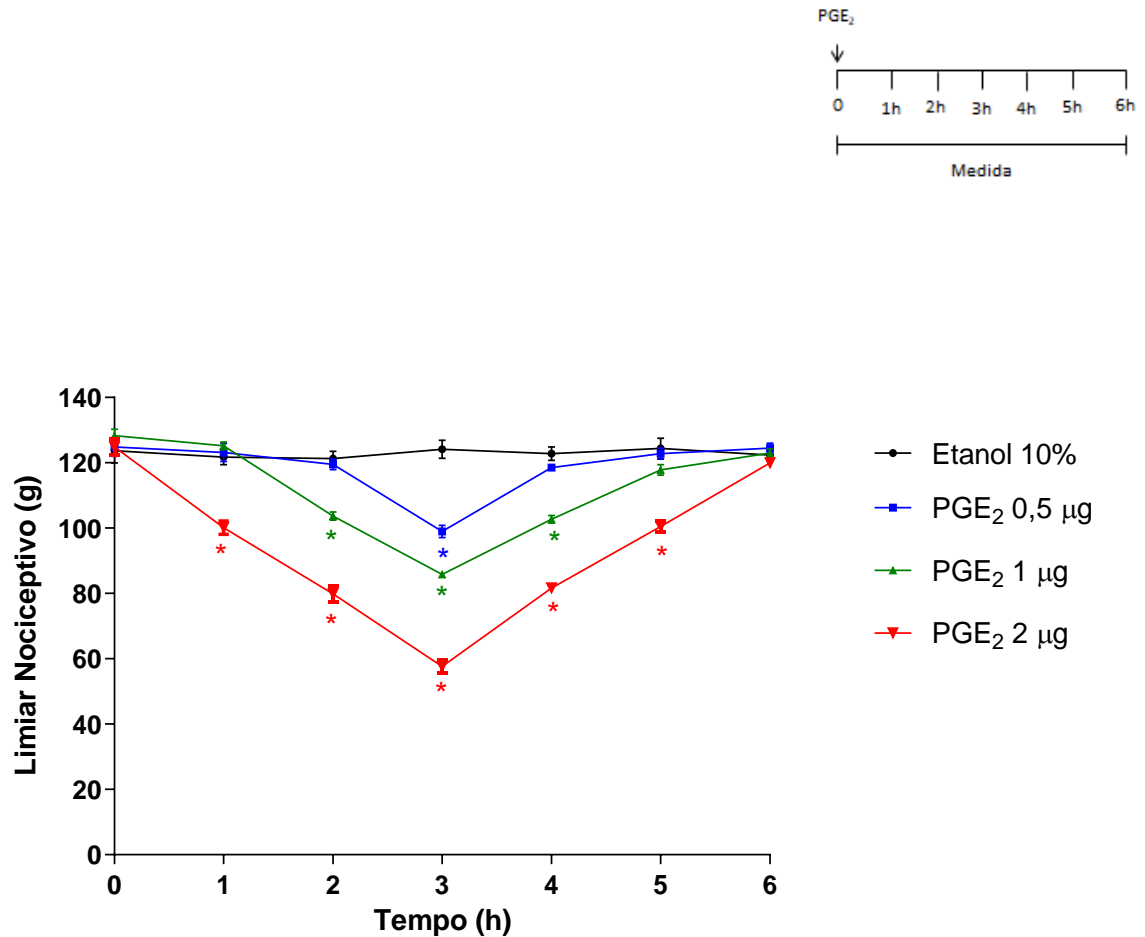


Figura 14. Curva de desenvolvimento temporal da administração intraplantar de diferentes doses de PGE₂: PGE₂ (0,5, 1 e 2 µg/pata) ou seu veículo (Etanol 10%) foram administrados na pata posterior direita dos animais no tempo zero. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata nos tempos indicados no gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo controle (Etanol 10%).

5.2 Efeito da administração intraplantar do peróxido de hidrogênio sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂

5.2.1 Efeito antinociceptivo dose-dependente do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O peróxido de hidrogênio administrado via intraplantar (i.pl.) foi capaz de reverter a hiperalgesia causada pela administração de PGE₂ (2 µg/pata) de maneira dose-dependente (0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 µg). A antinocicepção do H₂O₂ se desenvolveu desde o momento de sua administração até 75 minutos após essa. Seu pico de ação ocorreu após 15 minutos de sua administração. Seu efeito máximo, com reversão completa da hiperalgesia, se deu nas doses de 0,2 e 0,3 µg, como mostrado na Figura 15, sendo que a primeira dose foi considerada para os experimentos seguintes.

5.2.2 Exclusão do efeito antinociceptivo sistêmico do peróxido de hidrogênio na dose de 0,2 µg

A exclusão do efeito sistêmico da atividade antinociceptiva do peróxido de hidrogênio foi realizada com a aplicação da droga hiperalgésica (PGE₂ 2 µg) em ambas patas posteriores dos camundongos. Na pata esquerda (PE) foi injetada a dose analgésica do H₂O₂ (0,2 µg), enquanto na direita (PD) injetou-se seu veículo (salina). Ambas as patas foram submetidas ao teste de pressão. No grupo controle injetou-se PGE₂ 2 µg/pata e salina em ambas as patas posteriores, e foram submetidas ao teste de compressão. Na dose de 0,2 µg o H₂O₂ induziu efeito antinociceptivo na pata ipsilateral, porém o mesmo não foi observado na pata contralateral, demonstrando que, nesta dose há somente efeito local. No grupo controle houve hiperalgesia, que não foi revertida pelo veículo de H₂O₂. Todos os resultados foram obtidos no pico de ação conjunto das drogas na 3^a hora e foram expressos pelo Δ (delta) do limiar nociceptivo, que representa a diferença entre a média do limiar nociceptivo no tempo zero, sem ação de qualquer fármaco, e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após as injeções de PGE₂, H₂O₂ e salina (Figura 16).

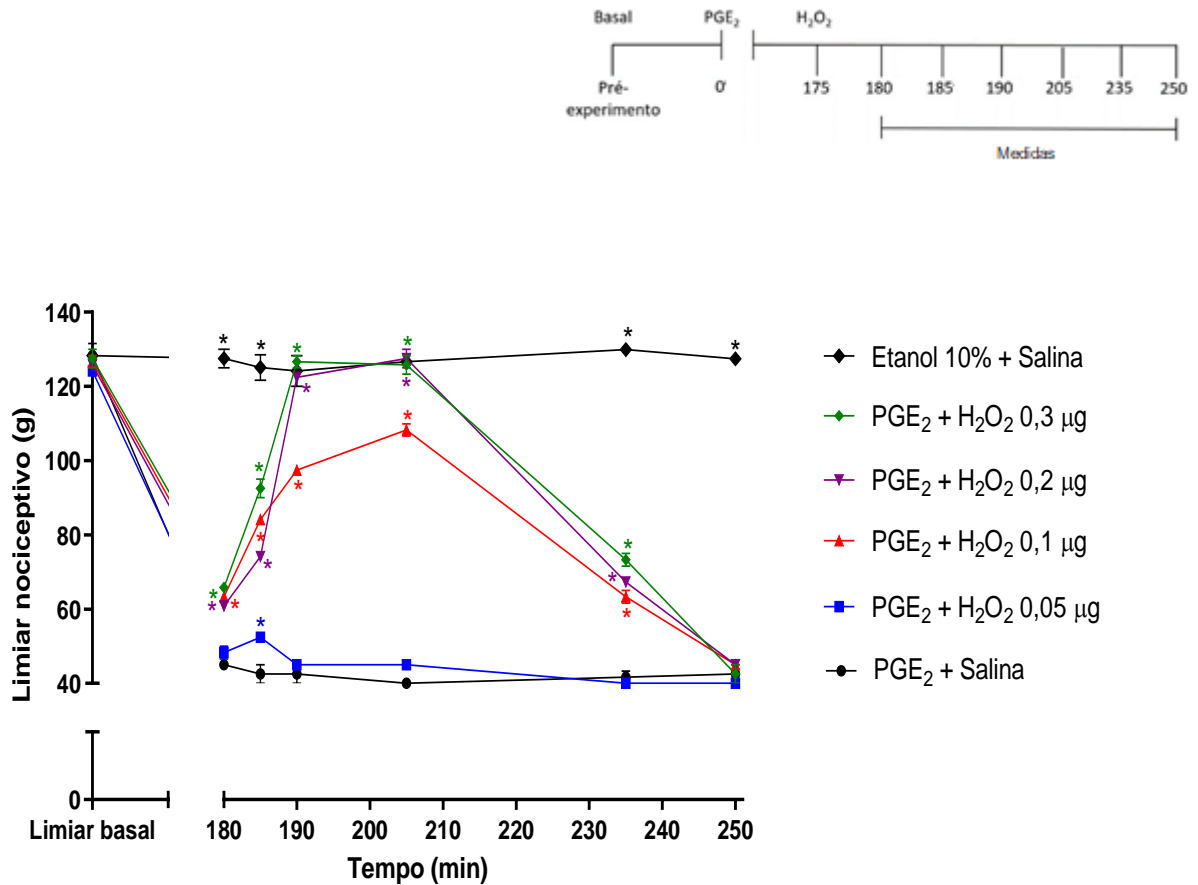


Figura 15. Curva de desenvolvimento temporal da antinociceção por diferentes doses de H₂O₂: PGE₂ (2 µg/pata) e H₂O₂ (0,05, 0,1, 0,2 e 0,3 µg/pata) ou seu veículo (salina) foram administrados na pata posterior direita dos animais nos tempos 0 e 175 min, respectivamente. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata nos tempos indicados no gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Salina).

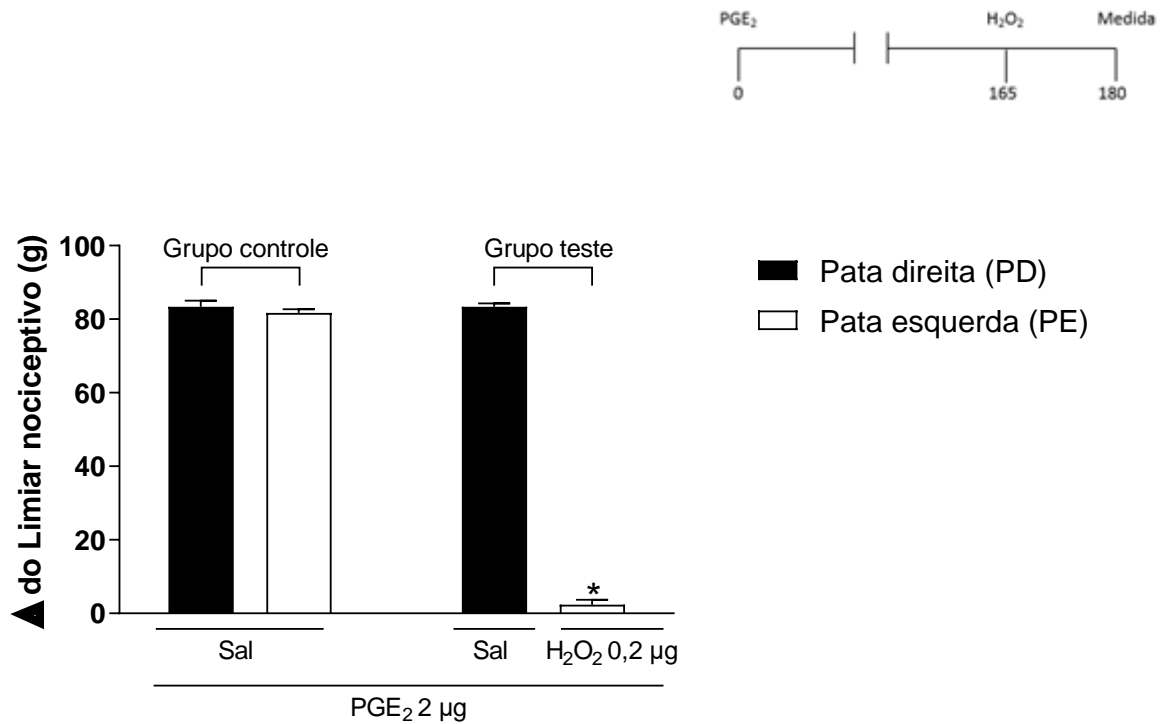


Figura 16. Exclusão do efeito antinociceptivo sistêmico do H₂O₂: PGE₂ (2 μg/pata) foi administrada em ambas as patas posteriores de 2 grupos de animais no tempo zero. Em 165 minutos o grupo controle recebeu salina nas duas patas posteriores, enquanto que o grupo teste recebeu H₂O₂ (0,2 μg/pata) na pata esquerda e salina na pata direita. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata na 3^a hora. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ 2 μg + Sal). Sal = Salina 0,9%.

5.3 Avaliação da participação dos receptores opioidérgicos no efeito antinociceptivo periférico do peróxido de hidrogênio

A naloxona (Nx), antagonista não seletivo de receptores opioidérgicos (μ , δ e κ), não conseguiu reverter a analgesia causada pelo peróxido de hidrogênio mesmo em sua dose máxima (50 $\mu\text{g/pata}$) (Figura 17). À direita, o gráfico mostra que a Nx, nesta dosagem, não causou hiperalgesia ou antinocicepção.

5.4 Avaliação da participação dos receptores canabinoidérgicos no efeito antinociceptivo periférico do peróxido de hidrogênio

Os antagonistas seletivos de receptores canabinoides CB_1 (AM251, 80 $\mu\text{g/pata}$) e CB_2 (AM630, 100 $\mu\text{g/pata}$), não foram capazes de impedir o efeito antinociceptivo do H_2O_2 (0,2 $\mu\text{g/pata}$). Por si só, os antagonistas não causaram antinocicepção ou hiperalgesia, conforme mostrado nas Figuras 18 e 19.

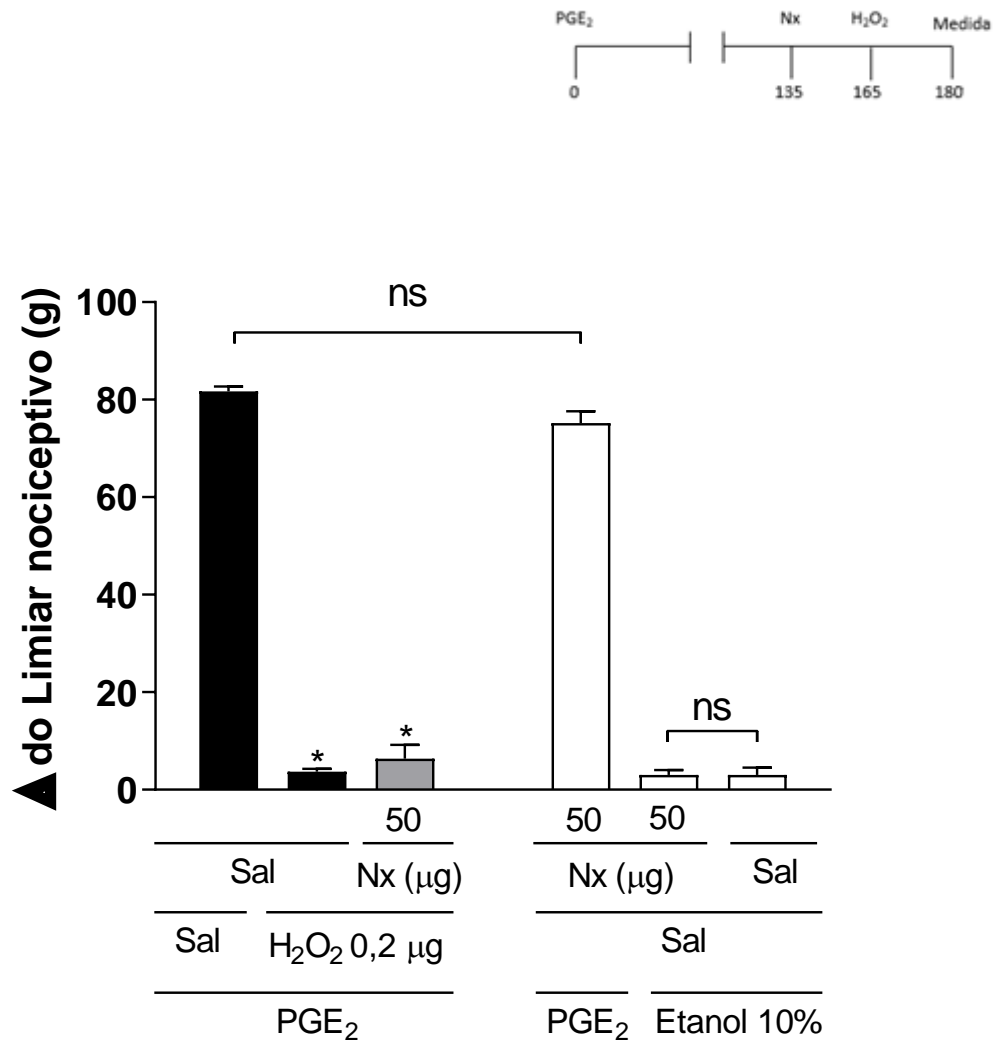


Figura 17. Efeito da Naloxona sobre a antinociceção periférica mediada pelo H₂O₂: PGE₂ (2 µg/pata), Naloxona (Nx; 50 µg/pata) e H₂O₂ (0,2 µg/pata) ou seus veículos foram administrados na pata posterior direita dos animais nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata em 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p < 0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Sal + Sal). ns = diferença estatisticamente não significativa; Sal = Salina 0,9%.

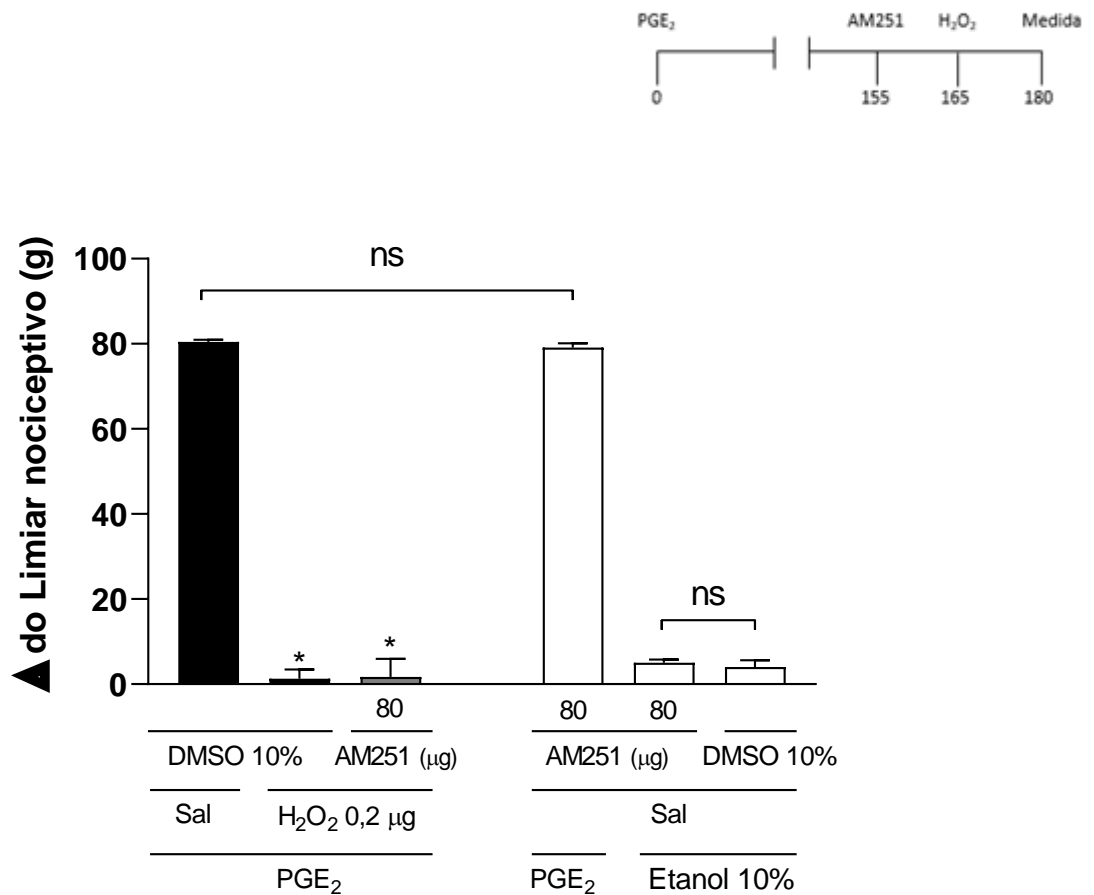


Figura 18. Efeito do AM251 na antinociceção periférica mediada pelo H₂O₂: PGE₂ (2 μg/pata), AM251 (80 μg/pata) e H₂O₂ (0,2 μg/pata) ou seus veículos foram administrados na pata posterior direita dos animais, nos tempos 0, 155 e 165 min, respectivamente. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata em 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + DMSO 10% + Sal). ns = diferença estatisticamente não significativa; Sal = Salina 0,9%; DMSO = dimetilsulfóxido 10%.

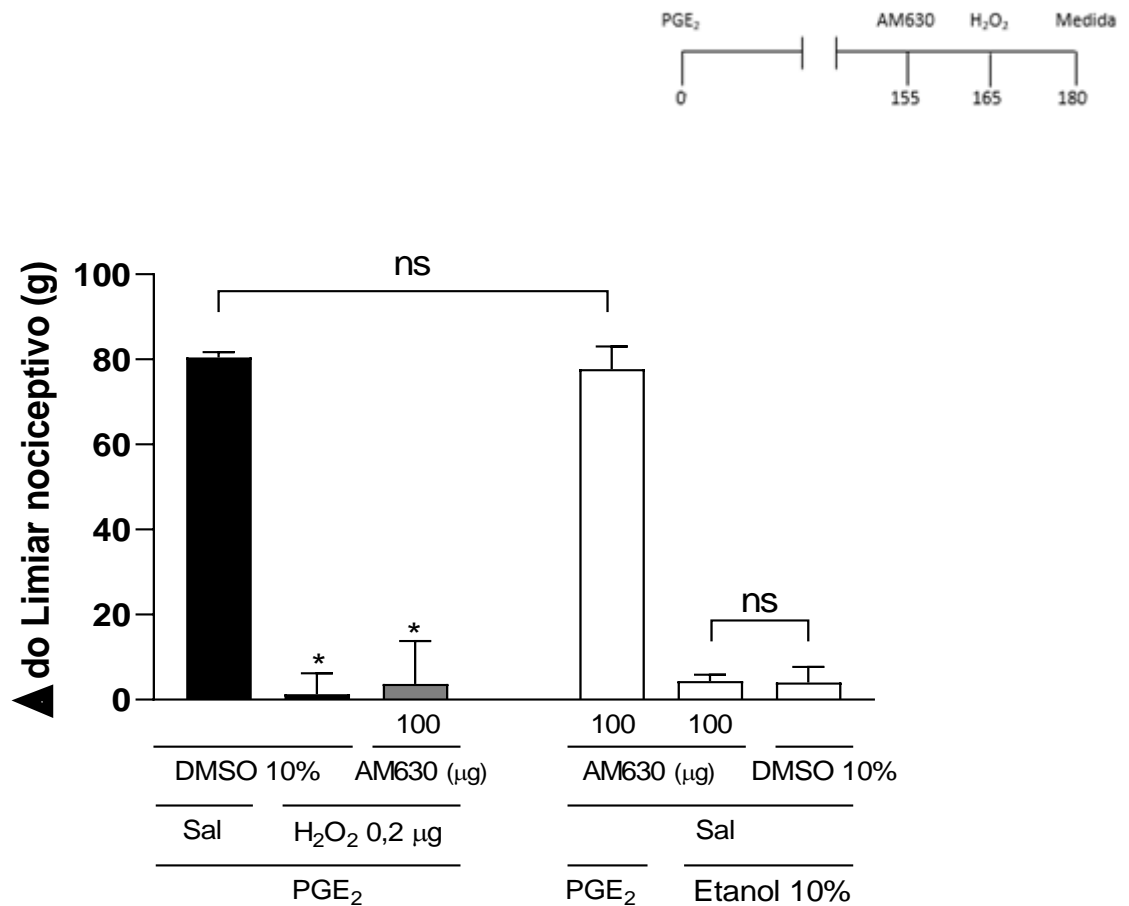


Figura 19. Efeito do AM630 na antinociceção periférica mediada pelo H₂O₂: PGE₂ (2 μg/pata), AM630 (100 μg/pata) e H₂O₂ (0,2 μg/pata) ou seus veículos foram administrados na pata posterior direita dos animais nos tempos 0, 155 e 165 min, respectivamente. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata em 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + DMSO 10% + Sal). ns = diferença estatisticamente não significativa; Sal= Salina 0,9%; DMSO= dimetilsulfóxido 10%.

5.5 Avaliação da participação da via do óxido nítrico (NO) no efeito antinociceptivo periférico do peróxido do hidrogênio

A administração do L-NOarg (24 µg/pata), inibidor enzimático não seletivo para as isoformas de NOS, foi capaz de reverter completamente a antinocicepção causada por H₂O₂ (Figura 20).

Ainda nesse experimento, realizou-se a análise de qual ou quais isoformas da NOS participaria do mecanismo antinociceptivo do H₂O₂. Para tal utilizou-se os inibidores seletivos da NOS induzível (L-NIL, 24 µg/pata), NOS neuronal (N-NPA, 24 µg/pata) e NOS endotelial (L-NIO, 24 µg/pata). Houve reversão completa da antinocicepção do H₂O₂ (0,2 µg/pata) pelo L-NIL (Figura 21) e parcial pelo L-NPA (Figura 22) e L-NIO (Figura 23).

Todos os inibidores utilizados não apresentaram efeito hiperalgésico ou antinociceptivo (dados à direita de cada Figura)

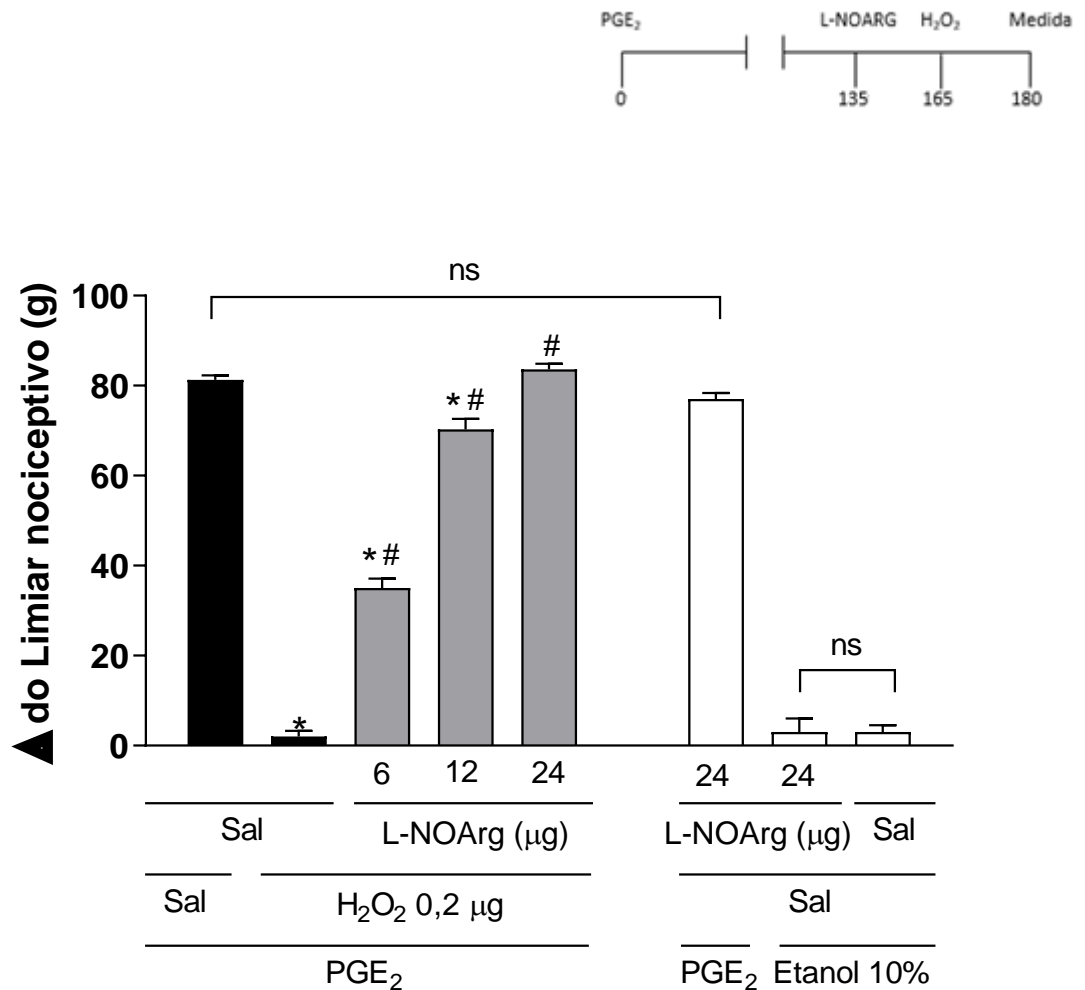


Figura 20. Efeito do L-NOArg na antinociceção periférica mediada pelo H₂O₂: PGE₂ (2 μg/pata), L-NOArg (12, 18 e 24 μg/pata) e H₂O₂ (0,2 μg/pata) ou seus veículos foram administrados na pata posterior direita dos animais nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata em 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Sal + Sal). #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Sal + H₂O₂ 0,2 μg). ns = diferença estatisticamente não significativa; Sal = Salina 0,9%.

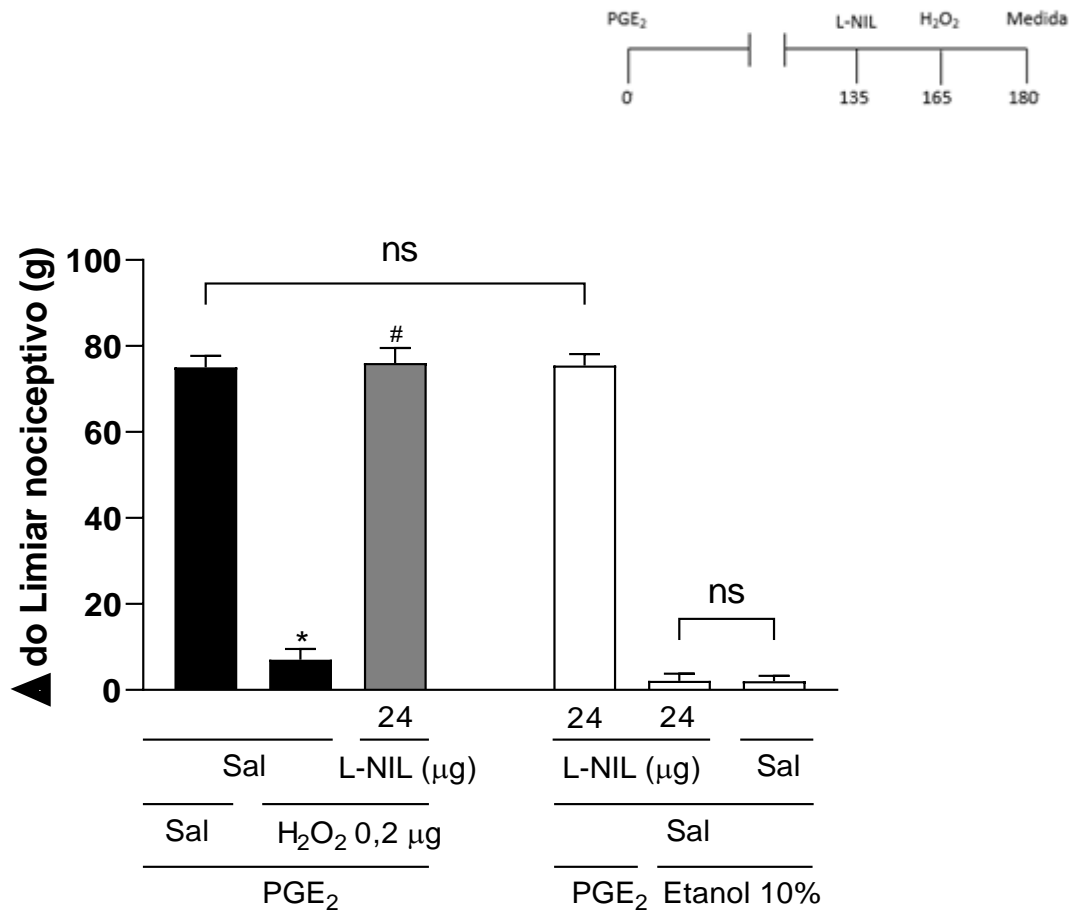


Figura 21. Efeito do L-NIL na antinociceção periférica mediada pelo H₂O₂: PGE₂ (2 μg/pata), L-NIL (24 μg/pata) e H₂O₂ (0,2 μg/pata) ou seus veículos foram administrados na pata posterior direita dos animais nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata em 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Sal + Sal). #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Sal + H₂O₂ 0,2 μg). ns = diferença estatisticamente não significativa; Sal = Salina 0,9%.

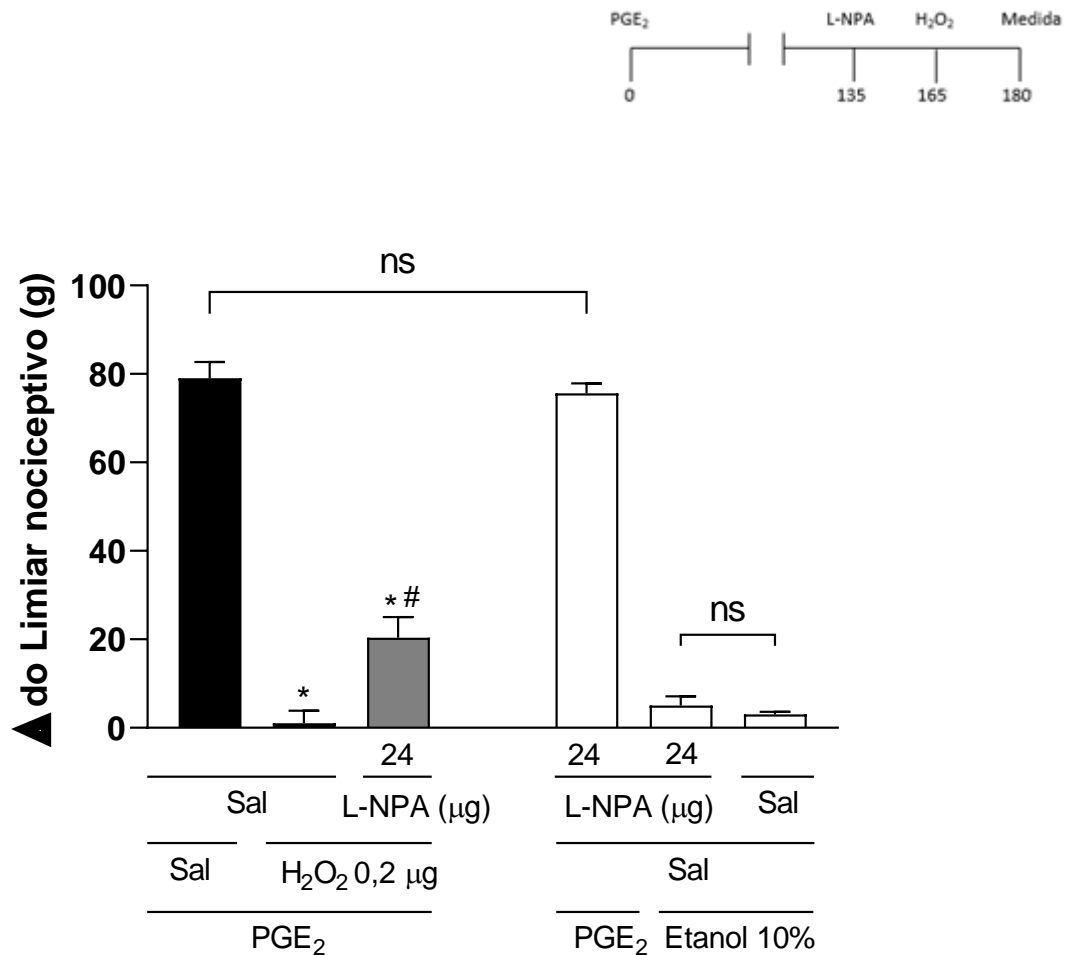


Figura 22. Efeito do L-NPA na antinociceção periférica mediada pelo H₂O₂: PGE₂ (2 μg/pata), L-NPA (24 μg/pata) e H₂O₂ (0,2 μg/pata) ou seus veículos foram administrados na pata posterior direita dos animais nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata em 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Sal + Sal). #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado à coluna (PGE₂ + Sal + H₂O₂ 0,2 μg). ns = diferença estatisticamente não significativa; Sal = Salina 0,9%.

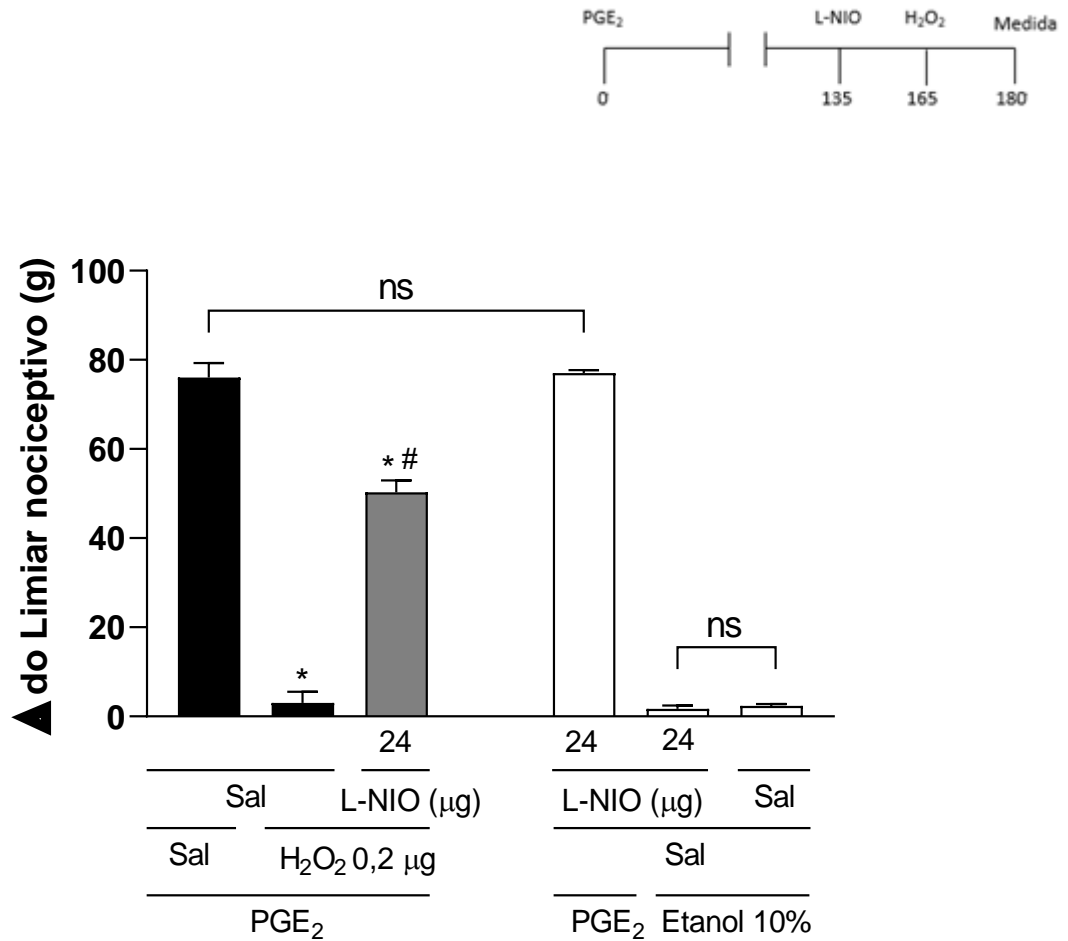


Figura 23. Efeito do L-NIO na antinociceção periférica mediada pelo H₂O₂: PGE₂ (2 μg/pata), L-NIO (24 μg/pata) e H₂O₂ (0,2 μg/pata) ou seus veículos foram administrados na pata posterior direita dos animais nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata em 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Sal + Sal). #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Sal + H₂O₂ 0,2 μg). ns = diferença estatisticamente não significativa; Sal = Salina 0,9%.

5.6 Avaliação da participação dos canais para potássio (K⁺) no efeito antinociceptivo periférico do peróxido de hidrogênio

O tetraetilamônio (TEA), um bloqueador seletivo de canais para K⁺ dependentes de voltagem (K_v), foi capaz de reverter a antinocicepção causada pelo H₂O₂ de forma dose-dependente, sendo que na dose de 60 µg houve reversão total da antinocicepção e, nas doses de 30 e 15 µg/pata, a reversão foi parcial (Figura 24).

A glibenclamida (Glib) foi utilizada para bloquear os canais pra K⁺ ativados por ATP (K_{ATP}) e, nas doses de 40, 80 e 160 µg houve reversão parcial em relação a antinocicepção causada pelo H₂O₂ (Figura 25).

No caso dos canais para K⁺ ativados por Cálcio de alta (BK_{Ca²⁺}) e baixa condutância (SK_{Ca²⁺}), foram utilizados os bloqueadores seletivos Paxilina (Px) e Dequalínio (Dq), respectivamente. A Px reverteu a antinocicepção de H₂O₂ de forma parcial mesmo com o dobro de sua dose máxima (20 µg) (Figura 26). Esta inibição não foi dose-dependente, uma vez que a metade de sua dose máxima também não foi estatisticamente diferente das outras duas dosagens. No caso do Dq, as doses de 12,5 e 25 µg causaram reversão parcial, enquanto que a dose de 50 µg foi capaz de reverter completamente a antinocicepção (Figura 27).

Nenhum dos bloqueadores ou de seus veículos causaram efeito hiperalgésico ou antinociceptivo nos animais (experimentos descritos no bloco à direita de cada figura).

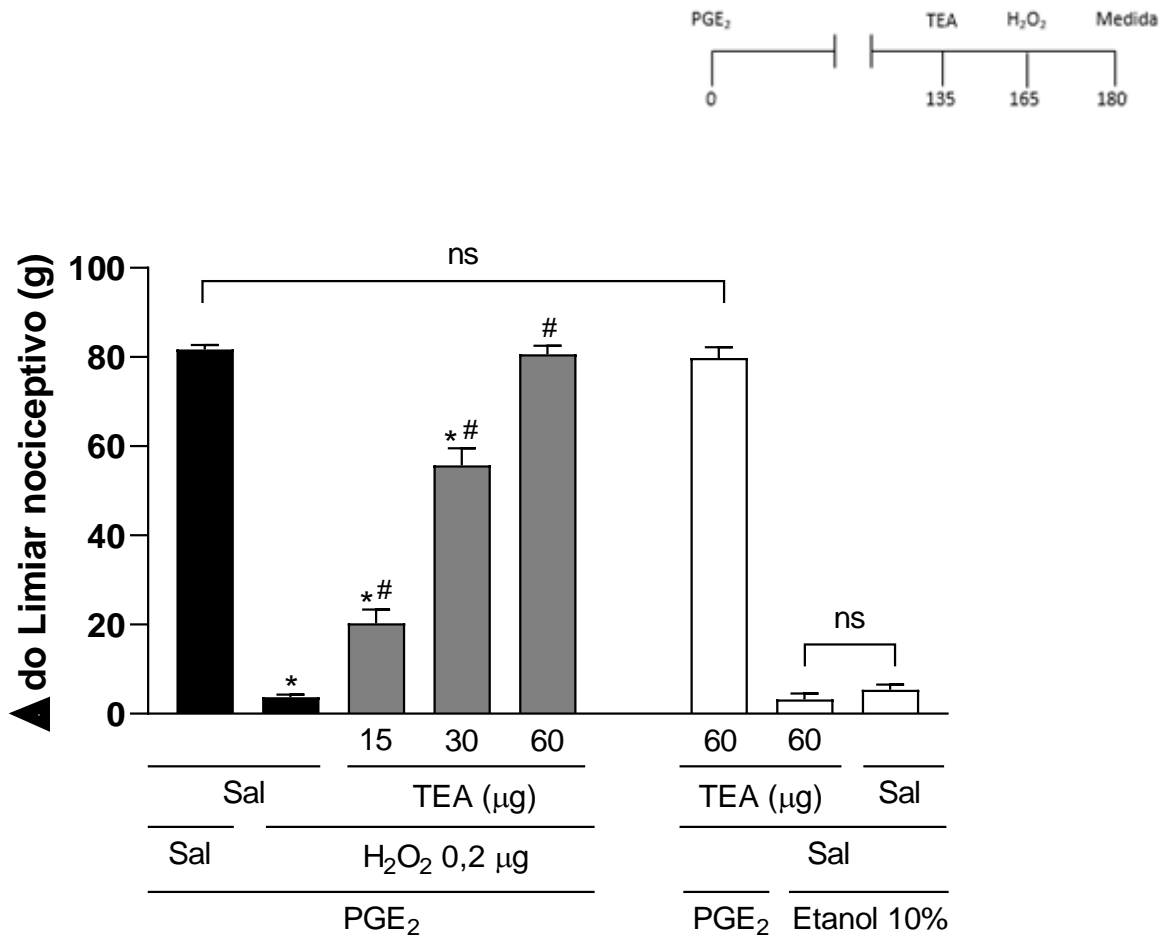


Figura 24. Efeito do TEA na antinociceção periférica mediada pelo H₂O₂: PGE₂ (2 μg/pata), Tetraetilamônio (TEA; 15, 30 e 60 μg/pata) e H₂O₂ (0,2 μg/pata) ou seus veículos foram administrados na pata posterior direita dos animais nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata em 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Sal + Sal). #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Sal + H₂O₂ 0,2 μg). ns = diferença estatisticamente não significativa; Sal = Salina 0,9%.

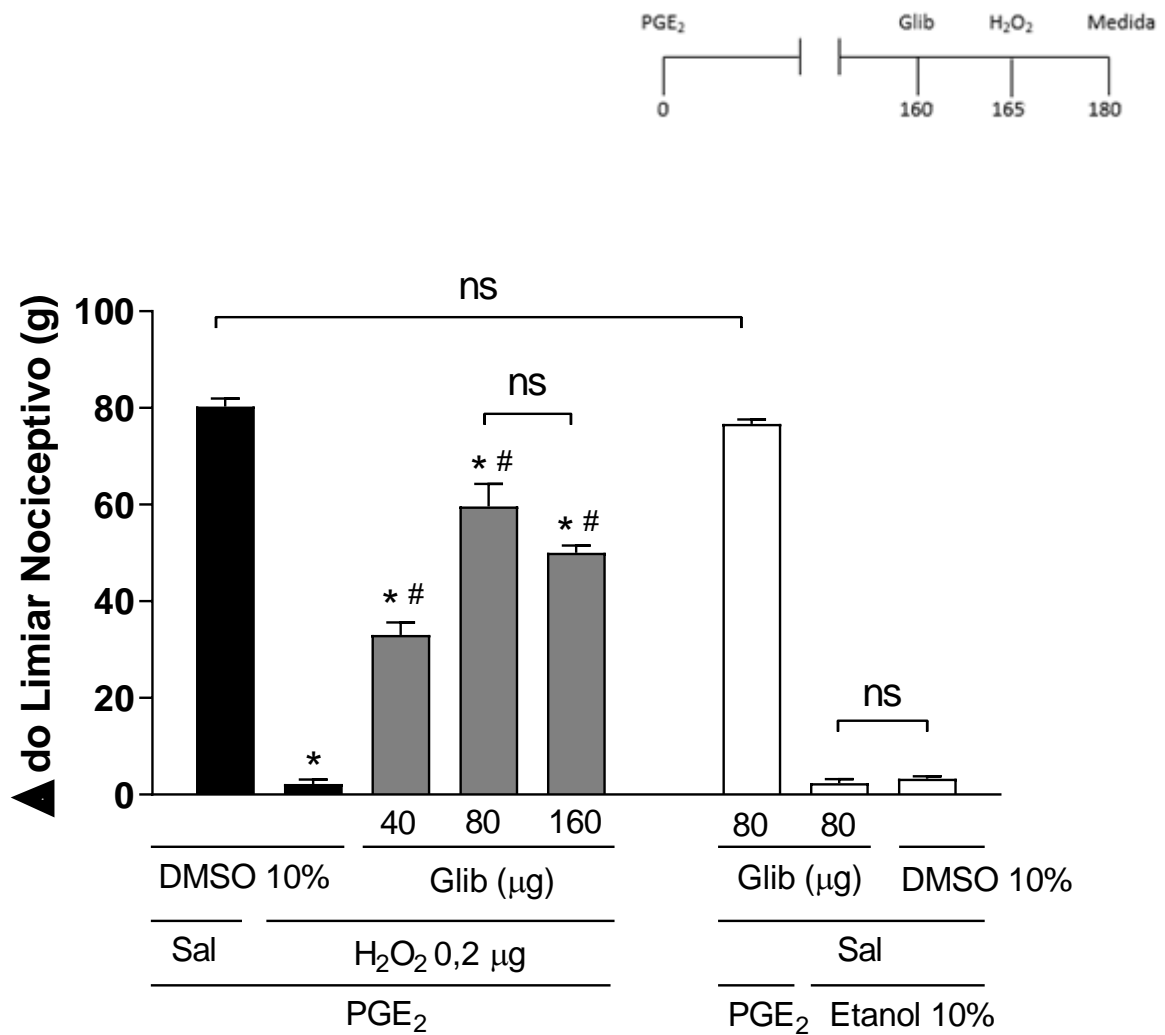


Figura 25. Efeito da Glib na antinociceção periférica mediada pelo H₂O₂: PGE₂ (2 µg/pata), Glibenclamida (Glib; 40, 80 e 160 µg/pata) e H₂O₂ (0,2 µg/pata) ou seus veículos foram administrados na pata posterior direita dos animais nos tempos 0, 160 e 165 min, respectivamente. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata em 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Sal + Sal). #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + DMSO 10% + H₂O₂ 0,2 µg). ns = diferença não estatisticamente significativa; Sal = Salina 0,9%; DMSO = dimetilsulfóxido 10%.

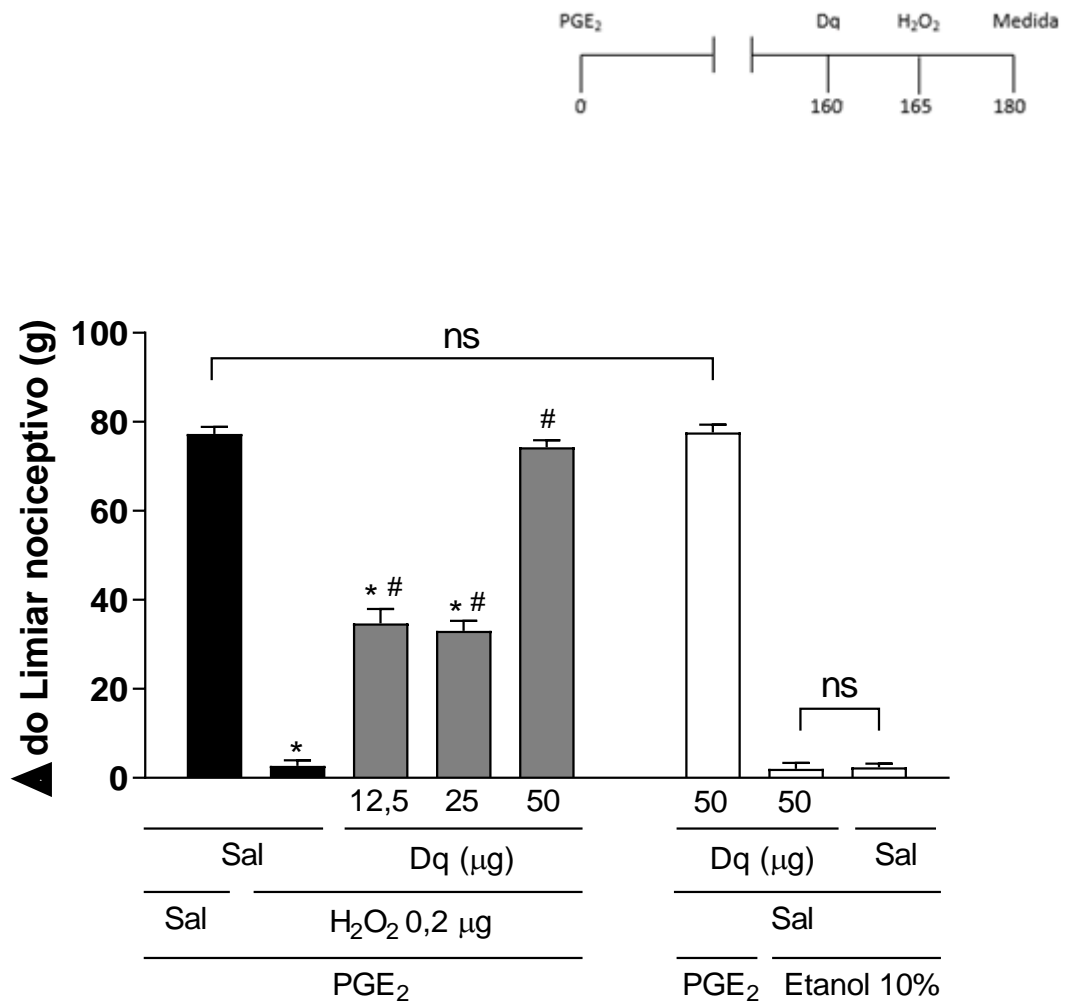


Figura 26. Efeito do Dq na antinociceção periférica mediada pelo H₂O₂: PGE₂ (2 µg/pata), Dequalínio (Dq; 12.5, 25 e 50 µg/pata) e H₂O₂ (0,2 µg/pata) ou seus veículos foram administrados na pata posterior direita dos animais nos tempos 0, 160 e 165 min, respectivamente. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata em 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Sal + Sal). #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo (PGE₂ + Sal + H₂O₂ 0,2 µg). ns = diferença não estatisticamente significativa; Sal = Salina 0,9%.

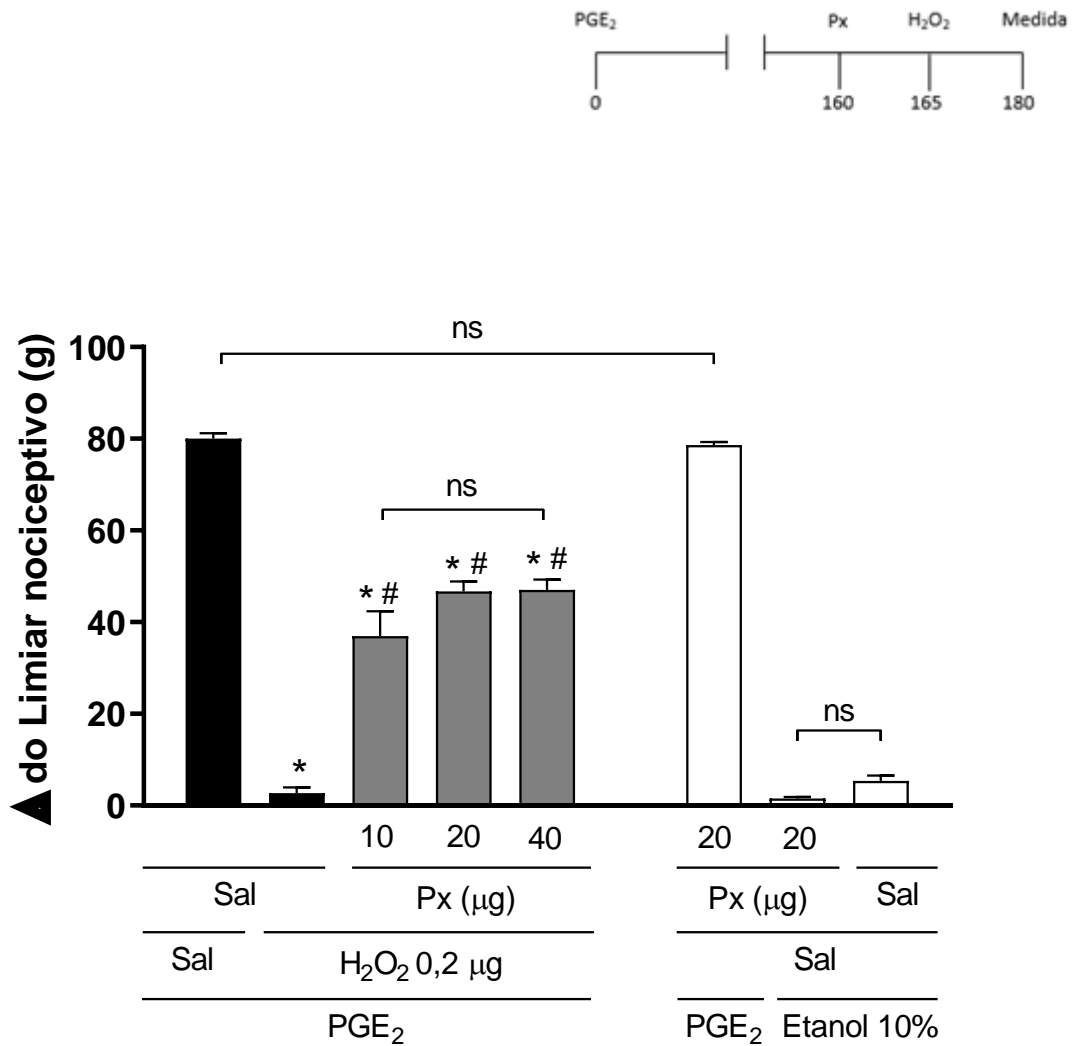


Figura 27. Efeito da Px na antinociceção periférica mediada pelo H₂O₂: PGE₂ (2 μg/pata), Paxilina (Px; 10, 20 e 40 μg/pata) e H₂O₂ (0,2 μg/pata) ou seus veículos foram administrados na pata posterior direita dos animais nos tempos 0, 160 e 165 min, respectivamente. O limiar nociceptivo foi mensurado através do teste de retirada de pata em 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ limiar nociceptivo em gramas (g) para n = 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ + Sal + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ + Sal + H₂O₂ 0,2 μg. ns = diferença não estatisticamente significativa; Sal = Salina 0,9%.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa de oxigênio (ROS) que, no entanto, não possui radicais livres e, apesar do foco sobre as discussões envolvendo essa molécula serem majoritariamente sobre efeitos tóxicos ou patogênicos, ela participa de vias essenciais ao organismo, estando incluída nas reações de oxirredução que controlam vários aspectos da vida (Sies e cols., 2017).

As espécies reativas de oxigênio, incluindo o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila (OH) participam do metabolismo oxidativo da célula e, durante as últimas décadas, acumulou-se evidências de que estes ROS são moléculas sinalizadoras comuns a diversas vias. O H_2O_2 , em particular, está envolvido em diversos processos, entre outros, o desenvolvimento embrionário (Coffman e cols., 2009), apoptose celular (Antunes e Cadenas 2001) e diferenciação celular (Sundaresan e cols., 1995). Nas células cerebrais, o H_2O_2 tem envolvimento como um fator regulador intracelular do crescimento e atividade neuronal e também em funções de organelas (Avshalumov e cols., 2003; Gerich e Funke 2009). Além disso, age como um mensageiro difuso para a sinalização dos neurônios com as células da glia (Atkins e Sweatt 1999) e comunicação interneuronal, incluindo regulação da transmissão e plasticidade sináptica (Samanta e cols., 1998; Kamsler e Segal 2003; Avshalumov e cols., 2003).

Nas vias nociceptivas já foi descrito que o H_2O_2 , quando administrado na dose de 100 mM (0,6 ml) na via intramuscular foi capaz de causar dor através da ativação dos receptores TRPA1. A avaliação ocorreu através de análise comportamental, na qual foi mensurado o tempo de elevação e lambida na pata onde foi administrada a droga. O mesmo efeito, nas mesmas doses, não ocorreu por via subcutânea (Sugiyama e cols., 2018).

Keeble e colaboradores (2009) descreveram, através das análises do teste de Hargreaves, para avaliação da hiperalgesia térmica e com o uso do teste de sensibilidade plantar, para avaliação de hiperalgesia mecânica, que o H_2O_2 também foi capaz de causar dor de forma dose-dependente nas doses de 2,2 μ Mol a 4,4 μ Mol (50 μ l) por via subcutânea na pata (intraplantar). Através da determinação da massa da pata também se evidenciou que o H_2O_2 foi capaz de causar edema, o que indica efeito inflamatório desta molécula, nesta dose. O mecanismo para que a molécula tivesse efeito hiperalgésico, neste caso, foi relacionado a ativação dos TRPV1.

Para critério de comparação, no estudo de Sugiyama e colaboradores (2018) a dose utilizada (100mM em 0,6 ml) corresponde a 2000 µg de H₂O₂. Dose 10.000 vezes maior que a utilizada no presente estudo. No estudo de Keeble e colaboradores (2009), a concentração utilizada de 2,2 µMol a 4,4 µMol (50µl) corresponde a 75 e 150 µg de H₂O₂, dose correspondente a 375 e 700 vezes maior ao valor em que encontramos a antinocicepção causada pela molécula no presente estudo (0,2 µg/pata de H₂O₂).

Apesar da literatura extremamente escassa no estudo do H₂O₂ como molécula antinociceptiva, um achado importante é o estudo de Orestes e colaboradores (2010), que demonstraram o H₂O₂ como um intermediário na analgesia do anestésico óxido nitroso (N₂O), agindo como um inibidor dos canais para Cálcio Cav3.2, levando à analgesia que, por sua vez, era interrompida pela administração de catalase, responsável pela degradação do H₂O₂. O estudo foi conduzido com o uso de ferramentas eletrofisiológicas.

A literatura descreve que uma mesma molécula, pode possuir efeito ambíguo nas vias nociceptivas, dependendo da dosagem e de seus mecanismos. A administração de doadores de NO (linsidomina – SIN1), em grandes concentrações (10 - 20 µg), aumenta significativamente a alodínia durante o teste mecânico na pata do animal, indicando a intensificação da transmissão nociceptiva e consequente sensação dolorosa. Enquanto que, em doses menores (0,1 - 2 µg) houve uma redução dose-dependente deste efeito de alodínia pelo estímulo mecânico (Sousa e Prado, 2001).

Assim, o presente estudo utilizou uma abordagem farmacológica para avaliação do potencial antinociceptivo de H₂O₂ no teste de compressão de pata em camundongos. Adicionalmente, investigou-se em quais doses houve efeito analgésico; se essas possuíam efeito sistêmico e se as vias opioidérgica, canabinoidérgica, via do óxido nítrico e a ativação dos canais para K⁺ voltagem dependente, ativado por ATP e por Ca²⁺ de alta e baixa condutância participariam da antinocicepção.

A fim de avaliar o efeito antinociceptivo promovido pelo peróxido de hidrogênio, utilizou-se, em nosso ensaio, o agente hiperalgésico prostaglandina E₂ (PGE₂), na dose em que esta possui máximo efeito hiperalgésico nos animais: 2 µg/pata (Soares e Duarte, 2001; Pacheco e Duarte, 2006; Alves e cols., 2012). A PGE₂ ativa correntes de sódio e inibe canais para potássio dependentes de voltagem, aumentando assim a

excitabilidade neuronal e, conseqüentemente diminuindo o limiar necessário para que haja o potencial de ação, tornando mais fácil a ativação dos neurônios aferentes primários que sinalizam a nocicepção (Vanegas e Schaible, 2001; Kassuya e cols., 2007). A capacidade que PGE₂ possui de sensibilizar os nociceptores de forma direta, sem necessitar da participação de células ou moléculas intermediárias, constitui uma vantagem em relação a outros tipos de agentes hiperalgésicos, como por exemplo a carragenina. Dessa forma, no modelo experimental utilizado, a administração de PGE₂ minimiza a possibilidade da liberação ou ação de mediadores produzidos durante um processo inflamatório (Vinegar e cols., 1987).

Quinze minutos antes do pico do efeito hiperalgésico da PGE₂, que ocorre na terceira hora, o H₂O₂ foi administrado nas doses de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 µg e, demonstrou efeito analgésico, que foi máximo nas dosagens de 0,2 e 0,3 µg entre 15 e 25 minutos após sua administração. Assim, foi escolhida a dosagem de 0,2 µg para os experimentos seguintes, uma vez que essa é a dosagem mínima necessária para que a droga alcance antinocicepção completa. Além disso, essa mesma dose promoveu seu efeito apenas periféricamente, uma vez que não houve participação efeitos sistêmicos, em conformidade com nosso objetivo de avaliar os mecanismos de ação apenas a nível periférico.

Assim como a serotonina (Diniz e cols., 2015), a noradrenalina (Romero e cols., 2012), a dopamina (Queiroz e cols., 2021, em fase de publicação) e o óxido nítrico (Duarte e cols., 1990), o peróxido de hidrogênio também parece apresentar efeito hiperalgésico e antinociceptivo dependente da sua concentração, bem como aos mecanismos que essas doses irão ativar (Sousa e Prado, 2001; de Oliveira-Marques e cols., 2007; Keeble e cols., 2009).

Assim, visando investigar as vias envolvendo os mecanismos do efeito antinociceptivo do H₂O₂, foi avaliada a participação das vias opioidérgica, canabinoidérgica, óxido nítrico e canais para potássio. Inicialmente foi estudada a via opioidérgica e, para isso utilizou-se naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opioidérgicos. No entanto, esse antagonista, não modificou a antinocicepção, o que aponta que o sistema opioidérgico parece não participar do efeito antinociceptivo induzido pelo H₂O₂.

A via opioidérgica, incluindo peptídeos opioides endógenos é responsável por sinalizações e funções da atividade neuronal e de neurotransmissores, possuindo uma importante função na modulação endógena da dor com seu mecanismo

analgésico. Os peptídeos opioides endógenos ainda agem como imunorreguladores, em conjunto com o sistema imune (Peterson e cols., 1998).

Os receptores para estes peptídeos opioides são classificados em três tipos: μ , δ e κ (Iwamoto e Martin, 1981). Stanojevic e colaboradores (2008) mostraram, em seu estudo, que 25 nM de metionina-enkefalina (MET), que é um peptídeo opioide endógeno, foi capaz de aumentar a liberação de H_2O_2 em macrófagos. O mesmo estudo, analisou quais receptores opioides participavam deste mecanismo. O antagonista não-seletivo dos receptores opioides naloxona diminuiu a liberação de H_2O_2 em macrófagos tratados com 6,25 nM de MET. Nessa mesma dose de MET, os antagonistas seletivos dos receptores opiodérgicos δ_1 (benzilidenaltrexona), δ_2 (naltrindole), κ (nor-binaltorfimial), μ (beta-funaltrexamina) também diminuíram a liberação de H_2O_2 nos macrófagos quando administrados em uma ampla faixa de concentração (entre 10^{-14} M e 10^{-8} M).

Assim como na via opiodérgica, em nosso estudo, o uso dos antagonistas dos receptores canabinoides CB_1 (AM215) e CB_2 (AM630) nas doses de 80 e 100 μ g, administrados 10 minutos antes do H_2O_2 , também não revertem sua analgesia. Não existem, até o momento, evidências de que H_2O_2 module a sinalização canabinoidérgica. No entanto, Wheal e colaboradores (2012) evidenciaram que o efeito de vasorelaxamento causado pelos endocanabinoides e moléculas semelhantes a estes, que é consolidado pelos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, depende do H_2O_2 , tanto para sua mediação quanto pela sua modulação.

Neste mesmo estudo, Wheal e colaboradores (2012) demonstraram que, em ramos da artéria mesentérica, o vasorelaxamento causado pelo H_2O_2 foi inibida pelo L-NAME, um inibidor não seletivo das óxido nítrico sintases, mas não pela catalase, uma enzima que degrada o próprio H_2O_2 . No vasorelaxamento causado pelos endocanabinoides o mesmo perfil foi observado, o que pode inferir que após a administração do H_2O_2 ocorre modulação da via por este.

De uma forma geral, os opioides, canabinoides e óxido nítrico (Velooso e cols., 2015; Ferreira e cols., 2019; Gonçalves e cols., 2021), possuem mecanismos analgésicos, com alvos finais similares à analgesia causada pelo H_2O_2 , mostradas por este estudo. Também se aponta certa similaridade entre seus mecanismos vasodilatadores e analgésicos, apesar de ocorrerem em células diferentes. E, apesar do fato de que H_2O_2 não possui antinocicepção gerada a partir dos receptores opioides e canabinoides (todos estes receptores acoplados a proteína G), há um certo padrão

que aponta que a ativação destes receptores por outras moléculas liberaria H_2O_2 endógeno que, por sua vez, poderia agir na sinalização analgésica (Stanojevic e col., 2008; Wheal e cols, 2012). No entanto, mais estudos necessitam ser realizados para desvendar se o H_2O_2 pode ser um mediador da analgesia causada pelos opioides e canabinoides para corroborar essa hipótese.

Em 1990, Duarte e colaboradores demonstraram que o óxido nítrico, além de induzir antinocicepção periférica, estava envolvido como mediador no mecanismo de antinocicepção da ACh. O NO e o H_2O_2 são moléculas intimamente relacionadas, uma vez que o acúmulo de NO derivado da sua produção pelas óxido nítrico-sintases (NOS) ocorre em conjunto com outros radicais livres e espécies reativas de oxigênio, que leva a superóxido dismutase a produzir H_2O_2 (Porasuphatana e cols., 2003).

Existem três isoformas de NOS: a endotelial (NOSe), a induzível (NOSi) e a neuronal (NOSn) (Shimokawa, 2020). Takaki e colaboradores (2008), utilizando camundongos nocaute para os genes reguladores das isoformas demonstraram que, com a diminuição da expressão de uma delas individualmente, ou em combinação de duas delas, a(s) isoforma(s) que ainda era(m) expressa tentava compensar a atividade das outras para manter o relaxamento dos EDHF mediado pelo H_2O_2 . Capettini e colaboradores (2010) corroboraram essa afirmação, mostrando que, inequivocadamente, o H_2O_2 derivado das isoformas NOSe e NOSn, era um importante fator de relaxamento vascular, e que, o bloqueio da expressão das isoformas, interrompia essa ação do H_2O_2 .

No presente estudo, a administração do inibidor não seletivo das óxido nítrico-sintases LNOarg (24 μ g/pata), antes da administração do H_2O_2 , reverteu completamente sua antinocicepção. A reversão foi dose-dependente, uma vez que quando administrados na dose de 12 e 6 μ g/pata essa ocorreu de forma parcial. Trabalhos do nosso grupo de pesquisa, já demonstraram a participação da enzima óxido nítrico-sintase em mecanismos analgésicos de substância exógena, como no caso da noradrenalina, diclofenaco, tingenona e o peptídeo sintético PnPP-19 (Romero et al., 2012; Alves et al., 2012; Veloso et al., 2015, Freitas et al., 2017).

Posteriormente, avaliamos qual ou quais das isoformas estariam envolvidas nesse efeito antinociceptivo do H_2O_2 . Para tal, utilizou-se L-NIL, L-NPA e L-NIO inibidores seletivos de NOSi, NOSn e NOSe respectivamente. A inibição das três isoformas alteraram a antinocicepção causada pelo H_2O_2 . A reversão causada pela inibição da NOSi foi completa enquanto com a inibição das outras duas isoformas a

reversão foi parcial. Destaca-se aqui que a seletividade do bloqueio do L-NIO para a NOSe possui um IC₅₀ cerca de duas vezes maior que para as outras isoformas. Isso torna a seletividade da droga um pouco menor que as outras drogas antagonistas, inibidoras e bloqueadoras do estudo. No entanto essa era a ferramenta farmacológica com maior seletividade a disposição para o trabalho (Rees e cols., 1990).

A via da ativação do óxido nítrico, após administração de analgésicos, geralmente inicia-se com a ativação de receptores acoplados a proteína G, na qual existem duas porções distintas que agem após sua ativação: a alfa e a beta-gama. Esta última é capaz de ativar a via da PI3Ky/AKT, que diretamente ativa as isoformas das óxido nítrico-sintases. Uma vez ativadas, as NOS sintetizam o NO, que estimula a guanilato ciclase a converter GTP em GMPc, que por sua vez ativa a PKG que provoca a fosforilação dos canais para K⁺, com sua abertura e hiperpolarização, causada pelo efluxo de íons potássio e consequente analgesia (Cunha e cols., 2010). No entanto, na literatura, existem relatos de que H₂O₂ pode estimular a ação de alguns destes componentes descritos acima, não iniciando a via por meio da ativação de receptores acoplados à proteína G.

De fato, o H₂O₂ pode ativar a PI3Ky/AKT (Angeloni e cols., 2011), as isoformas de NOS (Takaki e cols., 2008), a guanilato ciclase (Bae e cols., 2016), a PKG (Zhang e cols., 2012) e até mesmo diretamente os canais para K⁺ (Barlow e White, 1998; Avshalumov e Rice, 2003; Matoba e Shimokawa, 2003; Limei e cols., 2013).

A literatura descreve os canais para K⁺ intimamente relacionados aos mecanismos antinociceptivo de diversas drogas, como o diclofenaco, fentanil, N-araquidonoiletanolamina, noradrenalina e angiotensina 1-7 (Alves e cols., 2004; Rodrigues e cols., 2005; Reis e cols., 2011; Romero e cols., 2012; Costa e cols., 2014). Além disso, há décadas o H₂O₂ é comprovadamente um ativador de alguns canais para K⁺ (Barlow e White, 1998; Avshalumov e Rice, 2003; Matoba e Shimokawa, 2003; Limei e cols., 2013), portanto, visando avaliar este mecanismo, utilizamos drogas bloqueadoras destes canais para avaliar sua participação no efeito antinociceptivo do H₂O₂. O tetraetilamônio (TEA) foi utilizado na dose de 30 µg/pata, 30 minutos antes do H₂O₂ e reverteu parcialmente a sua antinocicepção. O aumento da dose para 60 µg/pata, reverteu completamente esse efeito, enquanto a dose menor, de 15 µg/pata, levou a uma menor reversão comparado as duas primeiras doses, inferindo a participação dos canais para K⁺ dependentes de voltagem na antinocicepção gerada pela droga, que ocorreu de forma dose-dependente.

Previamente, a ativação que H_2O_2 possui sobre os canais K_v já foi relatada por Rogers e colaboradores (2006). No estudo dos autores, o bloqueio destes canais pelo bloqueador 4-aminoperidina atenuou o efeito vasodilatador de H_2O_2 na coronária. O uso de *whole cell patch-clamp* evidenciou que o H_2O_2 realmente era capaz de aumentar a corrente que passava por este tipo de canal de forma dose-dependente. Park e colaboradores (2014) também conseguiram identificar este efeito do H_2O_2 neste tipo de canais e ainda evidenciaram em sua revisão sobre esse efeito em outros canais para K^+ , como os ativados por ATP e por Ca^{2+} .

A glibenclamida (bloqueador seletivo dos K_{ATP}), levou à reversão dose-dependente a antinocicepção induzida pelo H_2O_2 . No entanto, sua reversão não foi máxima. Avshalumov e Rice (2003) descreveram o H_2O_2 como um neuromodulador em função de sua capacidade de ativação dos canais para K^+ ativados por ATP, podendo regular inclusive a liberação de neurotransmissores, mecanismo esse que foi bloqueado também pelo uso da glibenclamida. Quando utilizado um bloqueador dos K_{ATP} específicos da mitocôndria, o mesmo não ocorreu.

Para avaliarmos se os canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de alta e baixa condutância participavam desta analgesia utilizou-se a paxilina e o dequalínio. A paxilina, foi administrada nas doses de 10, 20 e 40 $\mu g/pata$, 5 minutos antes de H_2O_2 e, mesmo na maior dose, a antinocicepção foi apenas parcialmente revertida, sem diferenças estatísticas entre os três grupos. Por outro lado, o dequalínio conseguiu reduzir a antinocicepção do H_2O_2 completamente com a dose máxima utilizada (50 $\mu g/pata$), enquanto que doses menores (25 e 12,5 $\mu g/pata$) foram menos expressivas com sua reversão da antinocicepção.

Barlow e White (1998), com o uso de *patch-clamp*, demonstraram a ativação de canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de alta condutância pelo H_2O_2 na concentração de 300 μM . Este efeito foi inibido pelo pré-tratamento com KCl. Bae e colaboradores (2016) também demonstraram a ativação destes canais pelo H_2O_2 , efeito este que foi bloqueado com o uso de KT5823 (inibidor de proteína kinase G) e pelo ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel). O uso de H-89 e KT5720 (inibidores de proteína kinase A), por sua vez, não bloqueou o efeito de H_2O_2 no canal, apontando que a ativação dos $BK_{Ca^{2+}}$ parece estar relacionada com a atividade da guanilato ciclase e da PKG.

Em modelos de culturas de alta glicose de células endoteliais da veia umbilical de humanos, o H_2O_2 conseguiu fazer com que houvesse a diminuição da expressão da proteína dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de baixa condutância, sugerindo que

a molécula pode ter uma relação de retroalimentação negativa após ativação dos canais. No entanto, a administração de um antioxidante (ácido lipóico alfa) conseguiu prevenir este efeito (Zhao, e cols., 2013). O efeito de H_2O_2 neste caso estava envolvido na diminuição da hiperpolarização dos vasos e no prejuízo da vasodilatação (Limei e cols., 2013). Em modelos experimentais parecidos, Yi e colaboradores (2015) corroboraram estes resultados, demonstrando que o aumento do estresse oxidativo em quadros de diabetes resultavam na remodelação da atividade eletrofisiológica destes canais.

Féletou e Vanhoutte (2009) descreveram também o potencial do H_2O_2 e de outros EDHFs de ativar indiretamente os canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de baixa condutância após o aumento de Ca^{2+} intracelular reflexo à liberação destes fatores endoteliais. Demonstrando os complexos mecanismos que o H_2O_2 possui na ativação dos canais iônicos.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Portanto, os nossos achados demonstraram, pela primeira vez, o efeito antinociceptivo periférico do H_2O_2 frente a hiperalgesia induzida por PGE_2 e, a participação da via do óxido nítrico, além dos canais para K^+ sensíveis ao ATP e ativados por Ca^{2+} de alta e baixa condutância, nesse evento. Os sistemas opioide e canabinoide parecem não possuir participação na antinocicepção do H_2O_2 (Figura 28).

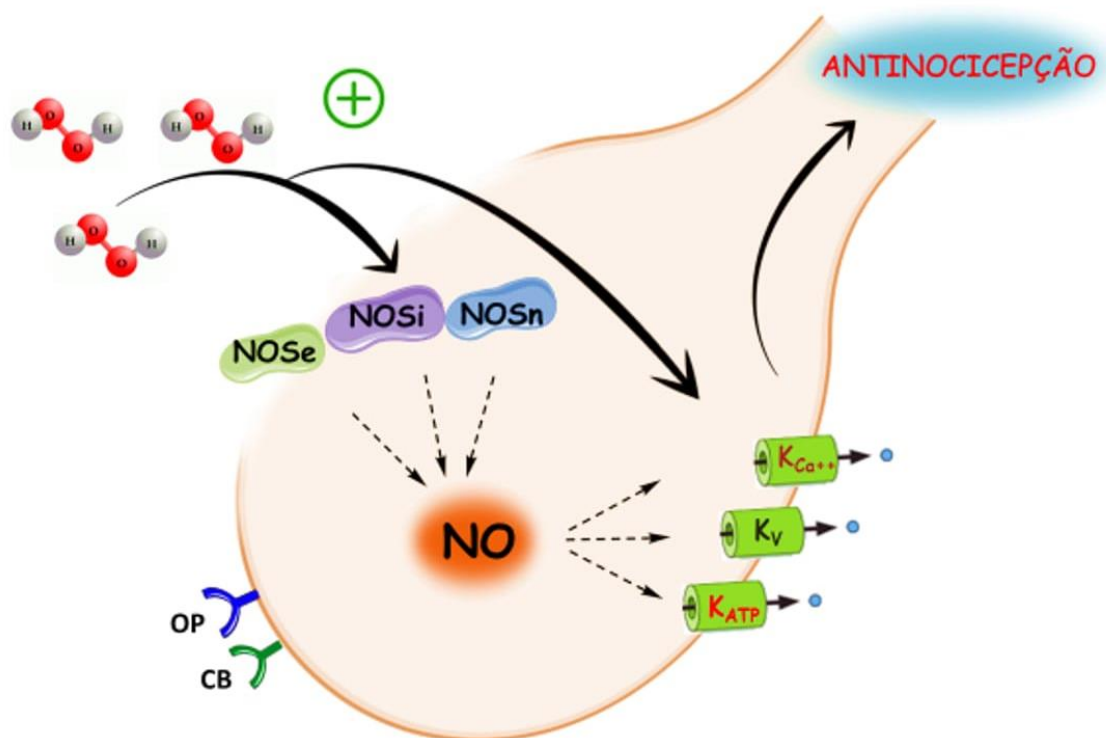


Figura 28. Mecanismos envolvidos na antinocicepção periférica induzida pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2): Ativação das óxido nítrico-sintases endotelial, induzível e neuronal, e canais para K^+ dependentes de voltagem, ativados por ATP e por Ca^{2+} de alta e baixa condutância. Ao lado inferior esquerdo a presença dos receptores opioides e canabinoides, que não participam do mecanismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, S. B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 10, n. SUPPL. 2, p. 1–7, 2008.

ADIMORA, N. J., et al. A Model of Redox Kinetics Implicates the Thiol Proteome in Cellular Hydrogen Peroxide Responses. **Antioxidants & Redox Signaling**, 13(6), 731–743. (2010).

ADRIAN, E. D. E ZOTTERMAN, Y. The impulses produced by sensory nerve endings. Part 2. The response of a single end-organ. **J. Physiol.** 61, 11–171 (1926).

AHMAD, S. et al. A stop codon mutation in SCN9A causes lack of pain sensation. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 17, p. 2114–2121, 2007.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: A neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, n. 1–2, p. 40–56, 2004.

ALVES, D. P. et al. Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K⁺ channels activation. **Life Sciences**, v. 74, n. 20, p. 2577–2591, 2004.

ALVES, D. P. et al. Inflammation mobilizes local resources to control hyperalgesia: the role of endogenous opioid peptides. **Pharmacology**, v.89, p.22–28, 2012.

ANASTAS, T. M. et al. Social Influences on Peer Judgments about Chronic Pain and Disability. **Journal of Pain**, v. 20, n. 6, p. 698–705, 2019.

ANGELONI, C. et al. H₂O₂ preconditioning modulates phase II enzymes through p38 MAPK and PI3K/Akt activation. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 300, n. 6, 2011.

ANTUNES, F.; CADENAS, E. Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: Submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through fenton chemistry independent of the cellular thiol state. **Free Radical Biology and**

Medicine, v. 30, n. 9, p. 1008–1018, 2001.

ATKINS, C. M.; SWEATT, J. D. Reactive oxygen species mediate activity-dependent neuron-glia signaling in output fibers of the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 17, p. 7241–7248, 1999.

AVSHALUMOV, M. V., E RICE, M. E. Activation of ATP-sensitive K⁺ (KATP) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100(20), 11729–11734. 2003.

AVSHALUMOV, M. V. et al. Glutamate-dependent inhibition of dopamine release in striatum is mediated by a new diffusible messenger, H₂O₂. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 2744–2750, 2003.

BAE, H. et al. Effects of hydrogen peroxide on voltage-dependent K⁺ currents in human cardiac fibroblasts through protein kinase pathways. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 315–324, 2016.

BAI, J. et al. Overexpression of Catalase in Cytosolic or Mitochondrial Compartment Protects HepG2 Cells against Oxidative Injury. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 37, p. 26217–26224, 10 set. 1999.

BARLOW, R. S.; WHITE, R. E. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BK(Ca) channel activity. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 275, n. 4 44-4, p. 1283–1289, 1998.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.

BESSOU, P. E PERL, E. R. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **J. Neurophysiol.** 32, 1025–1043 (1969).

BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic anatomy and physiology of pain

pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 629–638, 2014.

BROWN-SÉQUARD, C. E. Course of Lectures on the Physiology and Pathology of the **Central Nervous System** (Collins, Philadelphia, 1860).

BURGESS, P. R. e Perl, E. R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **J. Physiol.** 190, 541–562 (1967).

CAPETTINI, L. S. A., CORTES, S. F., & LEMOS, V. S. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. **European Journal of Pharmacology**, 643(2-3), 260–266. 2010.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature** 389, 816–824 (1997).

CHAPLAN, S.R., et al. Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. **J. Neurosci.** 2003.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527–605, jul. 1979.

CHELIKANI, P.; RAMANA, T.; RADHAKRISHNAN, T. M. Catalase: A repertoire of unusual features. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 20, n. 2, p. 131–135, 2005.

CHEN, G.; SUZUKI, H.; WESTON, A. H. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. **British Journal of Pharmacology**, v. 95, n. 4, p. 1165–1174, dez. 1988.

CHRISTENSEN, B. N. E PERL, E. R. Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn. **J. Neurophysiol.** 33, 293–307 (1970).

CLIFFOR, J. e WOOLF, C. J. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. **Annals of Internal Medicine**, 140(6), 441. 2004.

CRANEFIELD, P. F. The Way In and the Way Out: Francois Magendie, Charles Bell and the Roots of the Spinal Nerves (**Futura Publishing Company**, Mount Kisco, New York, 1974).

COFFMAN, J. A. et al. Oral-aboral axis specification in the sea urchin embryo. III. Role of mitochondrial redox signaling via H₂O₂. **Developmental Biology**, v. 330, n. 1, p. 123–130, 2009.

COHEN, G. Enzymatic/Nonenzymatic Sources of Oxyradicals and Regulation of Antioxidant Defenses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 738, n. 1, p. 8–14, 1994.

COSTA, A. et al. Ang-(1-7) activates the NO/cGMP and ATP-sensitive K⁺ channels pathway to induce peripheral antinociception in rats. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 11–16, 2014.

CUNHA, T. M. et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K γ /AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 9, p. 4442–4447, 2010.

CURI, R. e PROCÓPIO, J. A. F. (2009). **Fisiologia básica**. 1ª edição.

DALLENBACH, K. M. Pain: History and Present Status. *The American Journal of Psychology*, 52(3), 331. 1939.

DALTON, T. P.; SHERTZER, H. G.; PUGA, A. REGULATION OF GENE EXPRESSION BY REACTIVE OXYGEN. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 67–101, abr. 1999.

DEJERINE, J. e ROUSSY, G. Le syndrome thalamique. **Rev. Neurol.** (Paris) 14, 521–532 (1906) (in French).

DE GROOT, H.; LITTAUER, A. Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 6, n. 5, p. 541–551, jan. 1989.

DE OLIVEIRA-MARQUES, V., et al. A Quantitative Study of NF- κ B Activation by H₂O₂: Relevance in Inflammation and Synergy with TNF- α . **J. Immunol.** 2007.

DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, v. 82, n. SUPPL.1, p. 27–35, 1999.

DILLY, P. N., et al. Cells of origin of the spinothalamic tract in the cat and rat. **Exp. Neurol.** 21, 550–562 (1968).

DINIZ, D. A., et al. Serotonin induces peripheral mechanical antihyperalgesic effects in mice. **European Journal of Pharmacology**, 767, 94–97. 2015.

DUARTE, I. D. G., et al. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, 186(2-3), 289–293. 1990.

DUBOIS-REYMOND, E. **Untersuchungen über thierische Elektrizität** (Georg Reimer, Berlin, 1848–1849) (in German).

EDINGER, L. Zwölf vorlesungen über den bau der nervösen centralorgane. **FÜR Ärzte und Studierende** 150–153 (F. C. W. Vogel, Leipzig, 1892).

EL HASSANI, R. A. et al. Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 288, n. 5 51-5, p. 933–943, 2005.

ERLANGER, J., et al. The compound nature of the action current of nerve as disclosed by the cathode ray oscillograph. **Am. J. Physiol.** 70, 624–666 (1924).

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 93, n. 3, p. 515–524, mar. 1988.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: An update. **Clinical Science**, v. 117, n. 4, p. 139–155, 2009.

FERREIRA, R. C. M. et al. Role of Endocannabinoid System in the Peripheral Antinociceptive Action of Aripiprazole. **Anesthesia and Analgesia**, v. 129, n. 1, p. 263–268, 2019.

FREITAS, A.C.N.; et al. The synthetic peptide PnPP-19 induces peripheral antinociception via activation of NO/cGMP/KATP pathway: Role of eNOS and nNOS. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 64, p. 31-38, 2017.

GEISZT, M. NADPH oxidases: New kids on the block. **Cardiovascular Research**, v. 71, n. 2, p. 289–299, 2006.

GERICH, F. J. et al. H₂O₂-mediated modulation of cytosolic signaling and organelle function in rat hippocampus. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 458, n. 5, p. 937–952, 2009.

GOBEL, S. Golgi studies of the neurons in layer I of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). **Journal of Comparative Neurology**, v. 180, n. 2, p. 375–393, 1978.

GONÇALVES, W. A. et al. Endogenous opioid and cannabinoid systems modulate the muscle pain: A pharmacological study into the peripheral site. **European Journal of Pharmacology**, v. 901, n. March, p. 1–10, 2021.

GOWERS, W. R. A case of unilateral gunshot injury to the spinal cord. **Trans. Clin. Lond.** 11, 24–32 (1878).

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2015.

HEINBECKER, P., et al. Pain and touch fibers in peripheral nerves. **Arch. Neurol. Psychiatry** 29, 771–789 (1933).

HO, Y. S. et al. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32804–32812, 2004.

HOFMANN, B.; HECHT, H.; FLOHÉ, L. Birgit Hofmann 1 , Hans-Jürgen Hecht 2 and Leopold Flohé 1, * 1. **New York**, v. 383, n. April, p. 347–364, 2002.

HÖKFELT, T., et al. Substance P: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. **Science** 190, 889–890 (1975).

HUNG, H. C.; LEE, E. H. Y. MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 1, p. 76–84, 1998.

IASP (International Association for the Study of Pain), 2020. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org>>. Acesso em: 1 de Outubro de 2021.

Iwamoto, E. T., e Martin, W. R. Multiple opioid receptors. **Medicinal Research Reviews**, 1(4), 411–440. 1981.

JULIUS, D., e BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 413(6852), 203–210. 2001.

KANDEL, E.R., et al. **Principles of neural science**. 4th editio. 2000.

KAMSLER, A.; SEGAL, M. Hydrogen peroxide modulation of synaptic plasticity. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 269–276, 2003.

KANOFSKY, J. R. Singlet oxygen production by biological systems. **Chemico-Biological Interactions**, v. 70, n. 1–2, p. 1–28, 1989.

KASSUYA, C. A., et al. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **Br J Pharmacol.**, v.150, n.6, p.727-37, 2007.

KATO, G. et al. Electrophysiological mapping of the nociceptive inputs to the substantia gelatinosa in rat horizontal spinal cord slices. **Journal of Physiology**, v. 560, n. 1, p. 303–315, 2004.

KAWABATA, A., et al. L-Leucyl-L-arginine, naltrindole and Darginine block antinociception elicited by L-arginine in mice with carrageenin-induced hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107(4), p. 1096–1101. 1992.

KAWANO, T., et al. Nitric Oxide Activates ATP-Sensitive Potassium Channels in Mammalian Sensory Neurons: Action by Direct S-Nitrosylation. **Molecular Pain**, 5, 1744–8069–5–12. 2009.

KEEBLE, J. E. et al. Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. **Pain**, v. 141, n. 1–2, p. 135–142, 2009.

KIM, H. S. et al. Induction of 1-cys peroxiredoxin expression by oxidative stress in lung epithelial cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 285, n. 2 29-2, p. 363–369, 2003.

KONIETZNY, F., et al. Sensory experiences in man evoked by intraneural electrical stimulation of intact cutaneous afferent fibers. *Exp. Brain Res.* 42, 219–222 (1981).
Ochoa, J. & Torebjörk, E. Sensations evoked by intraneural microstimulation of single mechanoreceptor units innervating the human hand. **J. Physiol.** 342, 633–654 (1983).

KRIPPEIT-DREWS et al. Interference of H₂O₂ with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic β -cells. **Journal of Experimental Pharmacology**, Volume 11, 149–

158. 1999.

KWONG, L. K.; SOHAL, R. S. Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse Mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1998.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 181–189, 2004.

LE BARS, D.; CADDEN, S. W. What is a Wide-Dynamic-Range Cell? **The Senses: A Comprehensive Reference**, v. 5, p. 331–338, 2008.

LE BARS, D., et al. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v.53, p.597-652, 2001.

LEBOVITZ, R. M. et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1996.

LEE, G. I.; NEUMEISTER, M. W. Pain: Pathways and Physiology. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 47, n. 2, p. 173–180, 2020.

LEE, Y. J. Knockout Mouse Models for Peroxiredoxins. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 182, 2020.

LIMEI, Z., et al. Oxidative stress impairs IKCa- and SKCa-mediated vasodilatation in mesenteric arteries from diabetic rats. **J South Med Univ**, 33(7): 939-944. 2013.

MARTIN-SERRANO, J. et al. Oxygen toxicity and the health and survival of eukaryote cells: A new piece is added to the puzzle. **F. Archibald**, which appeared in issue 18, September 2, 2003, of. v. 100, n. 18, p. 10141–10143, 2003.

MATOBA, T.; SHIMOKAWA, H. Hydrogen Peroxide Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Animals and Humans. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 92, n. 1, p. 1–6, 2003.

MATSUMOTO, A. et al. Cloning of the peroxiredoxin gene family in rats and characterization of the fourth member. **FEBS Letters**, v. 443, n. 3, p. 246–250, 29 jan. 1999.

MELOV, S. et al. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. **Nature Genetics**, 1998.

MELZACK, R. e WALL, P. D. Pain Mechanisms: A New Theory. **Science**, v.150(3699), p.971–979, 1965.

MENSE, S. Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia. **The American Journal of Medicine**, v. 75, n. 5 PART 1, p. 4–14, 1983.

MILLAN, M. J. (2002). Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**. 66(6), 355–474. 2002.

MILLAN, M. J. The induction of pain: An integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1–164, 1999.

MISHINA, N. M. et al. Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2011.

MOAYEDI, M.; DAVIS, K. D. Theories of pain: From specificity to gate control. **Journal of Neurophysiology**, v. 109, n. 1, p. 5–12, 2013.

MÜLLER, J. **Handbuch der Physiologie des Menschen** (J. Holscher, Koblenz, 1840) (in German).

NIETHAMMER, P. et al. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. **Nature**, v. 459, n. 7249, p. 996–999, 2009.

ORESTES, P. et al. Free radical signalling underlies inhibition of CaV3.2 T-type calcium channels by nitrous oxide in the pain pathway. **Journal of Physiology**, v. 589,

n. 1, p. 135–148, 2011.

PACHECO, D. F.; DUARTE I. D. G. Delta-opioid receptor agonist SNC80 induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *European Journal of Pharmacology*, v.512(1), p.23-82, 2005. Pacher, P.; Bátkai, S.; Kunos, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. ***Pharmacological Reviews***, v.58(3), p.389–462, 2006.

PARK, S. W., et al. Hydrogen peroxide induces vasorelaxation by enhancing 4-aminopyridine-sensitive Kv currents through S-glutathionylation. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 467(2), 285–297. 2014.

PERL, E. R. Ideas about pain historical review-Neuroscience-07.pdf. v. 8, n. January, p. 71–80, 2007.

PERT, C. B. E SNYDER, S. H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. ***Science*** 179, 1011–1014 (1973).

PETERSON, P. K.; MOLITOR, T. W.; CHAO, C. C. The opioid-cytokine connection. ***Journal of Neuroimmunology***, v. 83, n. 1–2, p. 63–69, 1998.

PEUCHEN, S. et al. Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. ***Progress in Neurobiology***, v. 52, n. 4, p. 261–281, 1997.

PORASUPHATANA, S.; TSAI, P.; ROSEN, G. M. The generation of free radicals by nitric oxide synthase. ***Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology***, v. 134, n. 3, p. 281–289, 2003.

PRICE, D. D. e MAYER, D. J. Neurophysiological characterization of the anterolateral quadrant neurons subserving pain in *M. mulatta*. ***Pain*** 1, 59–72 (1975).

QUEIROZ, B.F. Estudo sobre os mecanismos antinociceptivos periféricos induzidos pela dopamina. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). 2020

RANDALL, L. O. e SELITTO J. J. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 111(4), p. 409 – 419. 1957.

REDDY, J. K.; RAO, M. S. Oxidative DNA damage caused by persistent peroxisome proliferation: its role in hepatocarcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 214, n. 1, p. 63–68, set. 1989.

REES, D. D. et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **British Journal of Pharmacology**, 101(3), 746–752. 1990.

REIS, G. M. L. et al. Endogenous cannabinoid receptor agonist anandamide induces peripheral antinociception by activation of ATP-sensitive K⁺ channels. **Life Sciences**, v. 88, n. 15–16, p. 653–657, 2011.

RHEE, S. G. et al. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. **IUBMB Life**, v. 52, n. 1–2, p. 35–41, 2001.

RODRIGUES, A. R. A. et al. Participation of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect of fentanyl in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 1, p. 91–97, 2005.

ROMERO, T. R. L. et al. Noradrenaline activates the NO/cGMP/ATP-sensitive K⁺ channels pathway to induce peripheral antinociception in rats. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 157–161, 2012.

ROGERS, P. A., et al. H₂O₂ activates redox- and 4-aminopyridine-sensitive K_v channels in coronary vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 292(3), H1404–H1411. 2007.

ROSENOW, J. M.; HENDERSON, J. M. Anatomy and physiology of chronic pain. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 14, n. 3, p. 445–462, 2003.

SAMANTA, S. et al. Hydrogen peroxide enhances signal-responsive arachidonic acid release from neurons: Role of mitogen-activated protein kinase. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, n. 5, p. 2082–2090, 1998.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 11s, p. 1062–1067, 2002.

SEPASI TEHRANI, H., E MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Catalase and its mysteries. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**. 2018.

SEUTIN, V. et al. Hydrogen peroxide hyperpolarizes rat CA1 pyramidal neurons by inducing an increase in potassium conductance. **Brain Research**, v. 683, n. 2, p. 275–278, 1995.

SHIMOKAWA, H. Primary Endothelial Dysfunction: Atherosclerosis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, n. 1, p. 23–37, jan. 1999.

SHIMOKAWA, H. Reactive oxygen species in cardiovascular health and disease: Special references to nitric oxide, hydrogen peroxide, and Rho-kinase. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 66, n. 2, p. 83–91, 2020.

SIES, H., et al. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, 86(1), 715–748. (2017).

SOARES, A. C.; DUARTE, I. D. Dibutyl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K⁺ channels in the rat PGE₂-induced hyperalgesic paw. **Br J Pharmacol**, v.134, p.127-131, 2001.

SOUSA, A. M.; PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Research**, v. 897, n. 1–2, p. 9–19, 2001.

STANOJEVIĆ et al., 2008 - Methionine-enkephalin modulation of hydrogen peroxide H₂O₂ release by rat peritoneal macrophages involves different types of opioid receptors. **Neuropeptides**. v. 46, p. 261-274. 2012.

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery**, v. 27, n. 12, p. 507–511, 2009.

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery (United Kingdom)**, v. 34, n. 2, p. 55–59, 2016.

SUGIYAMA, D., et al. Hydrogen Peroxide Induces Muscle Nociception via Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Receptors. **Anesthesiology**, 127(4), 695–708. 2017.

SUNDARESAN, M. et al. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. **Science**, v. 270, n. 5234, p. 296–299, 1995.

TAKAGI, Y. et al. Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 7, p. 4131–4136, 30 mar. 1999.

TAKAKI, A. et al. Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 9, p. 2053–2063, 2008.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075–1081, dez. 2003.

TEJERO, J. et al. Peroxidase activation of cytoglobin by anionic phospholipids: Mechanisms and consequences. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 5, p. 391–401, 2016.

TRAUB, R. J.; MENDELL, L. M. The spinal projection of individual identified A- δ - and C-fibers. **Journal of Neurophysiology**, v. 59, n. 1, p. 41–55, 1988.

TREVINO, D. L. et al. Location of cells of origin of the spinothalamic tract in the lumbar enlargement of cat. **Exp. Neurol.** 34, 64–77 (1972).

TREVINO, D. L. E CARSTENS, E. Confirmation of the location of spinothalamic neurons in the cat and monkey by the retrograde transport of horseradish peroxidase. **Brain Res.** 98, 177–182 (1975).

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **The Biochemical journal**, v. 191, n. 2, p. 421–427, 1980.

UNGVARI, Z. et al. Increased mitochondrial H₂O₂ production promotes endothelial NF- κ B activation in aged rat arteries. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, 2007.

VAN HECKE, O.; TORRANCE, N.; SMITH, B. H. Chronic pain epidemiology and its clinical relevance. **British Journal of Anaesthesia**, v. 111, n. 1, p. 13–18, 2013.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Progress in Neurobiology**, v.64, p.327-363, 2001.

VELOSO, C. et al. Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to NO/cGMP and ATP-sensitive K⁺ channels pathway activation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 755, p. 1–5, 2015.

VINEGAR, R., et al. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Federation Proceedings**, v.46, p.118–126, 1987.

VON FREY, M. Beiträge zur sinnesphysiologie der haut. Vierte mittheilung. Königl. Sächs. Ges. Wiss., **Math. Phys.** Classe 49, 462–468 (1897) (in German).

WANG, X. et al. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. **Biochemical Journal**, v. 333, n. 2, p. 291–300, 15 jul. 1998.

WHEAL, A. J.; ALEXANDER, S. P. H.; RANDALL, M. D. Hydrogen peroxide as a mediator of vasorelaxation evoked by N-oleoylethanolamine and anandamide in rat

small mesenteric arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, n. 2–3, p. 384–390, 2012.

WILLIAMS, M. D. et al. Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. **Journal of Biological Chemistry**, 1998.

WILLIS, W. D. e WESTLUND, K. N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J Clin Neurophysiol**. Jan;14(1):2-31. 1997

WINTERBOURN, C. C. **The biological chemistry of hydrogen peroxide**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc. v. 528. 2013.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **Journal of Clinical Investigation**, 120(11), 3742–3744. 2010.

WOOLF, C.J., SALTER, M. W. Neuronal Plasticity Increasing the Gain in Pain. **Science**, v. 288, n. June, p. 1765–1769, 2000.

YAM, M., et al. General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, 19(8), 2164. 2018.

YI, F. et al. Down-regulation of the small conductance calcium-activated potassium channels in diabetic mouse atria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 11, p. 7016–7026, 2015.

YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 107–117, 2006.

ZHANG, D. X. et al. H₂O₂-induced dilation in human coronary arterioles: Role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. **Circulation Research**, v. 110, n. 3, p. 471–480, 2012.

ZHAO, L. et al. Oxidative stress impairs IKCa- and SKCa-mediated vasodilatation in mesenteric arteries from diabetic rats. **Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University**, v. 33, n. 7, p. 939–944, 2013.

Anexo I

Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética para uso de animais



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 212/2020
Título do projeto: Estudo sobre os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo periférico induzido pelo peróxido de hidrogênio (H2O2).
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Igor Dimitri Gama Duarte
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Farmacologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado Com Recomendação na reunião on-line do dia 05/10/2020. Validade: 05/10/2020 à 04/10/2025 **RECOMENDAÇÃO:** A CEUA solicita aos pesquisadores que enviem um relatório anual dos animais usados no projeto.
Belo Horizonte, 06/10/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@pqg.ufmg.br