

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas

**PARTICIPAÇÃO DOS SISTEMAS OPIOIDÉRGICO E CANABI-
NOIDÉRGICO NA MODULAÇÃO ENDÓGENA PERIFÉRICA DA
DOR INFLAMATÓRIA MUSCULAR**

William Antonio Gonçalves

Belo horizonte

2015

William Antonio Gonçalves

Participação dos sistemas opioidérgico e canabinoidérgico na modulação endógena periférica da dor inflamatória muscular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia.

Linha de pesquisa: Analgesia e dor.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero

Coorientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte

Belo Horizonte

2015

043

Gonçalves, William Antonio

Participação dos sistemas opioidérgico e canabinoidérgico na modulação endógena periférica da dor inflamatória muscular [manuscrito] / William Antonio Gonçalves. – 2015.

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

Orientador: Thiago Roberto Lima Romero. Co-orientador: Igor Dimitri Gama Duarte.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Dor muscular - Inflamação - Teses. 2. Mialgia - Inflamação - Teses. 3. Sistema opióide - Teses. 4. Sistema canabinóide - Teses. 5. Hiperalgisia muscular. 6. Farmacologia - Teses. I. Romero, Thiago Roberto Lima. II. Duarte, Igor Dimitri Gama. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 615

"PARTICIPAÇÃO DOS SISTEMAS OPIOIDÉRGICO E CANABINOIDÉRGICO NA MODULAÇÃO ENDÓGENA PERIFÉRICA DA DOR INFLAMATÓRIA MUSCULAR"

WILLIAM ANTÔNIO GONÇALVES

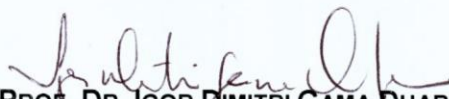
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 28 de agosto de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. ALBENÁ NUNES DA SILVA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO



PROF. DR. CANDIDO CELSO COIMBRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. IGOR DIMITRI GAMA DUARTE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CO-ORIENTADOR



PROF. DR. THIAGO ROBERTO LIMA ROMERO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

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

Belo Horizonte, 28 de agosto de 2015

*Dedico este trabalho à pátria amada, cuja grandeza orgulha e supera a desonra dos
filhos teus.*

*Aos meus queridos pais, Aloisio Antonio Gonçalves e Liale Rodrigues Gonçalves, pelo
investimento e fé.*

*À minha grande apoiadora e companheira Barbara Maximino, pela compreensão e
valiosa ajuda.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Orientador Thiago Roberto Lima Romero, por ter me aceitado e recebido com entusiasmo. Seu apoio e energia catalisaram meu interesse para o estudo da dor, a qual tenho imensa satisfação em investigar. Além disso, sua orientação sempre muito “humana” favorece a prática da reflexão e enriquece minha formação.

À minha esposa, que contribuiu imensamente com sua ajuda técnica durante os experimentos comportamentais. Agradeço ainda pelas discussões científicas, por aturar, às vezes, minhas manias profissionais em nosso tempo livre e pelos ensinamentos e reflexões que em muito contribuem para meu enriquecimento profissional.

Ao Professor Igor Dimitri Gama Duarte e Prof. Andrea de Castro Perez, por me receberem e ampararem as necessidades intelectuais e instrumentais do trabalho desenvolvido.

Aos meus bons colegas de laboratório, pela ajuda e apoio nos momentos necessários. Em especial, à Renata Cristina Mendes Ferreira e Daniel Portela Dias Machado, pelo convívio e disponibilidade técnica.

Ao nosso querido coordenador da Pós-graduação, Prof. Christopher Kushmerick, pelo imenso empenho e boa vontade evidentes em seus atos de “natureza” resolutiva. Sua dedicação enobrece e honra nosso programa de Pós-graduação.

Aos colegas da secretaria da Pós-graduação, sempre à postos para instruir, ajudar e fornecer o apoio necessário para resolução de minhas demandas enquanto aluno.

Aos excepcionais colegas trabalhadores do biotério, que desempenham uma importante função em nossas pesquisas. O considerável comprometimento de vocês garante a qualidade da produção de nosso departamento.

Ao Prof. Germán Arturo Bohórquez Mahecha, pela contribuição técnica e intelectual valorosa para conclusão dessa dissertação.

À Professora Fabiana Simão Machado, pela permissão da parceria com sua aluna Melissa Gualdrón, por me receber e deixar compartilhar a rotina de seu excelente laboratório e competentes alunos, com os quais aprendi e sou grato pela ajuda.

À querida Melissa Gualdrón, pela ajuda intelectual, técnica (western blot) e científica. Sua contribuição enriqueceu minha formação e se fez valiosa em momentos de grandes dificuldades.

Ao colega Flávio Henrique Pequeno de Macedo, pela paciência e parceria. Sua ajuda especializada e técnica (extração do gânglio da raiz dorsal) e científica (composição e desenho experimental) foram caras à finalização desta dissertação.

À Prof. Vanessa Pinho, por se apresentar sempre disponível para ajudar, em diversas situações, e permitir a contribuição técnica de suas excepcionais alunas Barbara Maximino e Rayssa Athayde.

Ao professor Gustavo Batista de Menezes, pelas aprendizagens e ensinamentos valiosos. Além disso, pela possibilidade de parceria com seu aluno André Gustavo de Oliveira, o qual tem minha gratidão pela contribuição.

Ao querido amigo Prof. Dr. César Fiuza, pelas correções do resumo em língua estrangeira.

À CAPES, por financiar algo que para mim tem sido mais que uma atividade laboral, uma atividade que considero essencial para meu desenvolvimento enquanto cidadão.

RESUMO

O processamento da dor se inicia a partir de um estímulo nocivo capaz de sensibilizar terminais periféricos de nociceptores. A informação da dor converge da periferia para o corno dorsal da medula espinhal através de fibras do tipo A δ , A β e C. Uma vez que a informação chega à medula, diversos componentes neuronais modulam sua transmissão no córtex, onde é então processada. Porém, ainda na periferia, alguns sistemas, como os sistemas opioidérgico e canabinoidérgico, são capazes de modular a ascensão do estímulo nociceptivo. A literatura mostra que durante a dor muscular inflamatória há liberação de uma série de mediadores associados ao aumento da atividade analgésica mediada por estes sistemas. Porém, pouco se sabe sobre as influências destes na dor muscular. Dessa forma, nosso objetivo foi verificar a participação do sistema opioidérgico e canabinoidérgico na modulação endógena periférica da dor muscular inflamatória. Para tanto, foram usados ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 220g. A injeção intramuscular (i.m.) de carragenina (Cg) foi utilizada para indução da dor muscular inflamatória e o teste de Randall e Sellito padronizado para o músculo tibial anterior (TA) foi aplicado para verificação do efeito hiperalgésico ou analgésicos das drogas utilizadas. Além disso, avaliamos o nível dos receptores opióides e canabinóides no gânglio da raiz dorsal (GRD) através da técnica de Western Blot. Nossos dados mostram que o pico do efeito hiperalgésico da Cg foi na terceira hora após sua injeção i.m. para todas as doses testadas. O menor efeito se deu após a injeção de Cg na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{músculo}$ e o maior efeito com a dose de 1.000 $\mu\text{g}/\text{músculo}$. Tanto naloxona (50 e 25 $\mu\text{g}/\text{músculo}$), um antagonista não seletivo para receptores opióides, quanto clocimanox (10 e 1 $\mu\text{g}/\text{músculo}$) e nor-binaltorfimina (100 e 50 $\mu\text{g}/\text{músculo}$), antagonistas seletivos para os receptores μ e κ opióides, intensificaram o efeito hiperalgésico da Cg (100 $\mu\text{g}/\text{músculo}$). Nosso ensaio biomolecular demonstrou que a quantidade desses receptores não foi alterada no GRD. Por outro lado, o antagonista dos receptores δ opióides, naltrindole, não intensificou a hiperalgesia provocada por Cg. Além disso, a bestatina (800, 400 e 200 $\mu\text{g}/\text{músculo}$), inibidor da enzima aminopeptidase N que degrada peptídeos opióides, reverteu o efeito hiperalgésico de Cg em sua maior dose (1.000 $\mu\text{g}/\text{músculo}$). Quando o receptor canabinóide do tipo 1 (CB₁) foi antagonizado, com o uso de AM251 (320 e 160 $\mu\text{g}/\text{músculo}$), o efeito hiperalgésico de Cg (100 $\mu\text{g}/\text{músculo}$) foi intensificado. Efeito este não observado com a utilização do antagonista dos receptores canabinóides do tipo 2, AM630 (400 $\mu\text{g}/\text{músculo}$). Os níveis de CB₁ no GRD não se altera-

ram. Já os inibidores das enzimas que degradam anandamida (AEA) e 2-Arachidonoylglycerol (2-AG), MAFP (16, 8 e 4 µg/ músculo) e JZL, (60 e 30 µg/ músculo) respectivamente, e o bloqueador da captação de AEA, VDM11 (80, 40 e 20 µg/ músculo), reverteram o efeito hiperalgésico de Cg na maior dose (1.000 µg/ músculo). Assim, nossos resultados indicam que a hiperalgésia muscular induzida por Cg sofre uma modulação já ao nível periférico. Esta modulação ocorreria de forma seletiva em relação aos receptores opióides e canabinóides sem alterar os níveis destes receptores no GRD. Sendo assim, é razoável considerar que essa modulação se dá, ao nível muscular, através de um aumento do aporte de peptídeos opióides endógenos e endocanabinóides, bem como através de um possível aumento da ativação de seus receptores durante o desenvolvimento hiperalgésico.

Palavras-chave: Dor muscular inflamatória, Sistema opióide, Sistema canabinóide, controle periférico da dor.

ABSTRACT

Pain processing starts from a noxious stimulus able to sensitize nociceptor peripheral terminals. Pain information converges from the periphery to the dorsal horn of the spinal cord through fibers type A δ , A β and C. Once the information reaches the bone marrow, a series of neuronal components modulates its transmission into the cortex, where it is then processed. Nevertheless, some systems, such as the opioid and the cannabinoidergic, are able to modulate the rise of the nociceptive stimulus still in the periphery. Literature shows that during inflammatory muscle pain, a number of mediators is released, which is associated with the increased analgesic activity mediated by these systems. Little is known, however, about the influence of the latter on muscle pain. Accordingly, our objective was to verify the participation of opioid and cannabinoidergic systems in peripheral endogenous modulation of inflammatory muscle pain. To achieve the aimed purpose, male Wistar rats weighing between 180 and 220g were employed. Intramuscular (i.m.) injection of carrageenan (Cg) was used to induce inflammatory muscle pain, whereas the Randall & Sellito test, standardized for the tibialis anterior muscle (m.TA), was applied to verify the analgesic or hyperalgesic effect of the used drugs. Furthermore, we evaluated the opioid and cannabinoid receptors in the dorsal root ganglion (DRG) by the Western blot technique. According to the research data, for all tested doses the peak of the hyperalgesic effect of Cg was the third hour after its i.m. injection. The lesser effect occurred after the injection of a 100 μ l/ muscle dose, and the greatest effect at the 1.000 μ g Cg dose. Naloxone (50 and 25 μ l/ muscle), a non-selective antagonist for opioid receptors, as well as clocimanox (10 and 1 μ l/ muscle) and nor-binaltorphimine (100 and 50 μ l/ muscle), selective antagonists for the μ and κ opioid receptors, intensified the hyperalgesic effect of Cg (100 μ l/ muscle). The biomolecular assay showed that the amount of these receptors has not been changed in DRG. On the other hand, the δ opioid receptor antagonist, naltrindole, was not able to intensify the hyperalgesia caused by Cg. Furthermore, bestatin (800, 400 and 200 μ l/ muscle), an aminopeptidase enzyme inhibitor, which degrades opioid peptides, reversed the hyperalgesic effect of Cg in its highest dose (1000 μ l/ muscle). When the cannabinoid type 1 receptor (CB₁) was antagonized with the use of AM251 (320 and 160 μ l/ muscle), the hyperalgesic effect of Cg (100 μ l/ muscle) was intensified. The same effect was not observed with the use of cannabinoid receptor antagonist of type 2, AM630 (400 μ l/ muscle). The quantified levels of CB₁ expressed in DRG are not altered,

whereas inhibitors of enzymes that degrade anandamide (AEA) and 2-Arachidonoylglycerol (2-AG), MAFF (16, 8 and 4 μl / muscle) and JZL (60 and 30 μl / muscle), respectively, as well as the uptake blocker VDM11 (80, 40 and 20 μl / muscle), reversed the hyperalgesic effect of Cg in the highest dose (1000 μl / muscle). Therefore, results indicate that the muscular hyperalgesia induced by Cg undergoes a certain modulation already at the peripheral level. This modulation would have occurred selectively as regards the opioid and cannabinoid receptors, without increasing the levels of the latter in the DRG. Thus, we believe that this modulation takes place at the muscle level by increasing the supply of endogenous opioids and cannabinoid peptides, as well as through a possible increase in the activation of these receptors during the hyperalgesic development.

Key-words: Inflammatory muscle pain; Opioid system; Cannabinoid system, Peripheral pain control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Compressão do músculo tibial anterior pelo algesímetro.....	32
FIGURA 2. Determinação da profundidade média do músculo tibial anterior.....	32
FIGURA 3. Agulha para injeção intramuscular	33
FIGURA 4. Acomodação e localização do Azul de Evans dentro do músculo tibial anterior.....	33
FIGURA 5. Corte histológico do músculo tibial anterior após injeção intramuscular. .	35
FIGURA 6. Representação esquemática do procedimento para constituição das amostras do gânglio da raiz dorsal.....	38
FIGURA 7. Cinética do infiltrado celular após injeção intramuscular de carragenina. .	42
FIGURA 8. Quantificação dos receptores μ e κ opióides no gânglio da raiz dorsal (GRD) após injeção intramuscular de carragenina.....	47
FIGURA 9. Expressão do receptor CB ₁ canabinóide gânglio da raiz dorsal (GRD) após injeção i.m. de carragenina (Cg).....	51
FIGURA 10. Modulação da nocicepção muscular inflamatória pelos sistemas opióide e canabinóide.....	63
GRÁFICO 1. Desenvolvimento temporal do efeito hiperalgésico de diferentes doses (100, 500 e 1000 μ g) de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior	41
GRÁFICO 2. Intensificação do efeito nociceptivo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de naloxona (Nx). .	43
GRÁFICO 3. Intensificação do efeito nociceptivo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de cloxinnamox (Cloc).....	44
GRÁFICO 4. Intensificação do efeito nociceptivo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de Norbinaltorfimina (NorBNI).....	45
GRÁFICO 5. Efeito nociceptivo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de naltrindole (NTD).....	46
GRÁFICO 6. Diminuição do efeito nociceptivo máximo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de bestatina (Best)	48

GRÁFICO 7. Intensificação do efeito nociceptivo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de AM251.	49
GRÁFICO 8. Efeito nociceptivo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de AM630.....	50
GRÁFICO 9. Diminuição do efeito nociceptivo máximo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de MAFP	52
GRÁFICO 10. Diminuição do efeito nociceptivo máximo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de VDM11.....	53
GRÁFICO 11. Diminuição do efeito nociceptivo máximo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de JZL	54

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2- AG - 2- aradonoilglicerol

AEA - anandamida

APN - aminopeptidase N

Best - Bestatina

CB₁ - receptor canabinóide do tipo 1

CB₂ - receptor canabinóide do tipo 2

CDME - corno dorsal da medula espinhal

CFA - Adjuvante completo de Freud

Cloc - Clocinnamox

COX-2 - ciclooxigenase

DAG - 1,2- diacilglicerol

DGL- α - diacilglicerol lipase

m.EDL- músculo extensor longo dos dedos

EPN - endopeptidase neutra

FAP's - fibras aferentes primárias

GPCR - receptores acoplados à proteína G

GRD - gânglio da raiz dorsal

IASP - International Association for the Study of Pain

i.m. - intramuscular

LOX - lipoxigenase

MGL - hidrolasemonoacilglicerol lipase

m.TA - músculo tibial anterior

NaCl 0,9% - salina 0.9%

NArPE - N- aradonoil- fosfatidiletanolamina

NGF - fator de crescimento neural

Nor-BNI - nor-binaltorfimina

NTD - naltrindole

Nx - naloxona

PEA- palmitoiletanolamida

PIP2- fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato

PLC - fosfolipase C

PLC- β - fosfolipase β

PLD - fosfolipase D

SNC - sistema nervoso central

TNF- α - fator de necrose tumoral- α

δ -OR - Receptor δ opióide

κ -OR - Receptor κ opióide

μ -OR - receptor μ opióide

SUMÁRIO

1	Introdução.....	15
1.1	Considerações sobre os termos da Dor e da Nocicepção na experimentação animal	15
1.2	Mecanismos de transmissão e controle da nocicepção e da dor	17
1.2.1	Via ascendente de transmissão da dor	17
1.2.2	Sistema opióide e a modulação endógena periférica da dor.....	17
1.2.3	Sistema canabinóides e modulação analgésica.....	20
1.3	Dor muscular inflamatória	22
2	Justificativa.....	25
3	Objetivos	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	Material e métodos	28
4.1	Animais	28
4.2	Fármacos e solventes	28
4.2.1	Agente hiperalgésico	28
4.2.2	Drogas relacionadas ao sistema opióide.....	29
4.2.3	Drogas relacionadas ao sistema canabinóide.....	30
4.3	Administração dos fármacos.....	31
4.3.1	Injeção intramuscular.	31
4.4	Caracterização morfológica do músculo tibial anterior após a padronização da injeção i.m. de Cg.....	34
4.4.1	Eficiência da injeção de carragenina no músculo tibial anterior.....	34
4.5	Teste algésimétrico	35
4.5.1	Método algésimétrico mecânico.....	35
4.5.2	Aparelho utilizado para mensurar hiperalgesia	36
4.5.3	Descrição do teste.....	36
4.5.4	Medida do limiar nociceptivo.....	37
4.5.5	Procedimento experimental	37
4.6	Western Blot	37
4.7	Análise estatística	39
5	Resultados	40

5.1	Cinética do efeito hiperalgésico induzido por injeção intramuscular de carragenina.....	40
5.2	Cinética do infiltrado celular após injeção intramuscular de carragenina	41
5.3	Participação dos receptores opióides na modulação antinociceptiva endógena muscular frente ao efeito hiperalgésico induzido por carragenina	42
5.4	Quantificação dos receptores μ e κ opióides no gânglio da raiz dorsal após injeção intramuscular de carragenina.	46
5.5	Participação de peptídeos opióides endógenos na modulação antinociceptiva endógena muscular frente ao efeito hiperalgésico induzido por carragenina.....	47
5.6	Participação dos receptores canabinóides na modulação antinociceptiva endógena muscular frente ao efeito hiperalgésico induzido por carragenina.....	48
5.7	Quantificação dos receptores CB ₁ canabinóide no gânglio da raiz dorsal após injeção intramuscular de carragenina	50
5.8	Participação de endocanabinóides na modulação antinociceptiva endógena muscular frente ao efeito hiperalgésico induzido por carragenina	51
6	Discussão.....	55
7	Conclusão	63
8	Referência.....	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre os termos da Dor e da Nocicepção na experimentação animal.

A definição de dor segundo a “International Association for the Study of Pain” (IASP) é compreendida como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial”. Tal definição, primeiramente, considera que a dor possa designar uma experiência sensorial, portanto dependente de mecanismos relacionados a aparatos sensoriais específicos, como estruturas anatômicas e maquinaria bioquímica próprios para identificação e processamento da informação dolorosa. Assim, a dor pode ser distinguida ou classificada em modalidades, dependendo da origem do estímulo que causa a sensação e dos mecanismos relacionados à sua percepção pelo organismo. Considerando tal perspectiva, a dor pode ser classificada como funcional (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009), neuropática, inflamatória e nociceptiva (SCHOLZ; WOOLF, 2002).

A dor funcional ocorre devido a uma disfunção do aparato somatosensorial e pode se manifestar mesmo quando não há um motivo aparente, sem atribuição de sua origem a um estímulo nocivo, inflamação ou dano no sistema nervoso. A síndrome do intestino irritável, cistite intersticial e a fibromialgia são algumas patologias que se enquadram nessa classificação (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

A dor neuropática se manifesta a partir de patologias oriundas de danos ou disfunções no sistema nervoso central (SNC) ou periférico. Como exemplo de condições que favorecem o aparecimento da dor neuropática, podem se destacar aquelas desencadeadas por lesões medulares, derrame talâmico e a síndrome do túnel do carpo (SCHOLZ; WOOLF, 2002).

A dor inflamatória ocorre em função da ação de mediadores que atuam diretamente na atividade de nociceptores, como a bradicinina (POOLE *et al.*, 1999; MEOTTI *et al.*, 2012), histamina e serotonina (SCHOLZ; WOOLF, 2002), ou que influenciam indi-

retamente a sensibilização do sistema nervoso somatosensorial (SCHOLZ; WOOLF, 2002), como as interleucinas (POOLE *et al.*, 1999), fator de crescimento neural (NFG) (MURASE, 2010) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (CUNHA *et al.*, 1992).

A dor nociceptiva por sua vez, é um produto da estimulação nociva de terminais periféricos de fibras nociceptivas, com consequente atuação de receptores e canais iônicos específicos e sensíveis ao calor, frio, perturbação mecânica ou prótons. Essas fibras transmitem a informação nociceptiva através de sinais elétricos ao longo da medula espinhal até o córtex, aonde a sensação dolorosa é processada e experimentada (SCHOLZ, J; WOOLF, 2002).

O termo dor ainda é constantemente usado para descrever uma percepção metafórica de sofrimento (SCHOLZ; WOOLF, 2002), dependente da condicionante emocional e, portanto, designando uma dimensão subjetiva para o termo.

Apesar das diferentes atribuições ao termo da dor, a possibilidade de prejuízo ao organismo é fisiologicamente prevenida através da identificação de estímulos nocivos que são interpretados como sensações dolorosas (CHAMPMAN *et al.*, 1999). Em geral, essa interpretação vem acompanhada de um comportamento defensivo ou reação afim de evitar o perigo eminente de dano ou possível dano à integridade do organismo (ALMEIDA *et al.*, 2004; MILLAN, 1999). A integralização de fatores sensoriais, afetivos cognitivos, junto ao objetivo da manutenção da integridade física separa a dor de outras experiências sensoriais (RAINVILLE, 2002), como a fome, sede ou desejo sexual (SCHOLZ; WOOLF, 2002).

Por outro lado, não parece muito adequado o uso do termo dor para descrever uma reação observada durante uma experimentação animal. Isso se deve ao fato de que, neste contexto, não seria possível medir a influência de aspectos subjetivos como a variável emocional. Nessa perspectiva, o emprego do termo nociceção certamente é mais fundamentado, uma vez que, segundo Holdcroft e Jaggar (2005), este se trata de um mecanismo neural pelo qual um organismo detecta a presença de um estímulo potencialmente prejudicial ao tecido, porém, sem qualquer tipo de implicação relacionada à consciência desse estímulo. Assim, ao manifestar um comportamento aversivo frente a um estímulo potencialmente nocivo, poderíamos entender que o animal em experimentação estaria apresentando uma resposta em função da intensidade desse estímulo.

1.2 Mecanismos de transmissão e controle da nocicepção e da dor

1.2.1 Via ascendente de transmissão da dor

A via ascendente de transmissão da dor é composta por vários elementos neurais que interagem e modulam as sensações dolorosas da periferia até regiões centrais formando um complexo circuito neuronal. Entre seus componentes incluem as fibras aferentes primárias (FAP's) do tipo C, que são de pequeno calibre e não mielinizadas, e as FAP's do tipo A δ , que possuem médio calibre e são mielinizadas (MILLAN, 2002). Ambas são responsáveis pela transmissão de informações geradas por estímulos nocivos, tais como os químicos, térmico ou mecânico (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Essas informações que podem apresentar caráter agressivo são transmitidas pelos FAP's até o corno dorsal da medula espinhal (CDME), especificamente até as lâminas I e II, mais superficiais, a lâmina V (SLUKA, 2009), mais profunda, bem como à lamina X circumcanular (MILLAN, 2002). Nesse nível do CDME, as terminações das FAP's formam sinapses com outras estruturas neurais, como terminais de fibras descendentes, interneurônios excitatórios e inibitórios, que regulam a dor a nível medular, e projeções neuronais que ascendem as informações até o córtex (MILLAN, 2002).

As projeções neurais, ou neurônios de segunda ordem, conduzem as informações nociceptivas através da medula espinhal, especificamente pelo trato espinotalâmico, até atingirem o tálamo. A partir daí a condução dos impulsos que serão codificados no córtex somatosensorial é realizada por neurônios de terceira ordem (VANDERAH, 2007). Dessa forma, ocorre a transmissão ascendente das informações nociceptivas que permite o processamento e interpretação no nível cortical (FURST, 1999).

1.2.2 Sistema opióide e a modulação endógena periférica da dor

O sistema opióide é constituído por três tipos de receptores da subfamília γ da classe A de receptores acoplados à proteína G (GPCR's), denominados como mu- opióide (μ -OR), kappa- opióide (κ -OR) e delta- opióide (δ -OR) (WATERFIELD; HUGHES; KOSTERLITZ, 1977). Essas proteínas de membrana operam no SNC

(MANSOUR *et al.*, 1995) controlando funções autonômicas, neuroendócrinas, emocionais, a resposta imune e atuam no controle da nocicepção (BODNAR, 2007). Além da ação no SNC, esses receptores integram um sistema de controle endógeno da dor no nível periférico e podem, assim, ser encontrados em distintos estratos do sistema nervoso (STEIN; SCHAFER; MASHELSKA, 2003).

Stein *et al.* (2003) mencionam que os receptores opióides podem ser localizados no mesencéfalo, córtex, interneurônios e projeções na medula espinhal, todas essas estruturas fundamentais no processo de condução de informações nociceptivas ao longo da via ascendente da dor (MILLAN, 2002). Pare *et al.* (2001), através de estudos de colocalização, mostraram a presença desses receptores em FAP's do tipo C e A δ . Corroborando esses autores, vários estudos mostram que os receptores opióides podem ser transportados através dos axônios (FIELDS, 1980; JEANJEAN *et al.* 1995; TRUONG, 2003), identificados em terminais sensoriais periféricos (STEIN *et al.*, 1990; STEIN, 1996; WENK, 1999; MOUSA *et al.*, 2001) e em processos periféricos de neurônios sensoriais (STEIN; SCHAFER; MASHELSKA, 2003).

Os principais ligantes endógenos dos receptores opióides fazem parte de uma família de peptídeos sintetizados a partir de três distintos precursores (AKIL *et al.*, 1994). A proopiomelanocortina, a pro-enkefalina e a prodinorfina são os respectivos substratos para formação da β -endorfina, enkefalina e dinorfina (AKIL *et al.*, 1994; HUA; CABOT, 2010; BUSCH-DIENSTFERTIG; STEIN, 2010). A produção destes peptídeos opióides endógenos ocorre em diferentes localidades, incluindo as glândulas adrenais e pituitárias, cujo os ligantes secretados não participam da modulação analgésica periférica (PARSONS *et al.*, 1990), em queratinócitos (KHODOROVA *et al.*, 2003) e em neurônios sensoriais (MOUSA *et al.*, 2002). Vários trabalhos também evidenciaram que células do sistema imunológico, como neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos, transportam (RITNER *et al.*, 2001; BRACK *et al.*, 2004 (a) (b); MASHELSKA, 2004; LABUZ *et al.*, 2010) e secretam ligantes opióides em sítios inflamados, influenciando a transmissão da informação nociceptiva (STEIN; SCHAFER; MASHELSKA, 2003).

Os ligantes opióides sofrem inativação enzimática mediada por peptidases. As mais bem caracterizadas enzimas são a aminopeptidase N (APN) e a endopeptidase neutra (NEP), ambas participando de processos relacionados ao controle de fenômenos analgésicos (ROQUES *et al.*, 1980; NOBLE; ROQUES, 2007; ROQUES; FOURNIÉ-

ZALUSKI; WURM, 2012). Tais peptidases foram identificadas no SNC (WAKSMAN *et al.*, 1986), nervos periféricos (BARNES, 1991; CADONI A. *et al.*, 1993) e em células do sistema imune (LENDECKEL *et al.*, 2000). Schreiter *et al.* (2012) mostraram que NEP e APN estão presentes em granulócitos, em menor quantidade, e em macrófagos, em maior quantidade. Esses autores mostraram ainda que a bestatina (Best) e o thiorphan bloquearam, respectivamente, a atividade da APN e NEP nos leucócitos e em nervos periféricos, ambos coletados e extraídos de tecidos inflamados. A inativação dessas peptidases, tanto pelo uso conjunto de Best e thiorphan, quanto pela inibição de forma não seletiva com o uso de P8B, incitou a diminuição do limiar nociceptivo mensurado na pata inflamada de ratos (SCHREITER *et al.*, 2012).

Uma vez que qualquer um dos três tipos de receptores é ativado por seu ligante, iniciasse um processo molecular com subsequente ativação da proteína- G (G_i / G_o ou ambas), culminando em mecanismos efetores que influenciam a modulação de canais de potássio e cálcio (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011). Tais processos estão relacionados à diminuição da excitabilidade neuronal através da retificação de canais de potássio (TORRECILLA *et al.*, 2002) e da diminuição da condutância dos canais de cálcio (BOURINET *et al.*, 1996; RUSSIN *et al.*, 1997; ZAMPONI; SNUTCH, 1998). Esses mecanismos ligados à inibição da transmissão neural ocorrem em diferentes extratos da medula espinhal e em outras várias estruturas do SNC (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011). Além disso, em neurônios sensoriais periféricos a modulação dos canais de cálcio diminui a sua excitabilidade explicando os efeitos inibitórios de opióides exógenos (STEIN; MACHELSKA; SCHÄFER, 2001; STEIN; SCHÄFER; MASHELSKA, 2003).

Periféricamente a regulação analgésica dependente da modulação da excitabilidade neural é um fenômeno observado quando o tecido se encontra em condições inflamatórias (STEIN; SCHÄFER; MASHELSKA, 2003). Nessa situação, as células do sistema imune rapidamente migram para o tecido inflamado (MACHELSKA, 2004; RITTNER; STEIN, 2005) transportando peptídeos opióides endógenos, em fases iniciais por granulócitos, principalmente neutrófilos, e fases mais avançadas da inflamação por monócitos/macrófagos e linfócitos (RITTNER *et al.*, 2001; BRACK *et al.*, 2004 (a) (b); MACHELSKA, 2004), onde são liberados e influenciam na transmissão da informação nociceptiva (STEIN; SCHÄFER; MASHELSKA, 2003). Além dessa liberação de peptídeos opióides endógenos em tecidos acometidos pela inflamação, Ji *et al.* (1995) mos-

traram que a síntese e expressão dos receptores opióides no GRD é aumentada durante a inflamação do tecido periférico inervado pelas projeções dessa estrutura. Em seguida, o transporte axonal dos receptores é aumentado (HASSAN *et al.*, 1993; JEANJEAN *et al.*, 1995; MOUSA *et al.*, 2001) levando a uma elevação da eficácia do agonista nas terminações periféricas (ZHOU *et al.*, 1998). Vários estudos ainda sugerem que ocorre um aumento do grau de acoplamento entre os receptores opióides e a proteína G, e uma elevação dos níveis de adenosinomonofosfato cíclico (INGRAM; WILLIAMS, 1994; GOLD; LEVINE, 1996; ZOLLNER *et al.*, 2003), influenciando a resposta analgésica modulada periféricamente (STEIN; SCHÄFER; MASHELSKA, 2003).

1.2.3 Sistema canabinóides e modulação analgésica

Outro sistema envolvido na modulação central e periférica da dor, além do opióide, é o canabinoidérgico (PIOMELLI; SASSO, 2014). Este sistema inclui a participação de dois principais alvos, que são os receptores canabinóide do tipo 1 (CB₁) e do tipo 2 (CB₂), que possuem sítio de ligação para mediadores lipídicos membros de uma família de ligantes derivada do ácido araquidônico, (PIOMELLI; SASSO, 2014). Essas duas proteínas receptoras tem uma semelhança estrutural de 40% e diferem pouco em relação à sua distribuição morfológica (YAO; MACKIE, 2009).

Os receptores CB₁ são responsáveis por regular a liberação de neurotransmissores no cérebro e medula espinhal (CASTILLO *et al.*, 2012). Eles são altamente expressos no SNC e podem ser encontrados em neurônios sensoriais nociceptivos (HOHMANN; HERKENHAM, 1999; VERESS *et al.*, 2013), interneurônios sensoriais inibitórios e projeções neuronais excitatórias (CASTILLO *et al.*, 2012), além de serem presentes em células do sistema imune (mastócitos e macrófagos) e queratinócitos epidermais (STÄNDER *et al.*, 2005; SUGAWARA *et al.*, 2013)

Os receptores CB₂ são receptores comuns em células de origem hematopoiéticas, incluindo aquelas que interagem com fibras aferentes primárias após um dano tecidual, como mastócitos e macrófagos (STÄNDER *et al.*, 2005; BUCKLEY, 2013), no cérebro, medula espinhal e no GRD de ratos e camundongos (PIOMELLI; SASSO, 2014). Em situações onde há dano de tecido nervoso, o número desse receptor se eleva consideravelmente (JHAVERI, 2006; GUINDON; HOHMANN, 2008).

As moléculas ligantes responsáveis pela ativação dos receptores canabinóides são chamadas endocanabinóides, com destaque para a anandamida (AEA) e o 2-aracdonoilglicerol (2-AG). Tais membros da família de mediadores lipídicos canabinóide são oriundos de vias sintéticas distintas e dependentes da hidrólise mediada por enzimas cujo os precursores são fosfolipídios de membrana (PIOMELLI; SASSO, 2014; PIOMELLI; ASTARITA; RAPAKA, 2007).

A AEA, que pode atuar como mensageiro autócrino ou parácrino (PIOMELLI, 2013), é sintetizada a partir da hidrólise da N- araconoil- fosfatidiletanolamina (NARPE) (PIOMELLI; SASSO, 2014). Essa reação é catalisada em neurônios pela fosfolipase D (PLD) (UEDA; TSUBOI; UYAMA, 2013) e em macrófagos pela fosfolipase C (PLC). Neste último caso, ficando pendente a atuação de fosfatases para que ocorra a conversão do produto formado pela PLC em AEA (LIU *et al.*, 2006). A degradação deste lipídio sinalizador se inicia através de sua captação para o interior da célula, por atuação de transporte mediado por carreador (PIOMELLI, 2013). Uma vez exposta à maquinaria intracelular, esse mediador lipídico é convertido em ácido araquidônico por atuação da enzima FAAH (PIOMELLI; ASTARITA, RAPAKA, 2007; UEDA; TSUBOI; UYAMA, 2013), ou ainda pode ser transformado em mediadores proalgésicos pela ação enzimática de cicloxigenase-2 (COX-2) (HERMANSON *et al.*, 2013).

O 2-AG é um derivado da hidrólise de um fosfolipídio contendo inositol, o fosfatidilinositol- 4, 5-bifosfato (PIP2) (PIOMELLI; ASTARITA; RAPAKA, 2007). O primeiro passo da reação que leva à síntese desse mediador lipídico é realizado pela isoforma β da fosfolipase C (PLC- β). Uma vez ativada pela proteína G_q , a PLC- β converte PIP2 em 1,2- diacilglicerol (DAG), que além de regular efetores celulares, como a proteína quinase C, é o substrato imediato para a síntese de 2-AG. A conversão de DAG para 2-AG é realizada pela proteína diacilglicerol lipase- α (DGL- α) (PIOMELLI; SASSO, 2014; PIOMELLI; ASTARITA; RAPAKA, 2007). O término da sinalização mediada por 2-AG ocorre pela atuação da hidrolase monoacilglicerol lipase (MGL), convertendo 2-AG em ácido araquidônico (PIOMELLI; SASSO, 2014). Assim como a AEA, o 2-AG pode sofrer com a ação de COX-2 sendo convertida em derivados proalgésicos, como a prostaglandina-2.

Os mediadores lipídicos ativam seletivamente os receptores canabinóides. Uma vez liberada no tecido lesado, a AEA interage com os receptores CB_1 e influencia os sinais nociceptivos através da modulação de canais de cálcio e potássio (PIOMELLI; 2003; PIOMELLI; SASSO, 2014) dependente da ativação da proteína- G_i/o (PIOMELLI,

2003). Por outro lado, alguns artigos sugerem que os efeitos relacionados à sinalização nociceptiva de 2-AG (GUINDON *et al.*, 2011; KHASABOVA *et al.*, 2011) derivam de sua interação com o receptor CB₂.

A natureza da ação do sistema canabinóide no nível periférico pode ser corroborada por várias evidências expostas na literatura corrente (AGARWAL *et al.*, 2007; VERESS, 2013; CALIGNANO *et al.*, 1998; GUINDON; HOHMANN, 2009). Amaya *et al.* (2006), através de um modelo de inflamação periférica induzida por Adjuvante completo de Freud (CFA) na pata de ratos, mostraram um aumento na densidade dos receptores CB₁ nos corpos celulares de neurônios nociceptivos que inervavam a pata acometida. Ferreira (2014), lançando mão de estratégia farmacológica, especificamente através da injeção de antagonistas seletivos para CB₁ (AM251) e CB₂ (AM630), mostrou o envolvimento de CB₁, mas não CB₂, no controle endógeno periférico da nocicepção em modelo de dor inflamatória induzida por Cg na pata de ratos. Estudos mostram ainda que agonistas canabinóides suprimem o comportamento nociceptivo através de mecanismos mediados por CB₁ em vários modelos (CALIGNANO *et al.*, 1998; RICHARDSON; KILO; HARGREAVES, 1998). A literatura também aponta o envolvimento de CB₂ na modulação da nocicepção em modelos de dor aguda, inflamatória e neuropática (GUINDON; HOHMANN, 2008; JHAVERI *et al.*, 2007, MALAN *et al.*, 2001), cujo os mecanismos podem ser explicados pela ação periférica desse receptor (HOHMANN *et al.*, 2004; ELMES *et al.*, 2004).

1.3 Dor muscular inflamatória

A inflamação é caracterizada por sinais e sintomas como calor, rubor, tumor, perda da função do tecido lesado e a dor (LEVINE; TAIWO, 1994). O aparecimento do sintoma da dor, neste contexto denominada como inflamatória, é fundamental para alertar ao organismo sobre a presença de um dano e prevenir traumas futuros ao tecido lesado (RIEDEL; NEECK, 2001). Durante o processo inflamatório ocorre a liberação de mediadores inflamatórios como a bradicinina, histamina, serotonina, prostanoídes, leucotrienos e citocinas (OHARA *et al.*, 1988) que atuam em sistemas de segundos mensageiros ou canais iônicos (DRAY, 1995) aumentando a sensibilidade das terminações nervosas

periféricas e interferindo na transmissão da informação nociceptiva durante o processo inflamatório.

No músculo, após um estímulo lesivo ocorre uma rápida invasão e consequente aumento na quantidade de neutrófilos (TIDBALL, 2005; BELCASTRO *et al.*, 1996), fenômeno esse que pode ser observado em modelo experimental capaz de induzir inflamação através da exposição de camundongos ao exercício físico (SILVA *et al.* 2014). Silva *et al.* (2014) mostraram que o rolamento, adesão e migração de células do sistema imune foram aumentados no músculo do quadríceps de camundongos expostos a um protocolo de corrida em esteira. Não obstante, alguns trabalhos demonstram a presença de marcadores inflamatórios que atuam no tecido muscular após estímulos provenientes de demandas motoras (PEAK, 2005; PEAKE; NOSAKA; SUZUKI, 2006) ou através da injeção de agentes flogógenos, como a Cg (DINA; LEVINE; GREEN, 2008, LOHAN *et al.*, 2007).

Arelado ao contexto inflamatório, diversos trabalhos apontam um aumento da resposta nociceptiva aferida por testes algosimétricos em modelos animais de miosite induzida por Cg (ALVAREZ *et al.*, 2012; DINA *et al.*, 2008a; DINA *et al.*, 2008b; YOKOYAMA, *et al.*, 2007; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2003; SKYBA *et al.*, 2005; DIEHL *et al.*, 1988; RESENDE *et al.*, 2011; LORAM *et al.*, 2007). Loram *et al.* (2007), mostraram que a injeção de Cg intramuscular (i.m.) aumentou as concentrações de interleucina-1 β e 6 (IL-1 β e IL-6), conhecidas proteínas relacionadas à hiperalgesia mecânica (FERREIRA *et al.*, 1988; DINA; GREEN; LEVINE, 2008). Estas interleucinas por participarem do processo de síntese de prostaglandinas (Poole *et al.* 1999), exercem grande influência sobre o desenvolvimento hiperalgésico. Este efeito pôde ser observado inclusive no tecido muscular após injeção i.m. de prostaglandina-E₂ (DINA; GREEN; LEVINE, 2008).

Borghi *et al.* (2015), lançando mão de um modelo de dor muscular de início tardio (DMIT), mostram que IL-10 apresenta um papel regulador da hiperalgesia mecânica muscular. Esses autores sugerem que o efeito anti-hiperalgésico dessa citocina se deve à sua influência sobre o controle na produção de IL-1 e TNF- α , mediadores estes que exercem efeito hiperalgésico muscular (BORGHI *et al.*, 2014 (a) (b)).

Outro importante mediador inflamatório envolvido na resposta hiperalgésica muscular é o fator de crescimento neuronal (NGF), cujo o mRNA e sua expressão são au-

mentados no músculo extensor longo dos dedos (ELD) de ratos submetidos a um modelo de DMIT. Junto a esse aumento, destaca-se uma elevação nos níveis do mRNA para TNF- α , IL-1 β e IL-6 (MURASE *et al.*,2010).

2 JUSTIFICATIVA

Pelo menos 30% dos indivíduos serão afetados pela dor em algum momento de suas vidas. A dor ainda representa uma razão considerável para a busca de atendimento em serviços de emergências. Como reflexo desse fenômeno há que se destacar o impacto socioeconômico oriundo de absenteísmo, licenças de saúde, litígios trabalhistas e aposentadorias precoces (RAMALHO, 2009) que custa R\$ 150 bilhões do dinheiro público (CORRÊA, 2009) arrecadado dos cidadãos brasileiros.

Um outro problema atrelado à dor é que frequentemente ela é refrataria às terapias convencionais usadas para seu tratamento. Além disso, tais tratamentos podem gerar efeitos colaterais. A administração de agonistas α_2 adrenérgico dexmedetomidina, por exemplo, está associada a efeitos indesejados como a hipotensão, boca seca, diminuição da memória, do desempenho locomotor e sedação (HALL *et al.*, 2000). Os fármacos anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais podem induzir úlceras gastrointestinais, hemorragias além de complicações cardiovasculares (TRELLE *et al.*, 2011). Fármacos opióides podem causar constipação intestinal, depressão respiratória, tolerância e dependência (WOODCOCK, 2009; HEINL *et al.*, 2011). E finalmente, Os fármaco canabinóides podem induzir alteração e diminuição da locomoção, sedação (ASHTON, 2001), perda de memória temporária e dependência (FREUND *et al.*, 2003; PACHER *et al.*, 2006).

Com isso, entender os mecanismos fisiopatológicos e farmacológicos envolvidos na dor, desponta como uma possibilidade importante para diminuição do sofrimento experimentado pelos indivíduos por ela acometidos. A ampliação do conhecimento, com conseqüente desenvolvimento de novas terapias para o seu tratamento, poderia minimizar seus prejuízos econômico e sociais. Nesse sentido, a ativação de sistemas analgésicos endógenos na periferia se destaca como um recurso possível para intervenção terapêutica. Como exemplo, o aumento na atividade dos sistemas opióide e canabinoide na periferia poderia ser uma alternativa para viabilização dos efeitos analgésicos desses dois sistemas, sem a manifestação de seus efeitos colaterais derivados de suas ações sistêmicas. Os benefícios dessa orientação terapêutica se estenderiam não somen-

te ao tratamento de dores com origem inflamatória, mas também para vários outros tipos de dores refratárias aos tratamentos convencionais.

Apesar de algumas evidências, ainda foi pouco explorado sobre a participação do sistema opióide operando de forma endógena e periférica na dor muscular inflamatória, sendo esta uma possibilidade a ser considerada. Além deste sistema, alguns trabalhos descrevem o papel de componentes endocanabinóides na dor muscular (SÁNCHEZ ROBLES; BAQÜES; MARTÍN FONTELLES, 2012), inclusive em condições inflamatórias (VINCENZI, 2013), porém, o volume de informações na literatura que exploram esses dois sistemas e sua provável interação na modulação periférica da dor muscular inflamatória são escassos. Dessa forma, o estudo detalhado desses sistemas endógenos poderia ampliar as possibilidades terapêuticas para o tratamento da dor muscular inflamatória.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o possível envolvimento dos sistemas endógenos opioidérgico e canabinoidérgico na modulação periférica da hiperalgisia muscular, em modelo de hipernocicepção muscular inflamatória induzida por Cg em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- a. Verificar o desenvolvimento temporal do efeito hiperalgésico induzido pela injeção i.m. de Cg no TA.
- b. Avaliar o possível envolvimento dos receptores opióides na nocicepção muscular
- c. Verificar a expressão dos receptores opióides induzida pela i.m. de Cg no GRD.
- d. Avaliar o possível envolvimento dos peptídeos opióides através da inibição da APN.
- e. Avaliar o possível envolvimento dos receptores canabinóide CB₁ e CB₂ na nocicepção muscular.
- f. Verificar a expressão dos receptores canabinóides induzida pela i.m. de Cg no GRD.
- g. Avaliar o possível envolvimento dos endocanabinóides na nocicepção muscular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados nos experimentos ratos da linhagem Wistar, machos, pesando entre 180 e 220 g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Cebio-ICB/UFMG). Esses animais foram colocados e mantidos em caixas plásticas com superfície forrada com maravalha, sem restrição ao acesso à água e à ração. Cinco dias antes da realização dos experimentos os animais eram levados a uma sala climatizada (23 a 25°C) e com alternância de ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas para subsequente ambientalização. A ambientalização consistiu na exposição dos animais ao aparelho algesimétrico três dias consecutivos antecedentes ao dia do teste (fig. 1). Todos os experimentos foram realizados entre 9 e 16 horas, na fase clara do ciclo. Todos os procedimentos experimentais realizados na execução deste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG) através do protocolo: 126/2014.

4.2 Fármacos e solventes

4.2.1 Agente hiperalgésico

Carragenina lambida (Sigma, EUA). Suspensão preparada em salina fisiológica (NaCl 0,9%).

4.2.2 Drogas relacionadas ao sistema opióide

a. Antagonista não seletivo para receptores opióides

Naloxona (Nx) (Tocris, EUA). Mantida, no freezer, em solução-estoque, dissolvida em NaCl 0,9%, na concentração de 20 µg/µl. Imediatamente antes das injeções, a solução era diluída em NaCl 0,9%. Concentração final: 2,7 mM (para a dose de 50 µg/músculo); 1,4 mM (para a dose de 25 µg/ músculo), 659 µM (para a dose de 12,5 µg/ músculo).

b. Antagonista de µ-OR

Clocinnamox (Cloc) (Tocris, EUA). Mantida, no freezer, em solução-estoque, dissolvida em NaCl 0,9%, na concentração de 20 µg/µl. Imediatamente antes das injeções, a solução era diluída em NaCl 0,9%. Concentração final: 333 µM (para a dose de 10 µg/ músculo); 33 µM (para a dose de 1 µg/ músculo); 3 µM (para a dose de 0,1 µg/ músculo).

c. Antagonista do κ-OR

nor-Binaltorfimina (Nor BNI) (Tocris). Mantida, no freezer, em solução-estoque, dissolvida em NaCl 0,9%, na concentração de 5 µg/µl. Imediatamente antes das injeções, a solução era diluída em NaCl 0,9%. Concentração final: 680 µM (para a dose de 25 µg/ músculo); 1,4 mM (para a dose de 50 µg/ músculo); 2,7 mM (para a dose de 100 µg/ músculo).

d. Antagonista do δ-OR

Naltrindole (NTD) (Tocris). Mantida, no freezer, em solução-estoque, dissolvida em NaCl 0,9%, na concentração de 5 µg/µl. Imediatamente antes das injeções, a solução era diluída em NaCl 0,9%. Concentração final: 2,7 mM (para a dose de 60 µg/ músculo)

e. Inibidor da enzima aminopeptidase N (APN) que degrada peptídeos opióides endógenos.

Bestatina (Best) (Tocris). Dissolvida em solução NaCl 0,9% minutos antes do experimento. Concentração final: 12,9 mM (para a dose de 200 µg/ músculo); 25,9 mM (para a dose de 400 µg/ músculo); 51,9 mM (para a dose de 800 µg/ músculo).

4.2.3 Drogas relacionadas ao sistema canabinoide

a. Antagonista CB₁ canabinoide

AM251 (1-(2,4-diclorofenil) -5-(iodofenil)-4-metil-N-(1-piperidil) -pirazole-3-carboxamida) (Tocris, USA). Mantida no freezer em solução-estoque, dissolvida em DMSO na concentração de 40 µg/µl. Imediatamente antes das injeções a solução era diluída em salina, gerando solução para injeção em DMSO 10%. Concentração final: 2,9 mM (para a dose de 80 µg/ músculo); 5,8 mM (para a dose de 160µg/ músculo); 11,5 mM (para a dose de 320 µg/ músculo).

b. Antagonista CB₂ canabinoide

AM630 ([6-iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil) -etil]-1-H-indol-3-il](4etoxifeni) metadona (Tocris, USA). Mantida no freezer em solução-estoque, dissolvida em DMSO na concentração de 50 µg/µl. Imediatamente antes das injeções a solução era diluída em NaCl 0,9%, gerando solução para injeção em DMSO 10%. Concentração final: 15,8 mM (para a dose de 400 µg/ músculo).

c. Inibidor da degradação de AEA

MAFP (metil araquidonilfluorofosfonato) (ácido (5Z,8Z,11Z,14Z) -eicosatetraenil- fosfonofluorídrico metil éster) (Tocris, USA). Mantida no freezer em solução-estoque, dissolvida em Tocrisolve na concentração de 5 µg/µl. Imediatamente antes das injeções a solução era diluída em NaCl 0,9%, gerando solução para injeção em Tocrisolve 5%. Concentração final: 216 µM (para a dose de 4 µg/ músculo); 431 µM (para a dose de 8 µg/ músculo); 863 µM (para a dose de 16 µg/ músculo).

d. Inibidor da degradação de 2-araquidonilglicerol (2-AG)

JZL 184 (ácido 4-[Bis(1,3-benzodioxo-5-il) hidroximetil]-1-piperidinocarboxílico 4-nitrofenil éster) (Tocris, EUA). Mantida no freezer em solução-estoque, dissolvida em DMSO na concentração de 25 µg/µl. Imediatamente antes das injeções a solução era diluída em NaCl 0,9%, gerando solução para injeção em DMSO 10%. Concentração final: 577 µM (para a dose de 15 µg/ músculo); 1,6 mM (para a dose de 30 µg/ músculo); 2,3 mM (para a dose de 60 µg/ músculo).

e. Bloqueador da captação de AEA

VDM11 [(5Z,8Z,11Z,14Z) -N-(4-Hidroxi-2-metilfenil) -5,8,11,14-eicosatetraenamida] (Tocris, UFMG). Mantida no freezer em solução-estoque, dissolvi-

da em Tocrisolve na concentração de 10 µg/µl. Imediatamente antes das injeções a solução era diluída em NaCl 0,9%, gerando solução para injeção em Tocrisolve 10%. Concentração final: 976 µM (para a dose de 20 µg/ músculo); 2 mM (para a dose de 40 µg/ músculo); 3,9 mM (para a dose de 80 µg/ músculo).

4.3 Administração dos fármacos

4.3.1 Injeção intramuscular.

O local determinado para as injeções correspondeu ao ponto de aplicação da parte compressora do algesímetro no músculo tibial anterior (m.TA) (fig.1). A profundidade média (P.m.) do m.TA foi determinada utilizando o m.TA dos membros inferiores de dez ratos eutanasiados. O m.TA de cada um deles foi seccionado transversalmente no local determinado para a injeção. A P.m. foi calculada como a média aritmética da distância (d) perpendicular entre uma reta tangente à superfície do músculo e paralela à face da tíbia (F.T.) (A), e outra reta paralela e na altura da base desta mesma face (B) (fig. 2). Com isso, estabeleceu-se que a profundidade em que a agulha penetraria o TA seria de 50% da P.m. (fig. 3), garantindo a entrada e acomodação do líquido dentro do músculo como mostra a figura 4. Durante os experimentos, realizados posteriormente à padronização da injeção intramuscular (i.m.) no ventre do m.TA, as drogas foram administradas por via i.m. O volume de 100 µl para as soluções contendo Cg e de 50 µl para as soluções contendo as demais drogas foram injetados próximo ao ponto de contato da parte compressora do algesímetro com o m.TA da pata posterior direita dos ratos, ou esquerda, para exclusão do efeito sistêmico das drogas utilizadas.



FIGURA 1. Compressão do músculo tibial anterior pelo algosímetro.

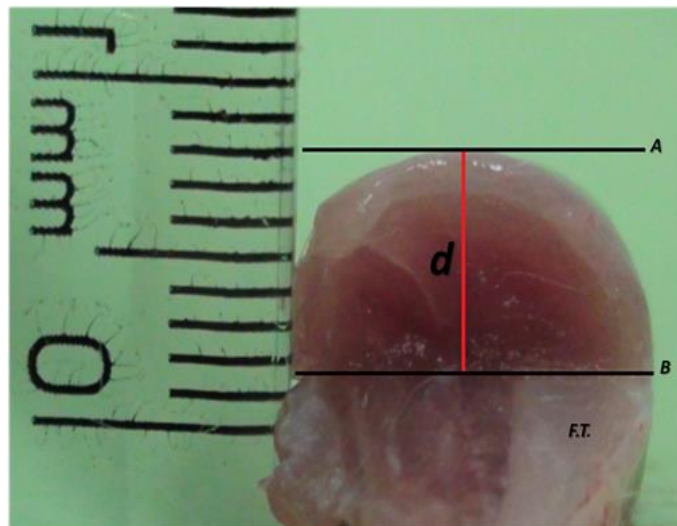


FIGURA 2. Determinação da profundidade média do músculo tibial anterior. Reta tangente à superfície do músculo e paralela à face da tíbia = A. Reta paralela à face da tíbia = B. Profundidade do músculo tibial anterior = d. Face da tíbia = F.T.

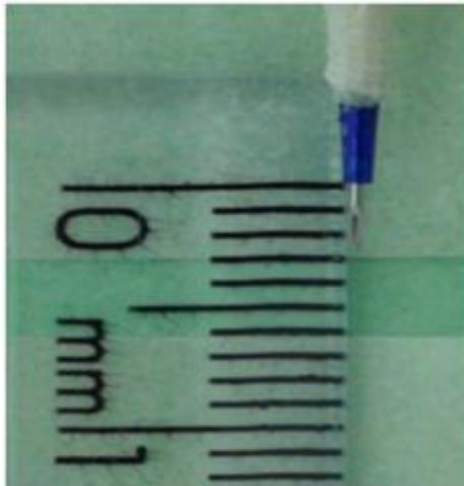


FIGURA 3. Agulha para injeção intramuscular. A capacidade de penetração da agulha foi limitada em 50% da profundidade média (P.m.) do músculo tibial anterior (50% P.m.= 3mm).

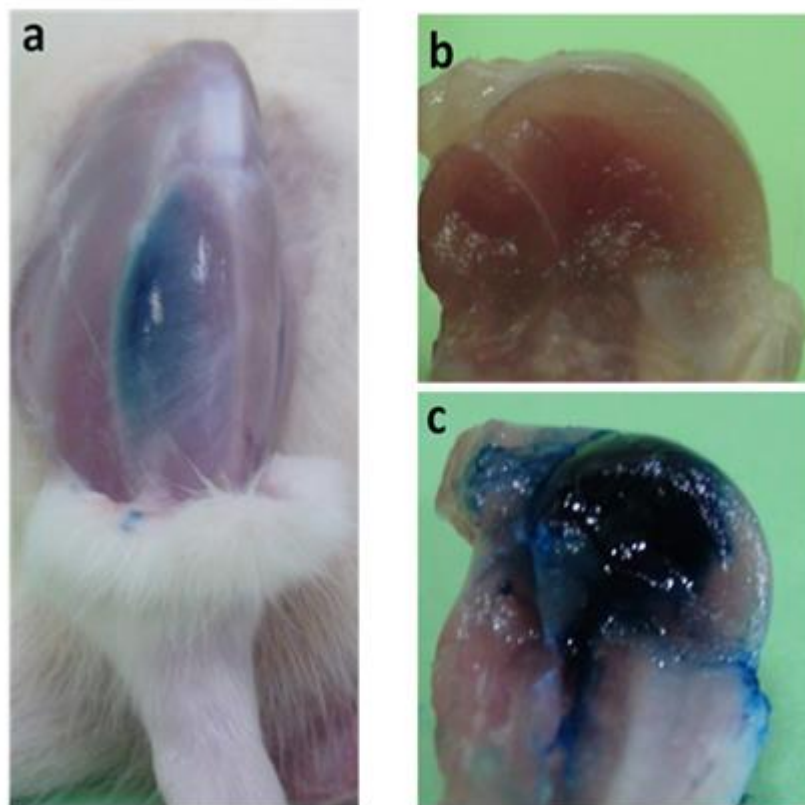


FIGURA 4. Acomodação e localização do Azul de Evans dentro do músculo tibial anterior. (a) Exposição do músculo tibial anterior após injeção de Azul de Evans, (b) músculo tibial anterior seccionado sem injeção. (c) músculo tibial anterior seccionado após injeção com Azul de Evans.

4.4 Caracterização morfológica do músculo tibial anterior após a padronização da injeção i.m. de Cg

Os ratos de cada grupo foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de pentobarbital sódico (80mg/ kg) e cetamina (10mg/ Kg) e então submetidos à perfusão intracardíaca com 300 ml de solução de Ringer (9,0 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,4g de cloreto de potássio (KCl), 0,167 g de cloreto de cálcio (CaCl₂.H₂O) e 0,2 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃)) e 500 ml de formol tamponado (NBF) (2,0g de Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄H₂O), 3.25 g de Fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄) e 50 ml de Formaldeído 37% completos para 500 ml de água destilada) Depois, o ventre muscular do m.TA foi extraído e armazenado em NBF. Durante seu processamento os tecidos musculares sofreram desidratação, realizada através de passagens subsequentes em etanol em diferentes concentrações (70%, 80%, 90%, absoluto I, II e III durante 1 hora cada), diafanização com xilol (I, II e III durante 1 hora cada) e embebidos em parafina líquida (Paraplast Sigma) (I, II e III durante 1 hora). As amostras de tecido muscular foram incluídas em uma forma contendo parafina líquida onde permaneceram por 24 horas. Os blocos foram confeccionados, levados ao micrótomo e cortados em uma espessura de 5 µm. As lâminas contendo os cortes foram então desparafinizadas com xilol (I, II e II) e álcool absoluto (III, II e I, 90%, 80%, 70%). Por fim, as lamínas foram coradas com hematoxilins de Harris (20 segundos) e Eosina (50 segundos), H&E. Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínulas e bálsamo de Canadá sintético.

4.4.1 Eficiência da injeção de carragenina no músculo tibial anterior

Após a padronização da injeção no m.TA, nós examinamos a eficiência dessa técnica avaliando o efeito da injeção de Cg no ventre muscular. Nós verificamos que o infiltrado celular aumentou 2, 3 e 4 horas após a injeção de Cg (100 µg). Além disso, evidenciamos que a extensão desse aumento se deu de forma limitada, onde o líquido se compartimentalizou após a injeção. Essa compartimentalização pôde também ser observada no músculo cuja salina 0,9% foi utilizada. Apesar de não induzir aumento no infil-

trado celular, a compartimentalização da salina 0,9% especificamente onde foi injetada fica evidente pela área que sofreu distensão aparente (fig. 5).

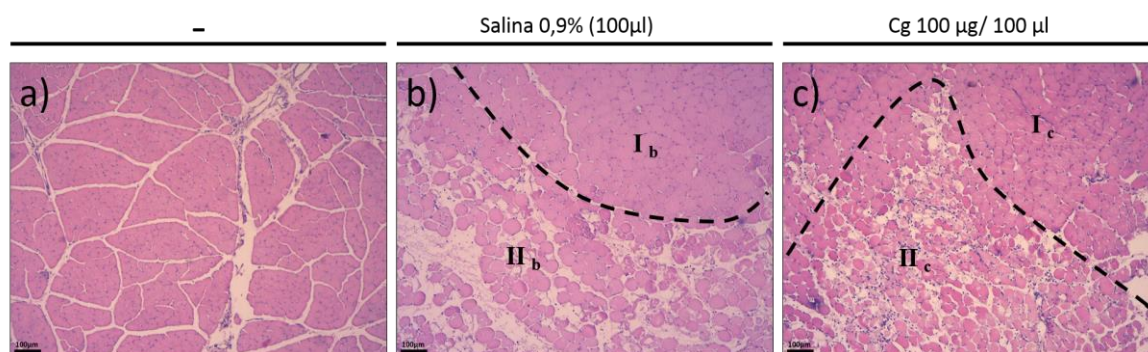


FIGURA 5. Corte histológico do músculo tibial anterior após injeção intramuscular. (a) Músculo tibial anterior sem injeção (aumento de 5x). (b) Músculo tibial anterior 3 horas após injeção de salina 0,9% (aumento de 5x) provocando uma compartimentalização evidenciada pela região sem comprometimento (I_b) e a região distendida pelo líquido injetado (II_b). (c) Músculo tibial anterior após injeção de carragenina (100 µg) (aumento de 5x) provocando uma compartimentalização evidenciada pela região sem comprometimento (I_c) e a região distendida e com aumento no infiltrado celular (II_c).

4.5 Teste algésimétrico

4.5.1 Método algésimétrico mecânico

Para a mensuração do limiar nociceptivo foi utilizado uma adaptação do método de retirada da pata do rato submetido à compressão originalmente descrito por Randall e Selitto (1957). Estes autores desenvolveram a técnica para medir a atividade antinociceptiva, baseada no princípio de que a inflamação aumenta a sensibilidade ao estímulo doloroso (hiperalgesia) e que essa sensibilidade aumentada é susceptível de ser alterada por drogas. Neste método, a pata é submetida a uma compressão, cuja magnitude é crescente ao longo do tempo, até que o animal apresente resposta de retirada de pata, quando é registrado o limiar nociceptivo, expresso em gramas (g). Para a modificação, no lugar da pata o m.TA sofreu a compressão crescente. Além disso, um período de ambientalização de 3 dias anteriores ao dia do experimento, não evidenciado no trabalho original, foi adotado afim de aumentar a sensibilidade do teste. A identificação dos limiares nociceptivos apresentados pelos animais resultou da observação do experimen-

tador no momento em que o animal percebeu o estímulo como sendo doloroso e manifestou uma reação de retirada. É considerado como resposta o instante inicial dessa reação. Nesse momento, observa-se um reflexo de retirada da perna. É importante ressaltar que o período de ambientalização ao aparelho consiste em submeter o animal à mesma situação que será experimentada no dia do experimento. Os m.m.TA dos animais foram colocados no aparelho três vezes com um intervalo mínimo de 10 segundos entre cada exposição, como no dia do experimento. Esse procedimento é muito importante, pois permite uma melhor observação da resposta nociceptiva do animal, que durante o teste deve permanecer quieto, sem comportamentos aversivos devido à situação inabitual a qual se encontra.

4.5.2 Aparelho utilizado para mensurar hiperalgesia

Foi utilizado o aparelho algesimétrico da Ugo Basile (Itália) (fig. 1).

4.5.3 Descrição do teste

Durante o teste os animais foram cuidadosamente mantidos em posição horizontal sobre a bancada por uma das mãos do experimentador, e a região anterolateral da perna direita, local aonde está localizado o m.TA, foi colocada junto ao componente compressor do aparelho. Este componente consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se apoia a perna do animal, e outra cônica, com uma área de $1,75 \text{ mm}^2$ na extremidade, por meio da qual é aplicada a pressão. A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 32 g/s , mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador. Ao observar a resposta nociceptiva do animal, caracterizada pela retirada completa da perna do animal do componente compressor do aparelho, o experimentador cessa o acionamento do pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta ao TA, sendo que o último valor, correspondente ao limiar nociceptivo, fica indicado na escala numerada do aparelho.

4.5.4 Medida do limiar nociceptivo

O limiar nociceptivo deve ser entendido neste estudo como a pressão aplicada no m.TA do animal que foi suficiente para que ele manifestasse a resposta nociceptiva de retirada do membro. A intensidade da resposta nociceptiva foi avaliada através dos valores absolutos ao longo de 6 horas e da diferença entre os limiares no momento antes da injeção do agente hiperalgésico (hora 0) e após a terceira hora da administração do agente hiperalgésico (pico de ação hiperalgésica da Cg), ou seja, através do delta (Δ) do limiar nociceptivo.

4.5.5 Procedimento experimental

O tempo de injeção dos fármacos, medidas do limiar nociceptivo, assim como as doses utilizadas foram baseados em experimentos piloto e dados da literatura e estão citados nas legendas de todos os gráficos. Em todos os experimentos, o limiar basal de cada animal foi determinado antes da administração dos fármacos, sempre mensurados três vezes, observando um intervalo mínimo de 10 segundos entre cada medida, sendo o resultado final a média aritmética dessas aferições.

4.6 Western Blot

Os GRD's localizados de L3 a L6, referentes ao nervo ciático, foram cuidadosamente removidos 3 horas após a injeção i.m. de salina 0,9%, Cg 100 μ g ou Cg 1.000 μ g no m.TA dos animais. Cada amostra deste último tecido foi constituída pelos GRD's de dois animais (fig. 6). A dissecação de todos os tecidos foi realizada nos animais já eutanasiados. Os tecidos foram separadamente homogeneizados em solução de lise (33,3 μ l/mg para o m.TA e 12,5 μ l/mg de tecido para o GRD) contendo 1% Triton X-100, 100 mM Tris/ HCl, pH 8.0, 10% glicerol, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2.5 l g/ml leupeptina, 5 l g/ml aprotinina, e 1 mM ortovanadato de sódio. Depois, as amostras foram incubadas no gelo por 15 minutos antes de serem centrifugados a 10.000 rpm durante 15 minutos a uma temperatura de 4 C°. Após a centrifugação,

o sobrenadante das amostras de DRG foram retirados e a concentração de proteínas quantificada pelo método de Bradford (Bio-Rad). Uma vez quantificadas, quantidades iguais das amostras (30 μ g) foram empilhadas em gel de SDS-poliacrilamida 12%, separadas por eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Depois, as membranas foram bloqueadas por 24 horas a 4C° com PBS contendo 5% de leite desnatado e 0,1% de Tween 20, lavadas por 3 vezes com PBS 0,1% de Tween e incubados com anticorpo anti-Mu (Abcam, 1:1.000), anti-Kappa (Abcam, 1:1.000), anti-receptor canabinóide tipo 1 (Abcam, 1:200) ou anti-GAPDH (Santa Cruz, 1: 3000) em PBS contendo 5% BSA e 0,1% de Tween por 24 horas. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS 0,1% de Tween e incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit para as membranas pré incubadas com os anticorpos anti-Mu, Kappa e CB₁, e anti-mouse para as membranas pré incubadas com anticorpo anti-GAPDH conjugados com peroxidase (HRP) (Santa Cruz 1:1000) por 24 horas para o anticorpo Anti-CB₁ e por 2 horas para os demais anticorpos, em temperatura ambiente. As bandas imunorreativas foram visualizadas usando o sistema de detecção por ECL segundo as recomendações do fabricante (Amersham Biosciences). A expressão das proteínas foi quantificada por densitometria usando um software para análise de imagem (ImajeJ). Os níveis de μ -OR, κ -OR e CB₁ mensurados por densitometria foram normalizados para GAPDH e expressos em unidades arbitrárias (UA).

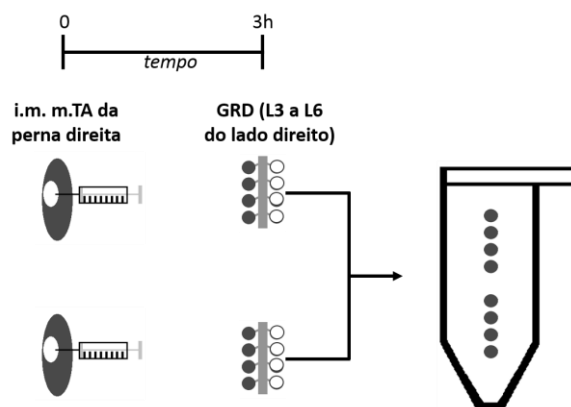


FIGURA 6. Representação esquemática do procedimento para constituição das amostras do gânglio da raiz dorsal. No tempo 0 foram injetados no ventre do músculo tibial anterior da perna direita de dois animais as soluções testadas (salina 0,9%, Cg 100 μ g ou Cg 1000 μ g). 3 horas após, os gânglios da raiz dorsal (de L3 a L6) desses animais foram coletados e constituíram uma amostra.

4.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a tratamentos estatísticos para a determinação das médias e erros padrões das médias (E.P.M.). A diferença estatística entre os grupos foi determinada pelo teste one-way ANOVA e complementada pelo teste Student-Newman-Keuls para múltiplas comparações. Foi considerada estatisticamente significativa as diferenças com valores de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Cinética do efeito hiperalgésico induzido por injeção intramuscular de carragenina

A partir da primeira hora após a administração de Cg, já foi possível observar uma diminuição do limiar nociceptivo mensurado no m.TA dos animais que receberam a injeção contendo Cg nas doses de 500 e 1000 μg / músculo. Essa diminuição foi observada também para a dose de 100 μg / músculo de Cg a partir da segunda hora. A maior diminuição do limiar nociceptivo foi registrado na terceira hora para todas as doses, sendo que a maior intensidade do efeito hiperalgésico foi mensurada nos animais que receberam a dose de 1000 μg / músculo de Cg e a menor para os que receberam 100 μg / músculo de Cg. A magnitude do efeito da injeção i.m. de Cg diminuiu na quarta hora para todas as doses, e teve sua remissão completa na quinta hora para a dose de 100 μg / músculo de Cg e na sexta hora para as demais doses.

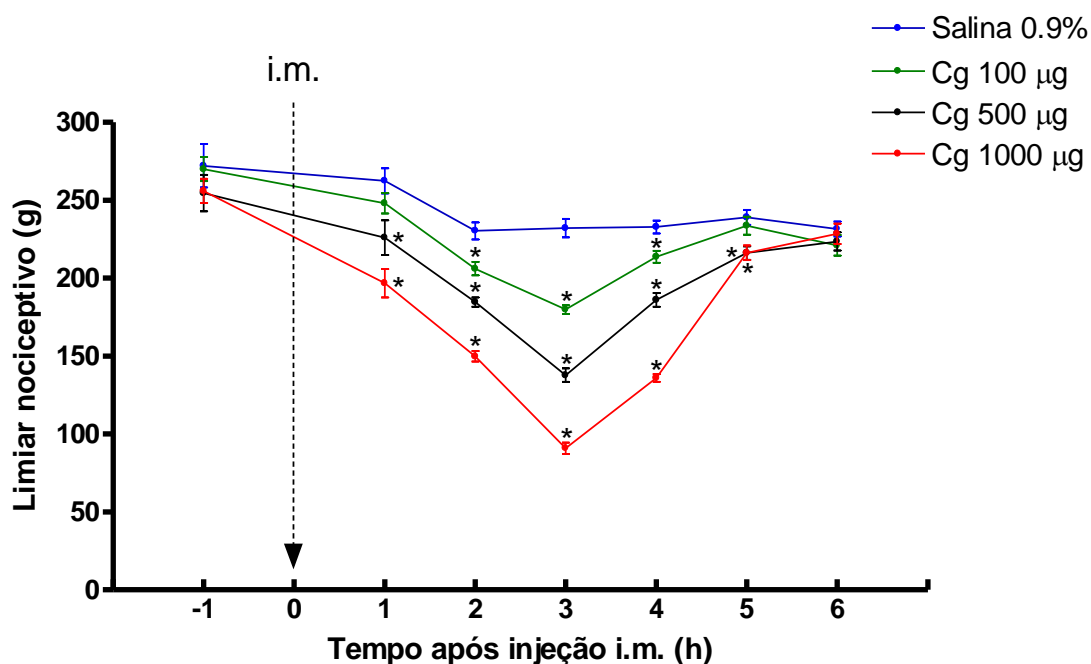


GRÁFICO 1. Desenvolvimento temporal do efeito hiperalgésico de diferentes doses (100, 500 e 1000 µg) de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior. A carragenina foi administrada no tempo 0h. As medidas foram realizadas com intervalo de uma hora entre elas. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g) referentes a 8 ratos. * indica significância estatística ($p < 0,5$) em relação ao grupo controle salina 0.9% (n=8).

5.2 Cinética do infiltrado celular após injeção intramuscular de carragenina

Após a injeção i.m. de Cg observamos um aumento no infiltrado celular. Esse aumento foi verificado 2, 3 e 4 horas após a injeção. O Grupo que recebeu injeção de salina 0,9% não apresentou infiltrado celular.

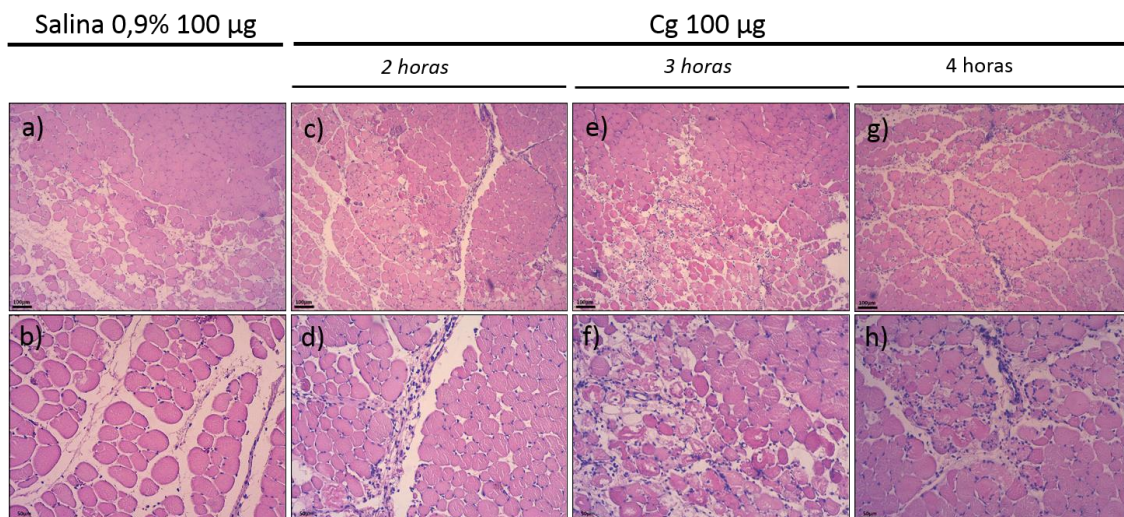


FIGURA 7. Cinética do infiltrado celular após injeção intramuscular de carragenina. Músculo tibial anterior após injeção intramuscular de salina (a-b), 2 (c-d), 3 (e-f) e 4 horas (g-h) após injeção de carragenina. As figuras superiores no aumento de 5x e inferiores no aumento de 10x.

5.3 Participação dos receptores opióides na modulação antinociceptiva endógena muscular frente ao efeito hiperalgésico induzido por carragenina

A injeção i.m. de Nx nas doses de 50 e 25 μ g/ músculo foram suficientes para intensificar o efeito hiperalgésico desenvolvido na terceira hora após a injeção i.m. de Cg na dose de 100 μ g/ músculo. O mesmo não foi observado para a dose de 12,5 μ g/ músculo de Nx. A injeção da maior dose de Nx no m.TA da perna contralateral não causou efeito sistêmico, ou seja, a ação de Nx foi restrita ao músculo tratado.

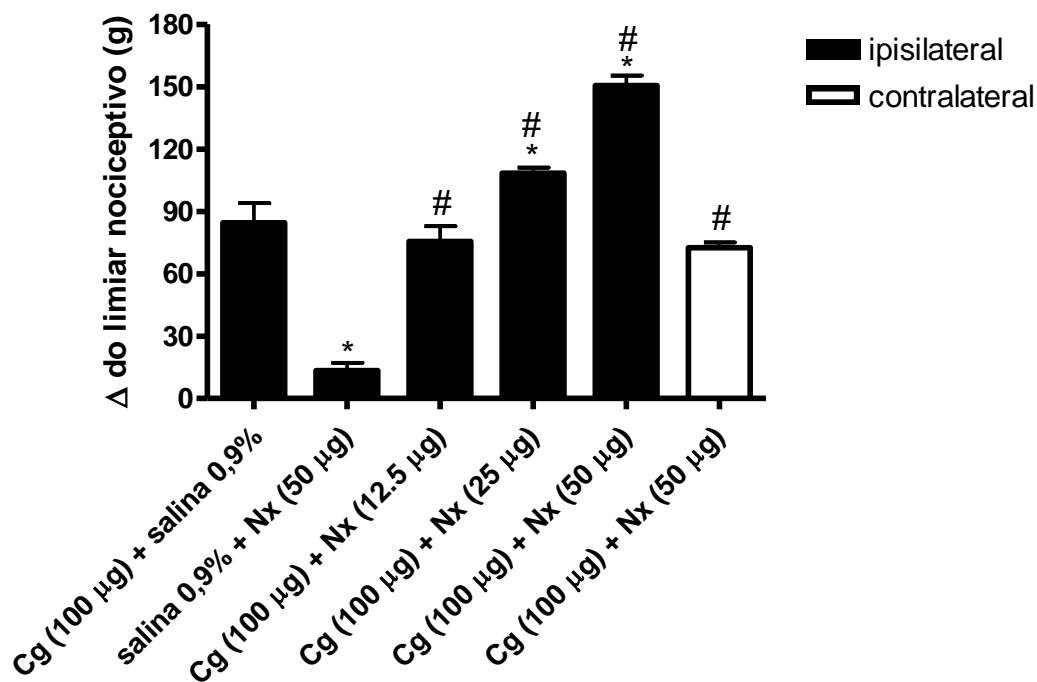


GRÁFICO 2. Intensificação do efeito nociceptivo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de naloxona (Nx). A Nx foi administrada 30 minutos antes da aferição do limiar nociceptivo realizado no algesímetro 3 horas após a injeção de Cg. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * e # indicam diferença ($P < 0,05$) em relação aos grupos Cg (100µg) + salina 0,9% e o grupo salina 0,9% + Nx (50µg), respectivamente, (n=4).

De forma semelhante à Nx, Cloc (antagonista seletivo para o μ -OR) e NorBNI (antagonista seletivo para o κ -OR) também intensificaram o efeito hiperalgésico induzido três horas após a injeção de 100 µg/ músculo de Cg. O maior grau de intensificação pôde ser observado após a injeção de 10 µg/ músculo de Cloc e de 100 e 50µg/ músculo de NorBNI. O grupo de animais que recebeu a dose de 0,1 µg/ músculo de Cloc não acusou efeito algum quando comparada ao grupo controle. A dose de 25 µg/ músculo de NorBNI também não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle

Os efeitos observados com a utilização do Cloc e de NorBNI ocorreram periféricamente, já que a maior dose usada no experimento não foi suficiente para causar um efeito sistêmico quando injetada no músculo contralateral ao que recebeu Cg.

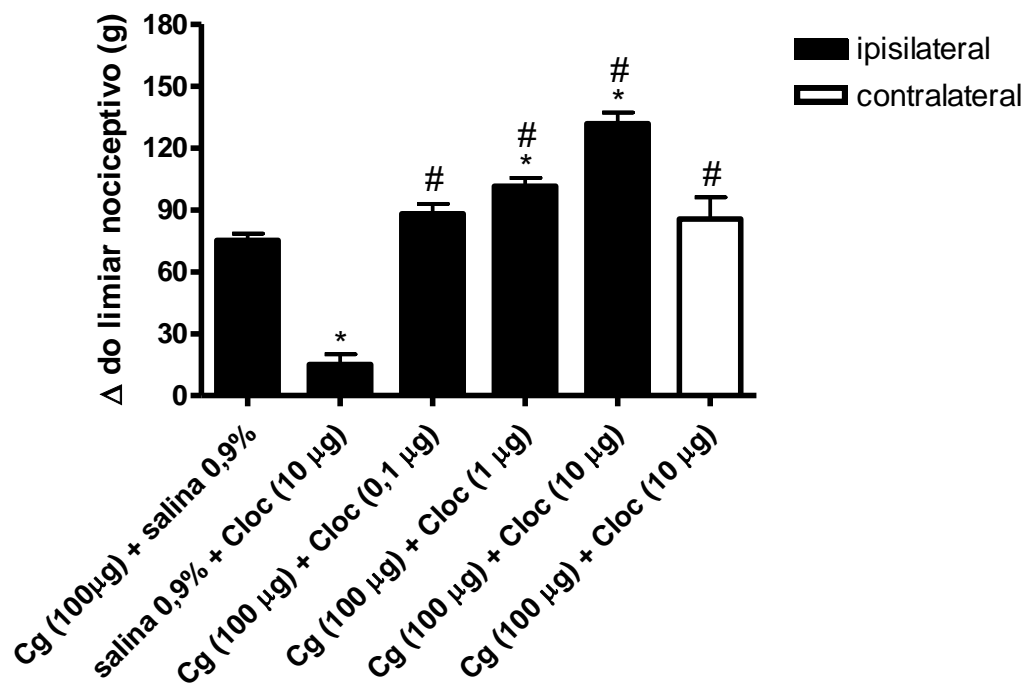


GRÁFICO 3. Intensificação do efeito nociceptivo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de cloxinnamox (Cloc). O Cloc foi injetado 30 minutos antes da aferição do limiar nociceptivo realizado no algosímetro 3 horas após a injeção de Cg. Cada coluna representa a média ± E.P.M. * e # indicam diferença ($P < 0,05$) em relação aos grupos Cg (100µg) + salina 0,9% e o grupo salina 0,9% + Cloc (10µg), respectivamente, (n=4).

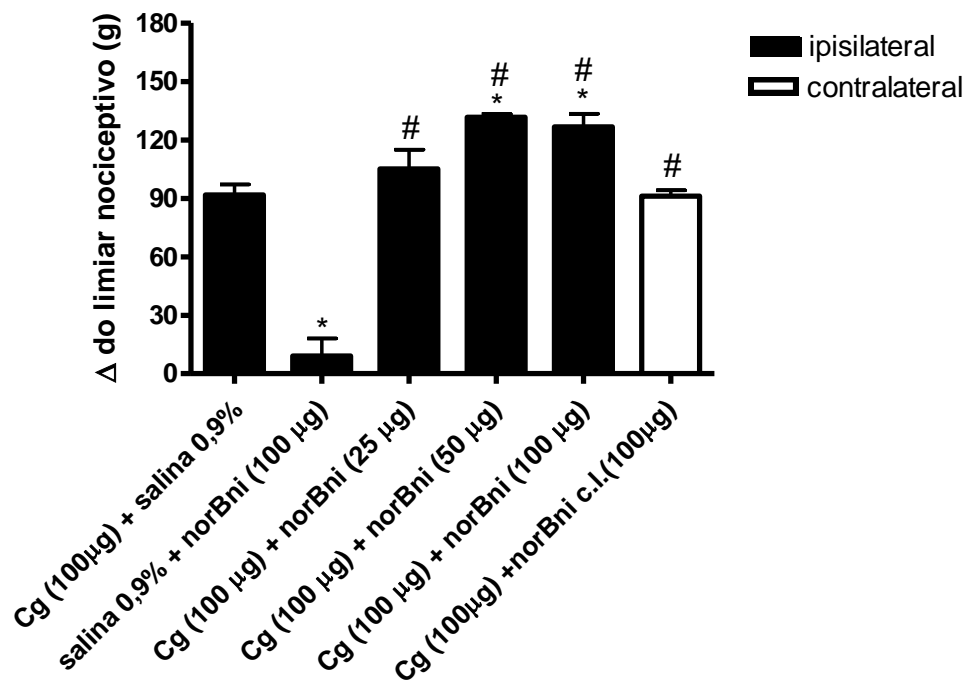


GRÁFICO 4. Intensificação do efeito nociceptivo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de Nor- binaltorfimina (NorBNI). O NorBNI foi injetado 30 minutos antes da aferição do limiar nociceptivo realizado no algesímetro 3 horas após a injeção de Cg. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * e # indicam diferença ($P < 0,05$) em relação aos grupos Cg (100µg) + salina 0,9% e o grupo salina 0,9% +NorBNI (100µg), respectivamente ($n=4$). c.l.= contralateral.

NTD, um antagonista seletivo para o δ -OR, não exerceu influência sobre o efeito hiperalgésico induzido por Cg. A maior dose utilizada em experimentos piloto não apresentou diferença estatística comparada ao grupo controle.

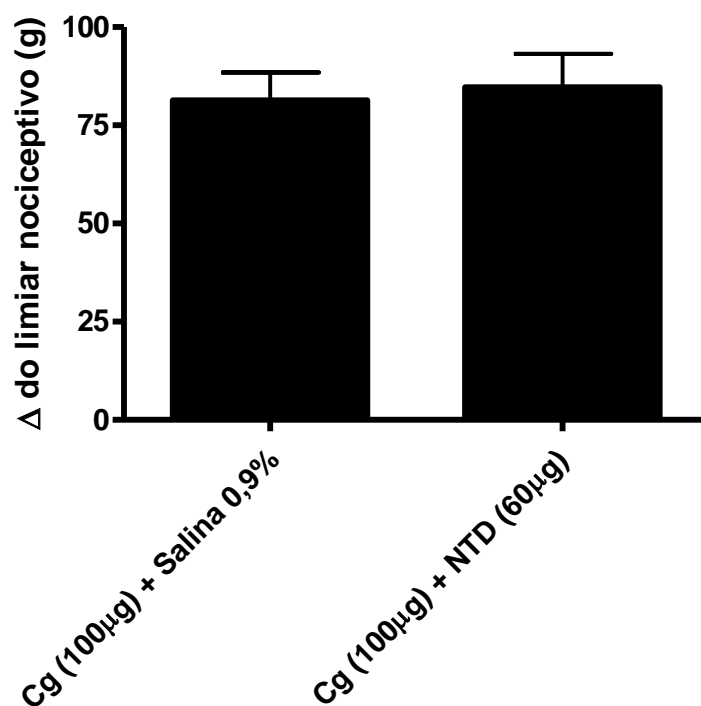


GRÁFICO 5. Efeito nociceptivo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de naltrindole (NTD). O NTD foi injetado 30 minutos antes da aferição do limiar nociceptivo realizado no algosímetro 3 horas após a injeção de Cg. Não houve diferença estatística entre os grupos (n=4).

5.4 Quantificação dos receptores μ e κ opióides no gânglio da raiz dorsal após injeção intramuscular de carragenina.

Considerando que o maior efeito hiperalgésico de Cg, tanto para a dose de 100 como para a dose de 1000 μg / músculo, ocorreu na terceira hora após sua injeção, e que houve uma intensificação da nocicepção devido ao antagonismo dos receptores μ -OR e κ -OR, nós verificamos a possível regulação desses receptores no GRD três horas após i.m. de Cg no m.TA.

Nossos dados mostram que as doses de 100 e 1000 μg / músculo de Cg, não alteraram a expressão dos μ -OR ou κ -OR no GRD.

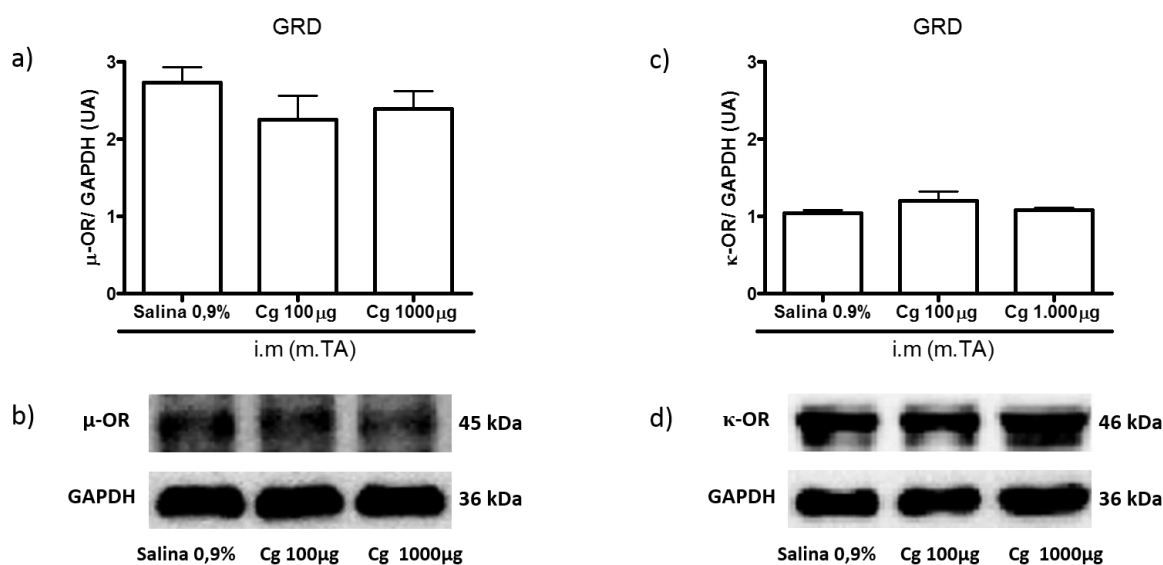


FIGURA 8. Quantificação dos receptores μ e κ opióides no gânglio da raiz dorsal (GRD) após injeção intramuscular de carragenina. Quantificação dos receptores μ opióide (a) e κ opióide (c), normalizada para GAPDH e representada em unidades arbitrárias (UA) para os grupos Salina 0,9%, Cg 100 μ g/ músculo e Cg 1000 μ g/ músculo (n=3). Os tecidos foram coletados 3 horas após a injeção de salina 0,9% ou Cg em ambas as doses. Imagem representativa da expressão do receptor μ opióide (b) e κ opióide (d) comparada à expressão de GAPDH no GRD. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. kDa (peso molecular em kilodalton).

5.5 Participação de peptídeos opióides endógenos na modulação antinociceptiva endógena muscular frente ao efeito hiperalgésico induzido por carragenina

Durante nossos experimentos, observamos que a maior resposta nociceptiva foi registrada na terceira hora após a injeção i.m. de 1000 μ g/ músculo de Cg. Tal hiperalgesia, que pode ser considerada como máxima, foi revertida pela ação da Best, um inibidor de peptidase. Todas as doses testadas dessa droga foram suficientes para propiciar um efeito analgésico verificado, de forma dose-dependente, através da diminuição do limiar nociceptivo, quando comparado ao limiar do grupo controle.

Best não apresentou efeito sistêmico.

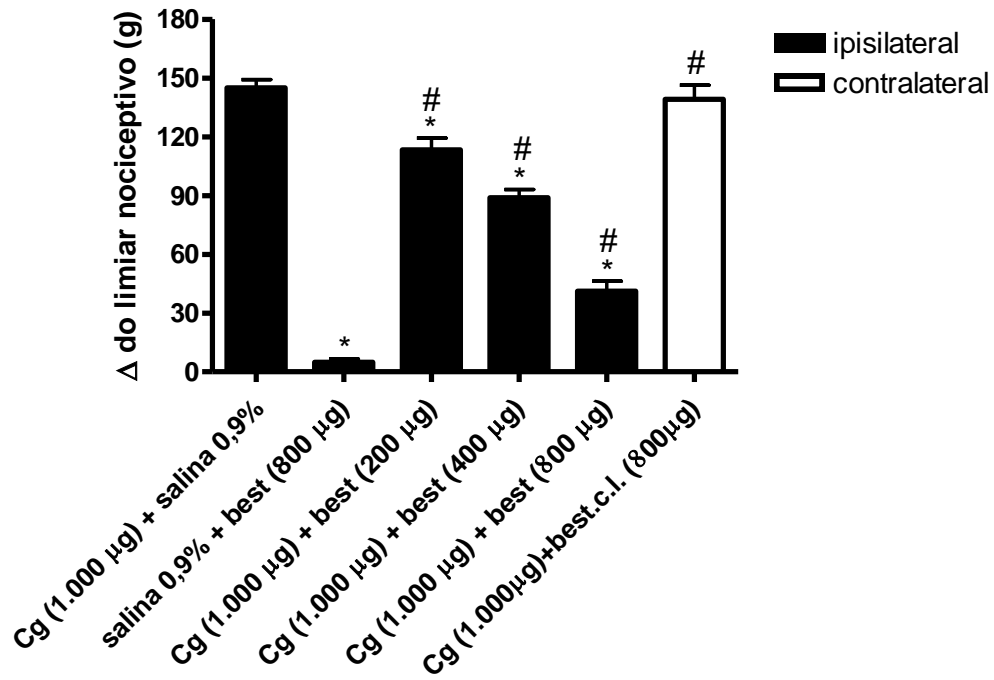


GRÁFICO 6. Diminuição do efeito nociceptivo máximo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de bestatina (Best). A Best foi injetada 30 minutos antes da aferição do limiar nociceptivo realizado no algésímetro 3 horas após a injeção de Cg. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * e # indicam diferença ($P < 0,05$) em relação aos grupos Cg (1.000 μ g) + salina 0,9% e o grupo salina 0,9% + Best (800 μ g), respectivamente (n=4).

5.6 Participação dos receptores canabinóides na modulação antinociceptiva endógena muscular frente ao efeito hiperalgésico induzido por carragenina

O AM51, antagonista dos receptores canabinóides CB₁, intensificou o efeito hiperalgésico induzido por Cg, de forma dose dependente e com ação restrita ao músculo tratado.

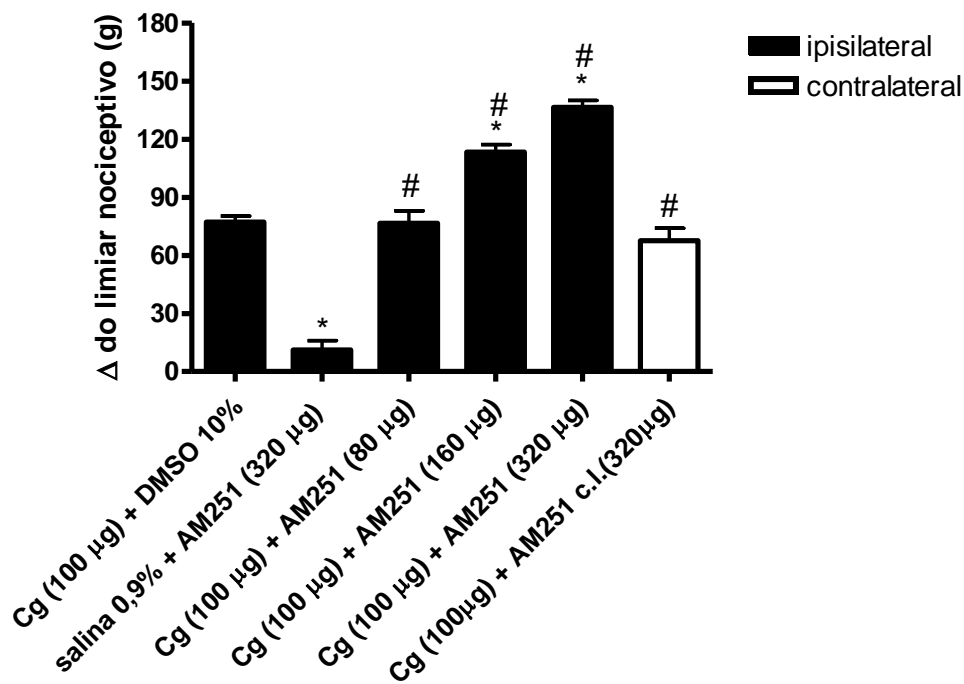


GRÁFICO 7. Intensificação do efeito nociceptivo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de AM251. O AM251 foi injetado 15 minutos antes da aferição do limiar nociceptivo realizado no algosímetro 3 horas após a injeção de Cg. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * e # indicam diferença ($P < 0,05$) em relação aos grupos Cg (100 μ g) + DMSO10% e o grupo salina 0,9% + AM251 (320 μ g), respectivamente, (n=4).

De forma contrária, AM630, um antagonista seletivo para CB₂, não exerceu influência sobre o efeito hiperalgésico induzido por Cg, mesmo na maior dose testada.

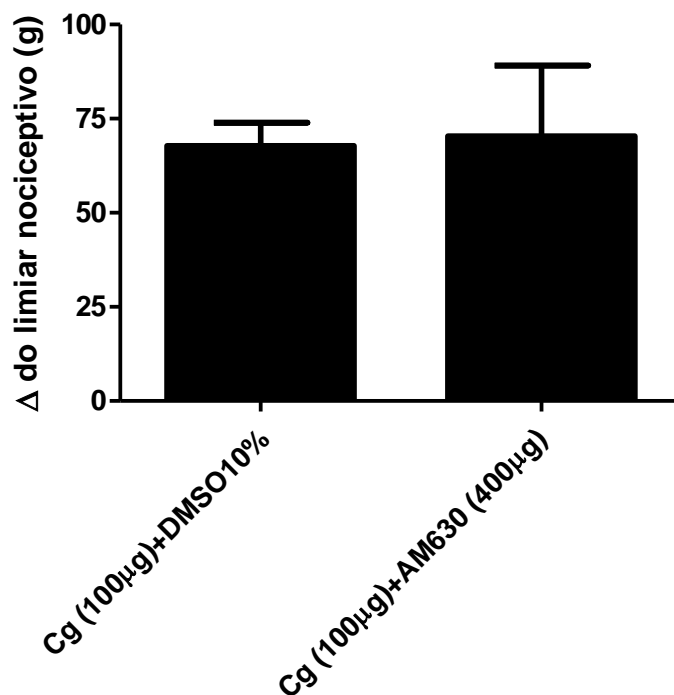


GRÁFICO 8. Efeito nociceptivo induzido pela injeção intramuscular de carragenina (Cg) no músculo tibial anterior após administração de AM630. O AM630 foi injetado 15 minutos antes da aferição do limiar nociceptivo realizado no algesímetro 3 horas após a injeção de Cg. Não houve diferença estatística entre os grupos (n=4).

5.7 Quantificação dos receptores CB₁ canabinóide no gânglio da raiz dorsal após injeção intramuscular de carragenina

Considerando que o maior efeito hiperalgésico de Cg, tanto para a dose de 100 como para a dose de 1000 µg/ músculo, ocorreu na terceira hora após sua injeção, e que houve uma intensificação da nocicepção devido ao antagonismo do receptor CB₁, nós verificamos a possível regulação da expressão desses receptores no GRD três horas após i.m. de Cg no m.TA.

De forma semelhante aos dados da quantificação de receptores opióides, nossos dados mostram que não houve alteração na quantidade do receptor CB₁ canabinóide no GRD após a injeção de carragenina i.m.

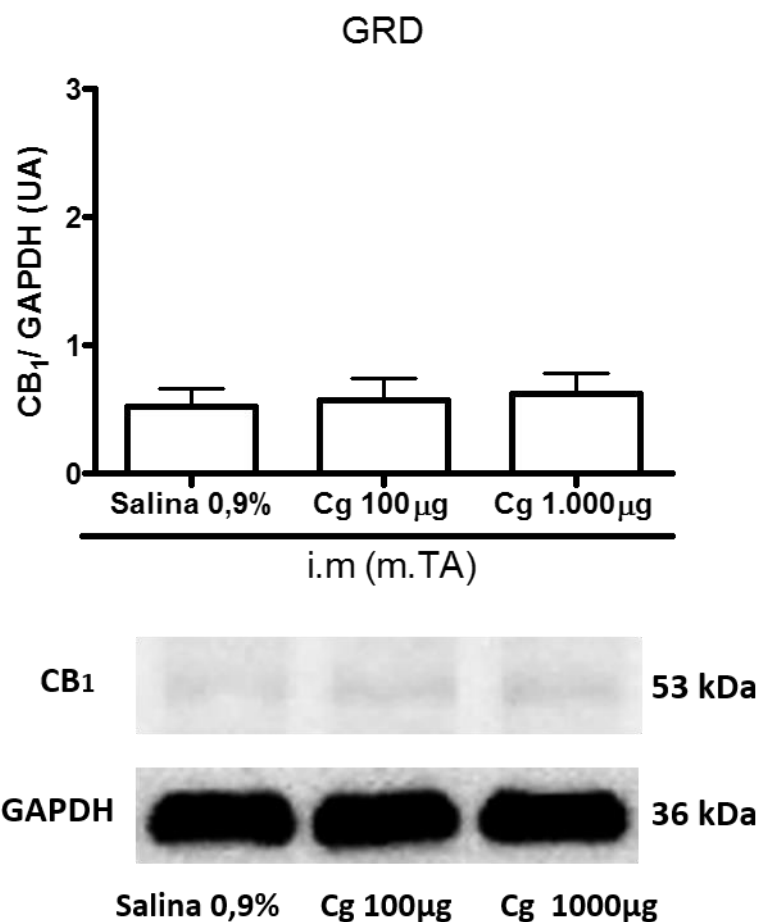


FIGURA 9. Expressão do receptor CB₁ canabinóide gânglio da raiz dorsal (GRD) após injeção i.m. de carragenina (Cg). Expressão do receptor CB₁ (a), normalizada para GAPDH e representada em unidades arbitrárias (UA) para os grupos Salina 0,9%, Cg 100µg/ músculo e Cg 1000µg/ músculo (n=3). Os tecidos foram coletados 3 horas após a injeção de salina 0,9% ou Cg em abas as doses. Imagem representativa da expressão do receptor CB₁ comparada à expressão de GAPDH no gânglio da raiz dorsal (b). Cada coluna representa a média ± E.P.M. UA (unidades arbitrárias). kDa (peso molecular em kilodalton).

5.8 Participação de endocanabinóides na modulação antinociceptiva endógena muscular frente ao efeito hiperalgésico induzido por carragenina

A inibição da enzima FAAH, responsável pela degradação de AEA, reverteu o efeito hiperalgésico da Cg na dose de 1000 µg/ músculo. A estratégia farmacológica

incluiu a utilização de MAFP nas doses de 4, 8 e 16 μg / músculo, sendo que todas elas apresentaram diminuição da resposta nociceptiva.

A maior dose de MAFP testada não apresentou efeito sistêmico.

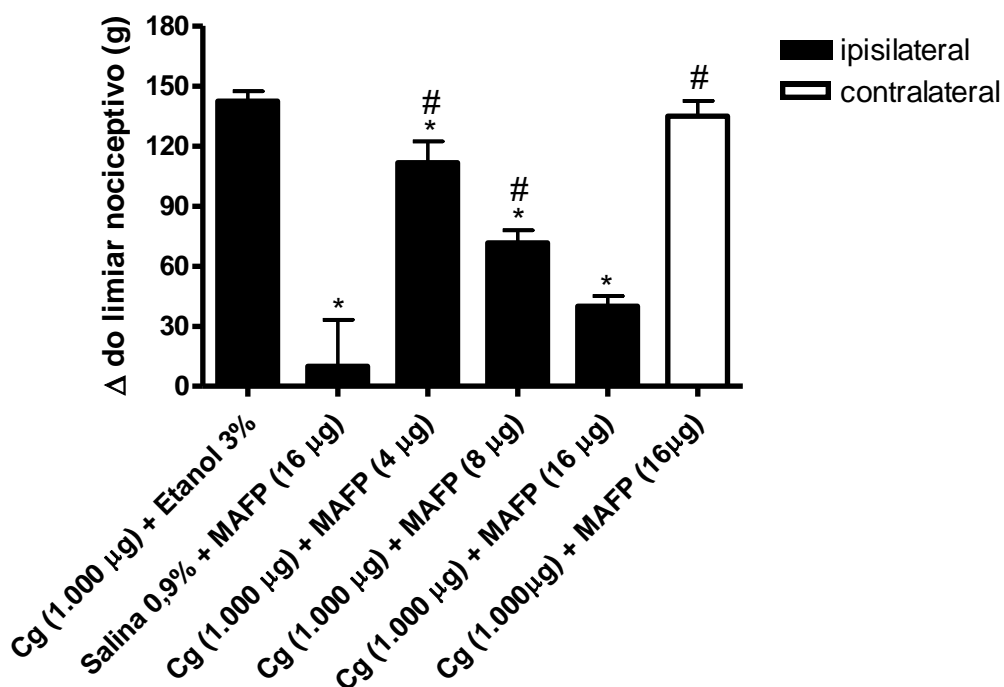


GRÁFICO 9. Diminuição do efeito nociceptivo máximo induzido pela injeção intramuscular de carragena (Cg) no músculo tibial anterior após administração de MAFP. O MAFP foi injetado 15 minutos antes da aferição do limiar nociceptivo realizado no algesímetro 3 horas após a injeção de Cg. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * e # indicam diferença ($P < 0,05$) em relação aos grupos Cg (1.000 μg) + etanol 0,3% e o grupo salina 0,9% + MAFP (16 μg), respectivamente ($n=4$).

Semelhante ao observado com MAFP, a inibição da captação de AEA através do uso de VDM11 amenizou a hiperalgesia muscular provocada pela injeção de 1000 μg / músculo de Cg. Todas as doses provocaram uma diminuição da resposta nociceptiva no m.TA.

O tratamento com VDM11 também não apresentou efeito sistêmico.

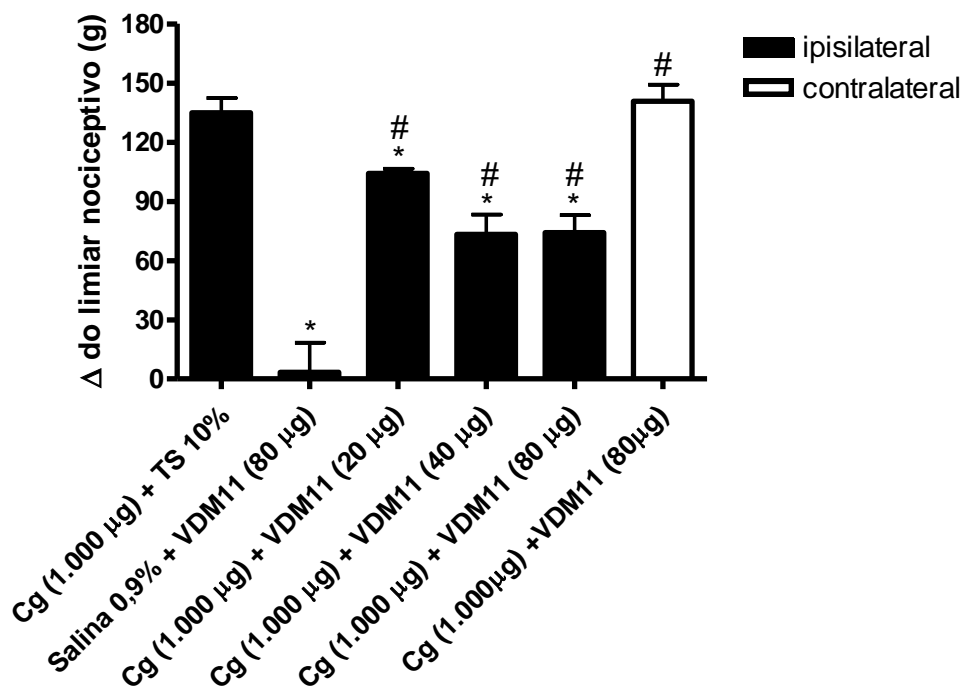


GRÁFICO 10. Diminuição do efeito nociceptivo máximo induzido pela injeção intramuscular de carragena (Cg) no músculo tibial anterior após administração de VDM11. O VDM11 foi injetado 15 minutos antes da aferição do limiar nociceptivo realizado no algesímetro 3 horas após a injeção de Cg. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * e # indicam diferença ($P < 0,05$) em relação aos grupos Cg (1.000 μ g) + TS 10% e o grupo salina 0,9% + VDM11 (80 μ g), respectivamente (n=4).

E finalmente, a injeção i.m. de JZL, um inibidor da enzima responsável pela degradação de 2-AG, a MGL, também reverteu a hiperalgesia muscular induzida pela dose de 1000 μ g/ músculo Cg de forma dose-dependente, não sendo observado efeito sistêmico com a maior dose testada.

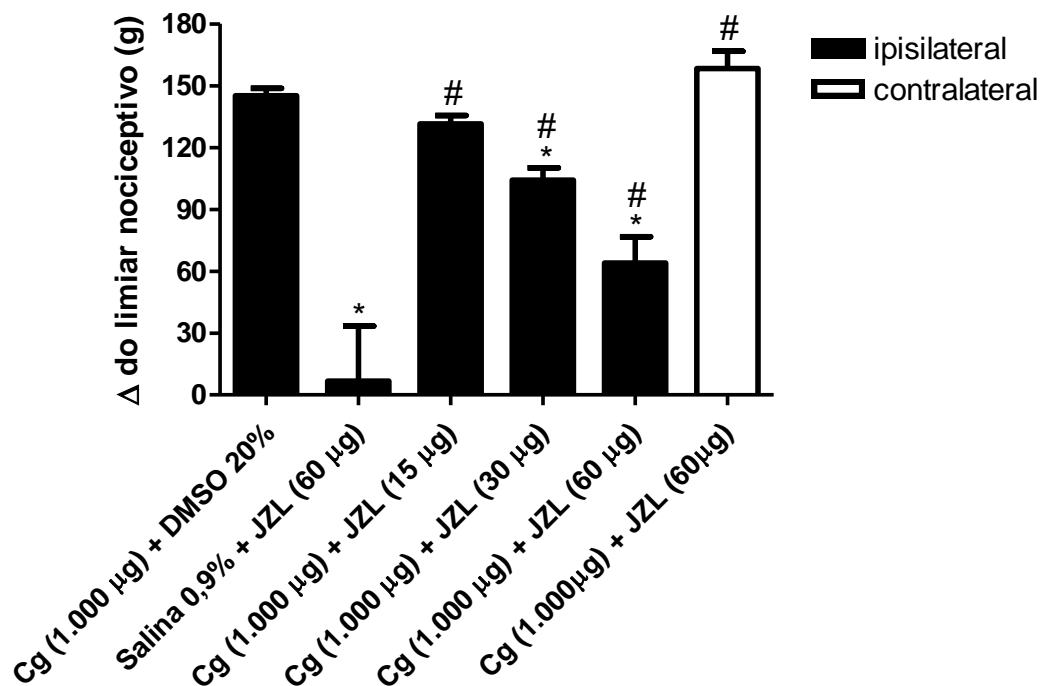


GRÁFICO 11. Diminuição do efeito nociceptivo máximo induzido pela injeção intramuscular de carragena (Cg) no músculo tibial anterior após administração de JZL. O JZL foi injetado 15 minutos antes da aferição do limiar nociceptivo realizado no algesímetro 3 horas após a injeção de Cg. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. * e # indicam diferença ($P < 0,05$) em relação aos grupos Cg (1.000 µg) + DMSO 20% e o grupo salina 0,9% + JZL (60 µg), respectivamente (n=4).

6 DISCUSSÃO

O m.TA dos ratos da linhagem Wistar é um músculo relativamente grande e ocupa grande parte da região anterolateral da perna desses animais. Por isso, esse ventre muscular foi escolhido para a realização dos experimentos, uma vez que suas características permitem com facilidade a aplicação de injeções, sem risco de extravasamento do conteúdo injetado, além de ótima exposição do local sensibilizado ao algesímetro (fig. 1). Para minimizar erros de aplicação da injeção i.m. durante os experimentos, nós delimitamos a profundidade em que a agulha penetraria o m.TA (fig. 2 e 3). Essa técnica mostrou-se eficiente, uma vez que o conteúdo injetado ficou compartimentalizado no m.TA (fig. 4). Dessa forma, e considerando que o limiar nociceptivo foi aferido estritamente no local da injeção, podemos afirmar que a padronização do método de injeção no m.TA mostrou-se eficiente em nosso estudo. Assim sendo, o estudo em questão produziu um método para futuras avaliações de hiperalgesia inflamatória muscular utilizando o método simples e eficiente proposto originalmente por Randall e Selitto em 1957. Taguchi *et al.* (2005) utilizaram o m.ELD, cuja localização é próxima ao m.TA (o m.TA é mais superficial que o m.ELD e ocupa uma posição que, se rebatido, permite a visualização do último), com o objetivo de avaliar a nocicepção após um protocolo de DMIT. Para isso os autores submetem o m.ELD dos ratos ao método algesimétrico mecânico, após a indução da DMIT através de ações musculares excêntricas, mostrando a possibilidade de se utilizar este método algesimétrico em músculos localizados na perna de ratos. Junto à compressão mecânica, agentes flugogênicos em músculos, como a Cg, são extensivamente utilizados para o estudo da dor muscular inflamatória em vários trabalhos (ALVAREZ *et al.*, 2012; DINA *et al.*, 2008a; DINA *et al.*, 2008(b); YOKOYAMA *et al.*, 2007; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2005; LORAM *et al.*, 2007) bem como em nosso estudo.

A Cg, fração lambda (λ) do polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Chondruscrispus*, é conhecida por induzir resposta inflamatória aguda e crônica (DI ROSA, 1972) com consequente hiperalgesia (NANTEL *et al.*, 1999). Este método instituído por Winter *et al.* (1962) para o estudo da inflamação ou dor inflamatória ainda hoje é um dos métodos mais amplamente utilizados. Como esperado, nossos resultados mostram que a

injeção i.m. de Cg no ventre do m.TA induziu tanto um aumento na sensibilidade noci-ceptiva (gráfico 1), quanto um aumento no infiltrado celular (fig. 5)

As doses de 100, 500 e 1000 μg / músculo de Cg induziram um aumento da hiperalgesia mecânica de forma dose dependente (gráfico 1). A cinética do evento hiperalgésico no m.TA foi similar ao observado no evento inflamatório em pata de ratos (Di Rosa, 1972), com início da hiperalgesia a partir da primeira hora, pico de ação na terceira hora e remissão da hiperalgesia na sexta hora. Quando comparamos a cinética do evento da hiperalgesia inflamatória induzida por Cg do m.TA e na pata de ratos (MOTTA, 2009) com camundongos (ROMERO, 2011) verificamos o mesmo desenvolvimento da hiperalgesia ao longo do tempo, com a diferença apenas em relação as doses injetadas. Enquanto que na pata de ratos e camundongos é necessário apenas 250 μg / músculo ou 200 μg / músculo de Cg, respectivamente, para induzir máximo efeito hiperalgésico aferido no algesímetro, no m.TA foi usada a dose de 1000 μg para obter o pico de hiperalgesia nos animais. As diferenças são facilmente verificadas ao se observar os limiares basais e limiares após a 3 hora da injeção de Cg. Enquanto que na pata de ratos e camundongos temos um limiar nociceptivo basal de 200 e 125 g respectivamente, no m.TA temos um basal por volta de 250 g. Após 3 horas da injeção de Cg temos uma queda do limiar nociceptivo para 40 g em patas e de 80g para o m.TA. Por outro lado, quando observamos a dose de 100 μg / músculo de Cg, seja em pata ou no m.TA, temos um mesmo padrão de hiperalgesia moderada, considerada ótima em outros estudos na pata (MOTTA, 2009 e ROMERO, 2011) para se verificar uma possível modulação analgésica endógena da hiperalgesia inflamatória. Isso permite, então, avaliar o possível efeito das drogas que apresentavam potencial para aumentar o limiar nociceptivo. Por outro lado, como no m.TA a dose de 1000 μg / músculo de Cg foi a que induziu hiperalgesia máxima, esta foi escolhida para a avaliação das drogas que apresentavam potencial para diminuir o limiar nociceptivo.

Para o estudo do sistema opioidérgico, vários trabalhos adotaram o uso de um antagonista não seletivo de receptores opióides, a Nx, como ferramenta farmacológica (SAWYNOK *et al.*, 1979). Em nosso trabalho, esse antagonista intensificou a hiperalgesia periférica induzida por Cg (gráfico 2). Sabendo que essa resposta foi induzida antagonizando de maneira inespecífica os receptores opióides, nós então utilizamos antagonistas seletivos para cada um dos tipos de receptores opióides.

Tanto Cloc quanto NorBNI, antagonistas seletivos para o μ -OR e o κ -OR respectivamente, intensificaram a nocicepção induzida por Cg (gráfico 3 e 4), mostrando que esses receptores opióides participam da modulação nociceptiva muscular. O estímulo inflamatório na periferia pode provocar um aumento no transporte axonal dos receptores κ e μ opióides (JEANJEAN *et al.*, 1995) elevando a densidade destes receptores no tecido periférico inflamado (HASSAN *et al.*, 1993; SHABAAN *et al.*, 2011; STEIN, 1995). Além disso, o transporte axonal de μ -OR é precedido pelo aumento dos níveis de seu mRNA no GRD, onde os próprios receptores opióides podem ser identificados (STAINER, MACHELSKA; SCHÄAFER, 2001). Nesse contexto, inicialmente nós hipotetizamos que a influência do κ -OR e do μ -OR sobre a nocicepção verificada em nossos experimentos poderia ter sido um fenômeno derivado do aumento da expressão desses receptores no GRD e subsequente transporte para o músculo inflamado, onde poderiam exercer suas ações inibitórias. Porém, não foi observada neste trabalho, nenhuma alteração na expressão do κ -OR ou do μ -OR no GRD (fig. 7).

Ambalavanar *et al.* (2006) indicam que durante a inflamação muscular ocorre um aumento nos níveis do neurotransmissor excitatório CGPR (proteína relacionada ao gene da calcitonina), e sugerem que sua queda intrassomática verificada no GRD poderia ser oriunda do seu transporte axonal ou de sua liberação. A liberação de CGPR nas lâminas mais superficiais do CDME, onde atuam em terminais de neurônios de segunda ordem, é dependente da variação intracelular de Ca^{2+} nos terminais pré-sinápticos centrais das FAP's (WAXMAN; ZAMPONI, 2014). Ou seja, quanto maior a concentração de Ca^{2+} nestes terminais pré-sinápticos, maior a magnitude da liberação de vesículas carregadas com neurotransmissores, dentre os quais o excitatório CGPR. Além disso, a excitabilidade dos neurônios nociceptivos pode ser aumentada devido ao influxo de Ca^{2+} em suas projeções periféricas, amplificando os sinais nociceptivos que chegam ao CDME, aumentando a liberação vesicular de neurotransmissores excitatórios neste estrato anatômico (ZAMPONI *et al.*, 2009). Por sua vez, quando ativados, os μ -OR's diminuem o influxo de Ca^{2+} (BOURINET *et al.*, 1996; RUSSIN *et al.*, 1997; ZAMPONI; SNUTCH, 1998), através de mecanismos efetores mediados pela proteína G (WAARD, 1994), atenuando a excitabilidade neuronal e conseqüentemente a liberação de vesículas contendo CGPR, e outros neurotransmissores excitatórios, como a substância P (SP), no CDME (WAXMAN; ZAMPONI, 2014; ZAMPONI *et al.*, 2009). Tal redução na excitabilidade neural é refletida pela diminuição da nocicepção (ANDRADE *et al.*, 2010).

Nossos resultados mostram que todo esse mecanismo supracitado pode ter sido controlado em nosso modelo pelo sistema opióide ainda na periferia, uma vez que os μ -OR e κ -OR quando antagonizados no m.TA causaram um aumento da resposta nociceptiva. Este aumento pode ter sido um reflexo da modulação periférica da excitabilidade dos nociceptores e, por tanto, do aumento do fluxo de informações que convergiram até o CDME quando os receptores opióides foram antagonizados.

Diferente dos μ e κ -OR's, os δ -OR's parecem não participar da modulação endógena periférica da nocicepção, uma vez que seu antagonista seletivo NTD não apresentou alteração do limiar nociceptivo. Corroborando esse resultado, Denning *et al.* (2008) mostraram que esse receptor não é expresso no tecido muscular de ratos.

Diferente dos nossos resultados, nosso grupo de pesquisa mostrou que o mecanismo de ação de vários agentes analgésicos periféricos como a xilazina (ROMERO *et al.*, 2009) e palmitoiletanolamida (PEA) (ROMERO *et al.*, 2012) são relacionados à ativação do δ -OR. Por outro lado, os trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório mostram que os δ -OR e μ -OR não estão envolvidos na antinocicepção periférica dos agentes anti-inflamatórios dipirona e diclofenaco (REZENDE *et al.*, 2015). Neste mesmo estudo apenas os receptores κ -OR estariam envolvidos no evento antinociceptivo. Pacheco *et al.* 2005 verificaram que o antagonista seletivo dos receptores δ -OR NTD diminui o efeito antinociceptivo periférico do agonista dos δ -OR SNC80 frente a hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de Cg ou prostaglandinaE₂.

Brack *et al.* (2004) afirmam que a antinocicepção nas fases iniciais da inflamação não é limitada pelos peptídeos opióides oriundos de leucócitos, e sim da expressão e grau de acoplamento dos receptores opióides em neurônios sensoriais periféricos. Diferentemente desses autores, e corroborando Roques *et al.* (1990) e Schreiter *et al.* (2012), nós mostramos que a inibição da degradação dos peptídeos opióides teve um efeito antinociceptivo frente a um estímulo hiperalgésico. Porém, em nosso trabalho, essa atividade analgésica com ação periférica foi verificada no músculo e não na pata. Schreiter *et al.* (2012) mostraram que a Best, o mesmo bloqueador testado nesta dissertação, e o thiorphan foram usados para avaliar a participação analgésica de APN e NEP em células e terminais periféricos de tecidos inflamados. Em nosso trabalho não exploramos a participação específica de NEP, ou da ação de thiorphan, sobre a hiperalgesia mecânica muscular. Porém isso não prejudica a interpretação dos nossos resultados, pois tanto APN quanto a NEP parecem degradar indiscriminadamente os peptídeos opióides endó-

genos (SCHREITER *et al.*, 2012). Estes mesmos autores ainda mostraram que a Best juntamente com o thiorphan diminuem a degradação de leu-encefalina e met-encefalina em leucócitos, e das mesmas encefalinas mais a dinorfina em nervos periféricos de tecido inflamado, conservando a ação desses peptídeos sobre seus receptores, com consequente diminuição da hiperalgesia. Esse fenômeno pode justificar o aumento da antinocicepção verificado em nosso trabalho após a i.m. de Best que, como consequência, poderia ter aumentado a oferta de ligantes opióides potencializado a ativação dos receptores μ -OR e κ -OR, diminuindo a sensibilidade dos nociceptores presentes no músculo.

A analgesia produzida por opióides e canabinóides endógenos envolve circuitos centrais (MENG *et al.*, 1998) e periféricos (HOWLETT *et al.*, 2002) similares. Há evidências de que canabinóides endógenos poderiam tonicamente modulados no sistema nervoso central (MENG *et al.*, 1998) e periférico (CALIGNANO *et al.*, 1998) em neuropatias. A respeito da possível modulação de endocanabinóides em processos inflamatórios, os estudos são ainda contraditórios. A participação dos receptores canabinóides não foi evidenciada em modelo de formalina, artrite com inflamação persistente e em modelos comportamentais de dor como tail-flick em camundongos (SMITH *et al.*, 1998). Por outro lado, Agarwale *et al.* (2007) verificaram um aumento da concentração de endocanabinóides 24 horas após a indução inflamatória com CFA em pata de camundongos. No mesmo trabalho, os autores verificaram que a hiperalgesia presente após a injeção de CFA é intensificada em animais que não expressam os receptores CB₁ canabinóides. A participação dos receptores CB₂ canabinóides não foi avaliada neste estudo.

Em nosso trabalho, apesar de os receptores CB₁ e CB₂ canabinóides serem encontrados no GRD (MUNRO *et al.*, 1993) os níveis da expressão desses receptores nessa estrutura anatômica não alteraram devido a injeção i.m. de Cg (figura 8). Porém, a avaliação farmacológica desses receptores e de enzimas do sistema canabinoide foi realizada na hiperalgesia induzida por Cg no músculo. Este experimento foi realizado com a perspectiva de que esse sistema, por atuar similarmente ao sistema opióide sobre a ativação de mecanismos efetores, poderia exercer influência sobre a hiperalgesia muscular periféricamente. Em nosso estudo, a intensificação da hiperalgesia induzida por Cg após a utilização de AM251 sugere a participação dos receptores CB₁ no controle endógeno periférico da dor inflamatória muscular. Da mesma forma que a avaliação opioidérgica, nossos resultados usando o AM251 demonstraram a participação do sis-

tema canabinoidérgico neste evento, na terceira hora após a injeção i.m. de Cg, quando ocorreu o maior efeito hiperalgésico desta droga.

Corroborando nossos resultados, Agarwale *et al.* (2007) mostraram que animais deficientes para CB₁, especificamente em receptores nociceptivos, apresentavam um aumento da hiperalgesia mecânica inflamatória em patas. Por outro lado, esses mesmos autores mostram uma modulação que se desenvolve de forma tardia, 24 horas após a injeção de CFA, sendo que, o pico do efeito hiperalgésico foi atingido com 6 horas após a injeção do adjuvante. Em nosso modelo, além de estarmos avaliando dor muscular no m.TA, a modulação é observada após três horas da injeção de Cg, ou seja, no pico do efeito hiperalgésico induzido por Cg. Esta divergência pode ser produto da diferença dos agentes inflamatórios usados ou mesmo das diferentes áreas anatômicas testadas, indicando que a modulação canabinoidérgica periférica da dor inflamatória tem características diferentes que poderiam depender não só do tecido avaliado, como também da etiologia do processo inflamatório.

Sánchez Robles *et al.* (2012) mostraram que a ação de agonistas com seletividade específica para CB₁ e CB₂ tiveram seus efeitos analgésicos revertidos pela injeção i.m. de AM251 e AM630. Dessa forma, esses autores indicam que ambos os receptores canabinóides estariam envolvidos no processo de modulação da hiperalgesia periférica muscular. Nosso trabalho mostra, no entanto, que somente o receptor CB₁ participou na modulação endógena da hiperalgesia periférica muscular.

Divergindo de nossos resultados, Bagüés *et al.* (2014) não verificaram a participação de CB₁ frente a um estímulo hiperalgésico no músculo. Esses autores mostraram que a ação analgésica provocada pela injeção de tetrahydrocannabinol (THC) no músculo gastrocnêmio de ratos não foi revertida pela injeção i.m. de AM251. Por outro lado, a analgesia no músculo gastrocnêmio parece ter sido mediado por CB₂, levando os autores a propor que a modulação da hiperalgesia periférica no músculo ocorreria em função da ação do receptor CB₂, e não em função da ativação de CB₁ como sugerem nossos resultados. Tendo em vista o fato de que o antagonista seletivo dos receptores canabinóide CB₂ AM630 não demonstrou atividade frente a hiperalgesia induzida em nosso modelo (gráfico 8), descartamos a participação dos receptores CB₂ pelo menos na modulação endógena periférica da nocicepção muscular induzida por Cg.

Os trabalhos dos autores supracitados, porém, não aferiram alterações nociceptivas no músculo em função da interferência farmacológica em outros componentes que

integram o sistema endógeno canabinóide, a não ser seus receptores. Além disso, eles usaram uma estratégia que incluiu a introdução de agentes exógenos no sistema, e portanto, desconsideraram a influência de agentes sintetizados endogenamente, como os endocanabinóides.

A sinalização dos endocanabinóides é limitada por um processo eficiente de degradação através das enzimas FAAH ou pela MGL (DI MARZO *et al.*, 2006; DI MARZO *et al.*, 2008). Inibidores para estas duas enzimas já foram descritos (SEIERSTAD *et al.*, 2008). Ambas enzimas são encontradas no meio intracelular, portanto, para promoverem a degradação dos endocanabinóides é necessário que estes sejam interiorizados. A captação de endocanabinóides no espaço sináptico, mais notavelmente de AEA, possivelmente é facilitada por um transportador, para o qual já foram desenvolvidas substâncias capazes de inibi-lo (BELTRAMO *et al.*, 1997).

Agarwal *et al.*, (2007) demonstraram que os níveis de AEA e 2-AG estão elevados em condições inflamatórias, e que a ativação do receptor CB₁ periférico é dependente da ação desses ligantes. Considerando que as quantidades de AEA e 2-AG poderiam estar aumentadas devido à inflamação provocada por Cg, o que poderia ativar seus alvos moleculares em nosso modelo, nós verificamos a participação das enzimas FAAH e MAG, que degradam AEA e 2-AG, respectivamente, e também da proteína responsável pela captação da AEA. Nossos resultados indicam uma possível liberação de endocanabinóides durante o processo inflamatório induzido por Cg também no músculo. Uma vez que MAFP e VDM11 revertem o efeito hiperalgésico induzido pela Cg em sua maior dose, é razoável considerar que a AEA de fato poderia ser liberada durante o desenvolvimento da inflamação periférica muscular provocando a antinocicepção.

A hidrólise de 2-AG é uma reação catabolizada por MAG (PIOMELLI; SASSO, 2014). Experimentalmente, a inibição dessa enzima pode ser conseguida com o uso de JZL (WOODHAMS, *et al.*, 2012). Uma vez que em nossos experimentos JZL diminuiu a hiperalgesia muscular induzida por Cg acreditamos que exista uma liberação de 2-AG no músculo durante processos inflamatórios. 2-AG possui seletividade tanto para CB₁, que mostrou participar da modulação na hiperalgesia muscular, quanto CB₂, que aparentemente não participa dessa modulação (MECHOULAN R. *et al.*, 1995). Assim, em nosso modelo, como CB₂ parece não apresentar uma contribuição durante a modulação endógena periférica da hiperalgesia muscular, possivelmente 2-AG exerceria sua ação ativando receptores CB₁. Sobre a seletividade de 2-AG para os receptores CB₁, está em

conformidade com os resultados encontrados por Guindon *et al.* (2010). Por outro lado, a expectativa expressa em nossa hipótese de que há liberação de AEA e 2-AG no músculo poderá ser melhor elucidada em experimentos subsequentes, como por exemplo com a dosagem de 2-AG muscular por espectrometria de massa e gasosa.

Poucos artigos exploram a manipulação farmacológica, e portanto, dos efeitos relacionados à participação específica de cada componente do sistema endocanabinoide na hiperalgesia muscular. Nós mostramos que o receptor CB₁, mas não o receptor CB₂, modula em um nível periférico a hiperalgesia inflamatória muscular, e que a indução de inflamação muscular induzida por Cg não altera a expressão desse receptor no GRD. Além disso, destacamos o papel da AEA e o 2-AG no processo de modulação periférica da hiperalgesia muscular através da inibição de enzimas que os degradam e proteína que capta AEA da fenda sináptica. A inibição de FAAH e MAGL, com o uso de MAFP e JZL184 respectivamente, pode ter proporcionado um aumento na quantidade de AEA e 2-AG disponíveis, permitindo que ativassem, então, o receptor CB₁ canabinoide, elevando a sinalização inibitória já ao nível periférico. A afirmação de que esse receptor exerce um papel sobre a modulação endógena periférica da nocicepção muscular fica restrita ao fato de que seu antagonista intensificou a hiperalgesia causada pela injeção de Cg no m.TA. A hipótese de que tal receptor tem sua expressão elevada durante a inflamação muscular, permitindo um aumento do efeito anti-hiperalgésico modulado pelo sistema canabinoide no músculo, ou diminuída, justificando a diminuição do limiar nociceptivo no músculo frente a um estímulo inflamatório deve ser melhor explorada posteriormente tanto para canabinóides quanto para opióides, provavelmente através da verificação da expressão destes receptores diretamente no m.TA.

Considerando que as interações entre os sistemas de controle periférico são tão complexas quanto à dos sistemas de controle propostos a nível espinhal e central, e que a utilização de agonistas opióides e canabinóides está associada a vários efeitos colaterais devido à suas ações no SNC, como perda de memória, sedação, depressão respiratória e desenvolvimento de tolerância e dependência (HALL *et al.*, 2000; ASHTON, 2001; FREUND *et al.*, 2003; PACHER *et al.*, 2006). Seria importante o aprofundamento dos estudos da modulação periférica da dor inflamatória, incluindo desenvolver novas terapias que possam controlar também a dor inflamatória muscular já a nível periférico, minimizando os efeitos colaterais dos fármacos analgésicos comumente utilizados.

7 CONCLUSÃO

Nós mostramos que durante a hiperalgesia muscular há uma participação dos sistemas opióide e canabinóide que favorece a modulação da nocicepção. Esta modulação se dá pelos receptores μ -OR e κ -OR, que são ativados pelos peptídeos opióides, e pelo receptor CB_1 , que é ativado pela AEA ou 2-AG liberados durante o desenvolvimento do processo inflamatório. A ativação destes sistemas diminui a excitabilidade dos nociceptores e como consequência a resposta nociceptiva (fig. 10). Além disso nós não verificamos qualquer alteração nos níveis de expressão dos receptores μ -OR, κ -OR e CB_1 no GRD após um estímulo inflamatório provocado no músculo.

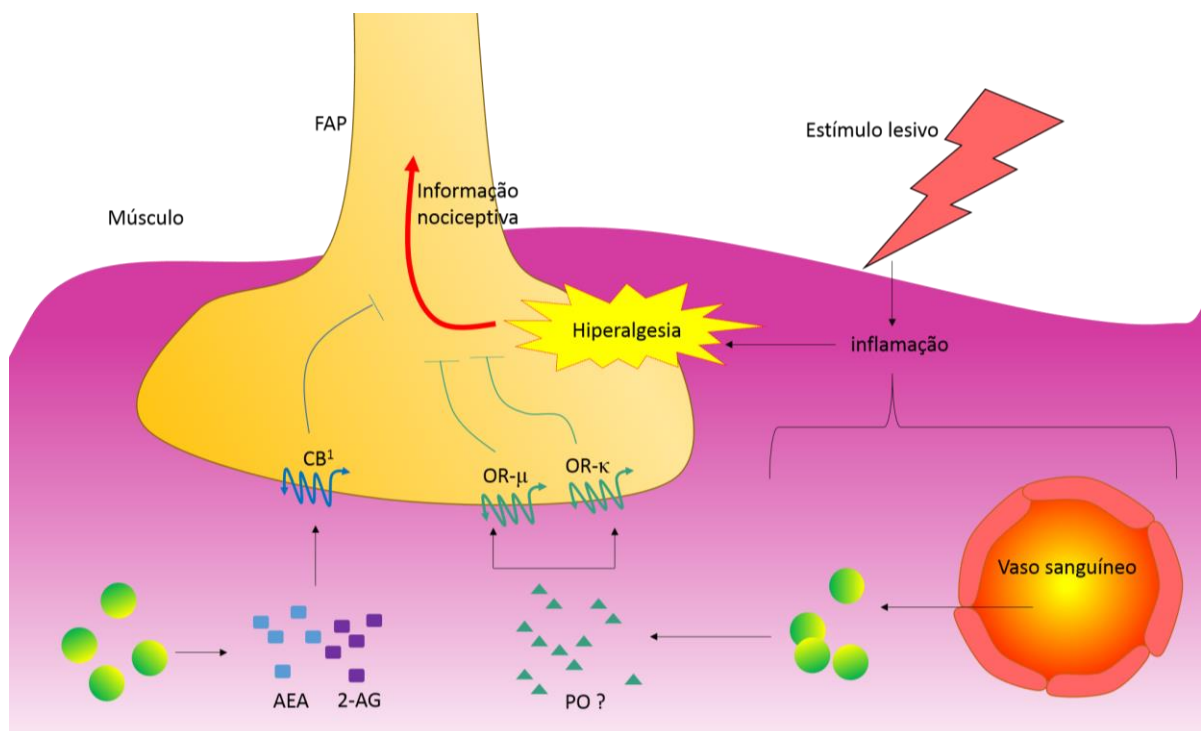


FIGURA 10. Modulação da nocicepção muscular inflamatória pelos sistemas opióide e canabinóide. 2-AG= 2- aracdonoilglicerol. AEA= anandamida. FAP= fibra aferente primária. PO= peptídeos opióides.

8 REFERÊNCIA

ANDRADE, A. *et al.* Opioid inhibition of N-type Ca²⁺ channels and spinal analgesia couple to alternative splicing. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1249- 1256, Oct. 2010.

AGARWAL, N. *et al.* Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. **Nature Neuroscience**, v.10, n.7, p.870-879, Jul. 2007.

AL-HASANI, R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior. **Anesthesiology**, v.15, n.6, p.1363-1381, Dec. 2011.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain research**, v.1000, n.1-2, p.40-56, Mar. 2004.

ALVAREZ, P. *et al.* IB4- saporin attenuates acute and eliminates chronic muscle pain in the rat. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 2, p. 859 - 865, Feb. 2012.

AMAYA, F. *et al.* Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates antihyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. **Pain**, v.124, n. 1-2, p.175–183, Sep. 2006.

ASTARITA, G., PIOMELI, D. Lipidomic analysis of endocannabinoid metabolism in biological samples. **Journal of Chromatography. B, Analytical technologiesem the biomedical and life sciences**, v.887, n.26, p.2755-2767, Sep. 2009.

BAGÜÉS, A.; MARTÍN, M.I.; SÁNCHEZ-ROBLES, E. M. Involvement of central and peripheral cannabinoid receptors on antinociceptive effect of tetrahydrocannabinol in muscle pain. **European Journal of Pharmacology**. v.15, n. 745, p.69-75, Dec. 2014.

BARNES, K. *et al.* Membrane peptidases in the peripheral nervous system of the pig: their localization by immunohistochemistry at light and electron microscopic levels. **Neuroscience**, v.44, n.1, p.245-61, 1991.

BELCASTRO, A. N. *et al.* Liver, and skeletal muscle xeloperoxidase activity during exercise. **Journal of applied physiology**. v.80, n.4, p.1331-1335, Apr. 1996.

BODNAR, R.J. Endogenous opiates and behavior: 2006. **Peptides**, v.28, n.12, p.2435–2513, Sep. 2007.

BORGHI, S. M. *et al.* Interleukin-10 limits intense acute swimming-induced muscle mechanical hyperalgesia in mice.**Experimental Physiology**. v.100, n.5, p. 531-544, Apr. 2015.

BORGHI, S. M. *et al.* Role of TNF- α /TNFR1 in intense acute swimming-induced delayed onset muscle soreness in mice.**Physiology & Behavior**. v.10, n.128, p. 277-287, Apr. 2014.

BORGHI, S. M. *et al.* Targeting interleukin-1 β reduces intense acute swimming-induced muscle mechanical hyperalgesia in mice. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.66, n.7, p.1009-1020, Jul. 2014.

BOURINET, E. *et al.* Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. **Proceedings of the National Academy of the United States of America**. v. 93, n. 4, p. 1486 – 1491, Feb. 1996.

BRACK, A. *et al.* Mobilization of opioid-containing polymorphonuclear cells by hematopoietic growth factors and influence on inflammatory pain. **Anesthesiology**, 100, n.1, 149-157, Jan. 2004 (a).

Brack, A. *et al.* Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression. **Pain**. v. 108, p. 67-75. 2004

BRACK, A. *et al.* Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception. **Anesthesiology**. v.101, n.1, p.204-211, Jul. 2004(a).

BOURINET, E. *et al.* Determinants of G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v.93, n.4, p.1486-1491. Feb.1996

BUCKLEY, N. E. The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. **British Journal of Pharmacology**, v.153, n.2, p.309-18, Jan. 2008.

BUSCH-DIENSTFERTIG, M.; STEIN, C. Opioid receptors and opioid peptide-producing leukocytes in inflammatory pain - basic and therapeutic aspects. **Brain, Behavior and Immunity**, v.24, n.5, p.683-694, jul. 2010.

CADONI, A. *et al.* Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD 10) by myelinated fibers of the peripheral nervous system. **Journal of Neuroimmunology**, v.45, n. 1-2, p.61-66. Jun. 1993.

CALIGNANO, A. *et al.* Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. **Nature**, v.394, n.6690, p.277-281, Jul. 1998.

CASTILLO, P. E. *et al.* Endocannabinoid signaling and synaptic function. **Neuron**, v.76, n. 4, p.70–81, Oct. 2002.

CHAMPMAN, C. R; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **The Lancet**, v.26, n.353, p.2253-2257, Jun. 1999.

COSTIGAN, M. *et al.* Neuropathic pain: A maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual review of neuroscience**, v 32, p 1-32, 2009.

CUNHA, F. Q. *et al.* The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v.107, n. 3, p. 660-664, Nov. 1992.

DENNING, G. M. *et al.* Proenkephalin expression and enkephalin release are widely observed in non-neuronal tissues. **Peptides**, v. 29, n. 1, p. 83- 92, Jan 2008.

DIEHL B.; HOHEISEL U.; MENSE S. Histological and neurophysiological induced by carrageenan in skeletal muscle of cat and rat. **Agents and actions**, v. 25, n. 3 - 4, p. 210 - 213, Dec. 1988.

DINA, O. A.; LEVINE, J. D.; GREEN, P. G. Muscle inflammation induces a protein kinase C ϵ - dependent chronic- latent muscle pain. **The journal of Pain**, v. 9, n. 5, p. 457 - 462, May 2008.

DINA, O.A.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. Role of IL-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. **Neuroscience**, v. 152, n. 2, p. 521-525, Mar. 2008.

DRAY A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, n. 2, p. 125-131, Aug. 1995.

ELMES, S. J. *et al.* Cannabinoid CB2 receptor activation inhibits mechanically evoked responses of wide dynamic range dorsal horn neurons in naive rats and in rat models of inflammatory and neuropathic pain. **The European Journal of Neuroscience**, v.20, n. 9, p.2311-2320, Nov. 2004.

FABRIZIO VINCENZI, F. *et al.* Pain Antinociceptive effect of the selective CB2 agonist MT178 in inflammatory and chronic rodent pain models. **Pain**. v.154, n.6, p.864-873, Jun. 2013.

FEREEIRA R. C. M. Participação do sistema endocanabinoidérgico no mecanismo antinociceptivo da Ketamina. 2014. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

FERREIRA S. H. *et al.* Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, p. 689 – 700, Aug. 1988.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. II- Prostaglandin hyperalgesia, the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalin and opioid antagonists. **Prostaglandin**, v. 18, n. 2, p. 191 - 200, Aug. 1979.

FIELDS, H.L. *et al.* Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibres. **Nature**, v.27, n.284, p.351–353, Mar. 1980.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **The Brain Research Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 129-141, Jan. 1999.

GOLD, M. S.; LEVINE, J. D. DAMGO inhibits prostaglandin E₂-induced potentiation of a TTX-resistant Na⁺ current in rat sensory neurons in vitro. **Neuroscience Letters**. v.212, n.2, p.83-86, Jul. 1996.

GUINDON, J. *et al.* Peripheral antinociceptive effects of inhibitors of monoacylglycerol lipase in a rat model of inflammatory pain. **British Journal of Pharmacology**, v.163, n.7, p.1464-1478, Aug. 2011.

GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. **British Journal of Pharmacology**. v.153, n. 2, p.319-334, Jan. 2008.

GUINDON. J.; HOHMANN A. G. The endocannabinoid system and pain. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v.8, n.6, p.403-421, Dec. 2009.

HASSAN, A. H. S. *et al.* Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. **Neuroscience**, v.55, n.1, p.185-195, Jul. 1993.

HEINL, C. *et al.* Distinct mechanisms underlying pronociceptive effects of opioids. **The journal of neuroscience**, v. 31, n. 46, p. 16748-16756, Nov 2011.

HERMANSON, D.J. *et al.* Substrate-selective COX-2 inhibition decreases anxiety via endocannabinoid activation. **Nature Neuroscience**, v.16, n.9, p.1291-1298, Sep. 2013.

HOHMANN, A. G.; HERKENHAM, M. Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. **Neuroscience**, v. 90, n.3, p.923-931, Mar. 1999.

HOHMANN, A.G. *Et al.* Selective activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses hyperalgesia evoked by intradermal capsaicin. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n.2, p.446-453, Nov. 2004.

HOLDCROFT, A.; JAGGAR, S. Core topics in pain. New York: Cambridge University Press, p.345, 2005.

HUA, S.; CABOT, P. J. Mechanisms of peripheral immune-cell-mediated analgesia in inflammation: clinical and therapeutic implications. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.31, n.9, p.427-433, Sep. 2010.

HUDA, A. *et al.* Endogenous opioids: biology and function. **Annual Review of Neuroscience**, v.7, p.223-55, Mar. 1984.

INGRAM, S. L.; WILLIAMS, J. T. Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase. **Neuron**, v.13, n.1, p.179-186, Jul. 1994.

JEANJEAN A.P. *et al.* Interleukin-1 beta induces long-term increase of axonally transported opiate receptors and substance P. **Neuroscience**, v. 68, n. 1, p. 151 -157, Sep. 1995.

JEANJEAN, A.P. *et al.* Interleukin-1 beta induces long-term increase of axonally transported opiate receptors and substance P. **Neuroscience**, v.68, n.1, p.151-157, Sep. 1995.

JHAVERI, M. D. *et al.* Analgesic effects of fatty acid amide hydrolase inhibition in a rat model of neuropathic pain. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of The Society For Neuroscience**, v.26, n.51, p.13318-13327, Dec. 2006

JHAVERI, M. D. *et al.* Cannabinoid CB2 receptor-mediated anti-nociception in models of acute and chronic pain. **Molecular Neurobiology**, v.36, n.1, p.26-35, Oct. 2007.

JL, R. *et al.* Expression of mu-, delta, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. **The Journal of Neuroscience**, v.15, n.12, p.8156-8166, Dec. 1995.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanism of nociception. **Nature**, v.13, n.413, p.203-210, Sep. 2001

KHASABOVA, I. A. *et al.* Increasing 2-arachidonoyl glycerol signaling in the periphery attenuates mechanical hyperalgesia in a model of bone cancer pain. **Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society**, v.64, n.1, p.60-67, Apr. 2011.

KHODOROVA, A. *et al.* Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. **Nature Medicine**, v.9, n.8, 1055-1061, Aug. 2003.

LABUZ, D. *et al.* T lymphocytes containing b-endorphin ameliorate mechanical hypersensitivity following nerve injury. **Brain, Behavior, And Immunity**, v.24, n., p.1045-1053, Apr. 2010.

LENDECKEL, U. *et al.* Review: the role of membrane peptidases in immune functions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.477, p.1-24, 2000.

LEVINE J.D.; TAIWO Y.O. **Inflammatory pain**. In: WALL D.; Melzack R. (Ed.). **Text Book of Pain**. 3ed. London: Churchill-Livingstone. Cap.2, p. 45 - 56, 1994.

LIU, J. *et al.* A biosynthetic pathway for anandamide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, n.36, p.13345-13350, Sep. 2006.

LORAM, L. C. *et al.* Cytokine profiles during carrageenan- induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **The journal of Pain**, v. 8, n. 2, p. 127 - 136, Feb. 2007.

MACHELSKA, H. *et al.* Selectins and integrins but not platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 regulate opioid inhibition of inflammatory pain. **British Journal of Pharmacology**. v.142, n.4, p.772–780, Jun. 2004.

MALAN, T. P, Jr. *et al.* CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. **Pain**, v.93, n.3, p.239-245, Sep. 2001.

MANSOUR, A. *et al.* Opioid-receptor mRNA expression. in the rat CNS: anatomical and functional implications. **Trends in Neurosciences**, V.18, n.1, p.22–29. Jan. 1995.

MECHOULAM, R. *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**. v. 29, n.50, p. 83- 90, Jun. 1995.

MEOTTI, F. C. *et al.* Inflammatory muscle pain is dependent on the activation of kinin B1 and B2 receptors and intracellular kinase pathways. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 3, p. 1127 - 1139, Jun. 2012.

MILLAN, M. J., Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v.66, n.6, p.355-474, Apr. 2002.

MOUSA, S. A. *et al.* Beta-endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. **Journal of Neuroimmunology**, V.115, n.1-2, p.71-78, Feb. 2001.

MOUSA, S. A. Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. **Journal Neuroimmunology**, v.126, n.1-2, p.5-15, Mai. 2002.

MURASE, S. *et al.* Bradykinin and Nerve Growth faktor play pivotal roles in muscular mechanical hyperalgesia after exercise (Delayed - onset muscle soreness). **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 10, p. 3752 - 3761, Mar. 2010.

MURASE, S. *et al.* Bradykinin and Nerve Growth faktor play pivotal roles in muscular mechanical hyperalgesia after exercise (Delayed - onset muscle soreness). **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 10, p. 3752 - 3761, Mar. 2010.

NOBLE, F.; ROQUES B. P. Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. **Expert Opin Therapeutic Targets**, v.11, n.2, p.145-159. Feb. 2007.

NUNES-SILVA, A. *et al.* Treadmill Exercise Induces Neutrophil Recruitment into Muscle Tissue in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner. An Intravital Microscopy Study AlbenaNunes-Silva. **Plos One**. v.9, n.5, May. 2014.

NÚÑEZ, S. *et al.* role of peripheral mu-opioid receptors in inflammatory orofacial muscle pain. **Neuroscience**. v.146, n.3, p.1346-1354, May. 2007.

OHARA H.; NAMIMATSU A.; FUKUHARA K. Release of inflammatory mediators by noxious stimuli: effect of neutropin on the release. **European Journal Pharmacol**, v.157, n. 1, p. 93 - 99, Nov. 1988.

PARE, M. *et al.* The Meissner corpuscle revised: a multiafferented mechanoreceptor with nociceptor immunochemical properties. **The Journal of Neuroscience**, v.21, n.18, p.7236-7246, Sep. 2001.

PARSONS, C. G. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Activation by endogenous opioids and role of the pituitary-adrenal axis. **Pain**, v.41, n.1, p.81-93, Apr. 1990.

PEAKE JM, *et al.* Exercise-induced muscle damage, plasma cytokines, and markers of neutrophil activation. **Medicine and Science in sports and exercise**. v.37, n.5, p.737-745, May. 2005

PEAKE, J.; NOSAKA, K.; SUZUKI, K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. **Exercise immunology review**. v.11, p.64-65, 2005.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature Reviews. Neuroscience**, v.4, n.11, p.873-884, Nov. 2003.

PIOMELLI, D. More surprises lying ahead. The endocannabinoids keep us guessing. **Neuropharmacology**, v.76 (part B), p.228-234, Aug. 2013.

PIOMELLI, D.; ASTARITA, G.; RAPAKA, R. A neuroscientist's guide to lipidomics. **Nature Reviews. Neuroscience**, v.8, n.10, p.743-754, 2007.

PIOMELLI, D.; SASSO, O. Peripheral gating of pain signals by endogenous analgesic lipids. **Nature Neuroscience**, v.17, n.2, p.164-174, Feb. 2014.

POOLE S. *et al.* Bradykinin B1 and B2 receptors, tumor necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 3, p. 649 - 656, Feb. 1999.

POOLE, S. *et al.* Bradykinin B1 and B2 receptors, tumor necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 3, p. 649 - 656, Feb. 1999.

PUEHLER, A. W. *et al.* Interleukin-1 beta contributes to the upregulation of kappa opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation. **Neuroscience**, v. 141, n. 2, p. 989 - 998, Aug. 2006.

PUEHLER, A. W, *et al.* Rapid upregulation of μ opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neural conduction. **Neuroscience**, v. 129, n.2, p. 473-479, 2004.

RADAK, Z. *et al.* Nitric oxide: is it the cause of muscle soreness? **Nitric Oxide**, v. 26, n. 2, p. 89 - 94, Feb. 2012.

RADHAKRISHNAN, R.; MOORE, S. A.; SLUKA, K. A. Unilateral carragenina injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. **Pain**, v. 104, n. 3, p. 567 - 577, Aug. 2003.

RAINVILLE, P. Pain mechanism of pain affect and pain modulation. **Current Opinion in Neurobiology**, V.12, n.2, p.195-204, Apr. 2002.

RANDALL L.O., SELITO J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. **Arch IntPharmacodyn**, v. 111, p. 409 - 419, 1957.

RESENDE, M. A. *et al.* Blockade of opioid receptors in the medullary reticularis nucleus dorsalis, but not the rostral ventromedial medulla, prevents analgesia produced by diffuse noxious inhibitory control in rats with muscle inflammation. **The Journal of Pain**, v. 12, n. 6, p. 687 - 697, Jun. 2011.

RICHARDSON, J.D.; KILO, S.; HARGREAVES, K. M. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. **Pain**, v. 75, n.1, p.111-119, Mar. 1998.

RIEDEL W.; NEECK G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v. 60, n. 6, p. 404 - 415, Dec. 2001.

RITTNER, H. L. *et al.* Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. **Anesthesiology**, v.95, n.2, p.500-508, Aug. 2001.

RITTNER, H.L.; STEIN, C. involvement of cytokines, chemokines and adhesion molecules in opioid analgesia. **European Journal of pain**, v.9, n.2, p.109-112, Apr. 2005.

ROQUES, B. P; FOURNIÉ-ZALUSKI, M. C.; WURM, M. Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain. **Nature Review. Drug Discovery**, v.11, n.4; p.292-310, Apr. 2012.

ROQUES, B. The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. **Nature**, v.20, n.288, p.286-288, Nov. 1980

RUSIN, K. I. *et al.* Kappa-opioid receptor activation modulates Ca²⁺ currents and secretion in isolated neuroendocrine nerve terminals. **The Journal of Neuroscience**, v.17, n.17, p.6565-6574, Sep. 1997.

SÁNCHEZ ROBLES, E. M., BAQUÉS ARIAS, A. MARTÍN FONTELLES, M. I. Cannabinoids and muscular pain. Effectiveness of the local administration in rat. **European Journal of Pain**. V.16, n.8, p. 1116-1127, Sep. 2012.

SÁNCHEZ ROBLES, E. M.; MARTÍN, M.I.; SÁNCHEZ-ROBLES, E. M. Canabinóide and muscular pain. Effectiveness of the local administration in rat. **European Journal of Pain**. v.16, n.8, p.1116-1127.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**. n.5, p.1062-1067, Nov. 2002.

SCHREITER, A. *et al.* Pain inhibition by blocking leukocytic and neuronal opioid peptidases in peripheral inflamed tissue. **FASEB Journal**. v.26, n.12, 5161-5171, Aug. 2012.

SKYBA, D. A.; RADHAKRISHNAN, R.; SLUKA, K. A. Characterization of a method for measuring primary hyperalgesia of deep somatic tissue. **The Journal of Pain**, v. 6, n. 1, p. 41 - 47, Jan. 2005.

SLUKA, K. A. Mechanisms and management of pain for the physical therapist. Seattle: International Association of Study of Pain, p.394, 2009.

STÄNDER, S. *et al.* Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. **Journal of Dermatological Science**, v.38, n. 3, p.177-188, Jun. 2005.

STEIN, C. *et al.* No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia. **The Journal of Clinical Investigation**, v.98, n.3, p.793-799, 1996.

STEIN, C. *et al.* Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.87, n.15, p.5935-5939, Aug. 1990.

STEIN, C.; MACHELSKA, H.; SCHÄFER, M. Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v.60, n.6, p.416-424, Dec. 2001.

STEIN, C.; SCHÄFER, M.; MASHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nature Medicine**, v.9, n.8, p.1003-1008, Aug. 2003.

STEINER, C. The control of pain peripheral tissue by opioids. *The new England journal of medicine*. v.332, n. 25, p. 1685-1690, Jun. 1995.

SUGAWARA, K. *et al.* Cannabinoid receptor 1 controls human mucosal-type mast cell degranulation and maturation in situ. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.132, n.1, p.182-193, Jul. 2013.

TIDBALL, J. G. (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v.288, n.2, p.345-353, Feb. 2005.

TORRECILLA, M. *et al.* G-protein-gated potassium channels containing Kir3.2 and Kir3.3 subunits mediate the acute inhibitory effects of opioids on locus ceruleus neurons, v.22, n.11, p.4328-4334, Jun. 2002.

TRELLE, S. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. **The BMJ**, v.342, 7086, Jan 2011.

TRUONG, W. *et al.* Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. **Annals of Neurology**, v.53, n,3, p.366–375, Mar. 2003.

UEDA, N.; TSUBOI, K.; UYAMA, T. Metabolism of endocannabinoids and related N-acyl ethanolamines: canonical and alternative pathways. **The FEBS Journal**, v.280, n.9, p.1874-1894, May. 2013.

VANDERAH, T. W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North American**, v. 91, p. 1-12, 2007.

VERESS, G. *et al.* Characterisation of cannabinoid 1 receptor expression in the perikarya, and peripheral and spinal processes of primary sensory neurons. **Brain Structure and Function**, v. 218, n.3, p. 733-750, May. 2013.

WAKSMAN, G. *et al.* Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase "enkephalinase" and of mu and delta opioid receptors in rat brain. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.83, n.5, p.1523-1527, Mar. 1986.

WATERFIELD, J. A.; HUGHES, A. A; KOSTERLITZ, H. W. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. **Nature**,v.9, n.267, p.495–499, Jun. 1977.

WENK, H. N.; HONDA, C. N. Immunohistochemical localization of delta opioid receptors in peripheral tissues. **The Journal of Comparative Neurology**, v.408, n.4, p.567-579, Jun. 1999.

WOODCOCK, J. A difficult balance-pain management, drugsafety, and the FDA. **The New England Journal of Medicine**, v.361, n. 22, p. 2105- 2107, Nov 2009.

WOODHAMS, S. *Get al.*Spinal administration of the monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 produces robust inhibitory effects on nociceptive processing and the development of central sensitization in the rat.**British Journal of Pharmacology**. v.167, n. 8, p. 1609- 1619, Dec 2012.

YAO, B.; MACKIE, K. Endocannabinoid receptor pharmacology. **Current Topics Behavioral Neurosciences**, v.1, p. 37-63, 2009.

YOKOYAMA, T. *et al.* Pregabalin reduces muscle and cutaneous hyperalgesia in two models of chronic muscle pain in rats. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 5, p. 422 - 429, May. 2007.

ZAMPONI, G. W.; SNUTCH, T, P. Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. **Current Opinion in Neurobiology**, v.8, n.3, p.351-356, Jun. 1998.

ZHOU, L. *et al.* Contribution of opioid receptors on primary afferent versus sympathetic neurons to peripheral opioid analgesia. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.286, n.2, 1000-1006, Aug. 1998.

ZÖLLNER, C. *et al.* Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. **Molecular Pharmacology**, v.64, n.2, p.202-210, Aug. 2003.