

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

**Efeito antinociceptivo periférico da Melatonina via  
ativação dos receptores  $MT_1/MT_2$ , endocanabinoides,  
canabinoide  $CB_1$  e de  $PI3K\gamma$**

**Tháís de Menezes Noronha**

BELO HORIZONTE  
2021

Thais de Menezes Noronha

**Efeito antinociceptivo periférico da Melatonina via ativação dos receptores MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub>, endocanabinoides, canabinoide CB<sub>1</sub> e de PI3K $\gamma$**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, com área de concentração em Farmacologia.

**Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero**

BELO HORIZONTE

202

043

Noronha, Thais de Menezes.

Efeito antinociceptivo periférico da Melatonina via ativação dos receptores MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub>, CB<sub>1</sub> canabinoides e de PI3K $\gamma$  [manuscrito] / Thais de Menezes Noronha. - 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero.

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

1 Melatonina. 2. Dor. 3. Analgesia. 4. Receptor MT1 de Melatonina. 5. Receptor MT2 de Melatonina. 6. Receptor CB1 de Canabinoide. 7. Fosfatidilinositol 3-Quinases. I. Romero, Thiago Roberto Lima. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615

## **AGRADECIMENTOS**

**A Deus**, por me sustentar em todos os momentos.

**Ao meu orientador**, professor Thiago Roberto Lima Romero, minha imensa gratidão por ter me aberto portas ainda na iniciação científica, me ensinando a importância da ciência e o quão ela é maravilhosa. Obrigada pelo incentivo, paciência, e por sempre acreditar em mim.

**Aos professores da PG- FisFar**, pela competência ao ensinar.

**Aos meus colegas de laboratório**, em especial a Bárbara Formiga Gonçalves de Querioz, Cristina da Costa Oliveira, Douglas Lamounier de Almeida, Flávia Fonseca por toda ajuda, amizade e companheirismo. Ao Daniel Portela, Vanessa Kaiser, Danielle Diniz, Loyara Rocha, Amanda Cristina Gonzaga, Marla Calazans, Renata Mendes, Raquel Rodrigues e Wiliam Valadares pelos bons momentos vividos.

**Aos órgãos de fomento:** CNPq, CAPES e FAPEMIG.

**Aos meus pais João e Maria de Lourdes, meu irmão André, ao Leandro e a Larissa**, por sempre estarem ao meu lado nos momentos difíceis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**2-AG** - 2- araquidonoil glicerol

**AANAT**- Serotonina N-acetiltransferase

**ACEA** - Araquidonil-2-cloroetilamida

**ACh** – acetilcolina

**AEA** - N-araquidonil etanolamina

**AINEs** - Antiinflamatórios não-esteroidais

**AKT** – proteína quinase B

**AM251** - 1-(2,4-diclorofenil)-5-(iodofenil)-4-metil-N-(1 piperidil)pirazole-3-carboxamida.

**AM630** - [6-iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il](4etoxifenil)metanona.

**AMPc** - 3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico

**Ca<sup>2+</sup>** - cálcio

**CEUA**- Comissão de Ética no Uso de Animais

**CFA** - Adjuvante completo de Freund

**CG** - Carragenina

**DAG** - Diacilglicerol

**eNOS** - Oxido nítrico sintase endotelial

**EPM** - Erro padrão da média

**FAAH** - Ácido graxo amida hidrolase

**PLC** - Fosfolipase C

**GC** – guanilato ciclase

**GMPc** - monofosfato cíclico de guanosina

**GPCRs** – receptores acoplados à proteína G

**i.c.v.** – intracerebroventricular

**i.p** – intraperitoneal

**i.pl.** – intraplantar

**IASP** – Associação Internacional para o Estudo da Dor

**IP<sub>3</sub>** - inositol trifosfato

**IUPHAR** - União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica

**K<sup>+</sup>** - potássio

**K<sub>ATP</sub>** – canal para potássio sensível ao ATP

**Kg** – quilograma

**MAGL** - monoacilglicerol lipase

**MDA** - malondialdeído

**mg** – miligrama

**MT** – melatonina

**NADA** - *N*-araquidonoil dopamina

**NMDA** - *N*-metil-*D*-aspartato

**nNOS** - óxido nítrico sintase neuronal

**NO** – óxido nítrico

**NOS** – óxido nítrico sintase

**OEA** - oleoiletanolamida

**PEA** – palmitoiletanolamina

**PGE<sub>2</sub>** – prostaglandina E<sub>2</sub>

**PI3K $\gamma$**  - fosfatidilinositol 3-quinase  $\gamma$

**PIP<sub>2</sub>** - fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

**PKA** – proteína quinase A

**PKC** – proteína quinase C

**PKG**- proteína quinase G

**PLD** – fosfolipase D

**SNC** – sistema nervoso central

**THC** -  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol

**TPH** - triptofano hidroxilase

**$\mu$ L** – microlitros

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Teste algesimétrico para mensuração do limiar nociceptivo na pata de camundongos.

**Figura 2** – Administração de fármacos por via intraplantar.

**Figura 3** – Curva temporal do efeito da administração intraplantar de melatonina (MT; 10, 30, e 100 µg/pata) sobre a hiperalgesia induzida por carragenina.

**Figura 4** – Exclusão de efeito antinociceptivo sistêmico da melatonina

**Figura 5** - Antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da melatonina 100 µg/pata induzido por Luzindole (50, 100 e 200 µg/pata).

**Figura 6** – Antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da melatonina 100 µg/pata induzido por AM251 (40, 80 e 160 µg/pata).

**Figura 7** – Efeito do AM630 sobre a antinocicepção periférica da Melatonina 100 µg/pata.

**Figura 8** – Efeito do AS-605240 frente à antinocicepção induzida por melatonina.

**Figura 9** - Mecanismo de ação analgésica periférica da melatonina.

## RESUMO

A melatonina é um importante neurohormônio envolvido em vários processos fisiológicos como regulação do ciclo sono, propriedade ansiolítica, antioxidante, e recentemente ganhou visibilidade na área do estudo da dor e analgesia. No entanto, os mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva da melatonina não estão bem elucidados. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a participação do sistema melatoninérgico, sistema canabinoide, e da PI3K frente à antinocicepção periférica induzida por melatonina. Utilizou-se o método de compressão de pata, para avaliar o limiar nociceptivo de camundongos Swiss machos pesando 35 g. Todas as drogas foram administradas num volume de 20  $\mu$ L, em uma injeção intraplantar subcutânea na pata posterior direita dos animais em n = 5 por grupo, sendo a hiperalgesia induzida por carragenina (200  $\mu$ g/pata). A melatonina induziu um efeito antinociceptivo periférico de forma dose-dependente (10, 30 e 100  $\mu$ g). O antagonista não seletivo de melatonina, luzindole, foi capaz de reverter a atividade antinociceptiva da melatonina também de forma dose-dependente. O antagonista seletivo do receptor CB<sub>1</sub> canabinoide, AM251 (40, 80 e 160  $\mu$ g/pata) mas não o antagonista seletivo do receptor CB<sub>2</sub> canabinoide, AM630 (100  $\mu$ g) reverteu o efeito antinociceptivo da melatonina de maneira dose-dependente. Os inibidores da degradação e recaptaçãode endocanabinoides MAFP (0,5), JZL (4,0  $\mu$ g) e VDM11 (2,5  $\mu$ g) potencializaram a ação da melatonina em sua menor dose, respectivamente. Finalmente o AS 605240, inibidor da PI3-kinase  $\gamma$  (50, 100, 200  $\mu$ g/pata) também foi capaz de antagonizar parcialmente a atividade antinociceptiva da melatonina. Os resultados sugerem que a melatonina induz efeito antinociceptivo periférico através da ativação dos receptores MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>, além da possível liberação de endocanabinoides com consequente ativação do receptor canabinoide CB<sub>1</sub>, e posterior ativação da via intracelular iniciada pela PI3K $\gamma$ .

**Palavras-chave:** dor, melatonina, analgesia, canabinoide PI3-kinase  $\gamma$

## ABSTRACT

Melatonin is an important neurohormone produced by the pineal gland and it is involved in the regulation of various physiological processes such as sleep-awake-cycle control, antioxidative, blood pressure, body temperature, cortisol rhythm modulation, and immune function. Recently melatonin has been shown to play an important role in pain regulation and antinociception processes. However, the mechanisms involved in this antinociceptive activity of melatonin are not well elucidated. Thus, the study aimed to evaluate the role of the melatonergic system, cannabinoid system, and the endogenous PI3K/AKT pathway in melatonin-induced peripheral antinociception. We used the paw compression method to evaluate the nociceptive threshold of male Swiss mice weighing 35-40 g. All drugs were administered in a volume of 20  $\mu$ L, injected on the right hind paw (n = 5 per group). Hyperalgesia was induced by carrageenan (200  $\mu$ g/paw). Melatonin induced a peripheral antinociceptive effect in a dose-dependent manner (10, 30, and 100  $\mu$ g). The non-selective melatonin receptor antagonist, luzindole, was able to reverse the antinociceptive effect of melatonin in a dose-dependent manner. The selective antagonist of CB1 cannabinoid receptor, AM251 (40, 80, and 160  $\mu$ g / paw) antagonized the antinociceptive effect of melatonin in a dose-dependent manner, however, the selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor, AM630 (100  $\mu$ g) was unable to antagonize this effect. The reuptake and hydrolysis inhibitors of endocannabinoids MAFP, JZL, and VDM11 (0.5, 4.0, and 2.5  $\mu$ g) potentiated the action of melatonin at its lowest dose. AS 605240, an inhibitor of PI3K $\gamma$  (50, 100, 200  $\mu$ g/paw) dose-dependently antagonized the antinociceptive activity of melatonin. The results obtained by melatonin inducing the peripheral antinociceptive effect through the activation of MT1 and MT2 receptors, in addition to the possible release of endocannabinoids with consequent activation of the CB1 cannabinoid receptor, and subsequent activation of the intracellular pathway induced by PI3K $\gamma$ .

**Palavras-chave:** pain, melatonin, analgesia, cannabinoid, PI3-kinase  $\gamma$

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	12
Considerações gerais sobre a dor.....	12
Transmissão ascendente da dor .....	13
Modulação descendente da dor .....	14
Melatonina.....	16
Sistema canabinoide e analgesia.....	19
Via intracelular iniciada por PI3K $\gamma$ e analgesia.....	22
JUSTIFICATIVA .....	24
OBJETIVOS GERAIS.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
Animais de experimentação .....	26
Teste algésimétrico de mensuração da hiperalgesia da pata de camundongo	26
Fármacos e solventes .....	28
Administração das drogas .....	29
Procedimento experimental.....	30
Análise estatística .....	30
RESULTADOS .....	31
1.0 Caracterização da ação antinociceptiva da melatonina ao nível periférico e participação do sistema melatoninérgico .....	31
2.0 Participação do sistema canabinoidérgico no evento antinociceptivo periférico induzido por melatonina. ....	34
3.0 Participação de PI3K $\gamma$ no evento antinociceptivo periférico induzido por melatonina.....	37

DISCUSSÃO .....	38
REFERÊNCIAS.....	47

## INTRODUÇÃO

### Considerações gerais sobre a dor

A dor é uma das razões mais comuns para a busca por um serviço de saúde. Sabe-se que a experiência de dor se manifesta de formas diferentes em cada indivíduo, sofrendo influência de múltiplos fatores biológicos, sociais e emocionais (FILLINGIM, 2017).

Quando a dor persiste por semanas ou meses, seus efeitos negativos na qualidade de vida são intensos. As atividades de vida diária, desempenho profissional, vida familiar e saúde mental podem ser significativamente prejudicadas. (GUREJE ET AL., 1998).

Nos Estados Unidos, estima-se que em 2012, 25 milhões de pessoas experimentavam a sensação dolorosa diariamente (NAHIN, 2015). Em toda a Europa, estima-se que 1,5% a 3% de seu PIB foi gasto para o tratamento da dor (HENSCHEKE; KAMPER; MAHER, 2015).

No Brasil, um estudo publicado em 2018 demonstrou que 76% da população brasileira sofre com dor crônica. Metade dos entrevistados com dor crônica experimentavam a sensação dolorosa diariamente. Sendo a intensidade da dor classificada como moderada em 57,28% dos casos (CARVALHO ET AL., 2018).

Apesar de incômoda, a sensação dolorosa apresenta um importante papel na sobrevivência e integridade física, funcionando como um sinal de alerta para alguma anormalidade no organismo, bem como mecanismo de proteção para potenciais lesões (MILLAN, 1999). Assim, quando surgem patologias que afetam essa sensação dolorosa, como a insensibilidade congênita devido a erros ou deleções de genes responsáveis pela deflagração da dor, como o gene SC9A, há um maior risco de o indivíduo se lesionar repetidas vezes com consequente automutilação inconsciente (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2010).

A partir da necessidade de se estudar a dor, em 1973, John J. Bonica fundou a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), que em 1979, definiu a dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, a qual é associada a um dano tissular real, potencial ou descrita em termos de tais lesões”.

Em 2020, este conceito foi atualizado pela IASP, na qual definiu-se como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a um dano real ou potencial ao tecido.

Tendo em vista a complexidade em se mensurar o componente emocional da dor durante a experimentação animal é comum, mesmo que de forma controversa, a utilização do termo nocicepção se referindo a comportamentos aversivos do animal frente aos experimentos. Este termo está relacionado com o reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso, que interpretam as informações relacionadas à lesão. (WOOLF, 2010).

A dor pode ser classificada em 4 diferentes tipos: (1) a dor nociceptiva ou neurogênica ocorre através de um estímulo nocivo, funcionando como um alarme a estímulos exógenos, calor, frio, compressão, picadas e queimaduras, por exemplo, e endógenos como a dor proveniente de uma isquemia do miocárdio; (2) dor inflamatória, que é deflagrada a partir da ativação da resposta inflamatória, através da liberação de citocinas e extravasamento de plasma; (3) dor neuropática, decorrente de uma lesão neuronal seja periférica ou central (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2010); (4) dor idiopática, que não é protetora, mas sim adaptativa decorrente do funcionamento anormal do sistema nervoso, sem que se tenha um estímulo nocivo evidente (WOOLF, 2010).

### **Transmissão ascendente da dor**

Para se proteger contra lesões teciduais, é necessário que o corpo seja capaz de reconhecer estímulos. Esse reconhecimento se dá através de um sistema sensorial que detecta estímulos nocivos (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2010).

Dessa forma, em 1903 foi proposta a existência de um conjunto de terminações nervosas que tinham como papel perceber estímulos nocivos. Mais tarde, foi postulada a definição de nociceptores, que seriam os responsáveis por reconhecer estímulos potencialmente lesivos (MCMAHON; KOLTZENBURG, 1990). Para que a experiência de dor seja deflagrada, é preciso que os estímulos nocivos, sejam eles térmicos, mecânicos e químicos apresentem alto limiar de estimulação nos nociceptores nos terminais nervosos.

Estes nociceptores podem ser classificados em dois tipos de acordo com sua dimensão, estrutura e velocidade de condução: (i) fibras A $\delta$ , de diâmetro e velocidade de condução intermediários, mielinizadas; (ii) fibras C pequeno diâmetro, não mielinizadas e velocidade de condução lenta (MILLAN, 1999).

As fibras A $\delta$  captam estímulos térmicos, mecânicos, e quando ativados geram sensação dolorosa bem localizada e específica, característica da dor aguda. As fibras C captam estímulos térmicos, mecânicos e químicos, e por isso são também chamadas de polimodais. Quando ativadas geram sensação dolorosa difusa e inespecífica (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Na via ascendente da dor, um estímulo nociceptivo, seja ele térmico mecânico ou químico, estimula às fibras ascendentes A $\delta$  e/ou C, na qual os neurônios aferentes de primeira ordem irão incidir da periferia até o corno dorsal da medula, fazendo sinapses com os neurônios aferentes de segunda ordem, que por sua vez, ascendem até o tálamo, fazendo sinapses com os neurônios ascendentes de terceira ordem, projetando-se para o córtex cerebral, onde os estímulos nocivos serão processados e interpretados ao nível de consciência. (BASBAUM et al., 2009; JULIUS, 2001).

### **Modulação descendente da dor**

Em 1965, Melzak e Wall, propuseram a teoria do portão da dor, na qual, segundo essa teoria, as informações nociceptivas periféricas que chegam ao corno dorsal da medula não são automaticamente transferidas para os centros superiores. De forma que o impulso aferente de dor é modulado por diferentes vias antes que a percepção dolorosa seja deflagrada. (MELZACK; WALL, 1965)

Quando as fibras de grande calibre, mielinizadas e responsáveis pela sensação do tato como as do tipo A $\beta$  são estimuladas, ocorre uma inibição da transmissão dos impulsos do corno dorsal da medula espinhal para os centros superiores (portão se fecha), resultando em uma não transmissão de estímulos nociceptivos para centros superiores da via da dor. A estimulação das fibras do tipo A $\delta$  e C tendem a facilitar a transmissão dos impulsos para os centros superiores

(portão se abre), gerando a sensação desagradável de dor (KLAUMANN, WOUK, SILLAS 2008).

A hipótese de que existia um controle endógeno da dor foi fortemente sustentada por Reynolds (1969), na qual a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal foi capaz de induzir antinocicepção em ratos sem a necessidade de nenhum fármaco para a realização de uma laparotomia exploradora.

A partir de então, diferentes sítios relacionados à modulação da dor foram descobertos, tais como: hipotálamo, núcleo magno da rafe, núcleo reticular paragigantocelular, núcleo parabraquial, loco cerúleo, núcleo do trato solitário e núcleo reticular dorsal (MILLAN, 1999).

Posteriormente, diferentes neurotransmissores foram associados a esse controle endógeno da dor, como os peptídeos opioides endógenos, sendo eles  $\beta$ -endorfinas, dinorfinas e encefalinas (HOLDEN; JEONG; FORREST, 2005). Este fato foi confirmado quando a administração de um antagonista de receptores opioides, a naloxona, foi capaz de reverter a analgesia induzida por estresse ou estimulação elétrica (WATKINS; MAYER, 1982).

Além dos peptídeos opioides, diversos outros mediadores químicos já foram descritos por atuar no controle endógeno da dor, são eles: noradrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina, entre vários outros como os endocanabinoides revisto por (SANDKIUHLER, 1996).

## Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um importante neurohormônio sintetizado principalmente pela glândula pineal, mas também pode ser sintetizada em outros órgãos, células e tecidos, como retina, células da medula óssea, linfócitos, pele, útero e trato gastrointestinal, compondo a produção periférica da melatonina. Está envolvida em diversos processos fisiológicos nos mamíferos, induzindo importantes efeitos como, regulação do ciclo circadiano, ansiolítico, antioxidante, anticonvulsivante, de imunomodulação além do efeito antinociceptivo (HERNÁNDEZ-PACHECO et al., 2008; PETER; ANDERSEN, 2016; SLOMINSKI et al., 1996).

É sintetizada a partir de um aminoácido precursor, o L-triptofano, e sua formação depende basicamente de duas enzimas, triptofano hidroxilase (TPH) e serotonina N-acetiltransferase (AANAT). A TPH transforma o L- triptofano em 5-hidroxitriptofano, que por sua vez sofre a ação a AANAT, transformando-o em N-acetil-5-hidroxitriptamina, que sofre ação através da hidroxiindole-O-metiltransferase, formando finalmente a N-acetil-5-metoxitriptamina, também conhecida como melatonina (ZAWILSKA; SKENE; ARENDT, 2009).

O gatilho para sua síntese só acontece na ausência de luminosidade, respeitando o ciclo natural claro-escuro. Este processo envolve sinapses entre o nervo óptico, núcleo supraquiasmático, hipotálamo lateral e fibras pré-ganglionares da medula espinhal, que irão se comunicar com o gânglio cervical superior, deflagrando o sinal até a glândula pineal (AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018).

Suas ações estão associadas à ativação de dois receptores próprios, do tipo GPCRs, denominados MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>. Ambos os receptores são acoplados a proteína G<sub>i/o</sub>, e MT<sub>1</sub> é acoplado adicionalmente à proteína G<sub>q</sub> (JOCKERS et al., 2016). Existe ainda um terceiro ligante para melatonina, denominado MT<sub>3</sub>, na qual imaginava-se ser um terceiro subtipo de receptor melatoninérgico, entretanto, atualmente é considerado como uma enzima quinona redutase 2 (NOSJEAN et al., 2000).

Estes receptores são encontrados em uma variedade de órgãos e tecidos centrais, como cerebelo, hipocampo, e estruturas formadoras das vias centrais dopaminérgicas. (SRINIVASAN et al., 2010).

Este neurohormônio tem como função fisiológica clássica o comando do ciclo circadiano no sistema nervoso central, onde já foi demonstrada a correlação entre a melatonina e a temperatura corporal central. Entretanto, os mecanismos pelos quais a melatonina induz o sono ainda não estão totalmente elucidados. (LOK et al., 2019).

Além disso, a melatonina possui alguns outros papéis de ação central, como agente ansiolítico, onde já foi demonstrado que os receptores  $MT_1$  e  $MT_2$  estão envolvidos neste processo (LIU; CLOUGH; DUBOCOVICH, 2017). E também como agente anticonvulsivante, nas quais os receptores melatoninérgicos, gabaérgicos e serotoninérgicos parecem funcionar como mediadores (DASTGHEIB; MOEZI, 2014).

Na periferia podemos encontrar receptores melatoninérgicos nos testículos, glândula mamária, retina, aorta, rim, fígado, vesícula biliar, pele, corno dorsal da medula espinhal, em maior densidade na lâmina superficial I-V e X, e sistema imune (AMBRIZ-TUTUTI et al., 2009). Na pele podemos observar a presença de receptores melatoninérgicos em diferentes células, como melanócitos, fibroblastos, e queratinócitos normais e malignos (SLOMINSKI et al., 2003, 2005). No corno dorsal da medula espinhal foi identificada a expressão de receptores melatoninérgicos  $MT_1$  e não  $MT_2$  (OLIVEIRA-ABREU et al., 2018).

Existem ainda evidências de que a melatonina exerce seus efeitos através de sua interação com outros sistemas, como o opióide, nitrérgico gabaérgico e receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (HERNÁNDEZ-PACHECO et al., 2008; PETER; ANDERSEN, 2016).

Nos últimos tempos a ação antinociceptiva da melatonina vem ganhando destaque no meio científico.

Diversos estudos experimentais em ratos e camundongos têm demonstrado a participação da melatonina como agente antinociceptivo, mas—o mecanismo pelo qual isso acontece ainda não está bem elucidado. Até então se sabe que além de ativar receptores próprios, a melatonina reduz a neurotransmissão excitatória

através de vários mecanismos, como ativação de receptores opióides e inibição de correntes de cálcio ativadas por voltagem (HERNÁNDEZ-PACHECO et al., 2008).

O efeito antinociceptivo central da melatonina foi observado por MICKLE e colaboradores (2010), onde a melatonina foi capaz de atenuar a hiperalgesia visceral pós-inflamatória em ratos envolvendo o sistema opioidérgico central.

Já em outro estudo, a co-administração de melatonina e morfina em um modelo de estimulação mecânica e térmica em pata traseira de ratos, foi capaz de inibir hiperalgesia e atenuar a tolerância induzidos por morfina. Esses efeitos foram associados a atividade da proteína quinase C (PKC) e um subtipo de receptor NMDA, NR1 (SONG; WU; ZUO, 2015).

Adicionalmente, os receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , receptores nicotínicos e muscarínicos, também já foram associados ao mecanismo de ação da melatonina quando administrada por via intratecal. Onde esta foi capaz de atenuar a hiperalgesia induzida pelo teste da formalina na pata de ratos (SHIN et al., 2011).

Em um estudo experimental realizado em ratos com pleurisia induzida por carragenina, verificou-se que aqueles que foram tratados com melatonina (doses 12,5, 25, 50 mg/kg i.p), apresentaram no exsudato analisado, níveis de prostaglandina completamente inibidos de forma dose-dependente, se comparados aos não tratados (CUZZOCREA et al., 1999).

Outro estudo demonstrou a melatonina atuando como agente analgésico em um modelo de dor neuropática por constrição do nervo ciático, onde o receptor  $MT_2$  parece estar envolvido neste evento (LIN et al., 2017).

Finalmente, um dos mecanismos pelo qual a melatonina atua gerando antinocicepção periféricamente foi sugerido por (HERNÁNDEZ-PACHECO et al., 2008), em seu estudo experimental com ratos, onde a melatonina administrada localmente foi capaz de ativar a via NO-GC-GMPC-PKG além de abrir canais de  $K^+$  induzindo hiperpolarização celular.

## Sistema canabinoide e analgesia

Os efeitos psicoativos do  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), derivado da *Cannabis sativa*, vêm sendo pesquisado em larga escala ao longo de anos e apresenta efeitos centrais e periféricos. Sabe-se que além de suas ações psicoativas, como sensação de relaxamento, bem-estar, consciência sensorial aguçada, comprometimento da memória em curto prazo, e prejuízo da coordenação motora, o THC também apresenta outras, tais como efeito analgésico, anti-inflamatório, imunossupressor, anticonvulsivante, antiemético, e redutor da pressão intraocular no glaucoma (MUNRO, THOMAS, 1993, RANG et al., 2012).

O seu efeito analgésico passou a ser mais bem entendido através de experimentos em animais, que demonstraram que existem receptores específicos para os canabinóides em vários locais nas vias de transmissão e modulação da dor, como terminais periféricos e centrais de aferências primárias, neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal, tálamo e córtex (AGARWAL et al., 2007; ZOU; KUMAR, 2018).

Os receptores canabinoides foram nomeados pela União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR), de acordo com sua ordem de descoberta como CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> canabinoide, respectivamente.

Os receptores CB<sub>1</sub> encontram-se distribuídos em larga escala no sistema nervoso central, em suas maiores quantidades no cerebelo, regiões límbicas e córtex (WOODHAMS et al., 2015). Também estão presentes nos terminais de neurônios centrais e periféricos, além de outros tecidos da periferia, como glândula adrenal, coração, pulmão, próstata, fígado e útero (HOWLETT et al., 2017).

Os receptores CB<sub>2</sub> são encontrados principalmente em células e tecidos do sistema imune, e também no gânglio da raiz dorsal, e neurônios sensoriais (JHAVERI; RICHARDSON; CHAPMAN, 2009; VAN SICKLE, 2005).

A ação antinociceptiva canabinoide ocorre através da ativação desses receptores, sendo estes acoplados à proteína Gi/o, inibindo a atividade da adenilato ciclase, com conseqüente inibição da síntese e ativação do AMPc e da proteína quinase A (PKA), respectivamente. Dessa forma, não haverá aumento da

concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e liberação de neurotransmissores (DI MARZO; PISCITELLI, 2015), bem como modulação com consequente abertura de canais para potássio, efluxo deste íon e finalmente hiperpolarização do nociceptor induzindo antinocicepção (PIOMELLI, 2003).

A partir da descoberta de receptores canabinoides específicos, descobriu-se também a existência dos primeiros canabinóides endógenos, dentre eles o *N*-araquidonoil etanolamina (AEA), também conhecido como anandamida, e o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (DEVANE et al., 1992; MECHOULAM et al., 1995). O estudo das afinidades dos endocanabinoides revelou que a AEA se liga preferencialmente ao receptor canabinoide  $\text{CB}_1$  e o 2-AG parece não apresentar tanta seletividade, se ligando a receptores  $\text{CB}_1$  e  $\text{CB}_2$  (WANG; UEDA, 2009).

Mais tarde, alguns outros ligantes de receptores canabinoides também foram descobertos, tais como 2-araquidonoil glicerol éter (noladina) (MECHOULAM et al., 1995) *O*-araquidonoil etanolamina (virodamina) (PORTER et al., 2002) e *N*-araquidonoil dopamina (NADA) (SUGIURA et al., 1995). Além do oleoiletanolamida (OEA), um endocanabinoide que não se liga a receptores próprios, mas em receptores nucleares (FU et al., 2003), e *N*-palmitoiletanolamida (PEA), que possui baixa afinidade por receptores canabinoides, mas pode atuar através deles por mecanismos indiretos (BEGGIATO; TOMASINI; FERRARO, 2019).

A biossíntese dos endocanabinoides depende de precursores lipídicos. Para a síntese de anandamida, por exemplo, é necessária a hidrólise do *N*-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NAPE). Já a síntese de 2-AG se dá através do diacilglicerol (DAG) (DI MARZO; PISCITELLI, 2015). Essa síntese só acontece sob demanda, a partir do aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e estes não são estocados em vesículas (DI MARZO; PISCITELLI, 2015).

Após sua produção, a maioria dos endocanabinoides atuam através do que chamamos de sinalização retrógrada, sendo liberados pelos neurônios pós-sinápticos, deslocando-se até os terminais pré-sinápticos, onde ativam receptores canabinoides, podendo regular a transmissão sináptica inibitória (ALGER, 2002; HOHMANN, 2002). Entretanto, existem evidências de que estes possam atuar de forma não retrógrada, como por exemplo, através de canais TRPV1 (CASTILLO et al., 2012).

A sinalização retrograda é finalizada por meio de transportadores que auxiliam no deslocamento do endocanabinoide do meio extra para o meio intracelular, e posterior degradação, envolvendo a hidrólise enzimática mediada por enzimas intracelulares específicas (DI MARZO, 2008).

A AEA é hidrolisada preferencialmente pelo ácido graxo amida hidrolase (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*), e o 2-AG preferencialmente pela monoacilglicerol lipase (MAGL), onde seus subprodutos são ácido araquidônico, etanolamina e ácido graxo e glicerol, respectivamente (GUINDON; HOHMANN, 2012).

Os efeitos antinociceptivos periféricos dos canabinoides já foram demonstrados em diversos modelos experimentais (revisado por HOHMANN, 2002). Por exemplo, Calignano *et al.* (1998) observaram que a anandamida foi capaz de inibir a hiperalgesia induzida pela formalina por ativar os receptores periféricos do subtipo CB<sub>1</sub>.

Em outro trabalho, AGARWAL *et al.* (2007) demonstraram que a deleção do receptor CB<sub>1</sub> em neurônios nociceptivos periféricos de camundongos, reduziu a antinocicepção produzida pela administração sistêmica e local de agonistas canabinoides.

Também foi demonstrada a participação do receptor CB<sub>2</sub> na antinocicepção periférica. Ao se administrar na periferia o AM124, um agonista seletivo de CB<sub>2</sub>, verificou-se uma hipoalgesia térmica. Entretanto, ao se administrar concomitantemente o AM630, antagonista seletivo deste receptor, a ação antinociceptiva foi revertida, indicando o envolvimento do receptor CB<sub>2</sub> neste evento (STAROWICZ; FINN, 2017).

Isto posto, entendemos que apesar de o sistema canabinoide e sua ativação estarem relacionados a efeitos centrais indesejáveis, existem possibilidades terapêuticas periféricas, permitindo um possível desenvolvimento de analgésicos canabimiméticos com efeitos predominantes na periferia.

## Via intracelular iniciada por PI3Ky e analgesia

PI3Ky é capaz de ativar AKT, também conhecida como proteína quinase B, sendo esta ativação importante em diferentes funções, dentre elas proliferação, sobrevivência celular, modulação do metabolismo do açúcar além de participar da fase G1-S do ciclo celular. (GUO et al., 2017).

Existem ainda evidências de que AKT é capaz de ativar algumas isoformas de NOS (óxido nítrico sintases), sendo elas eNOS (constitutivamente endotelial) nNOS (NO sintase neuronal), onde essas enzimas irão catalisar a produção de NO (óxido nítrico), que tem como precursor a L-arginina. (FULTON et al., 1999; FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Em 1990, Duarte e colaboradores demonstraram, utilizando o modelo de nocicepção modificado de Randall-Selitto, que a administração intraplantar (ipl.) de nitroprussiato de sódio, uma fonte de óxido nítrico, bem como acetilcolina (ACh) induziu um efeito analgésico periférico. E este efeito foi potencializado ao se administrar My5445, um inibidor de fosfodiesterase de GMPc.

Ainda neste estudo, a injeção ipl. de L-arginina causou uma antinocicepção periférica frente à hiperalgesia induzida por carragenina (CG). E administração ipl. de L-NMMA, um inibidor da biossíntese de NO, foi capaz de reverter a ação antinociceptiva produzida por L-arginina. Dados estes que sugerem a participação do óxido nítrico e GMPc no mecanismo de ação analgésica periférica dessas substâncias (DUARTE ET AL, 1990).

Um ano depois, em 1991, o mesmo grupo de pesquisadores relacionou a ação analgésica periférica da morfina ao sistema NO/GC/GPMc, onde a administração de L-NIO, L-NMMA, inibidores da síntese de NO, e azul de metileno, um inibidor de guanilato ciclase, reverteram a ação antinociceptiva da morfina na periferia. E a administração de MY5445 foi capaz de aumentar este efeito (FERREIRA; DUARTE; LORENZETTI, 1991).

Mais tarde, Cunha e colaboradores (2010), sugeriram que a atividade antinociceptiva da morfina dependia de NO, e sua ativação ocorria através da via da

PI3K $\gamma$ /AKT, culminando em abertura de canais para K<sup>+</sup> e hiperpolarização dos neurônios nociceptivos.

Sendo assim, a via PI3K $\gamma$ /AKT/NO/GMPc/KATP pode ser um importante objeto de estudo para se desvendar mecanismos de ação analgésicos de substâncias que são ainda pouco elucidados como o da melatonina.

## JUSTIFICATIVA

Um estudo descritivo avaliou a prevalência de dor no Brasil e demonstrou que esta se apresenta variando entre 29,3 a 73,3% em diferentes localidades do país, acometendo mais mulheres do que homens (VASCONCELOS; ARAÚJO, 2018).

Além disso, sabe-se que está diretamente relacionada à qualidade de vida, resultando em alterações biológicas e psicossociais, como prejuízo do sono, deambulação, alterações de humor, capacidade de concentração, relacionamento familiar, atividade sexual, e pensamentos pessimistas com relação à vida (RIGOTTI; FERREIRA, 2005).

Adicionalmente, os tratamentos disponíveis atualmente induzem efeitos adversos indesejáveis, como efeitos gastrointestinais através do uso anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (MONTEIRO et al., 2008), dependência e tolerância induzidos por uso de opioides (EIDSON; MURPHY, 2019).

Assim sendo, cada vez mais, se faz necessário buscar alternativas para o controle da dor. Entender os mecanismos fisiopatológicos e farmacológicos envolvidos na dor pode resultar no desenvolvimento de novas terapias para o seu tratamento.

Diante deste contexto a melatonina vem sendo estudada em diferentes áreas do conhecimento por apresentar propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e sedativas (BURCHAKOV; USPENSKAYA, 2017), além de receber visibilidade em estudos na área da analgesia, na qual a liberação de opióides, NO (óxido nítrico) e outros são propostos como possíveis mecanismos (HERNÁNDEZ-PACHECO et al., 2008; LI et al., 2005; ULUGOL et al., 2006), podendo ser uma boa alternativa como analgésico com baixos efeitos colaterais por se tratar de um hormônio produzido naturalmente pelo corpo.

## **OBJETIVOS GERAIS**

Analisar a possibilidade do evento antinociceptivo induzido pela melatonina ocorrer através da interação com o sistema canabinoidérgico e da via intracelular iniciada pela da PI3K.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar a ação antinociceptiva da melatonina a nível periférico no teste da carragenina.
2. Estudar a participação do sistema melatoninérgico no evento antinociceptivo periférico induzido por melatonina.
3. Estudar a participação do sistema canabinoidérgico no evento antinociceptivo periférico induzido por melatonina.
4. Estudar a participação da PI3K $\gamma$  no evento antinociceptivo periférico induzido por melatonina.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais de experimentação**

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, machos, pesando entre 30 e 40 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da UFMG (Cebio/UFMG). Os animais foram acondicionados em caixas plásticas com maravalha, tendo livre acesso à ração e água e mantidos na sala de experimentação dois dias antes do experimento para ambientalização. A sala de experimentação é controlada termicamente (22 a 24°C), e apresenta ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas. Após os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados através de injeção intraperitoneal de cloridrato de ketamina 10% (180 mg/Kg) mais cloridrato de xilazina 2% (15 mg/Kg) em 100 µL. Todos os procedimentos animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (ZIMMERMANN, 1983) e todos os experimentos foram aprovados pelo CEUA-UFMG sob protocolo número 286/2017 (ANEXO 1).

### **Teste algésimétrico de mensuração da hiperalgesia da pata de camundongo**

Para realizar a medida da hiperalgesia, foi utilizado o método de retirada de pata submetida à compressão, com a finalidade de medir o limiar nociceptivo ao estímulo mecânico. Originalmente descrito para ratos RANDALL & SELITTO (1957) e posteriormente adaptado para camundongos— KAWABATA e colaboradores (1992).

No teste, o animal (camundongo Swiss macho, n = 5 por grupo) é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a superfície plantar da pata a ser testada é colocada sob a parte compressora do aparelho algésimétrico (Ugo Basile, Itália).

A parte compressora do aparelho consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual coloca-se a pata do animal, e outra cônica, com uma área de 1,75 mm<sup>2</sup> na extremidade, por meio da qual é aplicada uma pressão na superfície

plantar da pata do camundongo. A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 16 g/s, mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador. Ao observar a resposta nociceptiva do animal, padronizada como retirada da pata, o experimentador desaciona o pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta à pata, sendo que o último valor, correspondente ao limiar nociceptivo, fica indicado na escala do aparelho e expresso em gramas (g). O valor de 160 g foi usado como valor de corte para reduzir a possibilidade de causar uma lesão na pata dos camundongos.



**Figura 1- Teste algesimétrico para mensuração do limiar nociceptivo na pata de camundongos.** Na figura observamos a superfície plantar posterior de camundongo apoiada à superfície cônica do aparelho, que irá exercer uma pressão sob a pata. A intensidade da pressão irá ocasionar o reflexo de retirada da pata do animal, que será então definido como limiar nociceptivo, e este é mensurado em gramas.

## Fármacos e solventes

### AGENTE HIPERALGÉSICO:

- Carragenina (CG) (Sigma, EUA) - Dissolvida em solução salina, e deixada para hidratar durante 1 hora, antes das injeções.

### SISTEMA MELATONINÉRGICO:

- Melatonina (Cayman Chemical, EUA) - Mantida em freezer (-20<sup>0</sup>C), em solução estoque, dissolvida em Etanol. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina, obtendo-se a concentração de etanol 20%.
- Luzindole (Cayman Chemical, EUA), antagonista não seletivo de receptores melatoninérgicos - Mantida em freezer (-20<sup>0</sup>C), em solução estoque, dissolvida em DMSO. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina, obtendo-se a concentração de DMSO 20%.

### SISTEMA CANABINÓIDE:

- MAFP (Tocris), inibidor da enzima ácido graxo amida hidrolase (*FAAH, fatty acid amide hydrolase*). Mantido no freezer (-20<sup>0</sup>C) em solução-estoque, dissolvido em etanol. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina, obtendo-se a concentração de etanol 3% em salina.
- VDM11 (Tocris), Inibidor do transportador de anandamida. Mantido no freezer (-20<sup>0</sup>C) em solução-estoque, dissolvido em Tocrisolve. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina, obtendo-se a concentração de Tocrisolve 10% em salina.
- JZL 184 (Tocris), inibidor da enzima monoacilglicerol lipase (MAGL). Mantido no freezer (-20<sup>0</sup>C) em solução-estoque, dissolvido em DMSO. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina, obtendo-se a concentração de DMSO 10% em salina.
- AM251 (Tocris), antagonista seletivo dos receptores canabinoides CB<sub>1</sub>. Mantido no freezer (-20<sup>0</sup>C) em solução-estoque, dissolvido em DMSO. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina, obtendo-se a concentração de DMSO 10% em salina.

- AM630 (Tocris), antagonista seletivo dos receptores canabinoides CB<sub>2</sub>. Mantido no *freezer* (-20<sup>0</sup>C) em solução-estoque, dissolvido em DMSO. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina, obtendo-se a concentração de DMSO 10% em salina

#### PI3Kγ:

- AS-605240 (Cayman), inibidor de PI3Kγ. Mantido no *freezer* (- 20<sup>o</sup> C) em solução-estoque, dissolvido em DMSO. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina, obtendo-se a concentração de DMSO 10% em salina.

### **Administração das drogas**

Todas as drogas utilizadas foram administradas através de injeção subcutânea na superfície plantar da pata posterior direita do camundongo, via intraplantar (i.pl.), em um volume de 20 µL com exceção do protocolo para a exclusão do efeito sistêmico, onde o agente hiperalgésico foi administrado em ambas as patas posteriores dos animais, além de melatonina na pata direita e salina na pata esquerda sendo as medidas foram realizadas em ambas as patas.



**Figura 2- Administração de fármacos por via intraplantar.** A figura representa a injeção subcutânea na superfície plantar posterior da pata de camundongos.

## **Procedimento experimental**

Em todos os experimentos o limiar basal de cada animal foi determinado antes da administração do agente hiperalgésico e três horas após a mesma. Os limiares, em todas as medidas, foram sempre aferidos três vezes, observando um intervalo mínimo de 10 segundos entre cada medida, sendo o resultado a média dessas. As doses e os tempos de injeção das drogas utilizadas foram baseados em experimentos preliminares (pilotos) e em dados da literatura (FERREIRA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019; PACHECO; ROMERO; DUARTE, 2019).

A melatonina ou seu veículo (etanol) foram injetados quinze minutos antes da terceira hora após injeção da carragenina (momento de pico da hiperalgesia). O luzindole foi administrado 30 minutos antes da terceira hora do pico de hiperalgesia e 15 minutos antes da administração da melatonina.

Os inibidores da recaptção (VDM11) e degradação de anandamida (JZL, e MAFP), assim como os antagonistas dos receptores canabinóides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (AM251 e AM630, respectivamente) foram administrados 25 minutos antes do pico da hiperalgesia, e 10 minutos antes da administração de melatonina .

O inibidor da enzima PI3Kγ foi administrado 30 minutos antes do pico de hiperalgesia induzido por CG e portanto, 15 minutos antes da administração da melatonina.

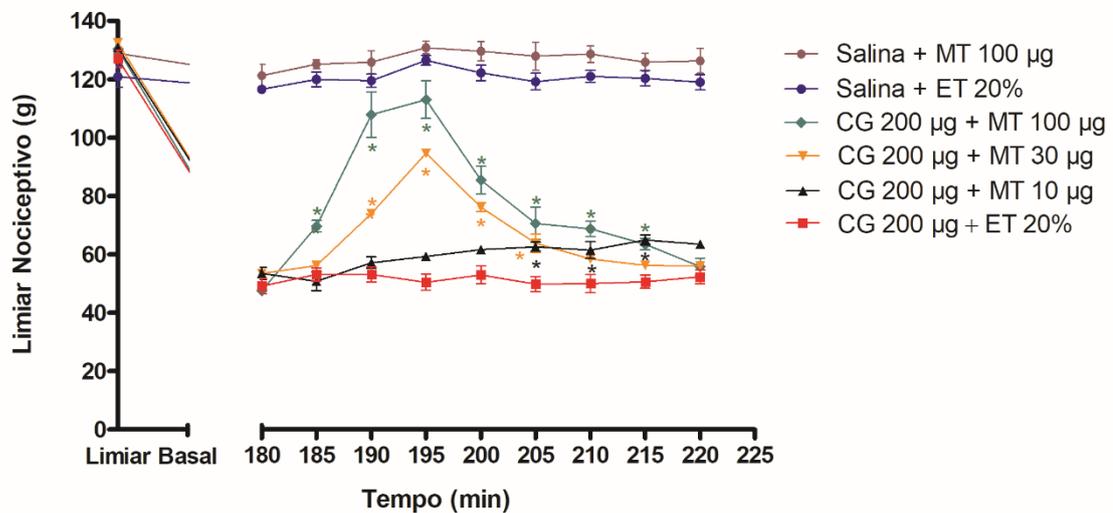
## **Análise estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística para a determinação das médias e erros padrões das médias (E.P.M.), sendo analisados pelo teste ANOVA, para análise de variância, seguido pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças com valores de  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

### 1.0 Caracterização da ação antinociceptiva da melatonina ao nível periférico e participação do sistema melatoninérgico

A administração i.pl. de melatonina foi capaz de induzir um efeito antinociceptivo frente ao estímulo hiperalgésico induzido por CG (200 µg/pata). O pico de ação da melatonina ocorreu 15 minutos após administração da droga (figura 3), e seu efeito ocorreu de forma dose-dependente (10, 30 e 100 µg).

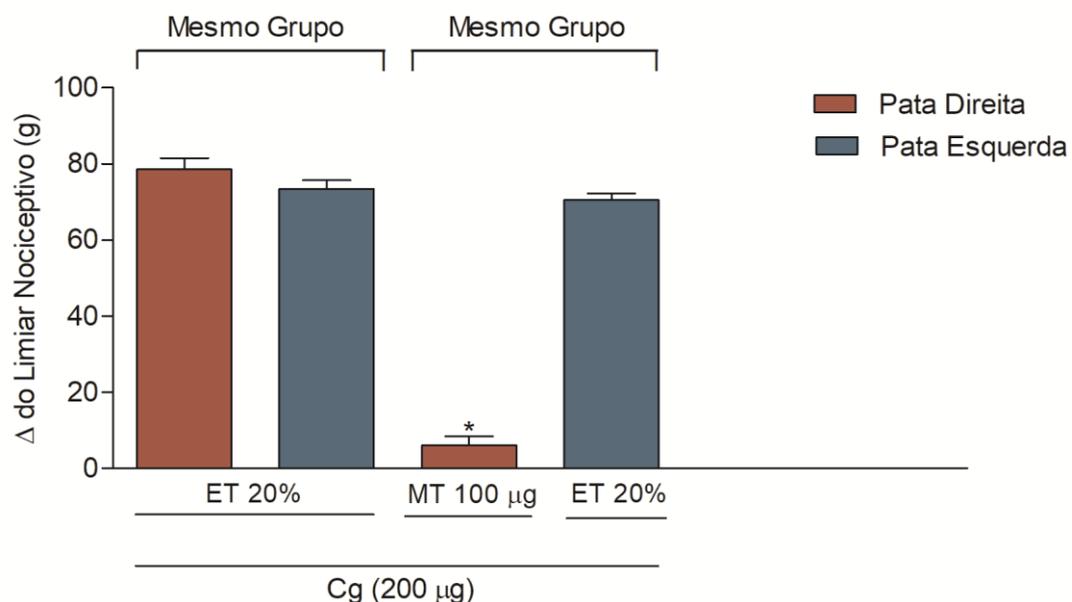


**Figura 3: Curva temporal do efeito da administração intraplantar de melatonina (MT; 10, 30, e 100 µg/pata) sobre a hiperalgésia induzida por carragenina (CG; 200 µg/pata).** CG foi administrada no tempo 0, e melatonina foi administrada 3 horas após a CG (180 min). As medições foram realizadas em intervalos de 5 minutos, no tempo de 180 à 225 min. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=5 animais. \* indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CG 200 µg + ET 20%.

Para a exclusão do efeito antinociceptivo não periférico da melatonina, foram administradas CG 200  $\mu\text{g}$  nas patas posteriores direita e esquerda. A melatonina na dose de 100  $\mu\text{g}$  foi administrada na pata direita e seu veículo, ET 20%, na pata esquerda. Posteriormente as medidas dos limiares nociceptivos foram realizadas em ambas as patas.

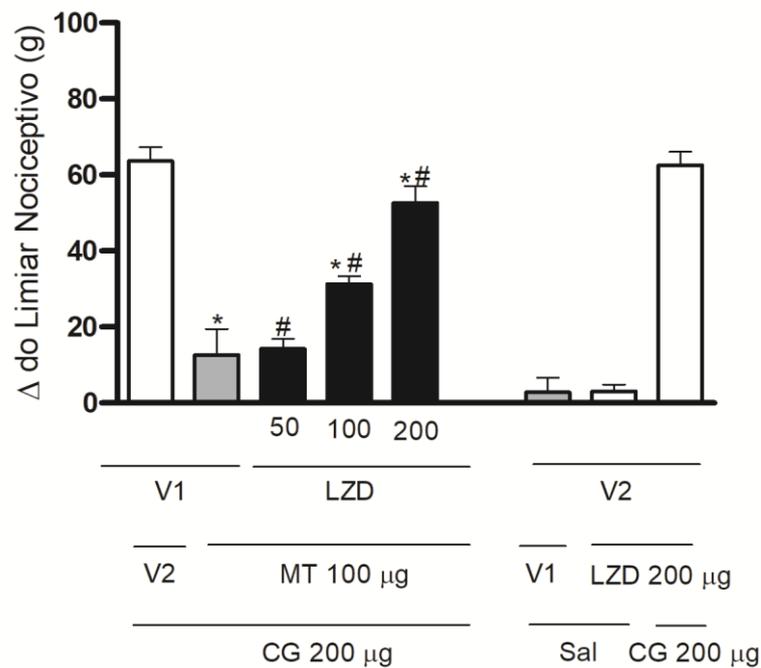
A administração de melatonina (100  $\mu\text{g}$ ) na pata posterior direita foi capaz de reverter o estímulo hiperalgésico induzido por CG administrada nesta mesma pata. Entretanto, este efeito não foi observado na pata contralateral, indicando um efeito somente periférico da melatonina nesta dose estudada (figura 4).

Dessa forma, a dose de 100  $\mu\text{g}$  de melatonina foi escolhida como de efeito máximo periférico, e foi utilizada nos experimentos subsequentes.



**Figura 4: Exclusão de efeito antinociceptivo sistêmico da melatonina.** CG foi injetada na pata posterior direita e na pata posterior esquerda e a melatonina 100  $\mu\text{g}$  foi injetada na pata posterior direita. ET 20% foi injetado nas patas esquerdas. A CG foi injetada no tempo 0, e a melatonina 15 minutos antes do pico da CG. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. da medida do  $\Delta$  do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=5 animais. \* indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CG 200 + ET 20% (pata direita).

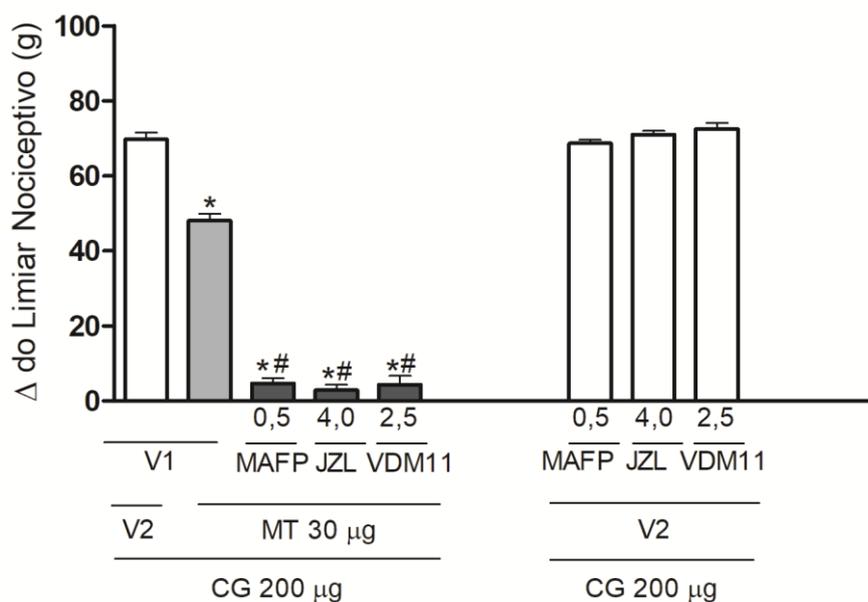
Ao verificarmos a participação dos receptores melatoninérgicos frente à antinociceção periférica induzida por melatonina, utilizamos o antagonista não seletivo luzindole. Este foi capaz de antagonizar de forma dose-dependente a ação analgésica da melatonina, entretanto, em sua maior dose (200  $\mu\text{g}$ ) não foi capaz de reverter de forma total à ação antinociceptiva da melatonina. Sugerindo, pelo menos em parte o envolvimento dos receptores melatoninérgicos no efeito anti-hiperalgésico da melatonina.



**Figura 5: Antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da melatonina 100  $\mu\text{g/pata}$  induzido por Luzindole (50, 100 e 200  $\mu\text{g/pata}$ ).** A CG foi administrada no tempo 0. A melatonina (MT) foi administrada 15 minutos antes do pico de ação da CG. O Luzindole foi injetado 15 minutos antes da administração da melatonina. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. da medida do  $\Delta$  do limiar nociceptivo em gramas (g) referentes ao N=5 animais. \* e # indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos (CG 200  $\mu\text{g}$  + DMSO 20% + Etanol 20%) e (CG 200  $\mu\text{g}$ + DMSO 20% + MT 100  $\mu\text{g}$ ), respectivamente.

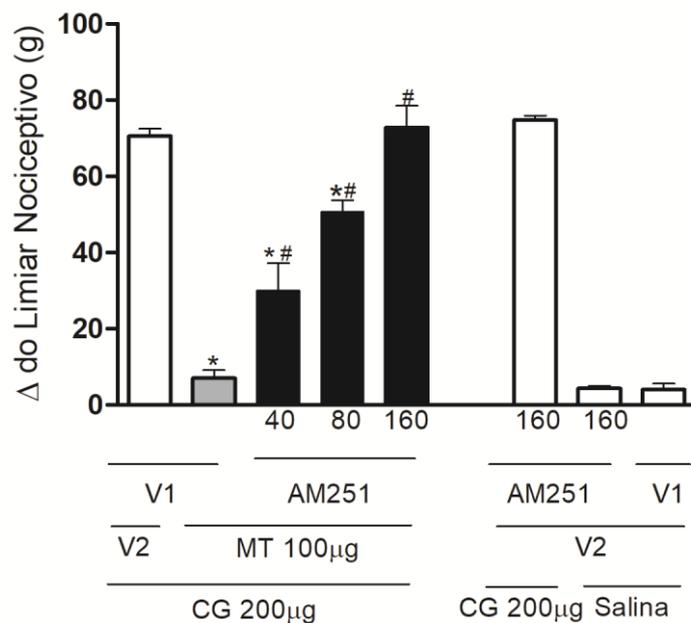
## 2.0 Participações do sistema canabinoide no evento antinociceptivo periférico induzido por melatonina.

Para investigar a participação dos endocanabinoides no evento antinociceptivo da melatonina foram utilizados os inibidores da degradação de AEA e 2-AG, sendo eles MAFP e JZL respectivamente e da recaptação de AEA, o VDM11, todos em doses máximas já padronizadas anteriormente em nosso laboratório (FERREIRA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019; PACHECO; ROMERO; DUARTE, 2019). Estes fármacos quando administrados foram capazes de intensificar a ação da melatonina administrada em sua dose intermediária eficaz (30 µg/pata) (Figura 5).



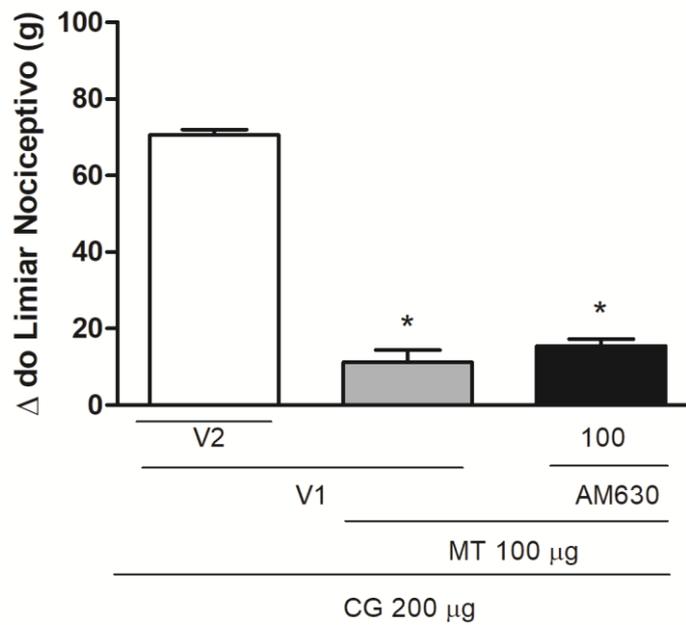
**Figura 5: Efeito do MAFP, JZL, e VDM11 sobre a antinociceção periférica da Melatonina 30 µg/pata.** A CG foi administrada no tempo 0. A melatonina (MT) foi administrada 15 minutos antes da CG. O MAFP, JZL E VDM11 foram injetados 10 minutos antes da administração da melatonina. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N = 5 animais. \* indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo (CG 200 µg + DMSO 10% + ET 7,5%) e # indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo (CG 200 µg + DMSO 10% + MT 30 µg).

O envolvimento de CB<sub>1</sub> no efeito antinociceptivo da melatonina foi verificado ao administrarmos AM251, um antagonista seletivo do receptor canabinoide CB<sub>1</sub>. Este foi capaz de antagonizar a atividade antinociceptiva induzida por melatonina, de forma dose-dependente nas doses de 40, 80 e 160 µg. O AM251 em sua maior dose foi capaz de causar reversão máxima do efeito anti-hiperalgésico induzido por melatonina. O AM251 por si só, ou somente na presença da CG, não induziu efeito ou alterou a ação hiperalgésica da CG (Figura 6).



**Figura 6: Antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da melatonina 100 µg/pata induzido por AM251 (40, 80 e 160 µg/pata).** A CG foi administrada no tempo 0. A melatonina (MT) foi administrada 15 minutos antes da CG. O AM251 foi injetado 10 minutos antes da administração da melatonina. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referentes ao N=5 animais. \* e # indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos (CG 200 µg + DMSO 10% + ET 20%) e (CG 200 µg + DMSO 10% + MT 100 µg), respectivamente.

Por outro lado, a participação do receptor CB<sub>2</sub> no efeito antinociceptivo da melatonina foi avaliado ao administrarmos o AM630 em uma dose já padronizada como eficaz por antagonizar por completo os receptores canabinoide CB<sub>2</sub> na pata de camundongos (ROMERO., et al, 2012). Observou-se que o AM630 não foi capaz de reverter a atividade antinociceptiva induzida por melatonina na periferia (Figura 7).

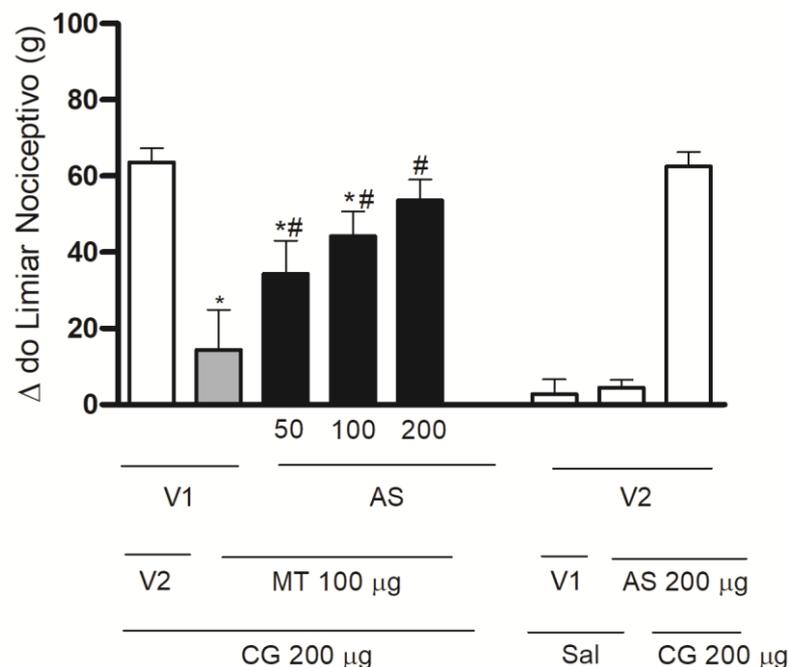


**Figura 7: Efeito do AM630 sobre a antinociceção periférica da Melatonina 100 µg/pata.** A CG foi administrada no tempo 0. A melatonina (MT) foi administrada 15 minutos antes da CG. O AM630 foi injetado 10 minutos antes da administração da melatonina. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N = 5 animais. \* indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo (CG 200 µg + DMSO 10% + ET 20%).

### 3.0 Participação de PI3K $\gamma$ no evento antinociceptivo periférico induzido por melatonina.

A administração de AS-605240, um inibidor de PI3K $\gamma$ , foi capaz de reverter à atividade antinociceptiva induzida por melatonina.

O AS-605240, quando administrado na dose de 50  $\mu\text{g}$  não foi capaz de antagonizar este efeito de forma significativa, entretanto, quando administrado nas doses de 100 e 200  $\mu\text{g}$  provocou uma inibição da ação antinociceptiva induzida por melatonina de forma dose dependente. (Figura 8).



**Figura 8: Efeito do AS-605240 frente à antinocicepção induzida por melatonina.** A CG foi administrada no tempo 0. A melatonina e o AS-605240 foram administrados 15 minutos e 30 minutos respectivamente, antes do pico de ação da CG. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. da medida do  $\Delta$  do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=5 -animais. \* indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CG 200 + V1. # indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CG 200  $\mu\text{g}$  + V1 + MT 100  $\mu\text{g}$ . V1 = DMSO 10% e V2 = ET 20%.

## DISCUSSÃO

Com o objetivo de estudar os mecanismos pelos quais a melatonina apresenta efeitos analgésicos, foi utilizado o modelo de hiperalgesia induzido pela carragenina (CG) em camundongos. Este é um bom modelo para se estudar inflamação e dor inflamatória por induzir um evento inflamatório próximo ao evento fisiológico (SAMMONS et al., 2000). A CG utilizada é extraída da alga *Chondrus crispus*, e seu princípio utilizado, a fração lambda ( $\lambda$ ) é capaz de induzir um processo inflamatório (DI ROSA, 1972), e conseqüentemente uma hiperalgesia, sendo esta observada através de variadas respostas físicas e comportamentais em camundongos (NANTEL et al., 1999).

Vários trabalhos realizados utilizando-se o modelo de hiperalgesia induzido por carragenina demonstraram o seu efeito tendo início 1 hora após sua administração, atingindo seu pico máximo de ação em 3 horas, com decaimento do efeito a partir da 6ª hora (CUNHA et al., 2005; LAURO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2019).

Dados estes que corroboram com nossos achados, onde a carragenina atingiu seu pico de ação máxima em 3h após sua administração e manteve sua ação estável por todo período de observação.

Dentre os modelos de indução de dor, a indução de nocicepção inflamatória através da carragenina mimetiza de forma fiel o processo natural de sensibilização do sistema nociceptivo que ocorre em nosso organismo, podendo ser utilizado tanto em ratos como em camundongos, além de promover uma resposta sustentada por várias horas (BARROT, 2012).

No presente estudo, a melatonina foi capaz de exercer um efeito antinociceptivo periférico frente a hiperalgesia induzida por carragenina. Este efeito apresentou-se de forma dose-dependente, na qual a dose de 100  $\mu$ g induziu uma resposta máxima, sendo capaz de reverter completamente a sensação dolorosa causada por CG na pata de camundongos.

Observamos ainda que o pico de ação da melatonina aconteceu em 15 minutos pós-administração. E o efeito antinociceptivo permaneceu de forma constante nos próximos 30 minutos mensurados.

Em um estudo usando o mesmo agente inflamatório que o usado neste trabalho, a administração de melatonina intraperitoneal foi capaz de reduzir o edema na pata de ratos causado pela injeção intraplantar de carragenina. Com o tratamento realizado com melatonina, os níveis de NO e malondialdeído (MDA) foram reduzidos e os níveis de glutathione aumentados, indicando um possível efeito anti-inflamatório (BILICI; AKPINAR; KIZILTUNÇ, 2002).

Na literatura não encontramos estudos que mostrem o efeito da aplicação de melatonina por via intraplantar ao longo do tempo. Entretanto, estudos nas quais as vias de administração foram intraperitoneal (ip.) e intracerebroventricular (i.c.v), a melatonina apresentou atividade antinociceptiva maior que 70 minutos e 80 minutos, respectivamente (LI et al., 2005; YU et al., 2000), corroborando com nossos achados.

Ainda de acordo com o estudo de Li e colaboradores (2005), a melatonina atingiu seu pico de ação máxima em 30 minutos tanto para via de administração ip, quanto para via i.c.v. A menor latência para o efeito máximo foi observada em nossos experimentos não pode ser explicada com os atuais experimentos, por outro lado acreditamos que o efeito curto da melatonina em injeção intraplantar se dê pela própria cinética envolvida, que claramente privilegia a absorção além do fato de que este tecido está inflamado devido à ação da carragenina, resultando em uma absorção ainda mais rápida em decorrência de um fluxo sanguíneo aumentado na região.

De acordo com dados da literatura, a melatonina administrada através de bolus ou infusão intravenosa apresentou um  $t_{1/2}$  de eliminação de 28 minutos e 45 minutos, respectivamente (ANDERSEN et al., 2016). Outros experimentos de farmacocinética se fazem necessários para se verificar possibilidades de se utilizar a melatonina como agente terapêutico no contexto da dor periférica, como a administração com agente de liberação lenta ou mesmo agentes que mantenham por mais tempo a melatonina na região administrada.

Diante dos dados citados acima, este trabalho é inovador quando nos referimos à via de administração intraplantar. Dados anteriores indicam uma baixa biodisponibilidade da melatonina quando administrada por via oral, sendo fortemente variável entre indivíduos (ANDERSEN et al., 2016; DI et al., 1997). Dessa forma, nosso trabalho abre um precedente importante para o uso alternativo de outras vias de administração da melatonina que não envolva o metabolismo de primeira passagem hepática, como a possibilidade de aplicação tópica da melatonina, seja através de pomadas, adesivos ou implantes intradérmicos.

A melatonina administrada por via intraplantar na dose de 100 µg/pata exerceu somente um efeito local, como foi demonstrado em nosso experimento de exclusão do efeito sistêmico.

Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores melatoninérgicos MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>, utilizamos seu antagonista, luzindole. Sabemos que este antagonista possui uma afinidade 25 vezes maior para MT<sub>2</sub> do que para MT<sub>1</sub> (DUBOCOVICH et al., 1998). Mas, apesar de sua maior afinidade pelo receptor MT<sub>2</sub>, o luzindole também é capaz de se ligar e antagonizar o receptor MT<sub>1</sub> (BROWNING et al., 2000).

Os receptores melatoninérgicos são classificados como GPCRs, podendo ter sua transdução de sinal via G<sub>i/o</sub> (MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>) ou G<sub>q</sub> (MT<sub>1</sub>). (JOCKERS et al., 2016).

Nossos dados mostram que a melatonina utiliza pelo menos em partes a maquinaria do sistema melatoninérgico para garantir sua resposta antinociceptiva, uma vez que o luzindole não foi capaz de antagonizar de forma máxima o seu efeito. Levando-nos a crer que exista uma possível participação de outros sistemas na ação analgésica da melatonina.

O efeito da melatonina como agente antinociceptivo periférico pode ser explicado a partir da sua ação direta nos nociceptores via sua transdução de sinal G<sub>i/o</sub>, ou seja, parte da antinocicepção observada pode ser independente de outros sistemas, mas sim dependente do sistema melatoninérgico local, uma vez que foram encontrados receptores MT no gânglio da raiz dorsal e ventral de ratos (ZAHN; LANSMANN, 2003). Através da ativação da subunidade α da proteína G<sub>i/o</sub>, ocorre a inibição da síntese do AMPc, inibindo a atividade da PKA, com consequente inibição do aumento da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular, impedindo a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005).

Em consonância com esta hipótese, trabalhos utilizando o teste algesimétrico tail-flick e o teste da formalina mostraram a atividade antinociceptiva da melatonina sendo revertida por um antagonista seletivo para receptor  $MT_2$ , sugerindo o envolvimento deste receptor em sua ação frente à dor (RAY et al., 2004; YU et al., 2000).

Embora muitas das ações da melatonina estejam associadas à transdução de sinal via  $G_{i/o}$ , é observada em menor extensão também a transdução de sinal via  $G_q$  através da ativação do receptor  $MT_1$  (CHEN et al., 2020).

Por exemplo, a ação da melatonina via  $MT_1$  nas células fotorreceptoras da retina, bem como no músculo liso intestinal, além da participação da melatonina na estimulação da liberação de glucagon pelas células  $\alpha$  pancreáticas já foram identificadas como dependentes da ativação de  $G_q$  (AHMED et al., 2013; BÄHR et al., 2012; JOCKERS et al., 2016).

Acreditamos, portanto, que a melatonina possa induzir analgesia periférica também através da ativação da subunidade  $\alpha$  da proteína  $G_q$  do receptor  $MT_1$ , uma vez que estes receptores já foram identificados na periferia em células residentes, os queratinócitos (FISCHER, 2009; SLOMINSKI et al., 2005) e células imunes, como os macrófagos (XIA et al., 2019). A estimulação deste receptor resulta em ativação da fosfolipase C (PLC), que quebra o fosfatidilinositol 4, 5 bisfosfato (PIP2) em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-inositol trisfosfato (IP3) (MINAMI; UEZONO, 2006). Através da ativação de IP3 e DAG ocorre um aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular, que por sua vez ativaria a fosfolipase D (PLD) (MOTASIM BILLAH, 1993) precursor para a síntese de endocanabinóides AEA e 2-AG, onde os queratinócitos e macrófagos teriam maquinaria suficiente para a produção destes endocanabinóides (KIENZL; KARGL; SCHICHO, 2020; MACCARRONE et al., 2003; WANG; UEDA, 2009).

Sabemos que modulação da dor através do sistema canabinoide envolve participação dos endocanabinóides (WOODHAMS et al., 2015) e partindo do pressuposto que o receptor  $MT_1$  presente nos queratinócitos e macrófagos, com transdução de sinal via  $G_q$ , poderia estar liberando endocanabinóides, avaliamos a hipótese de que a atividade analgésica da melatonina poderia estar relacionada a ação destes compostos.

Para isso utilizamos (i) MAFP, um inibidor da anandamida amidase, (ii) JZL 184, inibidor da enzima envolvida na degradação de 2-AG, (iii) VDM11, inibidor da recaptação de endocanabinoides. Essas substâncias, quando administradas sozinhas não foram capazes de induzir uma ação antinociceptiva. Entretanto, quando administradas em conjunto com a melatonina em sua menor dose, verificamos que foram capazes de potencializar a ação da melatonina, de forma que seu efeito se tornou semelhante ao encontrado na administração da melatonina em sua dose máxima.

Os endocanabinoides mais bem estudados são a AEA e o 2-AG, onde a AEA se liga preferencialmente a receptores CB<sub>1</sub>, e 2-AG em ambos os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (DI MARZO; BIFULCO; DE PETROCELLIS, 2004). Dessa forma, nossos resultados sugerem que a melatonina quando administrada na pata do camundongo é capaz de liberar endocanabinoides através da transdução de sinal via G<sub>q</sub> com a participação das células locais.

Estes endocanabinoides liberados poderiam conseqüentemente atuar nos receptores próprios do sistema canabinoide, CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>. Por isso, para confirmar esta hipótese, utilizamos os antagonistas dos receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> canabinoides. Sabe-se que esse sistema está diretamente envolvido com o efeito antinociceptivo de diversos fármacos, como foi demonstrado em estudos realizados em nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2019; PACHECO; ROMERO; DUARTE, 2019; ROMERO; PACHECO; DUARTE, 2013) e em outros, na qual foi visto que os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), analgésicos não canabinóides, apresentam seu mecanismo de ação atrelado ao sistema endocanabinóide (ATES et al., 2003; GÜHRING et al., 2002). Um bom exemplo de fármacos não canabinoidérgicos com propriedades antinociceptivas atrelada ao sistema canabinoide é a xilazina, um agonista  $\alpha_2$  adrenérgico, que demonstrou ter sua ação anti-hiperalgésica relacionada ao sistema canabinoide, através da reversão de seu efeito pela administração de antagonista canabinoide CB<sub>1</sub>, e potencialização do efeito pela administração de inibidores da degradação e recaptação de endocanabinoides (ROMERO et al., 2011). Evento semelhante foi evidenciado pela morfina, um opióide, na qual sua atividade antinociceptiva está associada ao sistema canabinoide (DA FONSECA PACHECO et al., 2008).

Nosso trabalho demonstra que a melatonina necessita pelo menos em parte do sistema canabinoide para induzir antinocicepção periférica e de forma seletiva aos receptores CB<sub>1</sub> canabinoides.

A participação dos receptores CB<sub>1</sub> canabinoides nos mecanismos antinociceptivos periféricos tem sido relatado em vários outros estudos. Trabalhos anteriores, já demonstraram a participação do antagonista AM251 na reversão da ação analgésica de agonistas canabinoides (WALKER et al., 1999). De forma semelhante, o aripiprazol, resveratrol, e o peltatosídeo tiveram seus efeitos antinociceptivos periféricos antagonizados pelo AM251 em sua maior dose utilizada nestes diversos trabalhos (FERREIRA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019, 2017).

Além disso, sabendo que anatomicamente os receptores CB<sub>1</sub> estão presentes na lâmina superficial do corno dorsal, gânglio da raiz dorsal e nos neurônios aferentes primários (GAFFAL et al., 2014; SAÑUDO-PEÑA et al., 1999), podendo assim explicar, em parte, o porquê do envolvimento do receptor CB<sub>1</sub> na ação antinociceptiva da melatonina.

Quando utilizamos o antagonista CB<sub>2</sub> (AM630), não houve reversão da atividade antinociceptiva da melatonina, mesmo fazendo o uso da maior dose utilizada em modelo experimental semelhante, capaz de antagonizar o efeito antinociceptivo do agonista CB<sub>2</sub> canabinoide PEA (palmitoiletanolamina) frente a ação hiperalgésica da PGE<sub>2</sub> (ROMERO et al., 2012). Igualmente, o resveratrol, peltatosídeo, e a ketamina não tiveram seus efeitos antinociceptivos periféricos bloqueados pelo AM630 (FERREIRA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019, 2017), sendo assim, confiamos em sugerir a não participação do receptor CB<sub>2</sub> no efeito antinociceptivo da melatonina.

Apesar de nossos achados, não foram encontrados dados na literatura que corroborem com a hipótese do envolvimento do sistema canabinoide no evento antinociceptivo da melatonina, seja ele periférico ou central, indicando ser este trabalho, mesmo que inicial, é pioneiro no entendimento da interação dos sistemas melatoninérgico e canabinoidérgico.

A via da PI3K $\gamma$ /AKT vem sendo associada aos mecanismos de ação analgésicos em diversos trabalhos no contexto da dor e analgesia. Em nosso estudo, com objetivo de avaliar a participação deste sistema na ação anti-

hiperalgésica da melatonina, utilizamos o antagonista de PI3K $\gamma$ , denominado AS-605240. Este antagonista foi empregado em doses já padronizadas anteriormente em nosso laboratório em experimentos pilotos, sendo elas 50, 100 e 200  $\mu$ g. Na dose de 50  $\mu$ g, este não foi capaz de causar reversão significativa na ação da melatonina. Entretanto, nas doses de 100  $\mu$ g e 200  $\mu$ g o AS-605240 antagonizou de forma significativa a atividade antinociceptiva da melatonina, e este efeito foi observado de forma máxima na dosagem de 200  $\mu$ g. Indicando, portanto, uma possível participação de PI3K $\gamma$  no evento antinociceptivo da melatonina.

Diversas áreas de estudo tem relacionado a ação da melatonina à via PI3K/AKT, seja por seu efeito como cardioprotetor, neuroprotetor, e como agente antitumoral (ALI; KIM, 2015; GAO et al., 2017; LUO et al., 2018). Mas, apesar disso, não existem artigos que relacionem essa via à ação analgésica da melatonina.

No entanto, Cunha e colaboradores (2010) demonstraram que a analgesia periférica da morfina dependia da via PI3K $\gamma$ /AKT/nNOS/NO/K<sub>ATP</sub>. Os autores propuseram que a ativação desta via ocorreria através do receptor  $\mu$  opióide, presente no neurônio nociceptivo primário.

Sendo este um GPCR do tipo inibitório (G<sub>i/o</sub>), há evidências na literatura de que a porção  $\beta\gamma$  deste receptor é capaz de ativar a enzima PI3K $\gamma$  (STEPHENS et al., 1994), que por sua vez ocasiona a transformação de difosfoinosítídeo em trifosfoinosítídeo, ativando assim AKT (FRUMAN; ROMMEL, 2014).

Sabendo que os receptores canabinoidérgicos CB<sub>1</sub> são receptores acoplados a proteína G<sub>i/o</sub>, e que estes foram encontrados no corno dorsal da medula espinhal (SALIO et al., 2002), acreditamos que de forma semelhante à morfina, a porção  $\beta\gamma$  de CB<sub>1</sub> presentes na medula espinhal possa estar ativando PI3K $\gamma$ .

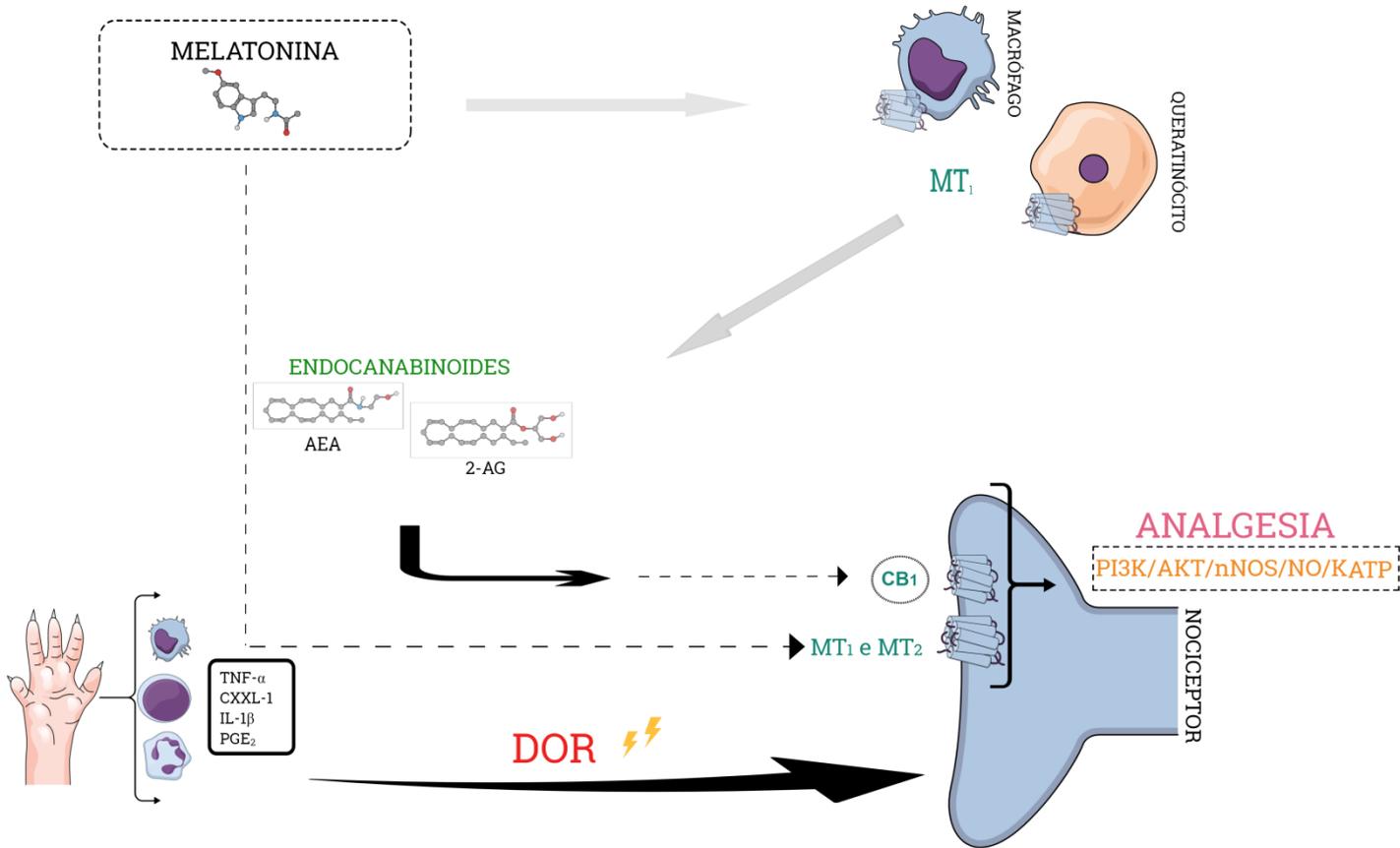
A via PI3K $\gamma$ /AKT ativada pode deflagrar uma ação antinociceptiva ao estimular a síntese de NOS através da fosforilação dessas enzimas (FULTON, et al., 1999; DIMMELER et al., 1999), sendo fácil encontrar trabalhos associando a via NO/GMPc/KATP à antinocicepção periférica induzida por vários agentes como a tingemona, angiotensina- (1-7), noradrenalina, PEA, ketamina, carbamazepina, PnPP-19, um peptídeo extraído da aranha armadeira, também conhecida como PNTX2-6, além do  $\alpha$ -terpineol, extraído de plantas medicinais (COSTA et al., 2014; DE CARVALHO VELOSO et al., 2015; FREITAS et al., 2017; GHORBANZADEH;

KHEIRANDISH; MANSOURI, 2019; ROMERO et al., 2011, 2012b, 2012a; SAFARIPOUR et al., 2018).

Em consonância com estes trabalhos, o envolvimento do NO, e a transdução de sinal via guanilato ciclase na ação analgésica periférica da melatonina foi constatada por Hernández-Pacheco e colaboradores (2008). A administração de L-NAME (inibidor da síntese de NO), ODQ (inibidor de guanilato ciclase), KT5823 (inibidor específico de PKG) e glibenclamida (bloqueador de canais para  $K^+$  sensíveis ao ATP) foram capazes de bloquear a ação antinociceptiva induzida por melatonina na segunda fase do teste da formalina. Sugerindo o envolvimento da via NO/GMP<sub>c</sub>/PKG/ $K_{ATP}$  no mecanismo de ação da melatonina.

Diante do exposto acima, concluímos que a melatonina pode exercer sua ação por meio da ativação de receptores melatoninérgicos presentes na periferia, em especial no corno dorsal da medula espinhal, queratinócitos e/ou macrófagos. A transdução de sinal via  $G_{i/o}$  inerente aos receptores  $MT_1$  e  $MT_2$  resultariam em seu efeito antinociceptivo direto nos gânglios da raiz dorsal por inibição da adenilato ciclase, sendo também possível a ativação direta da via PI3K/AKT/nNOS/NO/ $K_{ATP}$  neste evento. Por outro lado a transdução de sinal do receptor  $MT_1$  via Gq culminaria em aumento de cálcio intracelular com conseqüente liberação de endocanabinoides seletivos aos receptores  $CB_1$  canabinoide mais uma vez no gânglio da raiz dorsal, produzindo também como resultado final a ativação da via PI3K/AKT/nNOS/NO/ $K_{ATP}$ .

Assim sendo propomos como explicação da ação analgésica periférica da melatonina a figura abaixo:



**Figura 9: Mecanismo de ação analgésica periférica da melatonina.** A figura representa as diferentes possibilidades para o mecanismo pelo qual a melatonina induz antinocicepção periférica.

## REFERÊNCIAS

ABOOD, M., Alexander, S. P., Barth, F., Bonner, T. I., Bradshaw, H., Cabral, G., ... & Ross, R. A.. Cannabinoid receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. **IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE**, v. 2019, n. 4, 2019.

AGARWAL, N. Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, Rubino T, Michalski CW, Marsicano G, Monory K, Mackie K, Marian C, Batkai S, Parolaro D, Fischer MJ, Reeh P, Kunos G, Kress M, Lutz B, Woolf CJ, Kuner R. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. **NATURE NEUROSCIENCE**, [S. l.], v. 10, n. 7, 2007.

AHMED, R., Mahavadi, S., Al-Shboul, O., Bhattacharya, S., Grider, J. R., & Murthy, K. S. Characterization of signaling pathways coupled to melatonin receptors in gastrointestinal smooth muscle. **Regulatory Peptides**, [S. l.], v. 184, p. 96–103, 2013.

ALGER, Bradley E. **Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: Focus on endocannabinoids**. [s.l: s.n.]. v. 68, 2002.

ALI, T., & Kim, M. O. Melatonin ameliorates amyloid beta-induced memory deficits, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration via PI3/Akt/GSk3 $\beta$  pathway in the mouse hippocampus. **Journal of Pineal Research**, [S. l.], v. 59, n. 1, p. 47–59, 2015.

AMARAL, F. G. D., & Cipolla-Neto, J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 62, n. 4, p. 472–479, 2018.

AMBRIZ-TUTUTI, M., Rocha-González, H. I., Cruz, S. L., & Granados-Soto. Melatonin: A hormone that modulates pain. **Life Sciences**, [S. l.], v. 84, n. 15–16, p. 489–498, 2009.

ANDERSEN, L. P. H., Werner, M. U., Rosenberg, J., & Gögenur, I. A systematic review of peri-operative melatonin. **Anaesthesia**, [S. l.], p. 1163–1171, 2014.

ANDERSEN, L. P., Werner, M. U., Rosenkilde, M. M., Harpsøe, N. G., Fuglsang, H., Rosenberg, J., & Gögenur, I. Pharmacokinetics of oral and intravenous melatonin in healthy volunteers. **BMC Pharmacology and Toxicology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–5, 2016.

ATES, M., Hamza, M., Seidel, K., Kotalla, C. E., Ledent, C., & Gühring, H. Intrathecally applied flurbiprofen produces an endocannabinoid-dependent antinociception in the rat formalin test. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 597–604, 2003.

BÄHR, I., Mühlbauer, E., Albrecht, E., & Peschke, E. Evidence of the receptor-mediated influence of melatonin on pancreatic glucagon secretion via the Gq $\alpha$  protein-coupled and PI3K signaling pathways. **Journal of Pineal Research**, [S. l.], v.

53, n. 4, p. 390–398, 2012. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2012.01009.x.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, [S. l.], v. 211, p. 39–50, 2012. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.

BASBAUM, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, [S. l.], v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.

BEGGIATO, S., Tomasini, M. C., & Ferraro, L. Palmitoylethanolamide (PEA) as a potential therapeutic agent in Alzheimer's disease. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 10, n. July, p. 1–12, 2019.

BILICI, D., Akpınar, E., & Kiziltunc, A. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced acute local inflammation. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 133–139, 2002.

BROWNING, C., Beresford, I., Fraser, N., & Giles, H. Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt1 and MT2 receptors. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 129, n. 5, p. 877–886, 2000.

BURCHAKOV, D. I., & Uspenskaya, Y. B. Antioxidant, anti-inflammatory and sedative effects of melatonin: results of clinical trials. **Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova**, [S. l.], v. 117, n. 4. Vyp. 2, p. 67, 2017.

CARVALHO, R. C. D., Maglioni, C. B., Machado, G. B., Araújo, J. E. D., Silva, J. R. T. D., & Silva, M. L. D. Prevalence and characteristics of chronic pain in Brazil: a national internet-based survey study. **Brazilian Journal Of Pain**, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 331–338, 2018.

CASTILLO, P. E., Younts, T. J., Chávez, A. E., & Hashimoto-dani, Y. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. **Neuron**, [S. l.], v. 76, n. 1, p. 70–81, 2012.

CHEN, M., Cecon, E., Karamitri, A., Gao, W., Gerbier, R., Ahmad, R., & Jockers, R. Melatonin MT1 and MT2 receptor ERK signaling is differentially dependent on Gi/o and Gq/11 proteins. **Journal of Pineal Research**, [S. l.], v. 68, n. 4, p. 1–12, 2020.

COSTA, A., Galdino, G., Romero, T., Silva, G., Cortes, S., Santos, R., & Duarte, I. Ang-(1-7) activates the NO/cGMP and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels pathway to induce peripheral antinociception in rats. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 11–16, 2014.

COSTIGAN, M., Scholz, J., & Woolf, C. J. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. **Annual review of neuroscience**, [S. l.], p. 1–32, 2010.

CUNHA, T., Verri, W. A., Silva, J. S., Poole, S., Cunha, F. Q., & Ferreira, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 102, n. 5, p. 1755–1760, 2005.

CUNHA, T. M., Roman-Campos, D., Lotufo, C. M., Duarte, H. L., Souza, G. R., Verri, W. A., & Ferreira, S. H. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 107, n. 9, p. 4442–4447, 2010.

CUZZOCREA, S., Costantino, G., Mazzon, E., & Caputi, A. P. Regulation of prostaglandin production in carrageenan-induced pleurisy melatonin. **Journal of pineal research**, [S. l.], p. 9–14, 1999.

FULTON, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., ... & Sessa, W. C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**, 399(6736), 597-601, 1999.

DA FONSECA PACHECO, D., Klein, A., de Castro Perez, A., da Fonseca Pacheco, C. M., De Francischi, J. N., & Duarte, I. D. G. The  $\mu$ -opioid receptor agonist morphine, but not agonists at  $\delta$ - or  $\kappa$ -opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 154, n. 5, p. 1143–1149, 2008.

DASTGHEIB, M., & Moezi, L. Acute and chronic effects of agomelatine on intravenous pentylenetetrazol-induced seizure in mice and the probable role of nitric oxide. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 736, p. 10–15, 2014.

DE CARVALHO VELOSO, C., Rodrigues, V. G., Ferreira, R. C. M., Duarte, L. P., Klein, A., Duarte, I. D., ... & de Castro Perez, A. Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to NO/cGMP and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels pathway activation in mice. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 755, p. 1–5, 2015.

DEVANE, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G.,... & Mechoulam, R.. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science** [S. l.], v. 258, n. 5090, p. 1946–9, 1992.

DI MARZO, V. Targeting the endocannabinoid system: To enhance or reduce? **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 438–455, 2008.

DI MARZO, V., Petrocellis, L. D., & Bisogno, T. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 3, n. 9, p. 771–784, 2004.

DI MARZO, V., & Piscitelli, F. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. **Neurotherapeutics**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 692–698, 2015.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 89–102, 1972.

DI, W. L., Kadva, A., Johnston, A., & Silman, R. Variable Bioavailability of Oral Melatonin. **New England Journal of Medicine** [S. l.], p. 1021–1030, 1997.

DIMMELER, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt- dependent phosphorylation. **Nature**, [S. l.], v. 399, n. 6736, p. 601–605, 1999.

DUARTE, I. D. G., Lorenzetti, B. B., & Ferreira, S. H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Brain Research**, [S. l.], v. 909, n. 1–2, p. 170–178, 1990.

DUBOCOVICH, M. L., & MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 101–110, 2005.

DUBOCOVICH, M. L., Yun, K., Al-Ghoul, W. M., Benloucif, S., & Masana, M. I. Selective MT 2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 1211–1220, 1998.

EIDSON, L. N., & Murphy, A. Z. Inflammatory mediators of opioid tolerance: Implications for dependency and addiction. **Peptides**, [S. l.], v. 115, n. January, p. 51–58, 2019. DOI: 10.1016/j.peptides.2019.01.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.01.003>.

FERREIRA, S. H., Duarte, I. D., & Lorenzetti, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur J Pharmacol** [S. l.], v. 201, p. 121–122, 1991.

FERREIRA, Renata C. M.; ALMEIDA-SANTOS, Ana F.; DUARTE, Igor D. G.; AGUIAR, Daniele C.; MOREIRA, Fabricio A.; ROMERO, Thiago R. L. Role of Endocannabinoid System in the Peripheral Antinociceptive Action of Aripiprazole. **Anesthesia and Analgesia**, [S. l.], v. 129, n. 1, p. 263–268, 2019.

FERREIRA, Renata C. M.; CASTOR, Marina G. M.; PISCITELLI, Fabiana; DI MARZO, Vincenzo; DUARTE, Igor D. G.; ROMERO, Thiago R. L. The Involvement of the Endocannabinoid System in the Peripheral Antinociceptive Action of Ketamine. **Journal of Pain**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 487–495, 2018.

FILLINGIM, R. B. Individual differences in pain. **Pain**, [S. l.], v. 158, n. Suppl 1, p. S11–S18, 2017.

FISCHER, T. W. Einfluss von Melatonin auf die Physiologie des Haares. **Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete**, [S. l.], v. 60, n. 12, p. 962–972, 2009.

FLORA, F. R., & Zilberstein, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 265–271, 2000.

FREITAS, A. C. N., Silva, G. C., Pacheco, D. F., Pimenta, A. M. C., Lemos, V. S., Duarte, I. D. G., & de Lima, M. E. The synthetic peptide PnPP-19 induces peripheral antinociception via activation of NO/cGMP/KATP pathway: Role of eNOS and nNOS. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, [S. l.], v. 64, p. 31–38, 2017.

FRUMAN, D. A., & Rommel, C. PI3K and cancer: Lessons, challenges and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 140–156, 2014.

FU, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Verme, J. L., Serrano, A., de Fonseca, F. R., ... & Piomelli, D. Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- $\alpha$ . **Nature**, [S. l.], v. 425, n. 6953, p. 90–93, 2003.

GAFFAL, E., Glodde, N., Jakobs, M., Bald, T., & Tüting, T. Cannabinoid 1 receptors in keratinocytes attenuate fluorescein isothiocyanate-induced mouse atopic-like dermatitis. **Experimental Dermatology**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 401–406, 2014.

GAO, Y., Xiao, X., Zhang, C., Yu, W., Guo, W., Zhang, Z., ... & Deng, W. Melatonin synergizes the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/AKT and NF- $\kappa$ B/iNOS signaling pathways. *Journal of pineal research*, v. 62, 2017.

GHORBANZADEH, B., Kheirandish, V., & Mansouri, M. T. Involvement of the L-arginine/Nitric Oxide/Cyclic GMP/K ATP Channel Pathway and PPAR $\gamma$  Receptors in the Peripheral Antinociceptive Effect of Carbamazepine. *Drug Research, [S. l.]*, v. 69, n. 12, p. 650–657, 2019.

GÜHRING, H., Hamza, M., Sergejeva, M., Ates, M., Kotalla, C. E., Ledent, C., & Brune, K. A role for endocannabinoids in indomethacin-induced spinal antinociception. *European Journal of Pharmacology, [S. l.]*, v. 454, n. 2–3, p. 153–163, 2002.

GUINDON, J., & Hohmann, A. G. The Endocannabinoid System and Pain. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, [S. l.]*, v. 8, n. 6, p. 403–421, 2012.

GUO, J. R., Wang, H., Jin, X. J., Jia, D. L., Zhou, X., & Tao, Q. Effect and mechanism of inhibition of PI3K/Akt/mTOR signal pathway on chronic neuropathic pain and spinal microglia in a rat model of chronic constriction injury. *Oncotarget, [S. l.]*, v. 8, n. 32, p. 52923–52934, 2017.

GUREJE, O., Von Korff, M., Simon, G. E., & Gater, R. Persistent Pain and Well-being. *A World Health Organization Study in Primary Care, [S. l.]*, v. 280, n. 2, p. 147–152, 1998.

HENSCHKE, N., Kamper, S. J., & Maher, C. G. The epidemiology and economic consequences of pain. *Mayo Clinic Proceedings, [S. l.]*, v. 90, n. 1, p. 139–147, 2015.

HERNÁNDEZ-PACHECO, A., Araiza-Saldaña, C. I., Granados-Soto, V., & Mixcoatl-Zecuatl, T. Possible participation of the nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K $^{+}$  channels pathway in the peripheral antinociception of melatonin. *European Journal of Pharmacology, [S. l.]*, v. 596, n. 1–3, p. 70–76, 2008.

HOHMANN, A. G. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: Behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chemistry and Physics of Lipids, [S. l.]*, v. 121, n. 1–2, p. 173–190, 2002.

HOLDEN, J. E., Jeong, Y., & Forrest, J. M. The endogenous opioid system and clinical pain management. *AACN clinical issues, [S. l.]*, v. 16, n. 3, p. 291–301, 2005.

JHAVERI, M. D., Richardson, D., & Chapman, V. Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *British Journal of Pharmacology, [S. l.]*, v. 152, n. 5, p. 624–632, 2009.

JOCKERS, R., Delagrangé, P., Dubocovich, M. L., Markus, R. P., Renault, N., Tosini, G., ... & Zlotos, D. P. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. *British Journal of Pharmacology, [S. l.]*, p. 2702–2725, 2016. DOI: 10.1111/bph.13536.

JULIUS, D., & Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature, [S. l.]*, v. 413, n. September, p. 203–210, 2001.

KAWABATA, A., Nishimura, Y., & Takagi, H. l-Leucyl-l-arginine, naltrindole and d-arginine block antinociception elicited by l-arginine in mice with carrageenin-induced hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 107, n. 4, p. 1096–1101, 1992.

KIENZL, M., Kargl, J., & Schicho, R. The immune endocannabinoid system of the tumor microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 23, p. 1–25, 2020.

KLAUMANN, P. R., WOUK, A. F. P. F., & SILLAS, T. ( Pathophysiology of pain ). **Archives of Veterinary Science**, [S. l.], p. 1–12, 2008.

LAURO, F., Ilari, S., Giancotti, L. A., Ventura, C. A., Morabito, C., Gliozzi, M., ... & Muscoli, C. Pharmacological effect of a new idebenone formulation in a model of carrageenan-induced inflammatory pain. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 111, p. 763–767, 2016.

LI, S. R., Wang, T., Wang, R., Dai, X., & Chen, Q. Melatonin enhances antinociceptive effects of  $\delta$ -, but not  $\mu$ -opioid agonist in mice. **Brain Research**, [S. l.], v. 1043, n. 1–2, p. 132–138, 2005.

LIN, J. J., Lin, Y., Zhao, T. Z., Zhang, C. K., Zhang, T., Chen, X. L.,... & Li, J. L.. Melatonin suppresses neuropathic pain via MT2-dependent and -independent pathways in dorsal root ganglia neurons of mice. **Theranostics**, [S. l.], V. 7, N. 7, P. 2015–2032, 2017.

LIU, J., Clough, S. J., & Dubocovich, M. L. Role of the MT1 and MT2 melatonin receptors in mediating depressive- and anxiety-like behaviors in C3H/HeN mice. **Genes, Brain and Behavior**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 546–553, 2017.

LOK, R., van Koningsveld, M. J., Gordijn, M. C., Beersma, D. G., & Hut, R. A. Daytime melatonin and light independently affect human alertness and body temperature. **Journal of Pineal Research**, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1111/jpi.12583.

LUO, G. P., Jian, Z., Ma, R. Y., Cao, Z. Z., Zhu, Y., Zhu, Y., ... & Xiao, Y. B. Melatonin alleviates hypoxia-induced cardiac apoptosis through PI3K/Akt pathway. **International journal of clinical and experimental pathology**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 5840–5849, 2018.

MACCARRONE, M., Di Rienzo, M., Battista, N., Gasperi, V., Guerrieri, P., Rossi, A., & Finazzi-Agrò, A. The endocannabinoid system in human keratinocytes: Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activating protein-1, and transglutaminase. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 278, n. 36, p. 33896–33903, 2003.

MCMAHON, S., & KOLTZENBURG, M. The changing role of primary afferent neurones in pain. **Pain**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 269–272, 1990.

Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., ... & Vogel, Z. V. I. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 83–90, 1995.

MELZACK, R., & Wall, P. D. **GateControl-Pain mechanisms - a new theory.** *Science*, 1965.

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

MINAMI, K., & Uezono, Y. Gq protein-Coupled Receptors as Targets for Anesthetics. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 12, n. 15, p. 1931–1937, 2006.

MONTEIRO, E. C. A., T., J. M. D. F., D., A. L. B. P., & C., W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 53–63, 2008.

MOTASIM B., M. Phospholipase D and cell signaling. **Current Opinion in Immunology**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 114–123, 1993. D

MUNRO, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, [S. l.], 1993.

NAHIN, R. L. Estimates of Pain Prevalence and Severity in Adults: United States, 2012. **Journal of Pain**, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 769–780, 2015.

NANTEL, F., Denis, D., Gordon, R., Northey, A., Cirino, M., Metters, K. M., & Chan, C. C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], p. 853–859, 1999.

NOSJEAN, O., Ferro, M., Cogé, F., Beauverger, P., Henlin, J. M., Lefoulon, F., ... & Boutin, J. A. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 275, n. 40, p. 31311–31317, 2000.

HOWLETT, A. C., & Abood, M. E. CB1 and CB2 receptor pharmacology. **In Advances in Pharmacology** (Vol. 80, pp. 169-206) 2017.

OLIVEIRA-ABREU, K., Ferreira-da-Silva, F. W., da Silva-Alves, K. S., Silva-dos-Santos, N. M., Cardoso-Teixeira, A. C., do Amaral, F. G., ... & Leal-Cardoso, J. H. (2018). Melatonin decreases neuronal excitability in a sub-population of dorsal root ganglion neurons. **Brain Research**, [S. l.], v. 1692, p. 1–8, 2018.

OLIVEIRA, C. da Costa, de Carvalho Veloso, C., Ferreira, R. C. M., Lage, G. A., Pimenta, L. P. S., Duarte, I. D. G., ... & de Castro Perez, A. Evidence for the involvement of opioid and cannabinoid systems in the peripheral antinociception mediated by resveratrol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 369, n. June 2018, p. 30–38, 2019.

OLIVEIRA, C. da Costa; VELOSO, Clarice De Carvalho; FERREIRA, Renata Cristina Mendes; LAGE, Gisele Avelar; PIMENTA, Lúcia Pinheiro Santos; DUARTE, Igor Dimitri Gama; ROMERO, Thiago Roberto Lima; PEREZ, Andrea De Castro. Peltatoside Isolated from *Annona crassiflora* Induces Peripheral Antinociception by Activation of the Cannabinoid System. **Planta Medica**, [S. l.], v. 83, n. 3–4, p. 261–267, 2017.

FONSECA Pacheco, D., Romero, T. R. L., & Duarte, I. D. G. Ketamine induces central antinociception mediated by endogenous cannabinoids and activation of CB 1 receptors. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 699, n. January 2018, p. 140–144, 2019. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.01.059.

ANDERSEN, L. P. The analgesic effects of exogenous melatonin in humans. **Danish medical journal**, [S. l.], p. 1–15, 2016.

PIOMELLI, Daniele. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 4, n. 11, p. 873–884, 2003. DOI: 10.1038/nrn1247. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn1247>.

PORTER, Amy C. et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S. l.], v. 301, n. 3, p. 1020–1024, 2002. DOI: 10.1124/jpet.301.3.1020.

PRATIK K. MUTHA, ROBERT L. SAINBURG, Kathleen Y. Haaland. 基因的改变 NIH Public Access. **Bone**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.09.020. Endocannabinoid.

RANDALL, Lowell O. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. **Arch Int Pharmacodyn.**, v. 111, p. 409-419, 1957.

RAY, m.; Mediratta, P. K.; Mahajan, P.; Sharma, K. K. Evaluation of the role of melatonin in formalin-induced pain response in mice. **Indian Journal of Medical Sciences**, [S. l.], v. 58, n. 3, p. 122–130, 2004.

RIGOTTI, M. A., & Ferreira, A. M. Intervenções de enfermagem ao paciente com dor. **Arq Ciênc Saúde**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 50–4, 2005.

ROMERO, T. R., Galdino, G. S., Silva, G. C., Resende, L. C., Perez, A. C., Cortes, S. F., & Duarte, I. D. Involvement of the L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in peripheral antinociception induced by N-palmitoyl-ethanolamine in rats. **Journal of Neuroscience Research**, [S. l.], v. 90, n. 7, p. 1474–1479, 2012.

ROMERO, T. R., Galdino, G. S., Silva, G. C., Resende, L. C., Perez, A. C., Côrtes, S. F., & Duarte, I. D.. Ketamine activates the l-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway to induce peripheral antinociception in rats. **Anesthesia and Analgesia**, [S. l.], v. 113, n. 5, p. 1254–1259, 2011.

ROMERO, T. R., Guzzo, L. S., Perez, A. C., Klein, A., & Duarte, I. D. Noradrenaline activates the NO/cGMP/ATP-sensitive K + channels pathway to induce peripheral antinociception in rats. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 157–161, 2012. b.

ROMERO, T. R. L., da Fonseca Pacheco, D., & Duarte, I. D. G. (2013). Probable involvement of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels (CaCCs) in the activation of CB1 cannabinoid receptors. **Life Sciences**, [S. l.], v. 92, n. 14–16, p. 815–820, 2013.

SAFARIPOUR, S., Nemati, Y., Parvardeh, S., Ghafghazi, S., Fouladzadeh, A., & Moghimi, M. Role of l-arginine/SNAP/NO/cGMP/KATP channel signalling pathway in antinociceptive effect of  $\alpha$ -terpineol in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [S. l.], v. 70, n. 4, p. 507–515, 2018.

SALIO, C., FISCHER, J., FRANZONI, M. F., & CONRATH, M. Pre- and postsynaptic localizations of the CB1 cannabinoid receptor in the dorsal horn of the rat spinal cord. **Neuroscience**, [S. l.], v. 110, n. 4, p. 755–764, 2002.

SAMMONS, M. J., Raval, P., Davey, P. T., Rogers, D., Parsons, A. A., & Bingham, S. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. **Brain Res**, [S. l.], v. 876, n. 1–2, p. 48–54, 2000.

SANDKÜHLER, J. The organization and function of endogenous antinociceptive systems. **Progress in neurobiology**, v. 50, n. 1, p. 49-81, 1996.

SANUDO-PENA, M. C., Strangman, N. M., Mackie, K., Walker, J. M., & Tsou, K. CB1 receptor localization in rat spinal cord and roots, dorsal root ganglion, and peripheral nerve. **Acta Pharmacologica Sinica**, 1999.

SHIN, D. J., Jeong, C. W., Lee, S. H., & Yoon, M. H. Receptors involved in the antinociception of intrathecal melatonin in formalin test of rats. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 494, n. 3, p. 207–210, 2011.

SLOMINSKI, A., Baker, J., Rosano, T. G., Guisti, L. W., Ermak, G., Grande, M., & Gaudet, S. J. Metabolism of serotonin to n-acetylserotonin, melatonin, and 5-methoxytryptamine in hamster skin culture. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 271, n. 21, p. 12281–12286, 1996.

SLOMINSKI, A., Fischer, T. W., Zmijewski, M. A., Wortsman, J., Semak, I., Zbytek, B., ... & Tobin, D. J. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. **Endocrine**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 137–147, 2005.

SLOMINSKI, A., Pisarchik, A., Zbytek, B., Tobin, D. J., Kauser, S., & Wortsman, J. Functional activity of serotonergic and melatonergic systems expressed in the skin. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 196, n. 1, p. 144–153, 2003.

SONG, L., Wu, C., & Zuo, Y.. Melatonin prevents morphine-induced hyperalgesia and tolerance in rats: Role of protein kinase C and N-methyl-D-aspartate receptors. **BMC Anesthesiology**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–8, 2015.

SRINIVASAN, V., Pandi-Perumal, S. R., Spence, D. W., Moscovitch, A., Trakht, I., Brown, G. M., & Cardinali, D. P. Potential use of melatonergic drugs in analgesia: Mechanisms of action. **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 81, n. 4–5, p. 362–371, 2010.

STAROWICZ, K., & Finn, D. P. Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action. 1. ed. [s.l.] **In Advances in Pharmacology** (Vol. 80, pp. 437-475, 2017).

STEPHENS, L., Smrcka, A., Cooke, F. T., Jackson, T. R., Sternweis, P. C., & Hawkins, P. T. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein  $\beta\gamma$  subunits. **Cell**, [S. l.], v. 77, n. 1, p. 83–93, 1994.

SUGIURA, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., ... & Waku, K. 2-arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 215(1), 89-97 1995.

ULUGOI, A., Dokmeci, D., Guray, G., Sapolyo, N., Ozyigit, F., & Tamer, M. Antihyperalgesic, but not antiallodynic, effect of melatonin in nerve-injured neuropathic mice: Possible involvements of the L-arginine-NO pathway and opioid system. **Life Sciences**, [S. l.], v. 78, n. 14, p. 1592–1597, 2006.

VAN SICKLE, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., ... & Sharkey, K. A. Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB2 Receptors. **Science**, [S. l.], v. 310, n. 5746, p. 329–332, 2005.

VASCONCELOS, F. H., & Araújo, G. C. D. . Prevalence of chronic pain in Brazil: a descriptive study. **Brazilian Journal Of Pain**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 176–179, 2018.

WALKER, J. M., Huang, S. M., Strangman, N. M., Tsou, K., & Sañudo-Peña, M. C. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 96, n. 21, p. 12198–203, 1999.

WANG, J., & Ueda, N. Biology of endocannabinoid synthesis system. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, [S. l.], v. 89, n. 3–4, p. 112–119, 2009.

WATKINS, L. R., & Mayer, D. J. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. **Science**, [S. l.], v. 216, n. 4551, p. 1185–1192, 1982.

WILHELMSSEN, M., Amirian, I., Reiter, R. J., Rosenberg, J., & Gögenur, I. . Analgesic effects of melatonin: A review of current evidence from experimental and clinical studies. **Journal of Pineal Research**, [S. l.], v. 51, n. 3, p. 270–277, 2011.

WOODHAMS, S. G., Sagar, D. R., Burston, J. J., & Chapman, V. The role of the endocannabinoid system in pain. In: **Pain control**, p. 119-143, 2015.

WOOLF, C. J. Review series introduction What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 120, n. 11, p. 10–12, 2010.

XIA, Y., Chen, S., Zeng, S., Zhao, Y., Zhu, C., Deng, B., ... & Ren, W. Melatonin in macrophage biology: Current understanding and future perspectives. **Journal of Pineal Research**, [S. l.], v. 66, n. 2, p. 1–21, 2019.

YU, C. X., Zhu, C. B., Xu, S. F., Cao, X. D., & Wu, G. C. The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. **European journal of pharmacology**, [S. l.], v. 403, n. 1–2, p. 49–53, 2000. a.

YU, C. X., Zhu, C. B., Xu, S. F., Cao, X. D., & Wu, G. C. Selective MT 2 melatonin receptor antagonist blocks melatonin-induced antinociception in rats. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 282, p. 161–164, 2000. b.

ZAHN, P. K., Lansmann, T., Berger, E., Speckmann, E. J., & Musshoff, U. Gene expression and functional characterization of melatonin receptors in the spinal cord of the rat: implications for pain modulation. **Journal of Pineal Research**, [S. l.], p. 24–31, 2003.

ZAWILSKA, J. B., SKENE, D. J., & ARENDT, J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. **Pharmacological Reports**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 383–410, 2009. DOI: 10.1016/S1734-1140(09)70081-7.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 109–110, 1983.

ZOU, S., & Kumar, U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 3, 2018.

## ANEXO I

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>CEUA</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>Prezado(a):</p>	
<p>Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.</p>	
<p><b>Protocolo CEUA:</b> 286/2017 <b>Título do projeto:</b> ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINÓIDE NO MECANISMO ANTINOCEPTIVO PERIFÉRICO DA MELATONINA <b>Finalidade:</b> Pesquisa <b>Pesquisador responsável:</b> Thiago Roberto Lima Romero <b>Unidade:</b> Instituto de Ciências Biológicas <b>Departamento:</b> Departamento de Farmacologia</p>	
<p><b>Situação atual:</b> <a href="#">Decisão Final - Aprovado</a></p>	
<p>Aprovado na reunião do dia 13/11/2017. Validade: 13/11/2017 à 12/11/2022</p>	
<p>Belo Horizonte, 13/11/2017.</p>	

Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética para uso de animais

---