

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

**SINERGISMO E ADITIVIDADE ENTRE OS SISTEMAS CANABINOIDÉRGICO,
OPIOIDÉRGICO E ADRENÉRGICO NA MODULAÇÃO DA NOCICEPÇÃO
PERIFÉRICA EM CAMUNDONGOS.**

Caio Fábio Baeta Lopes

Belo Horizonte

2018

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

**SINERGISMO E ADITIVIDADE ENTRE OS SISTEMAS CANABINOIDÉRGICO,
OPIOIDÉRGICO E ADRENÉRGICO NA MODULAÇÃO DA NOCICEPÇÃO
PERIFÉRICA EM CAMUNDONGOS.**

Caio Fábio Baeta Lopes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, com área de concentração em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero.

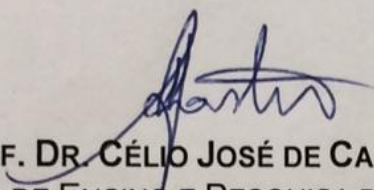
Belo Horizonte

2018

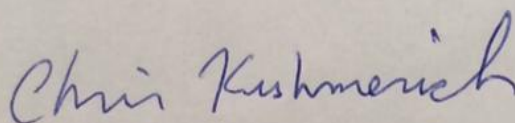
"SINERGISMO E ADITIVIDADE ENTRE OS SISTEMAS CANABINOIDÉRGICO, OPIOIDÉRGICO E ADRENÉRGICO NA MODULAÇÃO DA NOCICEPÇÃO PERIFÉRICA EM CAMUNDONGOS"

CAIO FÁBIO BAÊTA LOPES

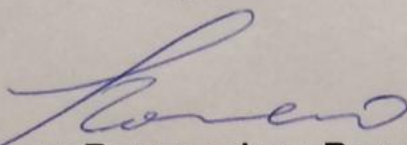
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 10 de dezembro de 2018, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. CÉLIO JOSÉ DE CASTRO JUNIOR
INSTITUTO DE ENSINO E PESQUISA DA SANTA CASA BH



PROF. DR. CHRISTOPHER KUSHMERICK
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



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

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

Belo Horizonte, 10 de dezembro de 2018

“Amar é um ato de coragem.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à UFMG, representada por toda a sua comunidade acadêmica, pela oportunidade de me tornar mestre em um ambiente tão enriquecedor e agradável. A Universidade é de todos e eu sou muito grato por ter aprendido tanto e ter podido contribuir com o meu melhor.

Tenho também sincera gratidão pelas agências públicas de fomento à pesquisa (CNPq, FAPEMIG) por financiarem a execução deste trabalho. Agradeço especialmente à CAPES pela concessão de bolsa de mestrado, essencial para aqueles que se dedicam exclusivamente à pós-graduação.

Agradeço ao Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero pela orientação acadêmica. Estendo meus cumprimentos aos Professores Dr. Igor Dimitri Gama Duarte e Dra. Andrea de Castro Perez, companheiros de pesquisa e trabalho de meu orientador, e mentores intelectuais sempre que preciso.

Aos colegas do LDA, meu sincero agradecimento e abraço. Todos são pessoas e cientistas incríveis, dotados de grande habilidade intelectual. Juntos, formamos um time de agradável convivência e forte amizade!

Agradeço também aos companheiros do LABRE, em especial à Hipácia Werneck e à Prof^a. Dra. Cleida Aparecida de Oliveira. A ajuda e acolhimento de ambas foram cruciais para a execução deste trabalho.

Tenho também gratidão ao Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz pelo empenho em me auxiliar com a cultura primária de neurônios, cedendo gentilmente o espaço do LAMEX para que eu aprendesse tanto.

Agradeço ao grande amigo MSc. Mário Fernandes Foganholi, que me acompanhou na jornada acadêmica do mestrado e que me auxiliou nos tórridos cálculos feitos. De fato, sem ele não teria sido possível finalizar esta dissertação.

Agradeço à minha querida irmã Maria Alice de Freitas Lopes, grande cientista e entusiasta da pesquisa acadêmica, pela ajuda com as análises de microscopia confocal. Sua sabedoria foi crucial na aquisição das belas imagens.

Meu sincero carinho e abraço para agradecer às minhas queridas MSc. Thamyris Santos Silva e MSc. Flávia Cristina Fonseca por terem tornado a isoblogografia possível. Ambas me auxiliaram muitíssimo na execução técnica dos procedimentos com animais. Devo este trabalho, em grande parte, às duas.

Agradeço também aos meus grandes amigos, que não vou enumerar para não correr o risco de esquecer ninguém. São essas amizades que alicerçam a vida. À minha querida família, um forte abraço e gratidão pelo apoio incondicional, sobretudo à minha querida mãe Celsita Baeta Lopes, que nunca deixou de acreditar em mim.

Por fim, retomo o agradecimento e dedico este trabalho ao meu grande amor, Thamyris. Minha querida companheira e amiga tornou esta jornada suave e engrandecedora. Sem ela, não havia como. Muito obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS

AEA: Aracdonoilletanolamina (anandamida)

Co-IP: Coimunoprecipitação

DAB: Diaminobenzidina

DAMGO: Ala²-MePhe⁴-Gliol⁵-Encefalina

DEMEM: *Dubelcco's Modified Eagle Medium*

DRG: Gânglio da Raiz Dorsal, do inglês *Dorsal Root Ganglion*

EMP: Efeito Máximo Possível

GPCR: Receptor Acoplado à Proteína G, do inglês *G-Protein Coupled Receptor*

HE: Hematoxilina e Eosina

IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor, do inglês *International Association for the Study of Pain*

IC: Índice de Combinação

MP: Membrana Plasmática

NGF: Fator de Crescimento de Nervos, do inglês *Nerve Growth Factor*

NMDA: N-metil-D-aspartato

PAG: Matéria Cinzenta Periaquedutal, do inglês *Periaquedutal Gray*

PFA: Paraformaldeído

PGE₂: Prostaglandina E₂

PLA: Ensaio de Ligação por Proximidade, do inglês *Proximity Ligation Assay*

RCA: Amplificação Circular, do inglês *Rolling Circle Amplification*

SFB: Soro Fetal Bovino

SNC: Sistema Nervoso Central

XYL: Xilazina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O princípio de aditividade de Loewe.	25
Figura 2. Administração intraplantar, em camundongos, de tratamentos e controles.	34
Figura 3. Teste algesimétrico de retirada de pata.....	36
Figura 4. Dissecção de DRGs lombares.	38
Figura 5. Esquema do PLA indireto.....	43
Figura 6. Curva dose-resposta de AEA.....	47
Figura 7. Curva dose-resposta de XYL.....	49
Figura 8. Curva dose-resposta de DAMGO.....	51
Figura 9. Isóbulas de aditividade AEA+XYL.	54
Figura 10. Isóbulas de aditividade para AEA+DAMGO.....	56
Figura 11. Isóbulas de aditividade para DAMGO+XYL.....	58
Figura 12. Interseções das retas de razão de doses constantes com isóbulas de aditividade.	60
Figura 13. Curva dose-resposta teórica AEA+XYL.....	62
Figura 14. Curva dose-resposta teórica AEA+DAMGO.	64
Figura 15. Curva dose-resposta teórica DAMGO+XYL.	66
Figura 16. Curva dose-resposta experimental AEA+XYL.....	67
Figura 17. Curva dose-resposta experimental AEA+DAMGO.	70
Figura 18. Curva dose-resposta experimental DAMGO+XYL.....	73
Figura 19. Isobogramas para as combinações AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL.	76
Figura 20. Comparação dos efeitos teóricos e experimentais para AEA+XYL.	78
Figura 21. Comparação dos efeitos teóricos e experimentais para AEA+DAMGO.	79
Figura 22. Comparação dos efeitos teóricos e experimentais para AEA+DAMGO.	80
Figura 23. Secções congeladas coradas com HE.	81
Figura 24. Avaliação imunohistoquímica da expressão de CB1R em tecidos de DRGs lombares (L3–L5) e coxim plantar de camundongos.....	83
Figura 25. Análise qualitativa, por imunohistoquímica, da expressão de MOR em coxim plantar e DRGs lombares (L3-L5) de camundongos.	84
Figura 26. PLA indireto em neurônios DRG cultivados.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diluições de anticorpo primário.	40
Tabela 2. Parâmetros farmacodinâmicos de AEA.	48
Tabela 3. Relações dose-efeito (10, 30 e 50% EMP) derivados para AEA.	48
Tabela 4. Parâmetros farmacodinâmicos de XYL.	50
Tabela 5. Relações dose-efeito (10, 30 e 50% EMP) para XYL.	50
Tabela 6. Parâmetros farmacodinâmicos de DAMGO.	52
Tabela 7. Relações dose-efeito (10, 30 e 50% EMP) para DAMGO.	52
Tabela 8. Equações de isóbatas AEA+XYL.	53
Tabela 9. Parâmetros das equações de isóbatas AEA+XYL.	54
Tabela 10. Equações de isóbatas de AEA+DAMGO.	55
Tabela 11. Parâmetros das equações de isóbatas de AEA+DAMGO.	55
Tabela 12. Equações de isóbatas de DAMGO+XYL.	57
Tabela 13. Parâmetros das equações de isóbatas de DAMGO+XYL.	57
Tabela 14. Razões de doses fixas.	59
Tabela 15. Combinações binárias de AEA, XYL e DAMGO.	59
Tabela 16. Doses de XYL equiefetivas às doses de AEA.	61
Tabela 17. Dose-efeito para XYL.	62
Tabela 18. Doses de DAMGO equiefetivas às doses de AEA.	63
Tabela 19. Dose-efeito para DAMGO.	63
Tabela 20. Doses de XYL equiefetivas às doses de DAMGO.	65
Tabela 21. Dose-efeito para XYL.	65
Tabela 22. Parâmetros farmacodinâmicos experimentais AEA+XYL.	68
Tabela 23. Relações dose-efeito para XYL.	68
Tabela 24. Efeito experimental AEA+XYL.	68
Tabela 25. Doses binárias AEA+XYL.	69
Tabela 26. Índices de combinação para AEA+XYL.	69
Tabela 27. Parâmetros farmacodinâmicos experimentais AEA+DAMGO.	70
Tabela 28. Relações dose-efeito para DAMGO.	71
Tabela 29. Efeito experimental AEA+DAMGO.	71
Tabela 30. Doses binárias AEA+DAMGO.	72
Tabela 31. Índices de combinação para AEA+DAMGO.	72
Tabela 32. Parâmetros farmacodinâmicos experimentais DAMGO+XYL.	73
Tabela 33. Relações dose-efeito para XYL.	74
Tabela 34. Efeito experimental DAMGO+XYL.	74
Tabela 35. Doses binárias DAMGO+XYL.	74
Tabela 36. Índices de combinação para DAMGO+XYL.	75
Tabela 37. Qualidade da regressão não-linear.	89
Tabela 38. Percentuais de resposta de cada fármaco nas associações binárias.	91

RESUMO

A dor patológica é uma condição clínica importante que afeta 30% dos indivíduos em alguma fase de suas vidas. A terapêutica da dor depende de um repertório diverso de abordagens farmacológicas, porém os medicamentos em geral empregados não são tão eficazes e apresentam efeitos colaterais. Apesar dos esforços para o desenvolvimento de novos fármacos, existem abordagens distintas que buscam se beneficiar da coadministração de analgésicos já existentes, na tentativa de se maximizar o efeito terapêutico em detrimento de reações adversas. De fato, essa abordagem visa se beneficiar do sinergismo farmacológico, definido como resultado de efeitos supra-aditivos associados a alguma resposta biológica. Neste trabalho, avaliou-se através de isobolografia a ação sinérgica de três agentes antinociceptivos, administrados em doses binárias, no teste algésimétrico de retirada de pata. Também se buscou a caracterização molecular da ocorrência de heterodímeros de GPCRs, por PLA, em neurônios cultivados de DRGs lombares. Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, tratados com um agonista canabinoide CB₁R (anandamida, AEA), um agonista opioide MOR (DAMGO) e/ou um agonista adrenérgico α₂R (xilazina, XYL), coadministrados via intraplantar em animais sensibilizados com prostaglandina E₂ (PGE₂). Procedeu-se com avaliação de limiar nociceptivo e os resultados obtidos foram comparados com a predição teórica de aditividade de efeitos. Observou-se profundo sinergismo farmacológico na ação antinociceptiva de AEA+XYL e AEA+DAMGO, para os quais se registram índices de combinação (IC) menores que 1. Para a combinação DAMGO+XYL, observou-se efeitos aditivos (IC = 1). Os efeitos experimentais foram significativamente maiores que os preditos teoricamente, baseando-se nos princípios de aditividade de Loewe, para todos os níveis de efeito testados (10, 30 e 50% EMP), considerando os pares AEA+XYL e AEA+DAMGO. Para o par DAMGO+XYL, os efeitos experimentais foram significativamente maiores apenas para 10 e 50% EMP. Buscou-se compreender a fundamentação molecular desse sinergismo, investigando-se a expressão de CB₁R e MOR em neurônios aferentes primários de DRGs lombares (L3-L5). Ambos os receptores são constitutivamente expressos nessa população de neurônios. Além disso, esses GPCRs aparecem co-localizados em culturas celulares desses neurônios, como revelado por um PLA indireto, capaz de detectar a formação de heterocomplexos de proteínas. Em conjunto, esses resultados sugerem forte efeito antinociceptivo sinérgico para diferentes

combinações de fármacos, sobretudo agonistas canabinoidérgicos e opioidérgicos, e tal efeito pode estar correlacionado a ocorrência de heterodímeros de GPCRs em neurônios de DRGs.

ABSTRACT

Pathologic pain is a relevant clinical condition that affects 30% of individuals at least once in life. The therapeutic management of pain relies on a diverse repertoire of pharmaceuticals, but most of them are not enough effective or leads to diverse side effects, justifying the urge for new treatments. Despite the efforts to develop new pharmaceuticals, diverse approaches seek benefits on the co-administration of already existing analgesics, an attempt to maximize therapeutic effects and concurrently reduce side effects. In fact, that approach seeks benefits on pharmacological synergism, which can be defined as supra-additive effects associated to a certain biological response. The aim of this work was to evaluate, using isobolographic analysis, the synergistic effects of three antinociceptive substances, administered in binary doses, on the algesimetric test of paw withdrawal. The occurrence of GPCR heterodimers on lumbar DRG neurons was also evaluated. For that aim, Swiss male mice were treated with a cannabinoidergic CB₁R agonist (anadimide, AEA), an opioidergic MOR agonist (DAMGO) and/or an adrenergic α₂R agonist (xylazine, XYL), co-administered in the hindpaw of mice previously sensitized with prostaglandin E₂ (PGE₂). The nociceptive threshold was evaluated, and the results obtained were compared with the additive predicted effects. It was observed a profound pharmacological synergism for the antinociceptive effects of AEA+XYL and AEA+DAMGO, with combination indexes (IC) lower than 1. For DAMGO+XYL combination, the effects were additive (IC = 1). The experimental effects were significantly higher than those predicted based on Loewe's additive principles, for all the effect levels tested (10, 30 and 50% MPE), considering the pairs AEA+XYL and AEA+DAMGO. For the pair DAMGO+XYL, experimental effects were significantly higher only for 10 and 30% MPE. The molecular foundation of such synergism was evaluated by investigating the expression of CB₁R and MOR on primary afferent neurons of lumbar (L3-L5) DRGs. Both receptors are constitutively expressed on this neuron population. Moreover, those GPCRs are co-localized on cell cultures of those neurons, as revealed by an indirect Proximity Ligation Assay (PLA), capable of detect the assembly of protein heterocomplexes. Taken together, the results presented suggest synergistic antinociceptive effects for distinct combinations of substances, especially cannabinoidergic and opioidergic agoists, and such effect could be correlated to the occurrence of GPCR heterodimers.

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. Considerações sobre o estudo da dor	17
1.2. Dor nociceptiva periférica.....	18
1.3. Receptores acoplados à proteína G.....	19
1.4. Heterocomplexos de GPCRs.....	20
1.5. Sinergismo farmacológico.....	21
1.6. Análise Isobográfica.....	23
2. Justificativa	27
3. Objetivos	29
3.1. Objetivo Geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. Materiais e Métodos.....	32
3.1. Animais de experimentação.....	33
3.2. Reagentes e soluções	33
3.3. Fármacos	34
3.3.1. Via de administração dos fármacos	34
3.3.2. Agente hiperalgésico	34
3.3.3. Agentes antinociceptivos.....	35
3.4. Teste algesimétrico de retirada de pata.....	35
3.5. Dissecção dos animais de experimentação	37
3.6. Histologia e Imunohistoquímica.....	39
3.6.1. Imunohistoquímica	39
3.7. Cultivo celular de neurônios aferentes primários (neurônios DRG)	40
3.8. Avaliação da Ocorrência de Heterocomplexos de GPCRs.....	41
3.8.1 <i>Ensaio de Ligação por Proximidade (PLA)</i>	41
3.8.2. PLA indireto em neurônios DRG.....	43

3.9. Abordagem estatística	44
3.9.1 Número amostral de animais de experimentação.....	44
3.9.2. Testes de hipóteses	45
3.9.3. Estimadores de variância	45
5. Resultados.....	46
5.1. Curva dose-resposta de AEA	47
5.2. Curva dose-resposta de XYL.....	49
5.3. Curva dose-resposta de DAMGO	51
5.4. Construção das isóbatas de aditividade para combinações binárias de AEA, XYL e DAMGO	53
5.4.1. Construção de isóbatas de aditividade AEA+XYL	53
5.4.2. Construção de isóbatas de aditividade AEA+DAMGO	55
5.4.3. Construção de isóbatas de aditividade XYL+DAMGO	57
5.5. Determinação das combinações de doses AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL.....	58
5.6. Determinação de doses equiefetivas para construção de curvas dose-resposta teóricas das combinações binárias de agentes antinociceptivos	61
5.6.1. Curva dose-resposta teórica AEA+XYL.....	61
5.6.2. Curva dose-resposta teórica AEA+DAMGO	63
5.6.3. Curva dose-resposta teórica DAMGO+XYL.....	64
5.7. Curvas dose-resposta experimentais para as combinações AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL.....	66
5.7.1. Curva dose-resposta experimental AEA+XYL.....	67
5.7.2. Curva dose-resposta experimental AEA+DAMGO	70
5.7.3. Curva dose-resposta experimental DAMGO+XYL.....	72
5.8. Isobogramas.....	75
5.9. Comparação de efeitos teóricos e experimentais das combinações AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL.....	77
5.9.1. Comparação de efeitos para AEA+XYL.....	77
5.9.2. Comparação dos efeitos para AEA+DAMGO	78
5.9.3. Comparação dos efeitos para DAMGO+XYL	79
5.10. Avaliação imunohistoquímica da expressão de CB ₁ R e MOR em tecidos de coxim plantar e DRGs lombares de camundongos.....	80

5.10.1.	Avaliação morfológica dos coxins plantares e DRGs lombares dissecados.	81
5.10.2.	Avaliação imunohistoquímica da expressão de CB1R em tecidos de coxim plantar e DRGs lombares de camundongos	82
5.10.3.	Avaliação imunohistoquímica da expressão de MOR em tecidos de coxim plantar e DRGs lombares de camundongos	83
5.11.	Avaliação da ocorrência de heterodímeros CB ₁ R-MOR em neurônios DRG lombares por PLA.....	85
6.	Discussão	87
7.	Referências Bibliográficas.....	97

1. Introdução

1.1. Considerações sobre o estudo da dor

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) definiu, em 1994, a dor como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada ao dano tissular real ou potencial”, e que pode ser classificada em quatro categorias: (1) dor nociceptiva, mediada por nociceptores, localizados em terminações nervosas livres de neurônios aferentes primários, capazes de captar estímulos nocivos e transduzi-los para o corno dorsal da medula espinhal, elicitando resposta aversiva (WOOLF, 2010); (2) dor inflamatória, decorrente de lesão tecidual com liberação de mediadores inflamatórios, capazes de sensibilizar nociceptores (MILLAN, 1999); (3) dor neuropática, associada à lesão direta da inervação periférica ou disfunção somatossensorial (COSTIGAN et al., 2009); (4) dor disfuncional ou idiopática, em que não existe agente lesivo, inflamatório ou neuropático presente, porém registra-se sensação dolorosa de origem desconhecida (WOOLF, 2010).

Evidências diretas têm demonstrado o papel de moduladores endógenos periféricos na dor, em adição aos mecanismos de controle central, em nível de terminais periféricos de neurônios aferentes (STEIN et al., 1995). Dentre esses moduladores encontram-se os endocanabinoides, opioides endógenos e neurotransmissores como a noradrenalina. Juntamente com seus receptores metabotrópicos específicos, estes formam um complexo sistema de modulação da nocicepção periférica, sendo determinada a existência de um tônus canabinoidérgico, opioidérgico e adrenérgico que controlam o *input* sensorial de dor (HONG et al., 1995; SPIGELMAN et al., 2010; ROMERO et al., 2009). A literatura evidencia um profundo sinergismo entre esses sistemas, indicando que seus elementos constitutivos operam em conjunto. Exemplos são: a interação entre a analgesia mediada por ketamina, um antagonista do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) e o sistema opioidérgico (PACHECO et al., 2014); a atividade analgésica periférica de um agonista parcial do receptor metabotrópico de dopamina D2 – aripiprazol – via receptores δ -opioides (FERREIRA et al., 2017); e a participação do sistema adrenérgico na analgesia periférica medida pelos diterpenos do café

cafestol e kahweol, que estimulam a liberação de peptídeos opioides endógenos (GUZZO et al., 2016).

1.2. Dor nociceptiva periférica

A dor nociceptiva é periféricamente mediada por nociceptores, localizados nas projeções axonais terminais de neurônios pseudo-unipolares cujos pericários se organizam em estruturas ganglionares laterais aos forames intravertebrais, os Gânglios da Raiz Dorsal (DRGs). A outra projeção axonal se encaminha e inerva corpos celulares de neurônios aferentes secundários presentes no corno posterior da medula. O estímulo nocivo periférico sensibiliza nociceptores, e ocorre transmissão sináptica para neurônios no corno posterior, dando início à via ascendente da dor, que segue através do trato espinotalâmico (paleo e neoespinotalâmico), alcançando o tálamo e de lá se comunicando com o córtex somatossensorial. A via descendente da dor é mais complexa e está relacionada à modulação da sensação de dor, iniciando-se por eferências direcionadas para a matéria cinzenta periaquedutal (PAG), projetando-se para o núcleo magno da rafe e daí para a substância gelatinosa no corno dorsal da medula espinal, modulando assim as aferências espinotalâmicas (DE FELICE, 2016).

A dor nociceptiva é uma sensação complexa e genuinamente subjetiva, porém com componentes fisiológicos bem estabelecidos, assim como uma compreensão farmacológica que viabiliza a existência de agentes analgésicos de ação periférica, anestésicos locais e outras classes de medicamentos (WOOLF, 2010). Além disso, o estudo farmacológico da dor periférica revelou a existência de sistemas tônicos de controle da transmissão nociceptiva periférica, fundamentado na existência de GPCRs e repertórios de ligantes endógenos (STEIN et al., 1995). Dentre esses sistemas, destacam-se os tónus canabinoidérgicos, opioidérgicos e adrenérgicos, mediado por GPCRs que se acoplam à proteína G inibitória (G_i) e que, portanto, diminuem os níveis intracelulares de cAMP, efeito acompanhado de uma inibição da excitação de neurotransmissores por diminuição da condutância de Ca^{2+} e incremento da condutância de K^+ (hiperpolarização) (BETKE, 2012). Esses

GPCRs estão localizados nas membranas neuronais tanto pré- quanto pós-sinápticas, e sua distribuição anatômica é diversa e abrange os terminais nociceptivos, DRGs e estruturas centrais como mesencéfalo. O padrão de expressão acompanha, portanto, os tratos ascendentes de dor (JI, 1995; GOLD, 1997; VERESS, 2012).

1.3. Receptores acoplados à proteína G

Receptores acoplados à proteína G (GPCRs) são uma classe de receptores transmembranares metabotrópicos caracterizados estruturalmente por uma porção N-terminal extracelular responsiva a ligantes, sete α -hélices transmembranas dinâmicas e uma cauda C-terminal citossólica e susceptível a fosforilação. A ligação de um agonista clássico ao sítio ortostérico de um GPCR estabiliza a conformação ativa do receptor, e viabiliza a interação de sua porção intracelular com proteínas G heterotriméricas ($G_{\alpha\beta\gamma}$), o que estimula a troca de nucleotídeos de guanidina difosforilados por trifosforilados ($GDP \rightarrow GTP$) na estrutura de $G_{\alpha\beta\gamma}$, com subsequente dissociação entre G_{α} e $G_{\beta\gamma}$. Essas subunidades agem então sobre enzimas que modulam a produção de segundos mensageiros, como adenilil-ciclase, responsável pela síntese de cAMP. Os GPCRs são, portanto, transdutores de sinais químicos (deve-se considerar a existência de GPCRs cujos “ligantes” são fótons, ex.: rodopsina). A atividade GTPásica de G_{α} garante a hidrólise de GTP com consequente re-estabilização do complexo $G_{\alpha\beta\gamma}$ (ROSENBAUM, 2009).

Esses receptores correspondem a cerca de 40% dos alvos biológicos dos atuais fármacos, e mais de 800 genes humanos codificam GPCRs. São, portanto, fundamentais na fisiologia humana e peças-chave no entendimento da farmacologia, já que seu caráter metabotrópico permite a interação desses receptores com ligantes exógenos com importância terapêutica ou experimental (FREDRIKSSON, 2003).

Pensados inicialmente como estruturas monoméricas, os GPCRs foram revelando-se estruturalmente complexos e diversos, assim como os múltiplos

ligantes a que respondem (de fótons a hormônios peptídicos). O descobrimento da obrigatoriedade de heterodimerização de receptores gabaérgicos metabotrópicos para sua funcionalidade estabeleceu novo paradigma no estudo de GPCRs, em que a oligomerização ganha destaque (EMSON, 2007). Atualmente, é crescente o número de evidências farmacológicas, biofísicas, bioquímicas e estruturais que sustentam essa hipótese, e o conceito de heterodímeros (e outros oligômeros) tem ganhado destaque. Nessa concepção, existe uma modulação alostérica mútua entre os protômeros, o que dá ao oligômero uma versatilidade dinâmica diferenciada que altera as propriedades farmacológicas esperadas para as estruturas protoméricas isoladas (HAACK, 2011).

1.4. Heterocomplexos de GPCRs

No início da década de 80 do século XX, Fuxe e colaboradores, baseados em achados prévios sobre expressão de GPCRs responsivos a monoaminas e neuropeptídeos no SNC, buscaram evidências da ocorrência de associações desses receptores em nível de MP através de estudos farmacológicos de ligação. Foi proposto, dessa forma, o paradigma da oligomerização de GPCRs como mecanismo responsável pelos efeitos observados: interações fortes e receptor-dependentes entre as sinalizações monoaminérgica e peptídica no sistema nervoso central (SNC) (FUXE et al., 2012).

Essa hipótese ganhou destaque em 1999, a partir do trabalho seminal de Marshall e colaboradores, em que se descreve a natureza heterodimérica do receptor metabotrópico do ácido γ -aminobutírico, GABA(B). Demonstrou-se que dois monômeros não funcionais - GABA(B)1 e GABA(B)2 – oligomerizam na membrana plasmática (MP), formando uma unidade dimérica funcional e responsiva a ligantes, e que de fato esse fenômeno de oligomerização é crucial e necessário para a formação de uma unidade sinalizadora funcional (MARSHALL, 1999).

A detecção experimental de heterocomplexos de MP, sobretudo heterodímeros de GPCRs, é desafiadora, porém plenamente factível e quantificável. Técnicas de FRET/BRET, baseadas na transferência de fótons virtuais entre fluoróforos adjacentes, de acordo com a premissa teórica de energia ressonante de Förster, são amplamente aplicadas para estudos de interações proteicas, inclusive heterodimerização de GPCRs (MARULLO et al., 2007) Outra técnica muito utilizada é a co-imunoprecipitação (Co-IP), capaz de determinar se há ou não associação entre unidades proteicas imunoprecipitadas, resolvidas em corrida eletroforética em gel de poliacrilamida e reveladas com anticorpos. Porém, o limite de resolução do método é relativamente alto, além de ele não revelar aspectos *in situ* da ocorrência de fenômenos de oligomerização, já que a amostra é destruída para obtenção da fração proteica (AVILA et al., 2015).

O “*proximity ligation assay*” (PLA) foi desenvolvido para permitir visualização, por imunomarcção, de proteínas, suas modificações pós-traducionais e de estados de ativação distintos. Porém a técnica também se mostrou útil na detecção localizada de interações proteína-proteína em células ou tecidos fixados, trazendo o conceito de PLA *in situ* para o paradigma de estudo de oligomerização de GPCRs (BELLUCCI et al., 2014). Dessa maneira, o PLA se consagra como uma técnica relativamente simples para o estudo de fenômenos de heterodimerização, como descrito na seção 3.8.1.

Considerando o papel crucial de diferentes GPCRs na modulação endógena da dor nociceptiva periférica, não é inesperado que o paradigma de oligomerização surja para justificar achados farmacológicos de sinergismo, tolerância e dependência. De fato, o tema já é extensamente revisto para GPCRs do sistema opioidérgico, em que se busca uma analgesia livre de tolerância e de interesse terapêutico (MUDGAL et al., 2015), e de forma mais geral por Fujita e colaboradores (2014).

1.5. Sinergismo farmacológico

A compreensão de sinergismo farmacológico pode ser feita qualitativamente, como o entendimento de ação farmacológica cooperativa, ou quantitativamente, como observação experimental de supra-aditividade de efeito – relacionado a alguma métrica analiticamente fundamentada em relações de dose-resposta dos agentes farmacológico em separado e/ou em conjunto (GEARY, 2012). Apesar do entendimento intuitivo, a temática ainda divide opiniões e não há consenso de terminologia, apesar dos esforços da comunidade acadêmica em sistematizar os conceitos relativos ao sinergismo farmacológico, sobretudo com o Acordo de Saariselkä, firmado em 1992 como consenso entre seis autores sobre adequação terminológica relacionada à associação binária de fármacos (GRECO et al., 1992).

Define-se assim sinergismo farmacológico como propriedade emergente, intrinsecamente associada a um sistema biológico e, portanto, complexo. Trata-se de um fenômeno observável e quantificável, que Geary (2012) classifica como efeito biológico “inesperadamente grande”, associado à coadministração de agentes farmacológicos. Em outras palavras, um efeito sinérgico corresponde a um total que é maior que a soma das partes. Ou seja, é possível se opor sinergismo e aditividade, sendo o primeiro algo mensurável e maior que o segundo. Apesar disso, outros autores entendem sinergismo como qualquer efeito ligado à associação de fármacos, podendo-se classificá-lo como aditivo ou de potenciação (RANG et al., 2011). No presente trabalho, optou-se pela definição de sinergismo como efeito biológico maior que o aditivo, caracterizável e mensurável.

Chou (2010), através de meticulosa análise algébrica de resultados de sinergismo, generaliza diversos resultados, baseados na lei da ação de massas, e assim sumariza a mensuração do efeito sinérgico ou aditivo em um Índice de Combinação (IC): IC = 1 indica aditividade, IC < 1 determina sinergismo e IC > 1 caracteriza sub-aditividade (alguns autores definem sub-aditividade como antagonismo, porém o termo é dúbio na medida em que diferentes antagonistas podem ter efeitos sinérgicos).

A abordagem do sinergismo farmacológico pode seguir dois referenciais teóricos: o modelo de independência de Bliss, que assume efeitos probabilísticos, associados à co-administração de fármacos, que são mutuamente independentes, e

o modelo de aditividade de Loewe, assentado em relações de dose-resposta para os fármacos separados e em conjunto, sem premissas de ação independente (TANG et al., 2015). A isoblografia, padrão-ouro para análise de sinergismo farmacológico, é um exemplo de metodologia aplicável aos estudos de interações de efeitos associados a doses conhecidas de fármacos. Essa técnica - expandida pelos trabalhos seminais de Ronald J. Tallarida - é baseada nos princípios de aditividade de Loewe e segue com extensa aplicabilidade em pesquisa básica, translacional e clínica.

1.6. Análise Isobolográfica

O método isobolográfico consiste em uma avaliação gráfica, estatisticamente validada, de desvios de uma situação de aditividade nos efeitos biológicos observáveis de associações de fármacos. Dessa forma, é uma técnica capaz de avaliar sinergismo farmacológico, já que desvios da aditividade são mensuráveis e expressos na forma de um IC, uma medida adimensional centrada na unidade. Desvios para valores menores que 1 indicam sinergismo, iguais a 1, aditividade e, para valores maiores que um, define-se sub-aditividade. É uma abordagem metodológica baseada em relações de dose-resposta (FOUCQUIER et al., 2015), e surgem dos trabalhos de Loewe (1926), que formaliza matematicamente a fundamentação teórica do princípio de aditividade. A assim definida aditividade de Loewe baseia-se nos princípios de equiefetividade de doses de fármacos distintos, ou seja, dada uma dose “a” de um fármaco “A”, existe uma dose “b” de um fármaco “B” equiefetiva, denominada b_a ; e na noção de aditividade, expressa como:

$$Efeito(a + b) = E_{A(a+a_b)} = E_{B(b_a+b)} = E_{AB}$$

Podendo-se definir, considerando um modelo sigmoidal de dose-resposta:

$$E_{A(a)} = \frac{E_{A,m\acute{a}x} \cdot a^{h_a}}{a^{h_a} + a_{50}^{h_a}} \text{ e } E_{B(b)} = \frac{E_{B,m\acute{a}x} \cdot b^{h_b}}{b^{h_b} + b_{50}^{h_b}}$$

Em que $E_{A,m\acute{a}x}$ e $E_{B,m\acute{a}x}$ são os efeitos máximos observáveis para os fármacos “A” e “B”, respectivamente, h_a e h_b são os respectivos coeficientes de Hill das curvas

dose-resposta de “A” e “B”, e a_{50} e b_{50} são as doses capazes de elicitar 50% do efeito máximo de “A” e “B”, respectivamente.

Para um determinado nível de efeito das combinações de “a” e “b”, por exemplo, $E_{AB,50}$, tem-se que:

$$\text{Se } a = 0, b = b_{50} \text{ e se } b = 0, a = a_{50}$$

Como “a” e “b” são valores reais positivos, para $E_{AB,50}$, os pares (a,b) são determinados por:

$$(0 \leq a \leq a_{50}, 0 \leq b \leq b_{50})$$

Pode-se representar essa coleção de pontos em um plano definido por eixos coordenados ortogonais, cada um representando, em escala linear, a dose de fármacos “A” e “B”. Esses pontos pertencem a uma curva, definida como isóbola de aditividade. Essa curva pode ser analiticamente representada por uma função real de $\mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$, de tal forma que se tem:

$$b = b(a)$$

Nessa relação, nota-se que a dose “b” pode ser expressa como uma função da dose “a”, para um dado nível de efeito E_{AB} . Analiticamente, determina-se essa função a partir dos princípios de aditividade de Loewe, como ilustrado na figura 1.

Essa igualdade é a chave para se determinar a isóbola de aditividade $E_{AB,50}$ como uma função, em que $b = b(a)$:

$$b_a = \frac{b_{50}}{\left[\frac{1}{\alpha} \cdot \left(1 + \frac{a_{50}^{h_a}}{a^{h_a}} \right) - 1 \right]^{\frac{1}{h_b}}}$$

Em que $\alpha = E_{A,máx}/E_{B,máx}$.

Logo, pode-se descrever a isóbola de aditividade $E_{AB,50}$ como:

$$b = b_{50} - b_a = b_{50} - \frac{b_{50}}{\left[\frac{1}{\alpha} \cdot \left(1 + \frac{a_{50}^{h_a}}{a^{h_a}} \right) - 1 \right]^{\frac{1}{h_b}}}$$

Em uma situação de efeitos máximos iguais, ou seja, $\alpha = 1$ e razão de potências constante, isto é, $h_a = h_b$, a isóbola de aditividade reduz-se a uma reta:

$$b = b_{50} - \frac{b_{50}}{a_{50}} \cdot a \rightarrow \frac{b}{b_{50}} + \frac{a}{a_{50}} = 1$$

As demais isóbulas de aditividade, como $E_{AB,10}$ (10% de efeito máximo possível) e $E_{AB,30}$ (30% de efeito máximo possível) podem ser obtidas de maneira similar.

2. Justificativa

A dor patológica, tida como sensação subjetiva, é na verdade uma condição clínica importante que afeta todos os indivíduos em alguma fase de suas vidas, e corresponde a um total de 80% das razões de busca por atendimento em serviços de urgência e emergência. Ausências no trabalho, licenças de saúde e aposentadorias precoces são consequências da dor que impactam diretamente no cenário socioeconômico do Brasil e do mundo (RAMLHO, 2009). Dessa maneira, um maior entendimento e novas alternativas para o manejo da dor no âmbito clínico se fazem necessárias.

Apesar do crescente esforço na busca por novos analgésicos, o uso racional e em regime combinado das opções já existentes é uma alternativa promissora. Isso porque existem efeitos analgésicos sinérgicos que podem reduzir doses administradas, maximizando assim o efeito terapêutico e detrimendo das reações adversas.

Dessa forma, a racionalização de regimes de coadministração de analgésicos deve ser objetivo de intenso estudo e compreensão, para que novas abordagens no âmbito clínico tornem-se realidade.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Caracterização isobolográfica do sinergismo farmacológico entre doses de combinações binárias de anandamida (AEA), xilazina (XYL) e DAMGO na antinocicepção periférica em camundongos, além de verificação, por ensaio de ligação por proximidade (PLA), da ocorrência de heterocomplexos de GPCRs CB₁R-MOR em neurônios de DRGs lombares.

3.2. Objetivos específicos

- Indução de dor nociceptiva na pata posterior direita de camundongos *Swiss* para avaliação de efeito antinociceptivo associado à administração de doses fixas de AEA, XYL, DAMGO e suas combinações binárias;
- Construção de curvas dose-resposta do efeito antinociceptivo periférico de doses crescentes dos fármacos AEA, XYL e DAMGO, em separado;
- Determinação dos parâmetros farmacodinâmicos ($E_{máx}$, C_{50} e h) para cada uma das curvas supracitadas;
- Construção de isóbulas de aditividade para 10%, 30% e 50% de efeito antinociceptivo máximo no teste de retirada de pata, para cada combinação binária de AEA, XYL e DAMGO;
- Cálculo de regime de doses das combinações binárias AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL, pela interseção da reta de razão de doses constante com as isóbulas citadas;
- Medição do limiar nociceptivo de controles e grupos tratados com os regimes de doses das combinações AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL;
- Construção de curvas dose-resposta experimentais para as combinações AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL;
- Comparação do efeito experimental observado com o efeito aditivo teórico, para determinação do índice de combinação (IC);

- Análise morfológica e imunohistoquímica de tecidos de coxim plantar e DRGs lombares (L3-L5) para detecção qualitativa da expressão de CB₁R e MOR;
- Análise qualitativa, por PLA, da ocorrência de heterodímeros CB₁R-MOR em MP de neurônios aferentes primários de DRGs lombares (L3-L5) cultivados.

4. Materiais e Métodos

3.1. Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* (machos), com peso médio de 35 g, provenientes do Centro de Bioterismo da UFMG (Cebio/UFMG). Esses animais foram dispostos em caixas plásticas contendo forragem, com acesso a água e comida *ad libitum*. Os animais foram ambientalizados em sala termicamente controlada em 24°C e ciclo claro/escuro de 12/12 horas por dois dias antes da realização dos experimentos. Todos os experimentos foram estritamente conduzidos segundo preceitos bioéticos de experimentação animal, e aprovados no Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA-ICB/UFMG), sob registro de protocolo nº 69/2018.

Para o sacrifício dos animais após os experimentos e para coleta de material biológico, foi utilizada uma dose três vezes maior que a terapêutica de xilazina e ketamina, administrada via intraperitoneal.

3.2. Reagentes e soluções

- Meio de cultivo celular *Dubelcco's Modified Eagle Medium* (DMEM): suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 200 mM l-glutamina (Sigma, EUA) e 0,0025% m.V⁻¹ de fator de crescimento de nervos (NGF) (Sigma,EUA), denominado de “meio completo”;
- Solução de colagenase derivada de *Clostridium histolyticum* (Sigma, EUA) a 20% m.V⁻¹, diluída em meio completo;
- Solução de tripsina (Sigma, EUA), a 0,025%, diluída em meio completo;
- Solução de Paraformaldeído (PFA) a 4% m.V⁻¹, diluído em 1X PBS;
- 10X PBS, contendo 96 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1400 mM NaCl, 27 mM KCl e 15 mM KH₂PO₄;
- Solução de sacarose a 30% m.V⁻¹, contendo NaN₃ 0,02% m.V⁻¹, diluída em 1X PBS;
- Solução salina estéril: NaCl 0,9% m.V⁻¹;
- 1X Tampão A: 35 mM Tris-base, 15 mM NaCl, 0,05% V.V⁻¹ Tween 20;
- 1X Tampão B: 35 mM Tris-base, 170 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl.

3.3. Fármacos

3.3.1. Via de administração dos fármacos

Todos os fármacos utilizados, bem como os controles, foram administrados via intraplantar, no coxim plantar posterior direito, em um volume fixo de veículo de 20 μ L. Para a injeção dos fármacos foi utilizada uma agulha hipodérmica acoplada a uma seringa de 1,0 mL, posicionando-se o bisel voltado para cima e em uma angulação de 20° em relação à superfície plantar dos animais, como mostrado na figura 2.



Figura 2. Administração intraplantar, em camundongos, de tratamentos e controles.

3.3.2. Agente hiperalgésico

Como agente hiperalgésico foi utilizada a prostaglandina E₂ (PGE₂, Sigma, EUA), substância hipernociceptiva capaz de sensibilizar nociceptores periféricos. A dose usada foi de 2 μ g diluídos em 20 μ L de solução salina fisiológica estéril (NaCl 0,9% m.V⁻¹), administrada via intraplantar conforme descrito.

3.3.3. Agentes antinociceptivos

- Anadamida (AEA): ([N-(2-Hidroxi-etil)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamida], Tocris, EUA), agonista canabinoide de alta afinidade para CB₁R;
- Xilazina (XYL): (Cloridrato de Xilazina 2,0% m.V⁻¹, Anasedan®), agonista adrenérgico com alta afinidade para α₂R;
- DAMGO: (Ala²-MePhe⁴-Gliol⁵-Encefalina, Tocris), agonista opioide de alta afinidade para MOR.

Uma solução estoque de AEA foi preparada em emulsão água/lipídeos comercialmente disponível (Tocrisolve®, Tocris). As demais diluições de AEA, bem como diluições de doses de XYL e DAMGO, foram feitas em NaCl 0,9% m.V⁻¹.

3.4. Teste algésimétrico de retirada de pata

A avaliação farmacológica de resposta antinociceptiva associada ao tratamento com AEA, XYL, DAMGO e suas combinações binárias foi feita através de teste algésimétrico de retirada de pata submetida à compressão, descrito originalmente por Randall & Selitto (1957) para ratos e posteriormente adaptado para camundongos por Kawabata *et al.* (1992). Para indução de hiperalgesia nos animais, no tempo t = 0h (t₀), foi administrada PGE₂, e em t = 2h55min, os agentes antinociceptivos e/ou suas combinações binárias foram injetados. Em t = 3h (t₃), foi feita a mensuração algésimétrica do limiar nociceptivo dos animais, como descrito abaixo.

Descrição do teste: No teste, o animal é gentilmente contido e mantido na posição horizontal sobre a bancada do algésímetro, alinhado rostralmente com o experimentador e com as patas posteriores ao alcance do pino de aplicação pressórica. A pata posterior do animal é então posicionada sob o pino de pressão (superfície de 1,75 mm²) e com os pés o experimentador aciona um pedal que ativa o mecanismo do algésímetro. Em funcionamento, o aparelho permite que um halter metálico de 10g avance ao longo da haste em que se fixa o pino de pressão,

incrementando a força aplicada sobre o coxim plantar do animal. A pressão cresce linearmente com a distância percorrida pelo halter, sendo que cada centímetro na escala da haste corresponde a um $\Delta p \approx 560$ kPa, que se traduz em dez gramas de massa por centímetro (10 g.cm^{-1}). Ao notar a resposta aversiva ao teste (retirada da pata), o experimentador interrompe o acionamento do pedal, cessando a movimentação do halter e permitindo assim que seu deslocamento em centímetros ao longo da haste seja aferido e dessa forma determinado o limiar de nocicepção (expresso em gramas). Os animais são submetidos ao teste, como ambientalização, no dia anterior ao experimento. A figura 3 ilustra o procedimento.

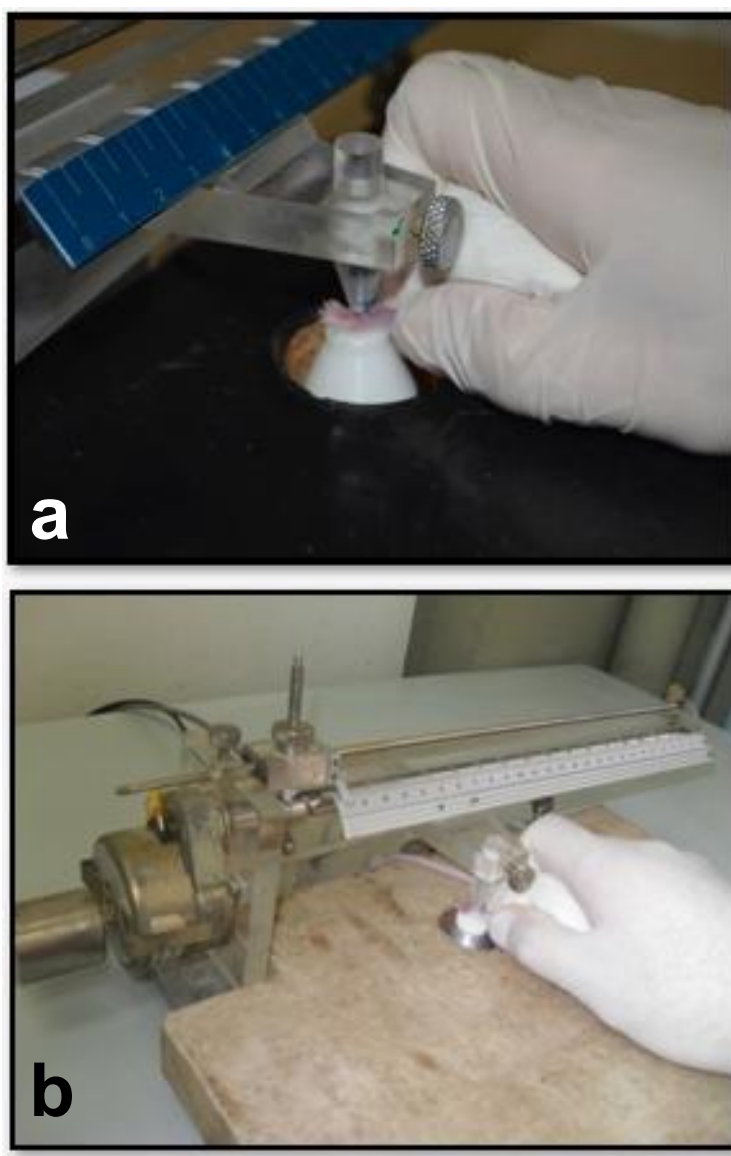


Figura 3. Teste algesimétrico de retirada de pata. (a) posicionamento da pata posterior direita do camundongo sob o pino pressórico, para realização do teste; (b) visão do aparato, em que se nota o halter e a régua que esse percorre, para incremento da pressão na pata do animal.

Os resultados foram normalizados e expressos como um percentual de efeito máximo possível (%EMP), definindo-se um ponto superior de corte igual a 160 g no algésímetro:

$$\%EMP = 100x \left(\frac{\text{Limiar} - E_0}{\text{ponto de corte} - E_0} \right) = 100x \left(\frac{\text{Limiar} - E_0}{160 \text{ g} - E_0} \right)$$

Em que E_0 corresponde à média dos limiares nociceptivos dos controles hiperalgésicos, ou seja, dos animais que receberam apenas PGE_2 e veículo. Essa maneira de se representar os dados mostra-se útil na interpretação dos resultados de antinocicepção, já que contempla, inclusive, quadros hipoalgésicos (dentro da escala percentual proposta). O corte superior é estabelecido como forma de se preservar o animal de lesão tecidual.

3.5. Dissecção dos animais de experimentação

Animais tratados com o agente hiperalgésico PGE_2 ou com $NaCl$ 0,9% m.V⁻¹ (controles positivos – expressão constitutiva as proteínas testadas) foram sacrificados para dissecção e retirada de amostras de tecido para análises histológicas e imunohistoquímicas (coxim plantar, DRGs) e cultivo celular primário (DRGs).

Para análises histológicas e imunohistoquímicas os animais foram perfundidos com PFA 4% m.V⁻¹ previamente à dissecção de coxins plantares tratados e dos DRGs lombares (L3-L5) ipsilaterais ao tratamento. Estes são os DRGs em que se localizam os corpos celulares dos axônios de neurônios aferentes primários que, em conjunto, formam tratos nervosos do nervo isquiático, responsável pela inervação sensorial e nociceptiva do coxim plantar. Para retirada dos coxins plantares, utilizou-se lâmina de bisturi nº 22, acoplada a cabo de bisturi, com corte frontal da superfície plantar, poupando ao máximo tecido conectivo, tendinoso e ósseo.

A retirada dos DRGs lombares foi feita a partir de adaptações técnicas dos métodos descritos por Richner et al. (2017) e Sleight et al. (2016). Resumidamente:

os animais, previamente perfundidos ou não, foram embebidos em etanol 70% V.V⁻¹ para diminuir o espalhamento de pelos durante a dissecação. Em seguida parte da pele do dorso foi removida, expondo-se a musculatura intercostal e paravertebral. Em sequência, foi feita exérese da coluna do animal, contendo vértebras torácicas, lombares e sacrais. O processo de extrusão hidráulica da medula espinhal foi feito, e consistiu na aplicação de pressão hidrostática positiva no canal medular, a partir de sua abertura caudal, através de uma seringa de 10 mL preenchida com 1X PBS e acoplada à uma ponteira de micropipeta P200. Procedeu-se com limpeza de tecido mesenquimal anexo à peça de coluna, isolamento da porção lombar e secção longitudinal da estrutura, para exposição lateral dos DRGs, localizados nos forames intervertebrais. Os DRGs lombares (L3-L5) foram então dissecados utilizando-se lente binocular no aumento de 16X, com auxílio de material cirúrgico de uso oftalmológico ou adaptado. A figura 4 ilustra as etapas mais relevantes do processo de remoção dos DRGs.

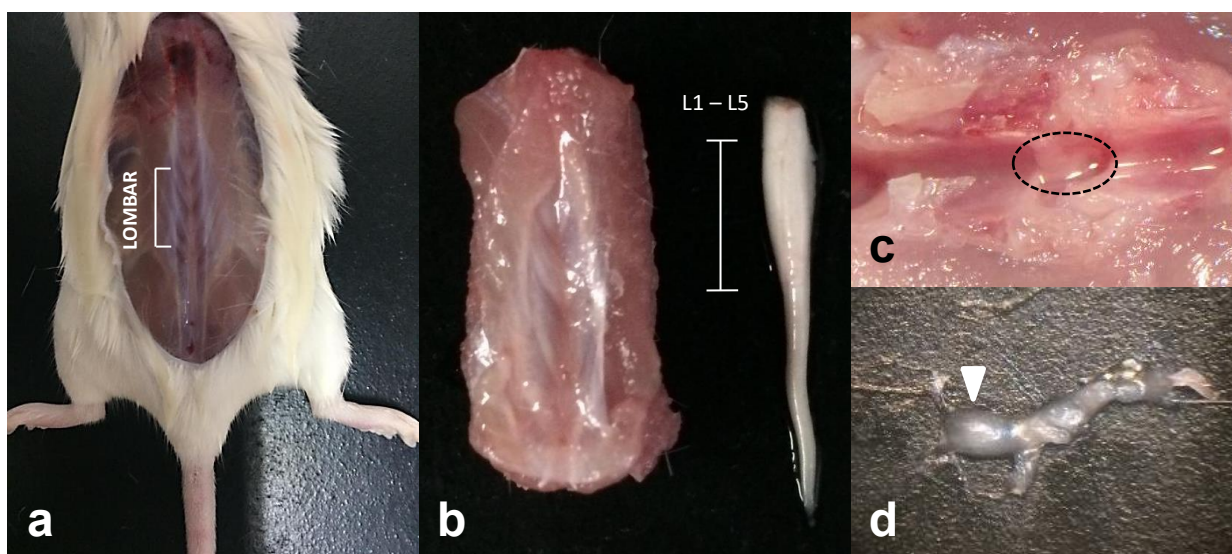


Figura 4. Dissecação de DRGs lombares. (a) visão dorsal da região da coluna vertebral a ser dissecada, neste caso, a porção lombar, acima da crista ilíaca (caudal) e abaixo do último arco costal (cefálico); (b) à esquerda, peça de coluna lombar dissecada, e à direita, porção de medula espinhal removida por extrusão hidráulica. Notar a tumefação lombar, em que se projetam as raízes dorsais L1–L5; (c) a secção longitudinal da peça de coluna revela, lateralmente, um DRG lombar localizado no forame intervertebral (círculo pontilhado); (d) DRG lombar dissecado, com destaque para o gânglio, contendo corpos celulares, na ponta de seta branca.

3.6. Histologia e Imunohistoquímica

Para análise histológica e imunohistoquímica dos tecidos de coxim plantar e DRGs lombares (L3-L5) de camundongos, os animais (n = 5/grupo) foram previamente submetidos a perfusão transcardíaca com 50 mL de NaCl 0,9% m.V⁻¹, seguidos de 50 mL de solução de PFA 4% m.V⁻¹, ambos os volumes a uma vazão de 5 mL.min⁻¹, com auxílio de bomba peristáltica. Em seguida, os animais foram dissecados como descrito anteriormente, e as amostras de tecido transferidas para solução de sacarose 30% m.V⁻¹, para crioproteção, por 24h. Em sequência, as amostras foram lavadas com 1X PBS, emblocadas com Tissuetek® e congeladas em N₂(l). Os blocos congelados foram então cortados em criostato, obtendo-se assim secções de 16 µm de tecido, que foram transferidas para lâminas previamente silanizadas para aderência do corte.

3.6.1. Imunohistoquímica

Para se investigar qualitativamente a expressão dos GPCRs CB₁R (receptor canabinoide) e MOR (receptor opioide) em tecidos de coxim plantar e DRGs lombares, foram feitas marcações imunohistoquímicas de secções congeladas dessas amostras (16 µm). As lâminas foram hidratadas em 1X PBS por 10 min, e então submetidas a bloqueio da atividade de peroxidases endógenas e fixação com solução de H₂O_{2(aq)} 0,6% V.V⁻¹ diluída em metanol absoluto por 30 min. Em seguida, bloqueou-se a ligação à avidinas e biotinas endógenas com uso de kit comercial (Vector Laboratories, Burlingame, EUA). Após essa etapa, os cortes foram tratados ou com soro normal de cabra a 10% V.V⁻¹ diluído em 1X PBS, ou com soro normal de coelho a 10% V.V⁻¹, por 1h, para redução de sítios de ligação inespecíficos de IgGs. Seguiu-se com incubação por 12h a 4°C das secções com soluções, diluídas em 1X PBS, de anticorpos primários, como mostrado na tabela a seguir:

Tabela 1. Diluições de anticorpo primário.

Técnica	Diluição do anticorpo primário	
	IgG de cabra anti-CB ₁ R	IgG de coelho anti-MOR
Imunohistoquímica	1:400	1:400
PLA	1:1000	1:1000

Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos secundários contra IgG de cabra (para anti-CB₁R) e IgG de coelho (para anti-MOR), ambos biotinizados, por 1h, e prosseguiu-se com adição de solução de complexo de avidina/biotina/peroxidase comercialmente disponível (Avidin/Biotin Blocking Kit®, Vector Laboratories, EUA) para amplificação de sinal. A imunorreação foi visualizada com solução de DAB a 0,05% m.V⁻¹, contendo H₂O_{2(aq)} a 0,01% V.V⁻¹, diluídos em tampão Tris-HCl 5 mM, pH = 7,4. A reação cromogênica foi interrompida por imersão em água deionizada. Por fim, as secções foram contracoradas com Hematoxilina de Dellafields, desidratadas por imersão em etanol absoluto, diafanizadas em xilol absoluto e enfim as lâminas foram montadas para análise em microscopia de luz.

3.7. Cultivo celular de neurônios aferentes primários (neurônios DRG)

Neurônios DRG foram cultivados para realização de PLA, com vistas a se detectar co-localização de CB₁R e MOR. Brevemente, animais não perfundidos tiveram os DRGs lombares (L3-L5), ipsilaterais ao tratamento intraplantar com PGE₂ ou NaCl 0,9% m.V⁻¹, dissecados como descrito anteriormente, e separados ao máximo das raízes nervosas. Os gânglios assim obtidos foram então lavados em 1X PBS estéril por gravidade e colocados em solução de colagenase 20% m.V⁻¹ em DEMEM por 1h a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado, o corpo de fundo lavado em 1X PBS por gravidade e então incubado com solução de tripsina a 0,025% em DMEM por 10 minutos. Nesse intervalo, lamínulas quadradas de 2 X 2 cm foram tratadas com poli-l-lisina e laminina para tornarem-se aderentes para as células. Após a etapa de tripsinização, o sobrenadante foi removido e solução de BSA a 16% m.V⁻¹ foi adicionada, e os gânglios gentilmente dissociados com auxílio de pipeta de vidro. A suspensão

celular obtida foi então transferida para um tubo de centrífuga contendo solução de BSA 16% m.V⁻¹, sendo delicadamente superposta ao conteúdo do tubo. Em seguida, procedeu-se com centrifugação a 6000 g por 5min para deposição, no fundo do tubo, das células, cujo sobrenadante foi removido, seguido de ressuspensão em meio completo e plaqueamento nas lamínulas recobertas, e então cultivadas por 24h a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% CO₂. As células aderentes foram então usadas para execução de PLA indireto.

3.8. Avaliação da Ocorrência de Heterocomplexos de GPCRs

3.8.1 Ensaio de Ligação por Proximidade (PLA)

O recentemente descrito PLA direto é um método que permite transduzir a detecção de proteínas para uma detecção de oligonucleotídeos (DNA fita simples). Trata-se de uma imunomarcagem de proteínas de interesse com anticorpos conjugados covalentemente com sequências de DNA fita simples. A técnica é de grande valor para análise de co-localização de proteínas, e seu baixo limite de detecção e as características intrínsecas da molécula de DNA associada (pareamento de Watson-Crick e alta fidelidade de amplificação na presença de DNA-polimerase e *primers*) a tornam muito adequada para os propósitos deste trabalho.

Descrição do ensaio PLA direto: Suponha a interação de duas espécies proteicas A e B, de forma que ambas co-localizem em algum compartimento celular. Procedeu-se com uma rotina imunohistoquímica para detecção *in situ* de A e B, utilizando-se anticorpos anti-A e anti-B, ambos covalentemente ligados a uma sequência de deoxinucleotídeos fita-simples, distintas e não complementares entre si. Essas quimeras moleculares são denominadas provas de PLA, sendo uma positiva (+, anti-A) e uma negativa (-, anti-B). Segue-se a essa imunomarcagem com anticorpos primários (+ e -) a adição de oligômeros fita-simples de deoxinucleotídeos capazes de anelarem-se com as extremidades do DNA covalentemente ligado aos anticorpos, além de uma ligase capaz de selar as extremidades aneladas em uma peça circular de DNA fita-simples. Os processos de anelamento e ligação só

ocorrem se as provas de PLA (+ e -) estiverem em proximidade suficiente (aproximadamente 27nm) para que os oligômeros interajam, o que justifica o nome do ensaio. Em seguida, são adicionados à reação *primers*, deoxinucleotídeos trifosfato e uma DNA-polimerase, que irão permitir a amplificação do DNA circular formado em um processo denominado *Rolling Circle Amplification* (RCA). A alta processividade da enzima DNA-polimerase permite a formação de uma longa fita simples de DNA com sucessivas cópias, complementares ao DNA circular original. A terminação do processo e a adição de sondas marcadas com fluoróforo - que consistem de peças de DNA fita-simples complementares a regiões do *amplicon* da RCA – permitem então a detecção de pontuações fluorescentes que correspondem a eventos de co-localização de A e B. Sugere-se que essa co-localização seja decorrente da formação de heterocomplexos constituídos de A e B, que estariam, dessa forma, interagindo em um complexo protéico detectável por PLA.

Uma variante do PLA direto é o denominado PLA indireto, em que as provas de PLA são na verdade anticorpos anti-IgG específicos, sendo a detecção associada à imunomarcação *in situ* de proteínas em interação (A e B) por anticorpos primários criados em espécies diferentes, seguida da marcação com anticorpos secundários (provas de PLA + e -) contra as imunoglobulinas específicas. Isso permite uma maior amplificação de sinal (fluorescência) e a estruturação de provas de PLA mais versáteis, capazes de detectarem não somente heterodímeros, mas também heterotrímeros. Nesse trabalho foi utilizado o combo de reagentes *Duolink® Starter Kit* (Sigma), que permite a execução de PLA indireto. Vale ressaltar que os anticorpos primários devem ser obrigatoriamente criados em espécies distintas, já que as provas de PLA fornecidas distinguem epítopos específicos. *Exemplo:* anticorpo anti-CB₁R criado em cabra, anticorpo anti-MOR criado em coelho - *Duolink® Starter Kit* contento provas de PLA anti-cabra (+) e anti-coelho (-), respectivamente. Na figura 5 o processo de formação de sinal fluorescente pela técnica de PLA é mostrado.

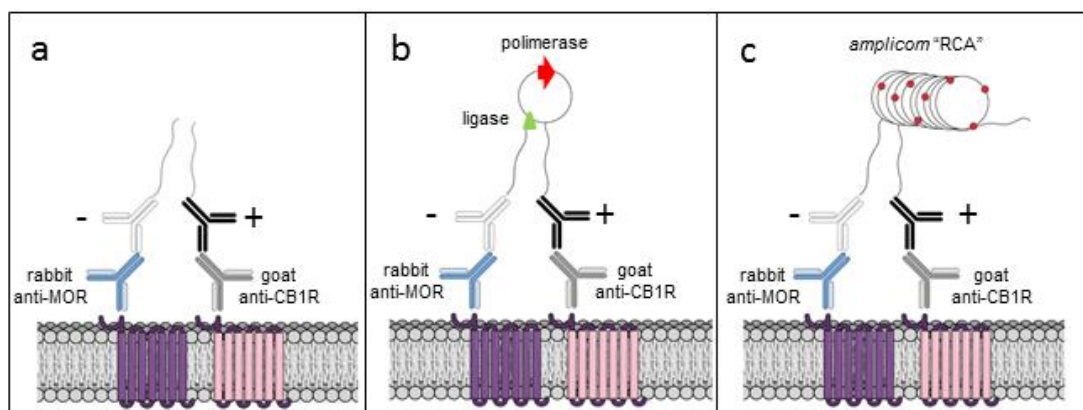


Figura 5. Esquema do PLA indireto. (a) Os GPCRs CB1R (rosa) e MOR (roxo) têm a porção N-terminal reconhecida por anticorpos anti-CB₁R (crescido em cabra) e anti-MOR (crescido em coelho), e esses anticorpos primários ligam-se às provas de PLA (+ e -, respectivamente), que são imunoglobulinas conjugadas com um oligonucleotídeo de fita simples; (b) Ao se adicionar ligase, forma-se uma peça de DNA fita simples circular, que é amplificada pela adição de uma solução contendo DNA-polimerase; (c) sondas fluorescentes contendo oligonucleotídeos podem então se anelar ao *amplicon* formado pelo processo RCA, destacando a ocorrência de co-localização dos GPCRs como uma pontilhagem fluorescente detectável em microscopia confocal.

3.8.2. PLA indireto em neurônios DRG

Os neurônios DRG cultivados foram fixados em solução de PFA 4% m.V⁻¹ a 37°C por 30min, seguido por duas lavagens de 5 min com 1X PBS. A seguir, as células foram incubadas com solução de l-glicina 200 mM para bloqueio de aldeídos livres e novamente lavadas por duas vezes de 5 min com 1X PBS. Os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados através da incubação das amostras com solução de BSA 2% m.V⁻¹ por 2 h. As células foram então novamente lavadas por duas vezes com 1X PBS e então bloqueadas com *Duolink® Blocking solution* por 1 h, a 37°C em câmara úmida. Em seguida, as lamínulas foram encobertas com soluções contendo anticorpos anti-CB₁R (crescido em cabra) e anti-MOR (crescido em coelho), ambos na diluição de 1:1000 por 24h a 4°C. As células foram em seguida lavadas por duas vezes de 5 min em 1X Tampão A, e então incubadas com *Duolink® PLA Probes* (+ e -), diluídas na razão 1:50 em *Duolink® Antibody Diluent*.

Novamente, procede-se com a lavagem das células por duas vezes de 5 min em 1X Tampão A, seguidas do embeбimento das lamínulas com solução de ligação, obtida pela diluição de *Duolink® Ligase* em 1X *Duolink® Ligation Buffer*. A ligação dos oligonucleotídeos ocorre então durante 1 h a 37°C em câmara úmida. Após mais duas lavagens de 5 min com 1X Tampão A, as amostras são incubadas com solução de DNA-polimerase, que corresponde à *Duolink® Polymerase* diluída em 1X *Duolink® Amplification Buffer*, por 100 min a 37°C em câmara úmida. Essa etapa é fotossensível, assim como as demais subsequentes, logo sendo conduzidas ao abrigo da luz. Por fim, são feitas duas lavagens de 10 min com 1X Tampão B e uma lavagem de 1 min com 0,01X Tampão B. As lamínulas são então secas em estufa, montadas sobre lâminas histológicas de vidro com *Duolink® Mounting Medium with DAPI*, seladas com base de unha e analisadas em microscópio confocal.

3.9. Abordagem estatística

3.9.1 Número amostral de animais de experimentação

O cálculo do número de réplicas por grupo foi estabelecido como (número amostral):

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

Onde:

n = número amostral;

Z_{α} = 1,64 (correspondente a α = 0,05 unicaudal à direita);

Z_{β} = 0,84 (correspondente a um poder de teste de 80%);

SD = 12,7 g (desvio-padrão da média);

E = 20 g (erro padrão estimado).

Logo:

$$n = \frac{2 \cdot (1,64 + 0,84)^2 \cdot 12,688^2}{20^2} \cong 5$$

Portanto, cada grupo de experimentação conteve 5 animais.

3.9.2. Testes de hipóteses

Quando necessário, a comparação estatística de médias foi feita pelo teste t de Student, com nível de significância $\alpha = 0,05$, utilizando-se o software Graphpad® Prisma 5.

3.9.3. Estimadores de variância

Na análise isoblográfica, é necessário que se estime a variância de efeitos teóricos aditivos associados a uma combinação de doses conhecida. A partir disso, os efeitos médios teóricos e experimentais podem ser estatisticamente comparados, com um teste t de Student modificado, de acordo com Tallarida (2011):

$$Var(E_{a,b}) = \left(\frac{\delta E_{a,b}}{\delta C_{i,a}} \right)^2 \cdot Var(C_{i,a}) + \left(\frac{\delta E_{a,b}}{\delta C_{i,b}} \right)^2 \cdot Var(C_{i,b})$$

Em que o índice “i” indica o i-ésimo nível de efeito esperado. Assumiu-se homocedasticidade para todos os valores de i, ou seja, as variâncias dos níveis de efeito foram consideradas as mesmas. Os valores foram calculados por simulação numérica de dois pontos, utilizando-se o software Matlab®.

5. Resultados

5.1. Curva dose-resposta de AEA

Para a construção da curva dose-resposta de AEA, foram usadas as doses de 12,5 ng, 25 ng e 50 ng do fármaco, assumindo-se que o controle hiperalgésico corresponde à dose 0 (n = 5 animais/dose). O gráfico assim obtido é ilustrado na figura 6:

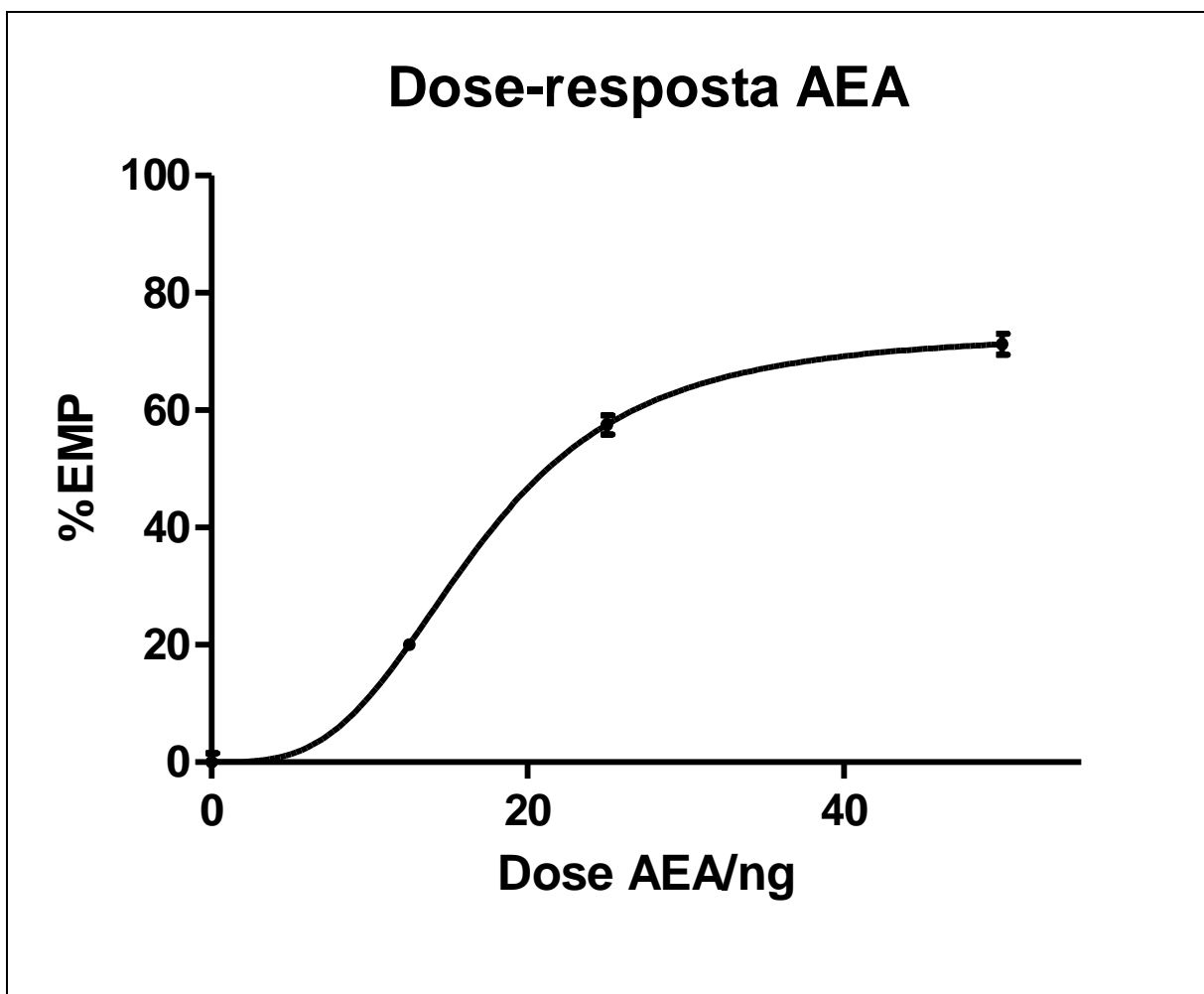


Figura 6. Curva dose-resposta de AEA. Efeito expresso como %EMP.

Para ajuste não-linear da relação de dose-resposta, foi utilizado um modelo sigmoidal de quatro parâmetros, considerando que o perfil de ligação de AEA aos

GPCRs CB₁R é específico, saturável e que o receptor em questão possui apenas um sítio ortostérico (LAPRAIRIE et al., 2015).

Dessa forma, os seguintes parâmetros farmacodinâmicos podem ser derivados utilizando-se o software Graphpad® Prisma 5:

Tabela 2. Parâmetros farmacodinâmicos de AEA.

	Valor estimado	Erro-padrão	95% I.C.
C_{50,AEA}/ng	16,8	0,6	15,6 – 18,1
E_{max,AEA}	73,3%	2%	69% - 77,5%
Coeficiente de Hill (h₁)	3,3	0,3	2,7 – 3,9

Os dados farmacodinâmicos estimados foram então aplicados no modelo sigmoidal de acordo com a equação:

$$Efeito = E_a = E_{max,AEA} \cdot \frac{a^{h_1}}{a^{h_1} + C_{50,AEA}^{h_1}}$$

Onde:

$$E_{max,AEA} = 73,3\%$$

$$a = \text{dose AEA/ng}$$

$$h_1 = 3,311$$

$$C_{50,AEA} = 16,8 \text{ ng}$$

Logo, estimam-se a partir dessa equação as seguintes doses de AEA para atingir 10, 30 e 50% EMP, utilizando-se a ferramenta online WolframAlpha:

Tabela 3. Relações dose-efeito (10, 30 e 50% EMP) derivados para AEA.

%EMP	a/ng
10	9,6
30	15,0
50	21,2

5.2. Curva dose-resposta de XYL

Para a construção da relação de dose-resposta para XYL, foram usadas as seguintes doses do fármaco: 25 μg , 50 μg e 100 μg (n=5 animais/dose), assumindo-se também que a dose de 0 corresponde ao controle hiperalgésico (n=5 animais/dose). Na figura 7 ilustra-se o gráfico obtido:

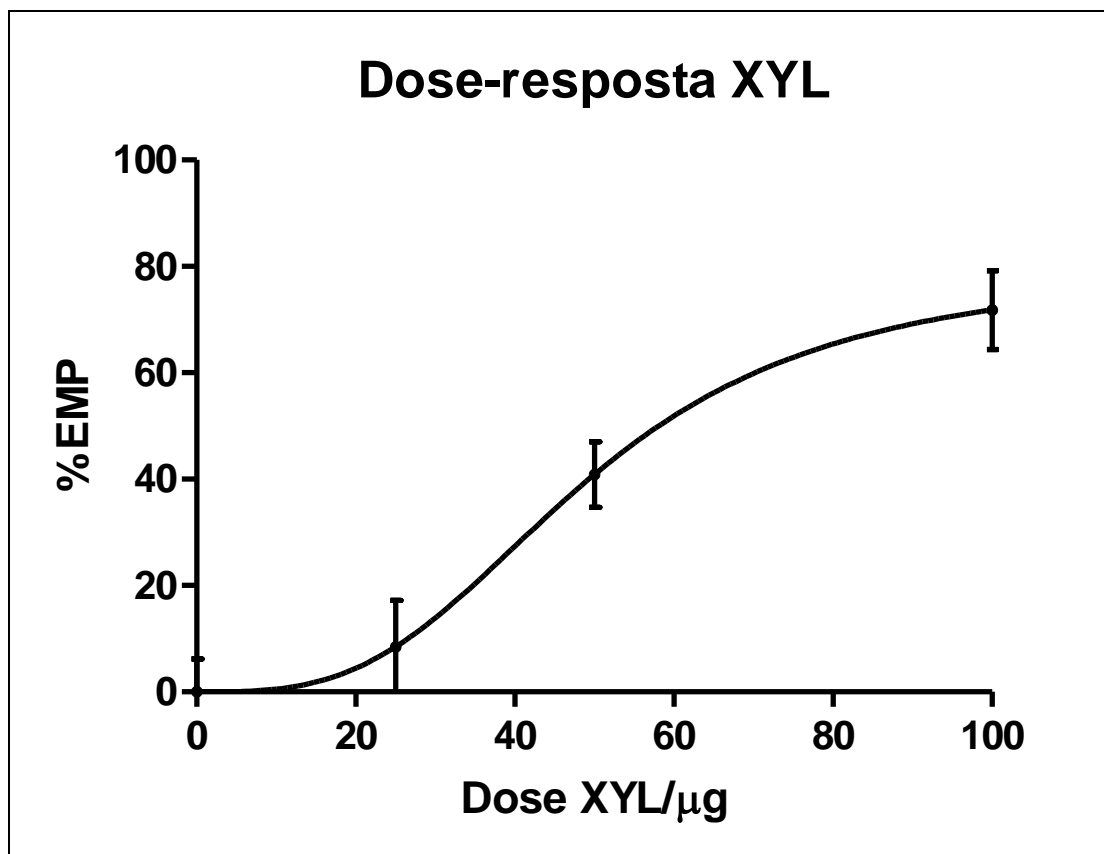


Figura 7. Curva dose-resposta de XYL. Efeito expresso como %EMP.

O ajuste sigmoide (não-linear) também assume que o receptor $\alpha_2\text{R}$, alvo farmacológico de XYL, exibe um perfil de ligação a agonistas específico, saturável e possui apenas um sítio ortostérico (TORNEKE *et al.*, 2003). Assim, a tabela a seguir apresenta os parâmetros farmacodinâmicos derivados:

Tabela 4. Parâmetros farmacodinâmicos de XYL.

	Valor estimado	Erro-padrão	95% I.C.
C_{50,XYL}/µg	49,1	10	27,5 – 70,7
E_{max,XYL}	79,5%	16,4%	44% - 115%
Coeficiente de Hill (h₂)	3,1	1,6	-0,4 – 6,7

Os dados farmacodinâmicos estimados foram então aplicados no modelo sigmoidal de acordo com a equação:

$$Efeito = E_b = E_{max,XYL} \cdot \frac{b^{h_2}}{b^{h_2} + C_{50,XYL}^{h_2}}$$

Onde:

$$E_{max,XYL} = 79,5\%$$

$$b = \text{dose XYL}/\mu\text{g}$$

$$h_2 = 3,1$$

$$C_{50,XYL} = 49,1 \mu\text{g}$$

Logo, estimam-se a partir dessa equação as seguintes doses de XYL para atingir 10, 30 e 50% EMP (aplicativo Wolframalpha):

Tabela 5. Relações dose-efeito (10, 30 e 50% EMP) para XYL.

%EMP	b/µg
10	26,5
30	41,9
50	58,1

5.3. Curva dose-resposta de DAMGO

A caracterização de dose-resposta de DAMGO foi feita utilizando-se as doses de 0,25 μg , 0,5 μg , 1 μg e 2 μg , com dose igual a 0 correspondendo ao controle hiperalgésico ($n = 5$ animais/dose). A figura 8 ilustra a curva obtida:

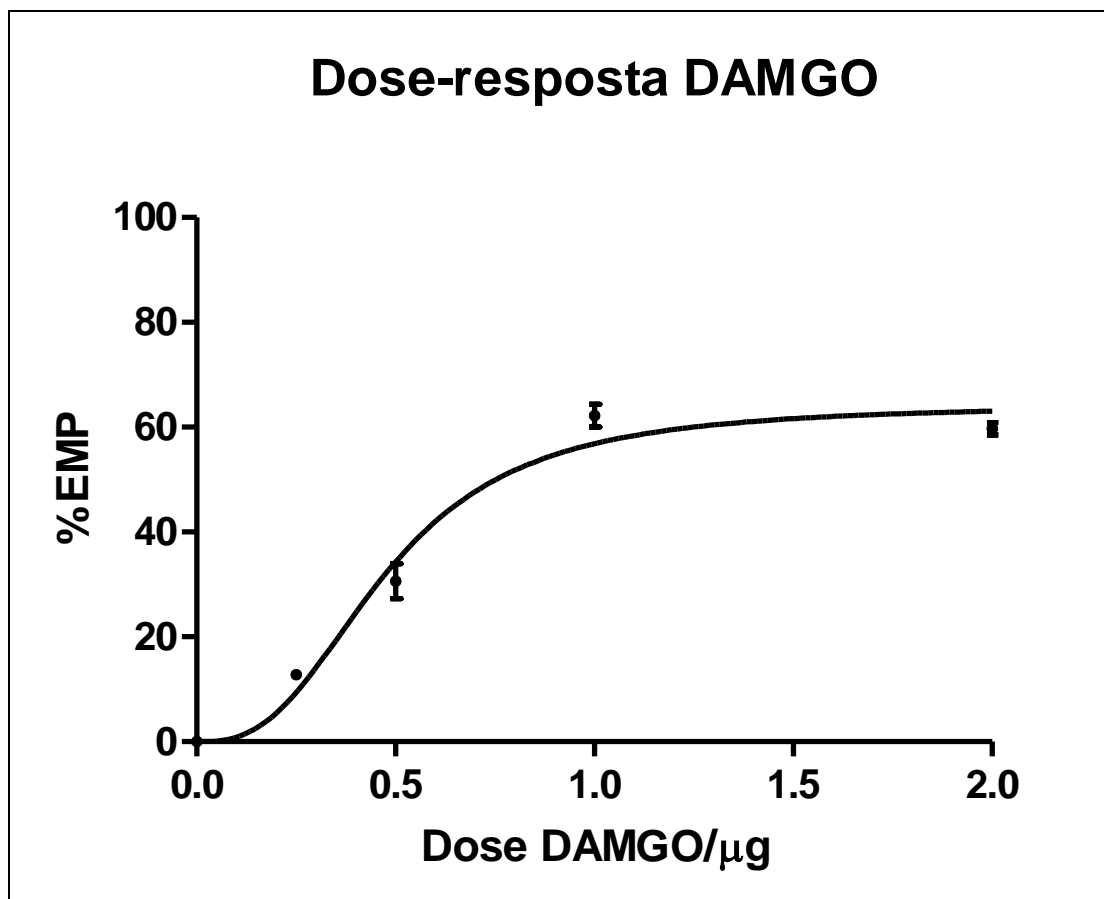


Figura 8. Curva dose-resposta de DAMGO. Efeito expresso como %EMP.

Aplicou-se novamente uma regressão não-linear (ajuste sigmoide de quatro parâmetros), considerando-se o perfil de ligação de DAMGO ao GPCR MOR: específico, saturável e de único sítio ortostérico (ZÖLLNER et al., 2003). Os parâmetros farmacodinâmicos são mostrados na tabela a seguir:

Tabela 6. Parâmetros farmacodinâmicos de DAMGO.

	Valor estimado	Erro-padrão	95% I.C.
C_{50,DAMGO}/μg	0,5	0,03	0,4 – 0,5
E_{max,DAMGO}	64,3%	3%	57,8% - 70,8%
Coeficiente de Hill (h₃)	2,7	0,5	1,7 – 3,7

Os dados farmacodinâmicos estimados foram então aplicados no modelo sigmoidal de acordo com a equação:

$$Efeito = E_c = E_{max,DAMGO} \cdot \frac{c^{h_3}}{c^{h_3} + C_{50,DAMGO}^{h_3}}$$

Onde:

$$E_{max,DAMGO} = 64,3\%$$

$$c = \text{dose DAMGO}/\mu\text{g}$$

$$h_3 = 2,740$$

$$C_{50,DAMGO} = 0,5 \mu\text{g}$$

Logo, estimam-se a partir dessa equação as seguintes doses de DAMGO para atingir 10 e 30 e 50% EMP (WolframAlpha):

Tabela 7. Relações dose-efeito (10, 30 e 50% EMP) para DAMGO.

%EMP	c/μg
10	0,3
30	0,5
50	0,8

5.4. Construção das isóbatas de aditividade para combinações binárias de AEA, XYL e DAMGO

A partir das relações de dose-resposta e dos parâmetros farmacodinâmicos derivados dessas curvas, pode-se determinar, para as combinações binárias de doses de AEA, DAMGO e XYL, isóbatas de aditividade. Num plano cartesiano, essas curvas correspondem às coleções de pontos que representam pares de doses cujo efeito aditivo seja iguais a 10%, 30% e 50% EMP.

5.4.1. Construção de isóbatas de aditividade AEA+XYL

Para elaboração dessas curvas, expressa-se $C_{XYL} = f(C_{AEA})$, logo $b = f(a)$:

Tabela 8. Equações de isóbatas AEA+XYL.

Isóбата de aditividade (Efeito E):	Equação da isóбата:
E_{10}	$b = C_{10,XYL} - \frac{C_{10,XYL}}{\left[\alpha \left(1 + \frac{C_{10,AEA}^{h_1}}{a^{h_1}} \right) - 1 \right]^{1/h_2}}$
E_{30}	$b = C_{30,XYL} - \frac{C_{30,XYL}}{\left[\alpha \left(1 + \frac{C_{30,AEA}^{h_1}}{a^{h_1}} \right) - 1 \right]^{1/h_2}}$
E_{50}	$b = C_{50,XYL} - \frac{C_{50,XYL}}{\left[\alpha \left(1 + \frac{C_{50,AEA}^{h_1}}{a^{h_1}} \right) - 1 \right]^{1/h_2}}$

Os parâmetros dessas equações são:

Tabela 9. Parâmetros das equações de isóbatas AEA+XYL.

E₁₀	E₃₀	E₅₀
$C_{10,XYL} = 26,5 \mu\text{g}$	$C_{30,XYL} = 41,9 \mu\text{g}$	$C_{50,XYL} = 58,1 \mu\text{g}$
$C_{10,AEA} = 9,6 \text{ ng}$	$C_{30,AEA} = 15 \text{ ng}$	$C_{50,AEA} = 21,2 \text{ ng}$
$h_1 = 3,3$	$h_1 = 3,3$	$h_1 = 3,3$
$h_2 = 3,1$	$h_2 = 3,1$	$h_2 = 3,1$
$\alpha = 1,1$	$\alpha = 1,1$	$\alpha = 1,1$

A representação gráfica dessas isóbatas (assumindo tendência linear com $R^2 > 0,99$) é mostrada na figura 9:

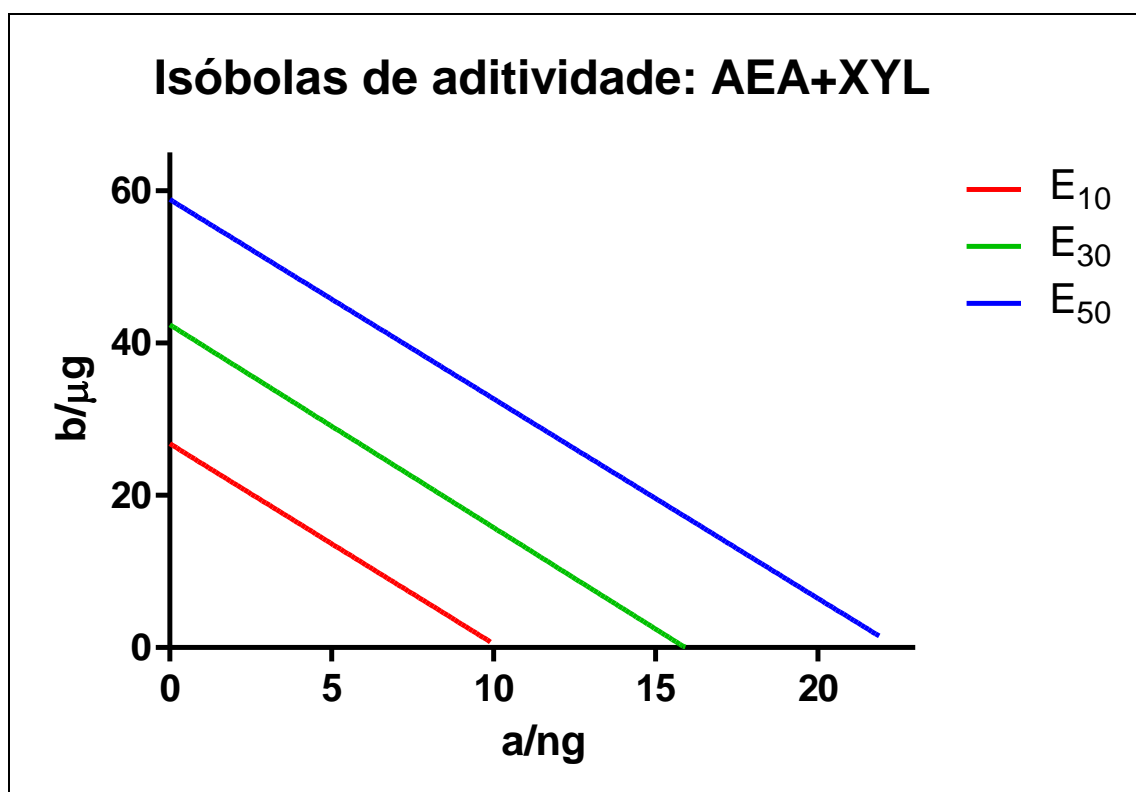


Figura 9. Isóbatas de aditividade AEA+XYL. a = dose AEA, b = dose XYL. E10, E30 e E50 correspondem a 10, 30 e 50% EMP, respectivamente.

5.4.2. Construção de isóbatas de aditividade AEA+DAMGO

Para elaboração dessas curvas, expressa-se $C_{DAMGO} = f(C_{AEA})$, logo $c = f(a)$:

Tabela 10. Equações de isóbatas de AEA+DAMGO.

Isóbata de aditividade (Efeito E):	Equação da isóbata:
E_{10}	$c = C_{10,DAMGO} - \frac{C_{10,DAMGO}}{\left[\beta \left(1 + \frac{C_{10,AEA}^{h_1}}{a^{h_1}} \right) - 1 \right]^{1/h_3}}$
E_{30}	$c = C_{30,DAMGO} - \frac{C_{30,DAMGO}}{\left[\beta \left(1 + \frac{C_{30,AEA}^{h_1}}{a^{h_1}} \right) - 1 \right]^{1/h_3}}$
E_{50}	$c = C_{50,DAMGO} - \frac{C_{50,DAMGO}}{\left[\beta \left(1 + \frac{C_{50,AEA}^{h_1}}{a^{h_1}} \right) - 1 \right]^{1/h_3}}$

Os parâmetros dessas equações são:

Tabela 11. Parâmetros das equações de isóbatas de AEA+DAMGO.

E_{10}	E_{30}	E_{50}
$C_{10,DAMGO} = 0,3 \mu\text{g}$	$C_{30,DAMGO} = 0,5 \mu\text{g}$	$C_{50,DAMGO} = 0,8 \mu\text{g}$
$C_{10,AEA} = 9,6 \text{ ng}$	$C_{30,AEA} = 15 \text{ ng}$	$C_{50,AEA} = 21,2 \text{ ng}$
$h_1 = 3,3$	$h_1 = 3,3$	$h_1 = 3,3$
$h_3 = 2,7$	$h_3 = 2,7$	$h_3 = 2,7$
$\beta = 0,9$	$\beta = 0,9$	$\beta = 0,9$

A representação gráfica dessas isóbatas (assumindo tendência polinomial de 2º grau com $R^2 > 0,99$) é mostrada na figura 10:

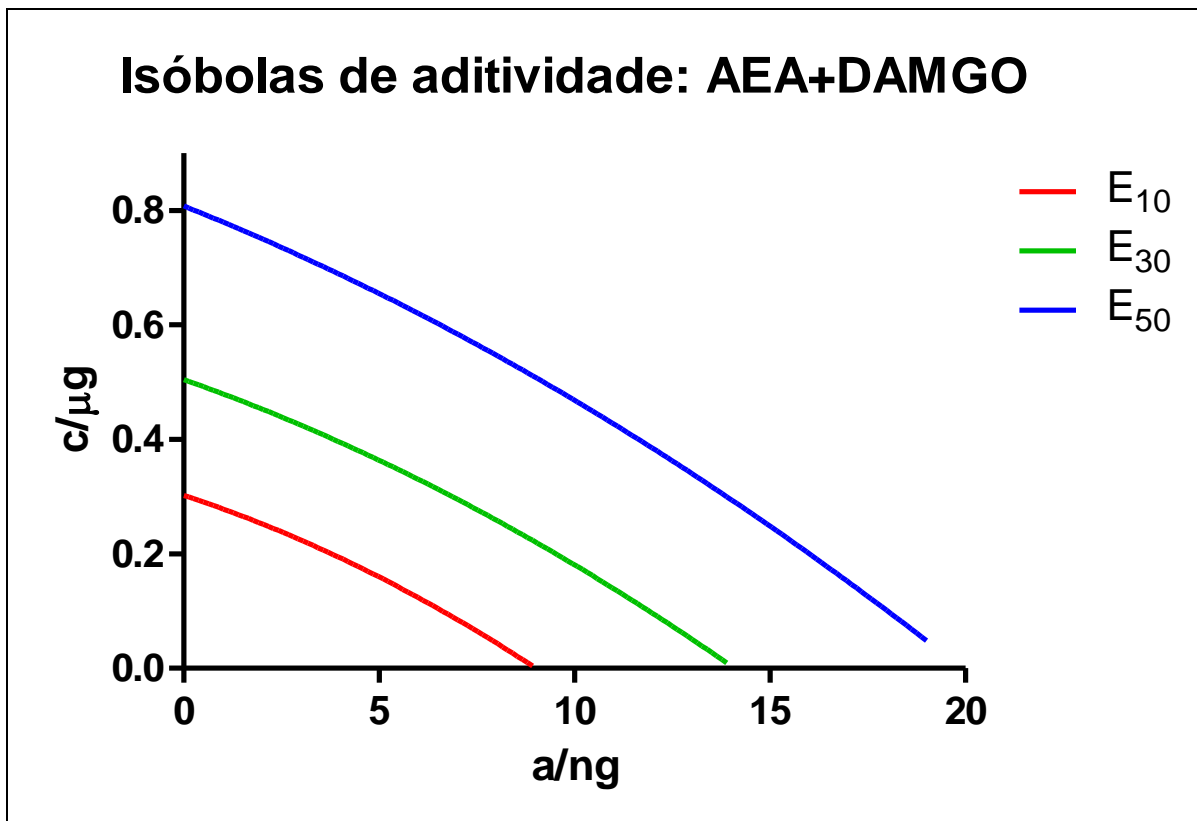


Figura 10. Isóbolas de aditividade para AEA+DAMGO. a = dose AEA, b = dose XYL. E₁₀, E₃₀ e E₅₀ correspondem a 10, 30 e 50% EMP, respectivamente

5.4.3. Construção de isóbatas de aditividade XYL+DAMGO

Para elaboração dessas curvas, expressa-se $C_{XYL} = f(C_{DAMGO})$, logo $b = f(c)$:

Tabela 12. Equações de isóbatas de DAMGO+XYL.

Isóbata de aditividade (Efeito E):	Equação da isóbata:
E_{10}	$b = C_{10,XYL} - \frac{C_{10,XYL}}{\left[\gamma \left(1 + \frac{C_{10,DAMGO}^{h_3}}{c^{h_3}} \right) - 1 \right]^{1/h_2}}$
E_{30}	$b = C_{30,XYL} - \frac{C_{30,XYL}}{\left[\gamma \left(1 + \frac{C_{30,DAMGO}^{h_3}}{c^{h_3}} \right) - 1 \right]^{1/h_2}}$
E_{50}	$b = C_{50,XYL} - \frac{C_{50,XYL}}{\left[\gamma \left(1 + \frac{C_{50,DAMGO}^{h_3}}{c^{h_3}} \right) - 1 \right]^{1/h_2}}$

Os parâmetros dessas equações são:

Tabela 13. Parâmetros das equações de isóbatas de DAMGO+XYL.

E_{10}	E_{30}	E_{50}
$C_{10,DAMGO} = 0,3 \mu\text{g}$	$C_{30,DAMGO} = 0,5 \mu\text{g}$	$C_{50,DAMGO} = 0,8 \mu\text{g}$
$C_{10,XYL} = 26,5 \mu\text{g}$	$C_{30,XYL} = 41,9 \mu\text{g}$	$C_{50,XYL} = 58,1 \mu\text{g}$
$h_2 = 3,1$	$h_2 = 3,1$	$h_2 = 3,1$
$h_3 = 2,7$	$h_3 = 2,7$	$h_3 = 2,7$
$\gamma = 1,2$	$\gamma = 1,2$	$\gamma = 1,2$

A representação gráfica dessas isóbatas (assumindo tendência polinomial de 2º grau com $R^2 > 0,99$) é mostrada na figura 11:

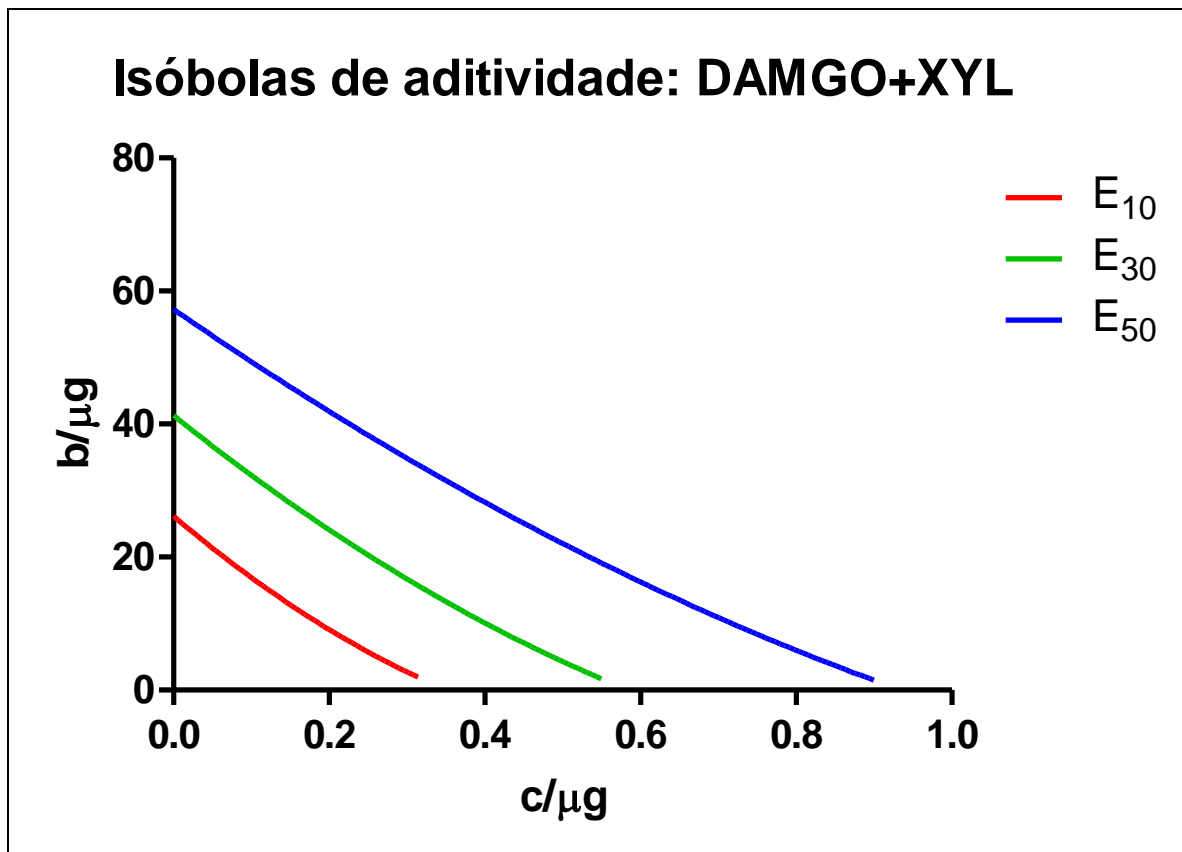


Figura 11. Isóbulas de aditividade para DAMGO+XYL. c = dose DAMGO, b = dose XYL. E_{10} , E_{30} e E_{50} correspondem a 10, 30 e 50% EMP, respectivamente

5.5. Determinação das combinações de doses AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL

Objetivou-se estabelecer empiricamente doses binárias de AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL tais que, se observado o princípio de aditividade de Loewe, gerariam uma resposta de 10, 30 e 50% EMP no teste algesimétrico de retirada de pata. Essas doses são determinadas pela interseção das isóbulas de aditividade com retas no plano cartesiano, representadas por equações do tipo:

$$y = \varphi \cdot x, \varphi \in R$$

Essas equações estabelecem uma razão de doses constante (φ) para a combinação binária dos agentes antinociceptivos. Cada interseção com uma das isóbulas de aditividade é tomado como um ponto experimental a ser testado, isto é, uma combinação de doses com uma resposta associada. Essa coleção de relações

de efeito e doses combinadas permite a construção de curvas dose-resposta que revelam o perfil farmacodinâmico da coadministração, que se comporta como um fármaco independente, para o qual podem ser derivados parâmetros farmacodinâmicos. Esses dados podem então ser comparados com a predição teórica, para análise de sinergismo farmacológico.

Na tabela a seguir se tem os valores de ϕ para cada combinação binária de agentes farmacológicos testados:

Tabela 14. Razões de doses fixas.

Combinação Binária	Φ	Função linear
AEA+XYL	1	$b = a$
AEA+DAMGO	0,02	$c = 0,02a$
DAMGO+XYL	30	$b = 30c$

Utilizou-se o aplicativo WolframAlpha® para determinação das interseções de cada uma dessas funções lineares com as respectivas isóbulas de aditividade, ou seja, o ponto que é solução simultânea das equações de reta (funções lineares) e das curvas de regressão das isóbulas. Os dados assim obtidos estão sumarizados na tabela a seguir:

Tabela 15. Combinações binárias de AEA, XYL e DAMGO.

Combinação Binária	Efeito	Dose AEA/ng	Dose XYL/μg	Dose DAMGO/μg
AEA+XYL	E ₁₀	7,5	7,5	---
	E ₃₀	12	12	---
	E ₅₀	16	16	---
AEA+DAMGO	E ₁₀	6	---	0,1
	E ₃₀	9	---	0,2
	E ₅₀	14	---	0,3
DAMGO+XYL	E ₁₀	---	6	0,2
	E ₃₀	---	11	0,4
	E ₅₀	---	17	0,6

As interseções são ilustradas na figura 12:

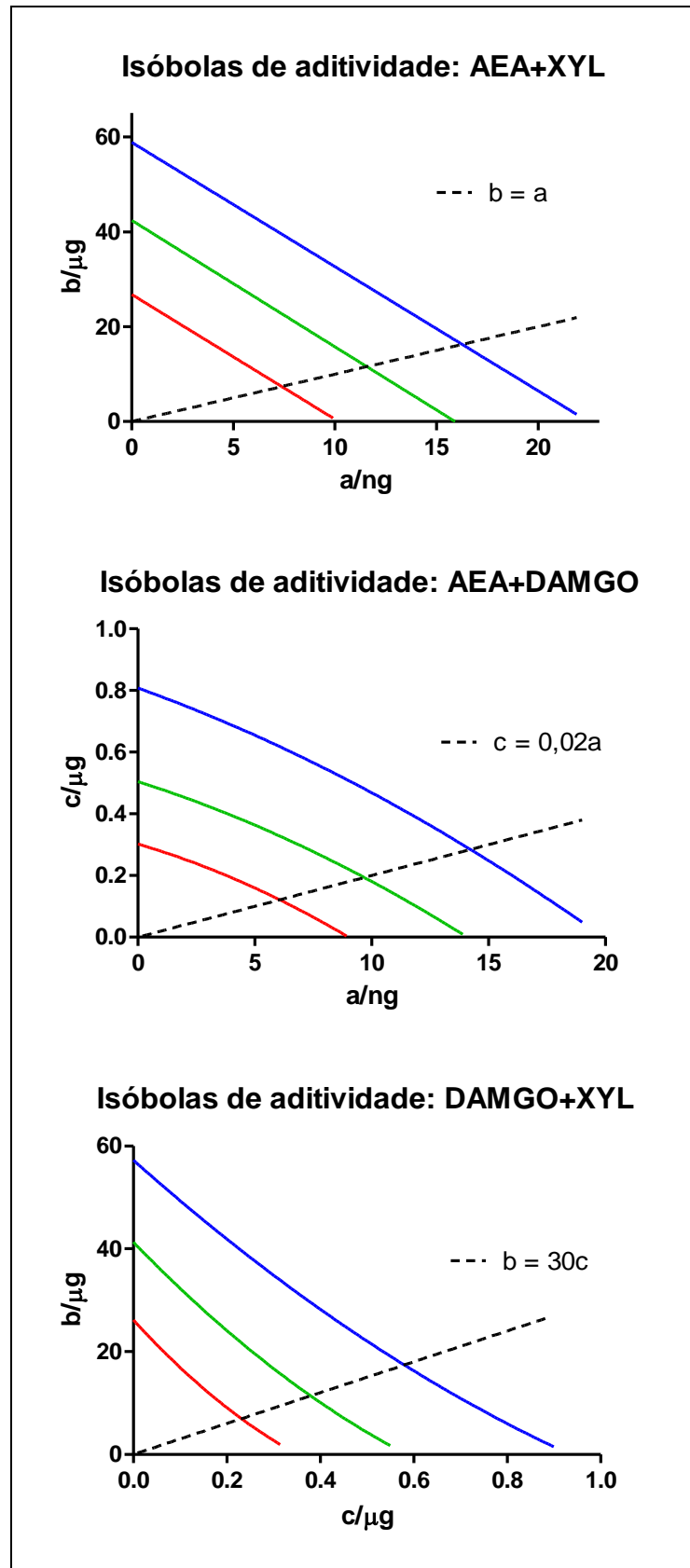


Figura 12. Interseções das retas de razão de doses constantes com isóbolos de aditividade.

5.6. Determinação de doses equiefetivas para construção de curvas dose-resposta teóricas das combinações binárias de agentes antinocceptivos

Partindo-se dos princípios de aditividade de Loewe, é possível determinar um efeito aditivo teórico para as combinações de doses em razões fixas acima citadas. Isto é, determinar qual é a dose “a” de um dado fármaco “A” que é equiefetiva à dose “b” de um fármaco “B”. Para isso, lança-se mão do repertório de equações já citados.

5.6.1. Curva dose-resposta teórica AEA+XYL

Nessa construção, expressaram-se as doses de AEA (a) como doses de XYL equiefetivas ($b_{eq,a}$), e os efeitos aditivos foram preditos utilizando o modelo sigmoidal derivado para XYL. Dessa forma, a dose de XYL aplicada na equação sigmoidal foi, portanto, igual a $b + b_{eq,a}$. A equação a seguir ilustra o procedimento:

$$Efeito = E_{a,b} = E_{max,XYL} \left[\frac{(b + b_{eq,a})^{h_2}}{(b + b_{eq,a})^{h_2} + C_{50,XYL}^{h_2}} \right], \text{ onde } b_{eq,a} = \frac{C_{i,XYL}}{\left[\alpha \left(1 + \frac{C_{i,AEA}^{h_1}}{a^{h_1}} \right) - 1 \right]^{1/h_2}}$$

Onde o índice “i” indica o i-ésimo nível de efeito máximo possível, isto é, 10, 30 e 50% EMP. Sendo assim, na tabela a seguir, determinam-se os valores de $b_{eq,a}$ (dose de XYL equiefetiva à dose de AEA dada) para diferentes pares (a,b):

Tabela 16. Doses de XYL equiefetivas às doses de AEA.

%EMP	Dose AEA (a)/ng	Dose XYL equiefetiva ($b_{eq,a}$)/ μ g	Dose XYL (b)/ μ g	(b + $b_{eq,a}$)
10	7,5	19,5	7,5	27
30	12	31,6	12	43,6
50	16	41,3	16	57,3

E, portanto, $E_{a,b}$ como função de $(b + b_{eq,a})$ é dado por:

Tabela 17. Dose-efeito para XYL.

$(b+b_{eq,a})$	$E_{a,b}/\%EMP$
27	11
43,6	33
57,3	49

A figura 13 ilustra a curva dose-resposta de efeito $E_{a,b}$ teórico esperado para a combinação AEA+XYL, se observado o princípio de aditividade de Loewe:

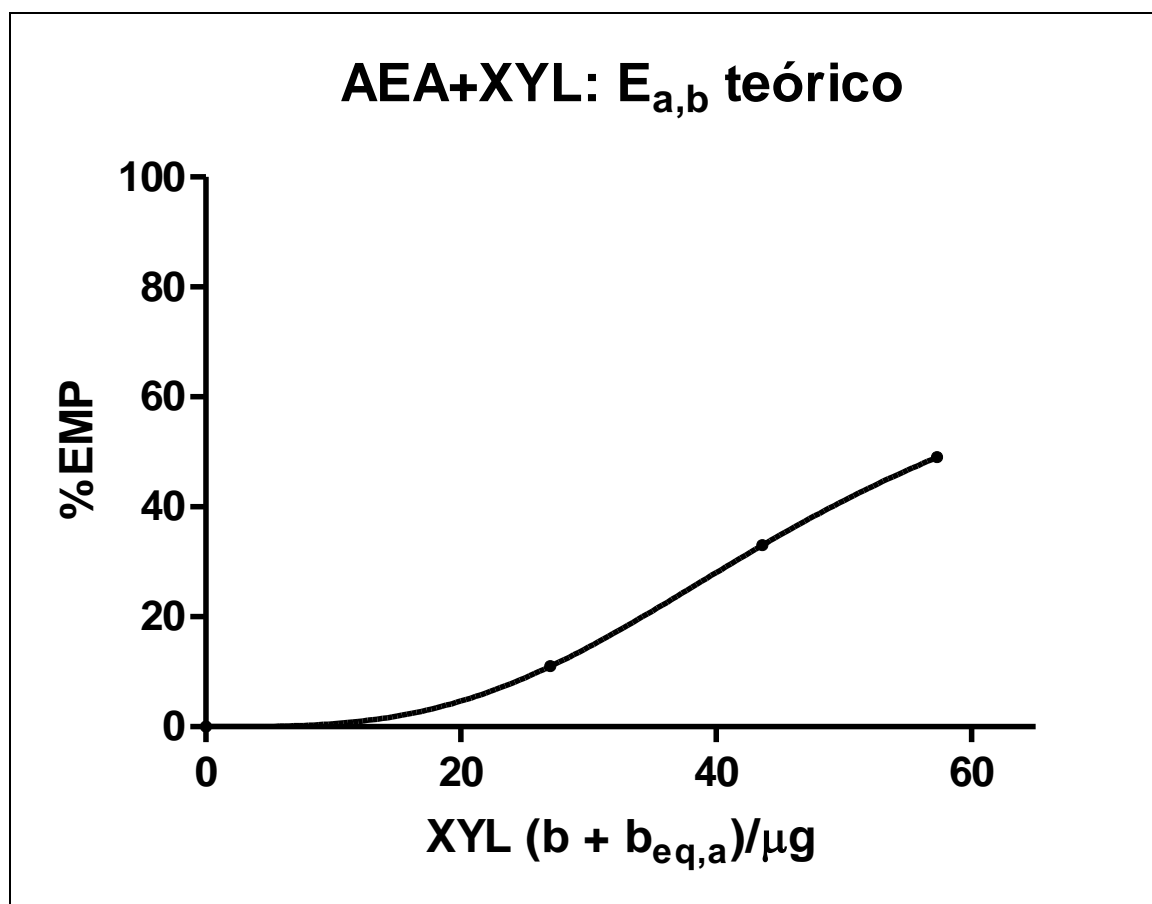


Figura 13. Curva dose-resposta teórica AEA+XYL.

5.6.2. Curva dose-resposta teórica AEA+DAMGO

Para elaboração dessa curva, as doses de AEA (a) foram expressas como doses de DAMGO equiefetivas ($c_{eq,a}$). Os efeitos aditivos teóricos ($E_{a,c}$) foram então derivados a partir do modelo sigmoidal obtido para DAMGO. Assim, a dose $c + c_{eq,a}$ foi aplicada na equação a seguir:

$$Efeito = E_{a,c} = E_{max,DAMGO} \left[\frac{(c + c_{eq,a})^{h_3}}{(c + c_{eq,a})^{h_3} + C_{50,DAMGO}^{h_3}} \right], \text{ onde } c_{eq,a} = \frac{C_{i,DAMGO}}{\left[\beta \left(1 + \frac{C_{i,AEA}^{h_1}}{a^{h_1}} \right) - 1 \right]^{1/h_3}}$$

Onde o índice “i” indica o i-ésimo nível de efeito máximo possível, isto é, 10, 30 e 50% EMP. Sendo assim, na tabela a seguir, determinam-se os valores de $c_{eq,a}$ (dose de DAMGO equiefetiva à dose de AEA dada) para diferentes pares (a,c):

Tabela 18. Doses de DAMGO equiefetivas às doses de AEA.

%EMP	Dose AEA (a)/ng	Dose DAMGO equiefetiva ($c_{eq,a}$)/ μ g	Dose DAMGO (c)/ μ g	(c + $c_{eq,a}$)
10	6	0,2	0,1	0,3
30	9	0,3	0,2	0,5
50	14	0,5	0,3	0,8

E, portanto, $E_{a,c}$ como função de (c + $c_{eq,a}$) é dado por:

Tabela 19. Dose-efeito para DAMGO.

(c + $c_{eq,a}$)	$E_{a,c}$ /%EMP
0,3	11
0,5	30
0,8	50

A figura 14 ilustra a curva dose-resposta de efeito $E_{a,c}$ teórico esperado para a combinação AEA+DAMGO, observando-se o princípio de aditividade de Loewe:

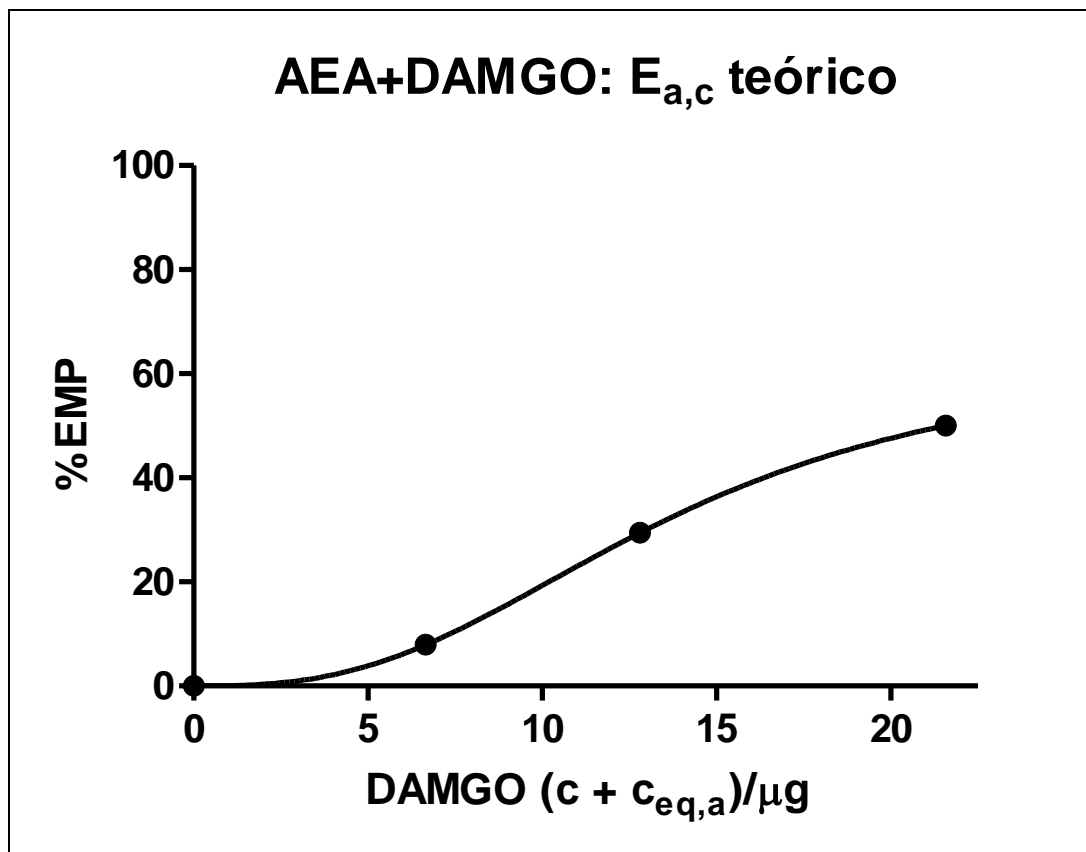


Figura 14. Curva dose-resposta teórica AEA+DAMGO.

5.6.3. Curva dose-resposta teórica DAMGO+XYL

A curva de aditividade teórica para a combinação DAMGO+XYL foi feita de maneira similar, expressando-se a dose de DAMGO (c) como uma dose de XYL equiefetiva ($b_{eq,c}$), e em seguida utilizando-se o modelo sigmoide derivado para XYL. Isto é, os efeitos teóricos $E_{b,c}$ foram preditos a partir da seguinte equação, em que a variável independente é $b + b_{eq,c}$:

$$Efeito = E_{b,c} = E_{max,XYL} \left[\frac{(b + b_{eq,c})^{h_2}}{(b + b_{eq,c})^{h_2} + C_{50,XYL}^{h_2}} \right], \text{ onde } b_{eq,c} = \frac{C_{i,XYL}}{\left[\gamma \left(1 + \frac{C_{i,DAMGO}^{h_3}}{c^{h_3}} \right) - 1 \right]^{1/h_2}}$$

Onde o índice "i" indica o i-ésimo nível de efeito máximo possível, isto é, 10, 30 e 50% EMP. Sendo assim, na tabela a seguir, determinam-se os valores de $c_{eq,b}$ (dose de XYL equiefetiva à dose de DAMGO dada) para diferentes pares (b,c):

Tabela 20. Doses de XYL equiefetivas às doses de DAMGO.

%EMP	Dose DAMGO (c)/ μg	Dose XYL equiefetiva ($b_{\text{eq},b}$)/ μg	Dose XYL (b)/ μg	(b + $b_{\text{eq},c}$)
10	0,2	17,2	6	23,2
30	0,4	31,6	11	42,6
50	0,6	41,6	17	58,6

E, portanto, $E_{b,c}$ como função de $(b + b_{\text{eq},c})$ é dado por:

Tabela 21. Dose-efeito para XYL.

($b+b_{\text{eq},b}$)	$E_{b,c}/\%EMP$
23,2	6
42,6	28
58,6	47

A figura 15 ilustra a curva dose-resposta de efeito $E_{b,c}$ teórico esperado para a combinação DAMGO+XYL, observando-se o princípio de aditividade de Loewe:

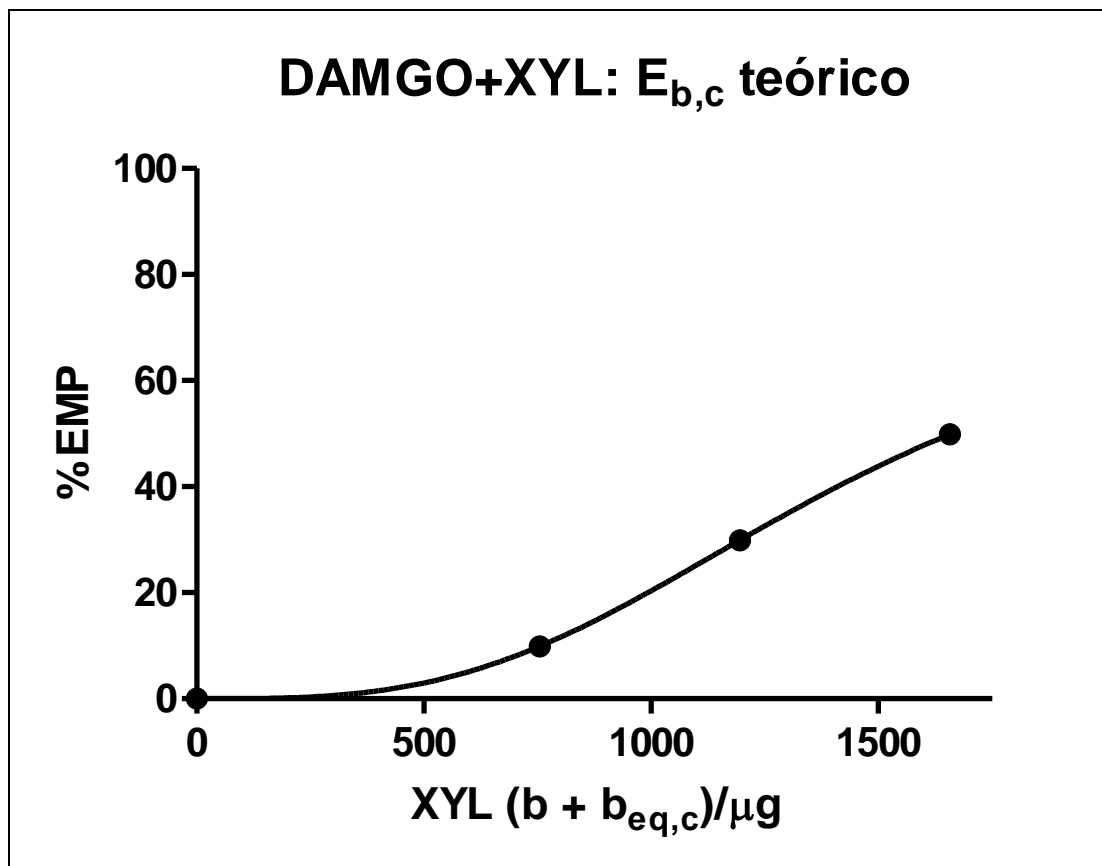


Figura 15. Curva dose-resposta teórica DAMGO+XYL.

5.7. Curvas dose-resposta experimentais para as combinações AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL

A partir das doses de combinações binárias estabelecidas através da interseção das isóbulas com as retas de razões de doses fixas, foi possível elaborar curvas dose-respostas experimentais para as coleções de pontos (a,b), (a,c) e (b,c) e seus respectivos efeitos experimentais $E_{a,b}$, $E_{a,c}$ e $E_{b,c}$. Os parâmetros farmacodinâmicos dessas curvas podem então ser derivados e estatisticamente comparados com as previsões teóricas de aditividade, para investigação de fenômenos sinérgicos.

5.7.1. Curva dose-resposta experimental AEA+XYL

Essa curva foi elaborada a partir das combinações de doses (a,b) de AEA+XYL. O efeito $E_{a,b}$ experimental foi então plotado como função de $b + b_{eq,a}$. A figura 16 a seguir ilustra a relação de dose-resposta assim obtida:

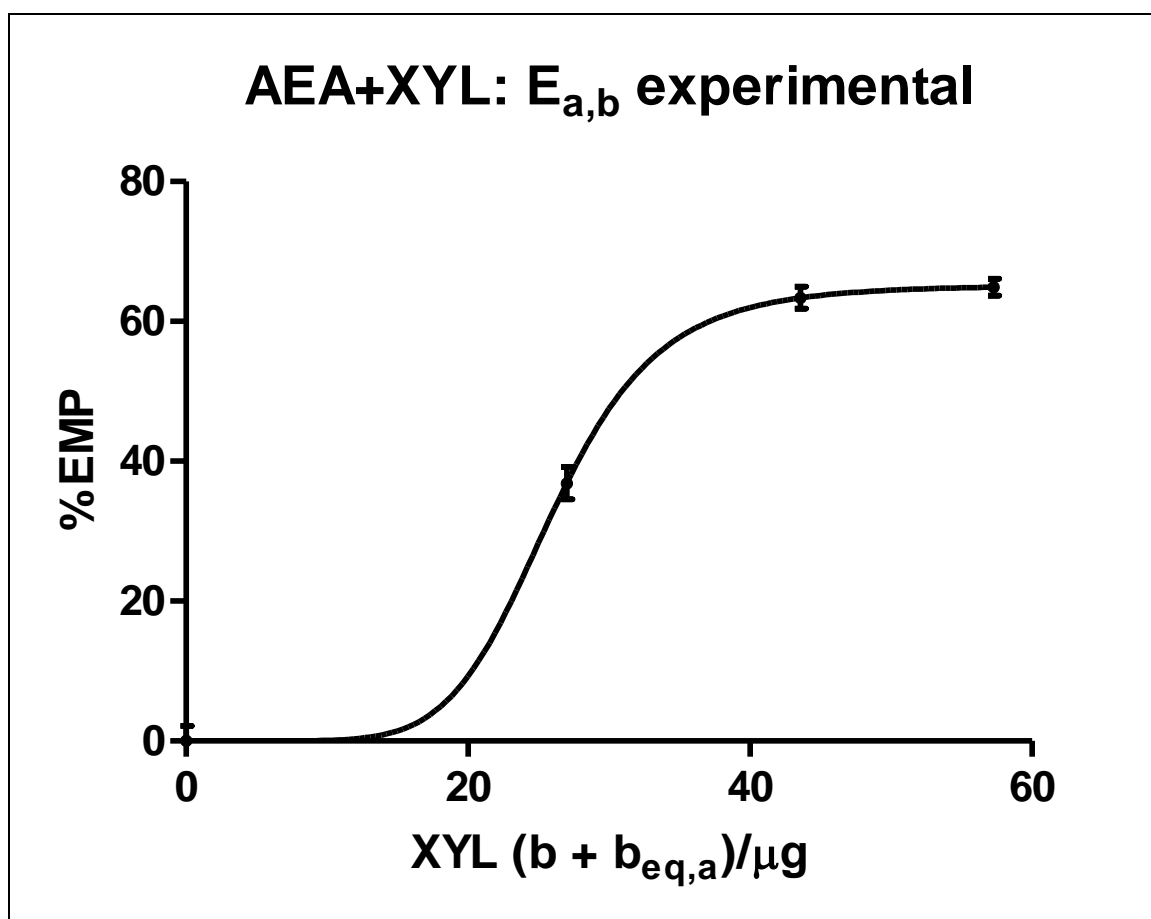


Figura 16. Curva dose-resposta experimental AEA+XYL.

Dados farmacodinâmicos derivados para essa curva foram obtidos, novamente, aplicando-se um modelo de regressão não linear sigmoide de quatro parâmetros. Os dados obtidos são mostrados na tabela a seguir:

Tabela 22. Parâmetros farmacodinâmicos experimentais AEA+XYL.

	Valor estimado	Erro-padrão	95% I.C.
C₅₀/μg	26	0,3	25,4 – 26,6
E_{max}	65,2%	1,2%	62,6% - 67,8%
Coeficiente de Hill	6,9	1,9	2,8 – 11

Dessa forma, o modelo sigmoidal que representa essa curva é:

$$E_{a,b} = 65,2 \frac{[b + b_{eq,a}]^{6,9}}{([b + b_{eq,a}]^{6,9} + 26^{6,9})}$$

Considerando esse modelo, as doses de XYL $b + b_{eq,a}$ necessárias para gerar 10, 30 e 50%EMP são mostradas na tabela a seguir:

Tabela 23. Relações dose-efeito para XYL.

	b + b_{eq,a}/μg
10% EMP	20,3
30% EMP	25,4
50% EMP	30,9

Sabendo-se que no modelo teórico de aditividade utilizou-se os dados farmacodinâmicos derivados para XYL, pode-se determinar qual efeito aditivo é esperado para essas doses $b + b_{eq,a}$, substituindo-as na seguinte equação:

$$E_{a,b} = 79,5 \frac{[b + b_{eq,a}]^{3,1}}{([b + b_{eq,a}]^{3,1} + 49,1^{3,1})}$$

Assim, tem-se que:

Tabela 24. Efeito experimental AEA+XYL.

b + beq,a/μg	Efeito E_{a,b}/°MPE
20,3	5
25,4	9
30,9	15

De posse desses dados, determinam-se os pares ordenados (a,b) com doses de AEA e XYL na razão de doses fixas estabelecida ($\phi = 1$) que, considerando o modelo de aditividade de Loewe, resultariam em 5, 9 e 15% EMP. Os valores são mostrados na tabela a seguir:

Tabela 25. Doses binárias AEA+XYL.

%EMP	b + b_{eq,a}/μg	Dose AEA/ng	Dose XYL/μg
5	20,3	5,2	5,2
9	25,4	6,2	6,2
15	30,9	7,6	7,6

Esses resultados podem ser sumarizados em um índice de combinação (IC), que corresponde à razão das distâncias entre os pontos (a,b) – experimentais e teóricos, respectivamente - e a origem do plano coordenado (0,0). Isto é, uma razão adimensional centrada na unidade, cuja variação em torno de 1 indica sinergismo ($IC < 1$), aditividade ($IC = 1$) e sub-aditividade ($IC > 1$). A definição matemática do IC é dada pela equação:

$$IC = \frac{d_{(0,0);(a_{exp},b_{exp})}}{d_{(0,0);(a_{teórico},b_{teórico})}}$$

Dessa maneira, calcularam-se os IC para os três pontos experimentais testados, e observou-se forte sinergismo farmacológico na ação analgésica da coadministração de AEA e XYL. Os valores obtidos estão na tabela a seguir:

Tabela 26. Índices de combinação para AEA+XYL.

Razões	Índice de Combinação IC
E ₄ /E ₁₀	0,69
E ₉ /E ₃₀	0,52
E ₁₄ /E ₅₀	0,48

5.7.2. Curva dose-resposta experimental AEA+DAMGO

Essa curva foi construída a partir das combinações de doses (a,c) de AEA+DAMGO. O efeito $E_{a,c}$ experimental foi então plotado como função de $c + c_{eq,a}$. A figura 17 a seguir ilustra a relação de dose-resposta obtida:

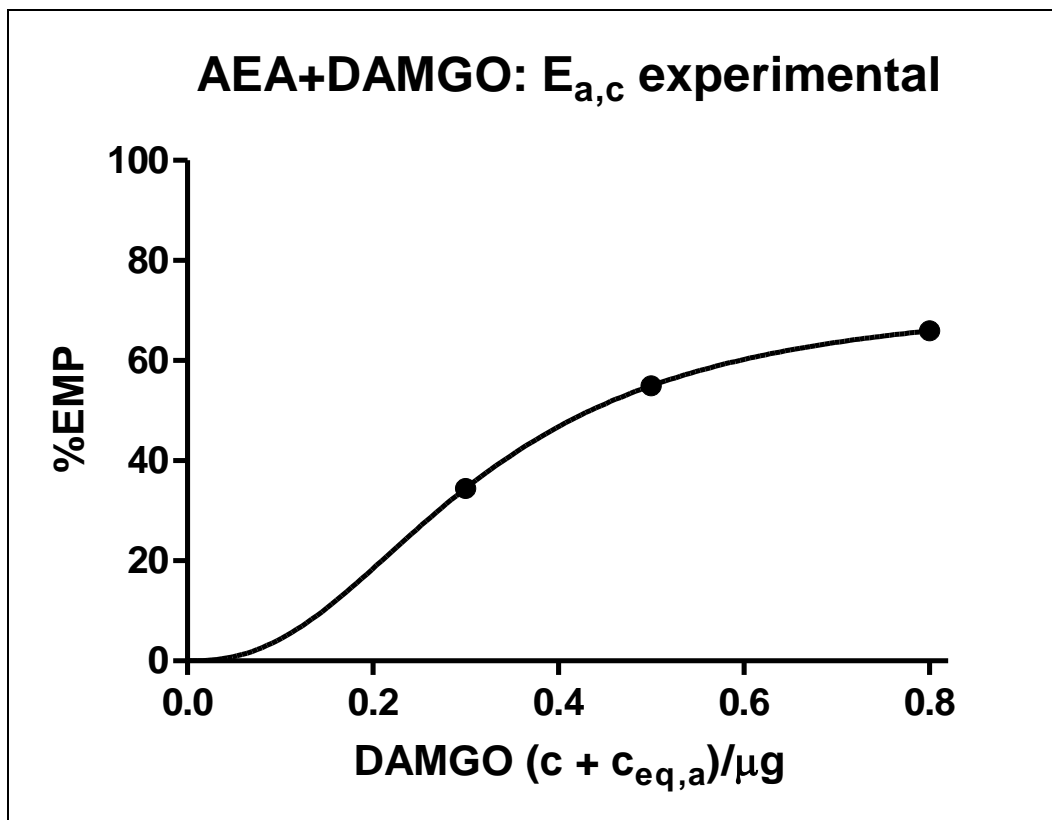


Figura 17. Curva dose-resposta experimental AEA+DAMGO.

Dados farmacodinâmicos derivados para essa curva foram obtidos, novamente, aplicando-se um modelo de regressão não linear sigmoidal de quatro parâmetros. Os valores obtidos estão na tabela a seguir:

Tabela 27. Parâmetros farmacodinâmicos experimentais AEA+DAMGO.

	Valor estimado	Erro-padrão	95% I.C.
$C_{50}/\mu\text{g}$	0,3	~0	~0
E_{max}	72,9%	3,6%	65,2% - 80,6%
Coeficiente de Hill	2,4	0,4	1,6 - 3,2

Assim, o modelo sigmoidal que representa essa curva é:

$$E_{a,c} = 72,9 \frac{[c + c_{eq,a}]^{2,4}}{([c + c_{eq,a}]^{2,4} + 0,3^{2,4})}$$

Considerando esse modelo, as doses $c + c_{eq,a}$ necessárias para gerar 10, 30 e 50% EMP são mostradas na tabela a seguir:

Tabela 28. Relações dose-efeito para DAMGO.

	c + c_{eq,a}/μg
10% EMP	0,1
30% EMP	0,3
50% EMP	0,4

Considerando que no modelo teórico de aditividade foram utilizados os dados farmacodinâmicos derivados para DAMGO, é possível se determinar qual efeito aditivo é esperado para tais doses $c + c_{eq,a}$, através da equação:

$$E_{a,c} = 64,3 \frac{[c + c_{eq,a}]^{2,7}}{([c + c_{eq,a}]^{2,7} + 0,5^{2,7})}$$

Assim, tem-se que:

Tabela 29. Efeito experimental AEA+DAMGO.

c + c_{eq,a}/μg	Efeito E_{a,c}/ %MPE
0,1	1
0,3	13
0,4	23

De posse desses dados, foram determinados os pares ordenados (a,c) com doses de AEA e DAMGO na razão de doses fixas estabelecida ($\phi = 0,02$) que, considerando o modelo de aditividade de Loewe, resultariam em 1, 13 e 23% EMP no teste algesimétrico de retirada de pata. Os valores obtidos são descritos na tabela a seguir:

Tabela 30. Doses binárias AEA+DAMGO.

%EMP	b + b_{eq,a}/μg	Dose AEA/ng	Dose DAMGO/μg
1	0,1	0,9	0,02
13	0,3	2,7	0,05
23	0,4	3,5	0,07

Dessa maneira, calcularam-se os IC para os três pontos experimentais testados, e observou-se extremo sinergismo farmacológico na ação analgésica da coadministração de AEA e DAMGO, no paradigma de retirada de pata. Os valores obtidos estão na tabela a seguir:

Tabela 31. Índices de combinação para AEA+DAMGO.

Razões	Índice de Combinação IC
E ₁ /E ₁₀	0,15
E ₁₃ /E ₃₀	0,30
E ₂₃ /E ₅₀	0,25

5.7.3. Curva dose-resposta experimental DAMGO+XYL

A construção dessa curva foi feita plotando-se o efeito experimental E_{b,c} como uma função de b + b_{eq,c}, correspondente à uma combinação de doses (c,b) de DAMGO+XYL. A figura 18 a seguir ilustra a relação de dose-resposta obtida:

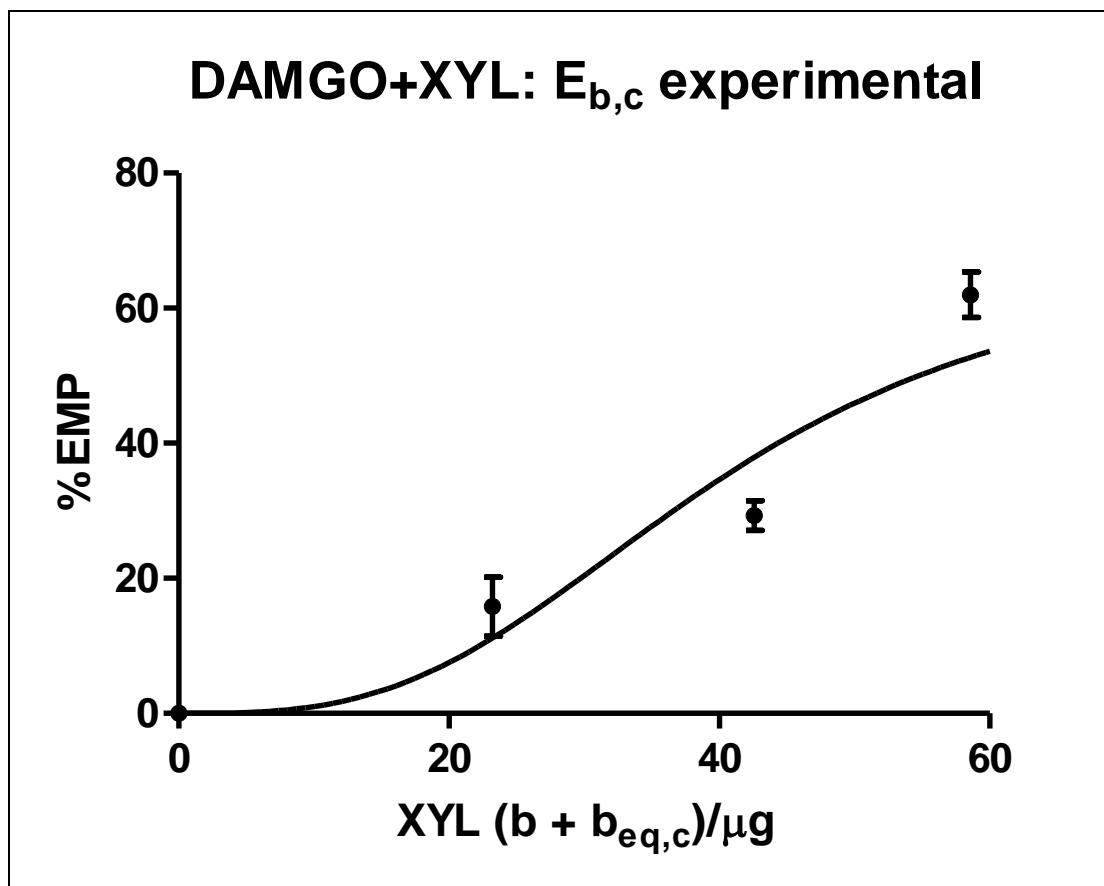


Figura 18. Curva dose-resposta experimental DAMGO+XYL.

Dados farmacodinâmicos derivados para essa curva foram obtidos, novamente, aplicando-se um modelo de regressão não linear sigmoide de quatro parâmetros. Os valores obtidos estão na tabela a seguir:

Tabela 32. Parâmetros farmacodinâmicos experimentais DAMGO+XYL.

	Valor estimado	Erro-padrão	95% I.C.
$C_{50}/\mu\text{g}$	40	3,6	32,5 – 47,6
E_{max}	64,5%	6%	56,7% - 82%
Coeficiente de Hill	3	0,7	1,6 – 4,5

Assim, o modelo sigmoide que representa essa curva é:

$$E_{b,c} = 64,5 \frac{[b + b_{eq,c}]^3}{([b + b_{eq,c}]^3 + 40^3)}$$

Considerando esse modelo, as doses $b + b_{eq,c}$ necessárias para gerar 10, 30 e 50% EMP são mostradas na tabela a seguir:

Tabela 33. Relações dose-efeito para XYL.

	$b + b_{eq,c}/\mu\text{g}$
10% EMP	22,7
30% EMP	38,2
50% EMP	60,4

Sabendo-se que no modelo teórico de aditividade foram utilizados os dados farmacodinâmicos derivados para XYL, determina-se qual efeito aditivo é esperado para as referidas doses $b + b_{eq,c}$, através da equação:

$$E_{b,c} = 79.5 \frac{[b + b_{eq,c}]^{3,1}}{([b + b_{eq,c}]^{3,1} + 49,1^{3,1})}$$

Assim, determina-se que:

Tabela 34. Efeito experimental DAMGO+XYL.

$b + b_{eq,c}/\mu\text{g}$	Efeito $E_{b,c}/\%MPE$
22,7	7
38,2	25
60,4	52

Foram então determinados os pares ordenados (c,b) com doses de DAMGO e XYL na razão de doses fixas estabelecida ($\phi = 30$) que, de acordo com o modelo de aditividade de Loewe, resultariam em 7, 25 e 52% EMP no teste algesimétrico de retirada de pata. Os valores obtidos são descritos na tabela a seguir:

Tabela 35. Doses binárias DAMGO+XYL.

%EMP	$b + b_{eq,c}/\mu\text{g}$	Dose DAMGO/μg	Dose XYL/μg
7	22,7	0,2	6
25	38,2	0,3	9
52	60,4	0,6	18

Dessa maneira, calcularam-se os IC para os três pontos experimentais testados, notando-se que não há efeito sinérgico apreciável, no paradigma de retirada de pata, quando da coadministração de DAMGO+XYL. Nota-se apenas efeito aditivo na antinocicepção mediada por esses agentes, como pode ser observado na tabela a seguir:

Tabela 36. Índices de combinação para DAMGO+XYL.

Razões	Índice de Combinação IC
E ₇ /E ₁₀	1
E ₂₅ /E ₃₀	0,8
E ₅₂ /E ₅₀	1

5.8. Isobologramas

Foram construídos isobologramas para as combinações AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL, representando as coleções de pontos aditivos teóricos e experimentais obtidos. Nota-se que essa representação gráfica ilustra bem os dados de IC obtidos para todas as combinações binárias feitas. Os isobologramas gerados são mostrados na figura 19:

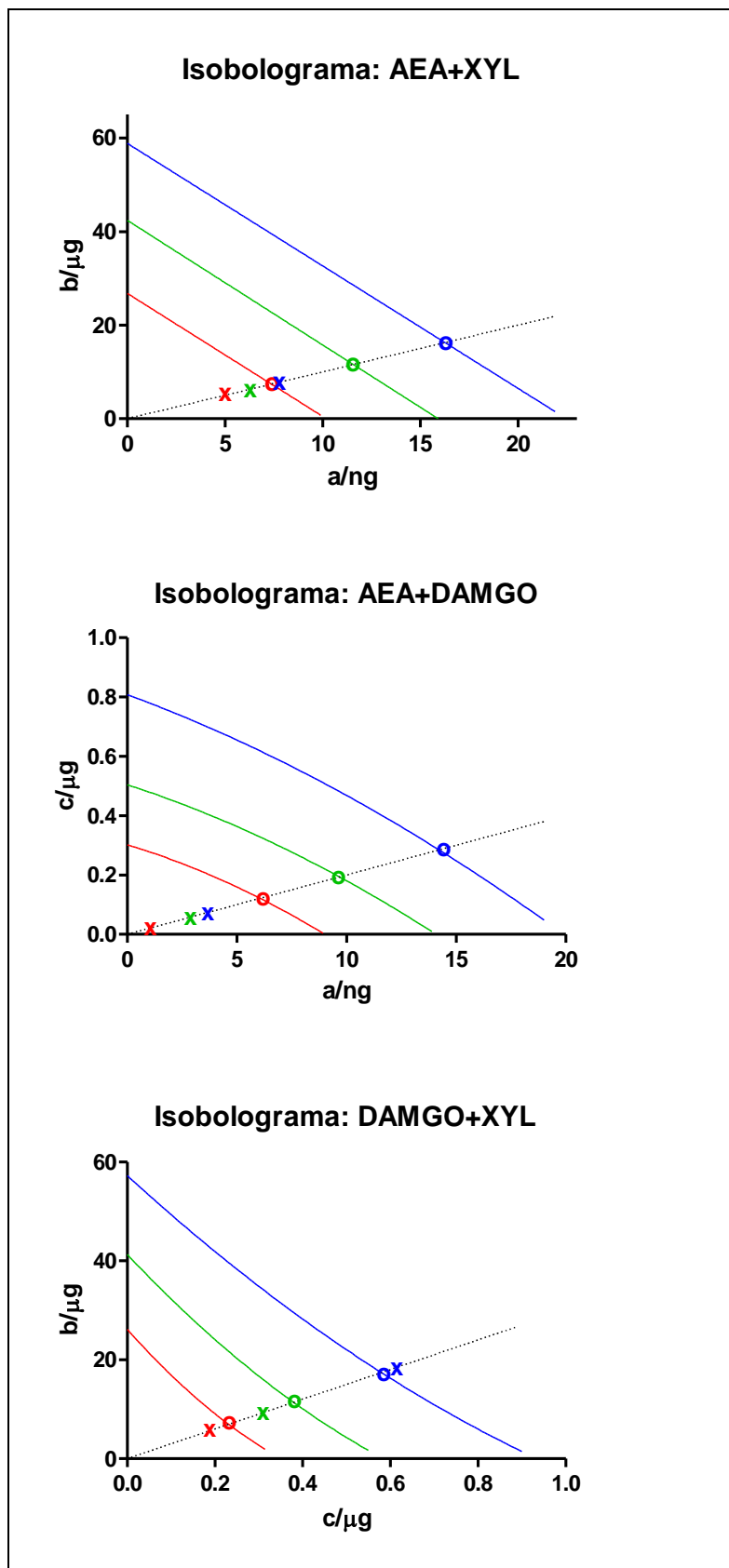


Figura 19. Isobologramas para as combinações AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL. Pontos aditivos teóricos são representados por "o" e pontos experimentais por "x", marcados ao longo das retas de razões de doses fixas. As isóbulas de cores vermelha, verde e azul correspondem aos níveis de efeito 10, 30 e 50% EMP, respectivamente.

5.9. Comparação de efeitos teóricos e experimentais das combinações AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL

Os efeitos experimentais obtidos para cada combinação binária de AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL foram comparados com os efeitos aditivos teóricos preditos, através de um teste de hipóteses que pressupunha, como hipótese nula, igualdade de efeitos observados. A variância dos efeitos aditivos teóricos foi estimada conforme descrito no item 3.9.3.

5.9.1. Comparação de efeitos para AEA+XYL

A figura 20 ilustra a comparação de efeitos aditivos teóricos e efeitos experimentais observados para as combinações de doses testadas para AEA+XYL. Nota-se que o efeito antinociceptivo experimental é significativamente maior que o aditivo teórico previsto para todas as combinações de dose testadas, indicando forte sinergismo farmacológico entre AEA e XYL, no efeito observável do paradigma de retirada de pata.

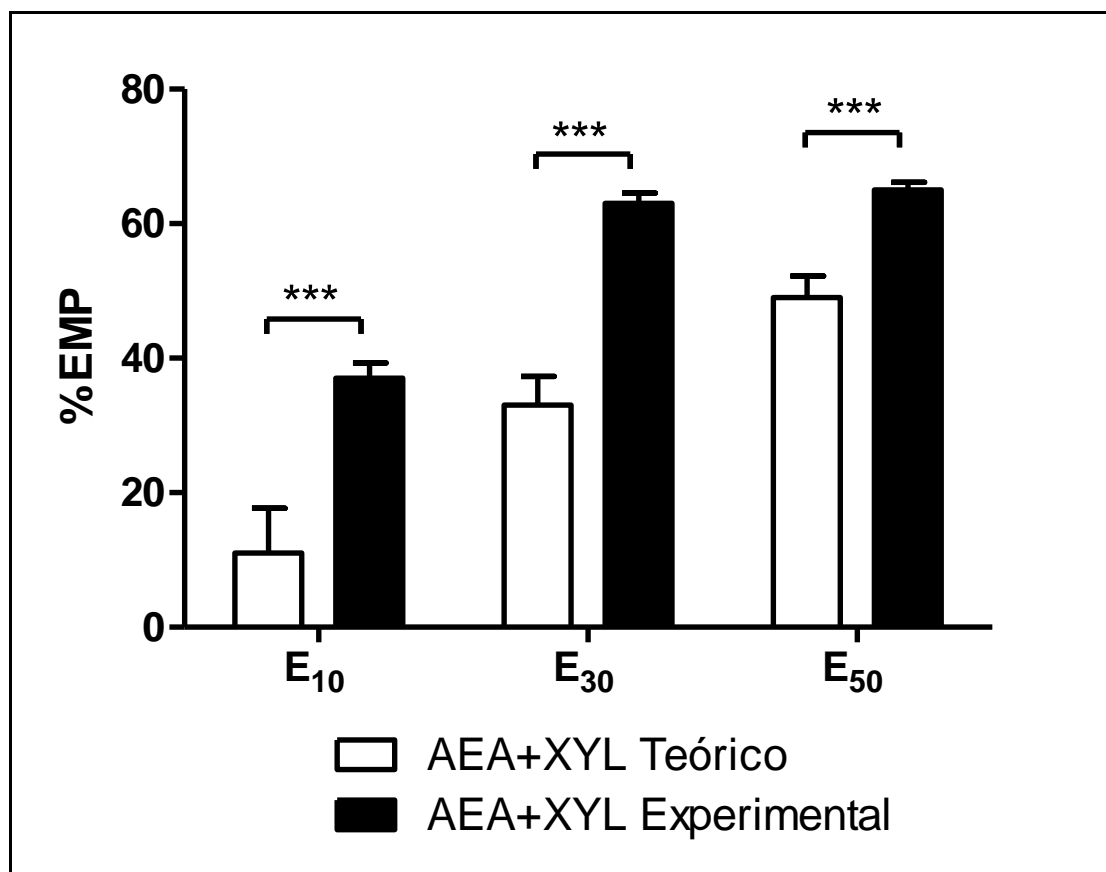


Figura 20. Comparação dos efeitos teóricos e experimentais para AEA+XYL. Nota-se forte sinergismo no efeito experimental observado, se comparado ao efeito aditivo previsto, para todos os níveis de efeito testados: E₁₀, E₃₀ e E₅₀. (**p < 0,001)

5.9.2. Comparação dos efeitos para AEA+DAMGO

Os efeitos aditivos teóricos e experimentais observados para as combinações AEA+DAMGO foram estatisticamente comparados, como mostrado na figura 20. É notável que o efeito antinociceptivo experimental seja significativamente maior que o aditivo teórico previsto, o que indica forte sinergismo de efeito para todas as combinações de dose testadas.

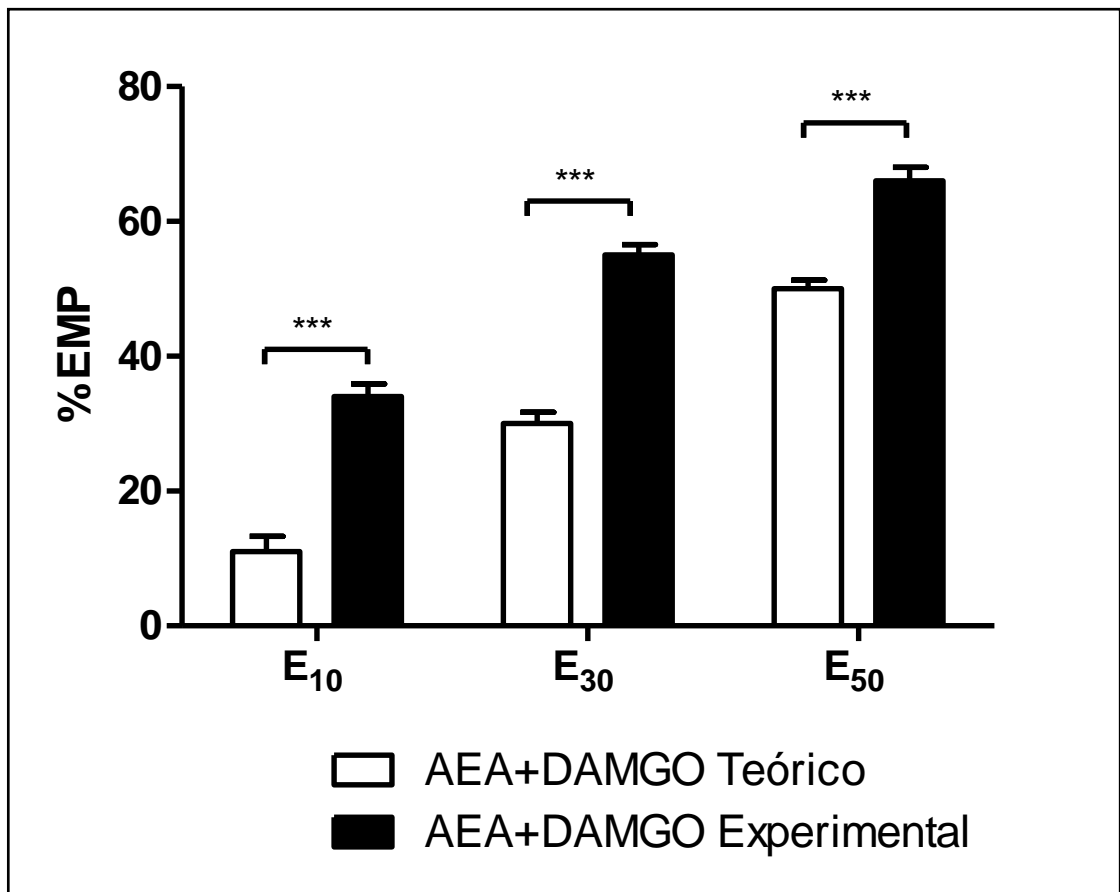


Figura 21. Comparação dos efeitos teóricos e experimentais para AEA+DAMGO. É possível se observar forte sinergismo no efeito experimental observado, para todos os regimes de dose testados e níveis de efeito, E₁₀, E₃₀ e E₅₀. (p < 0,001)

5.9.3. Comparação dos efeitos para DAMGO+XYL

A análise de efeitos experimentais, em comparação com efeitos aditivos teóricos, para DAMGO+XYL revela dados interessantes. Nota-se que, para os níveis de efeito de 10% (E₁₀) e 50% (E₅₀) EMP, existe diferença significativa entre a predição aditiva teórica e o observado experimentalmente, indicativo de sinergismo farmacológico dos agentes antinociceptivos no paradigma de retirada de pata. Porém, não houve diferença significativa entre os efeitos teórico e experimental para 30%EMP (E₃₀), o que indica aditividade de efeitos. A figura 21 ilustra esses achados.

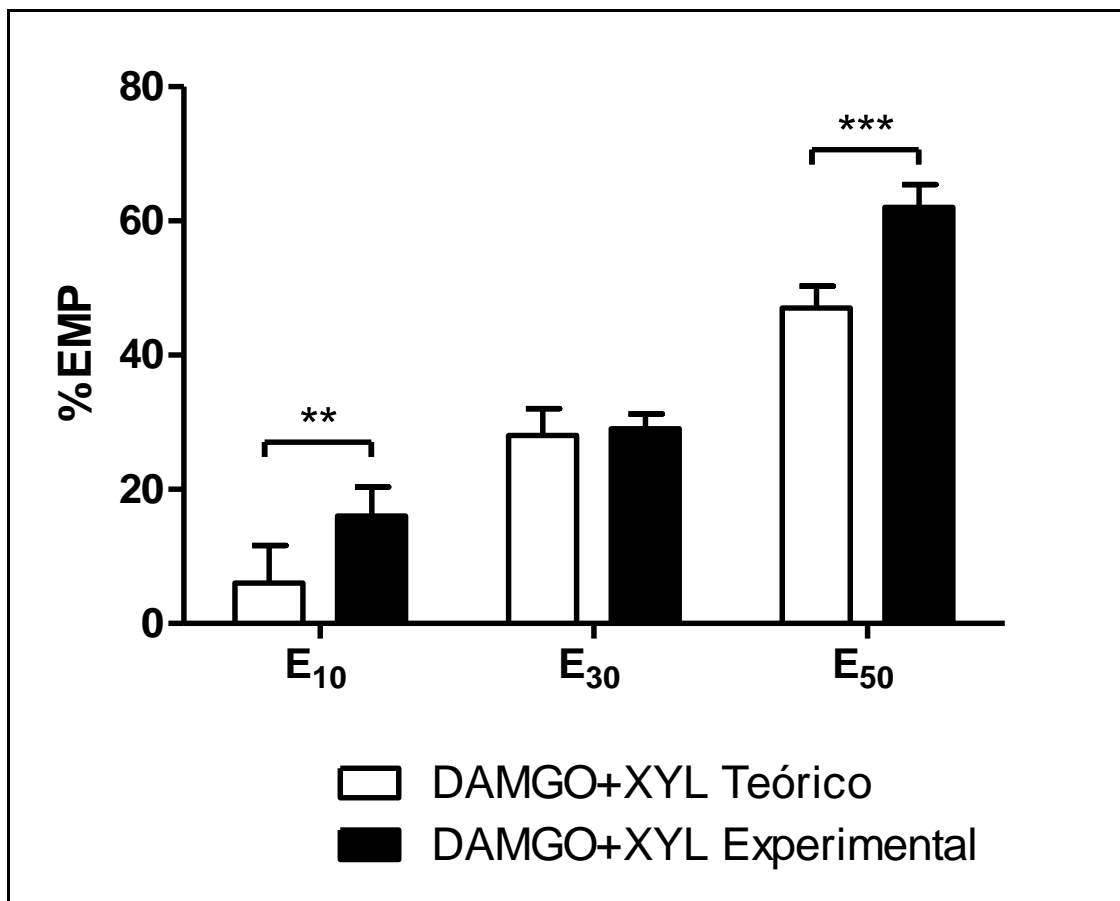


Figura 22. Comparação dos efeitos teóricos e experimentais para AEA+DAMGO. Nota-se sinergismo de efeito farmacológico, para as combinações DAMGO+XYL, apenas para E₁₀ e E₅₀. No nível de efeito E₃₀ não houve diferença significativa entre o efeito aditivo teórico e o experimental observado, indicando aditividade.

5.10. Avaliação imunohistoquímica da expressão de CB₁R e MOR em tecidos de coxim plantar e DRGs lombares de camundongos

A detecção qualitativa da expressão dos GPCRs CB₁R (receptor canabinoide) e MOR (receptor opioide) foi feita através de imunohistoquímica, com uso do cromógeno diaminobenzidina (DAB) para marcação de células imunopositivas. Não foram feitas quantificações e, portanto, comparações entre grupos, apenas buscou-se estabelecer a ocorrência desses GPCRs em tecido de pata (local de administração dos agonistas) e DRGs lombares (gânglios que contêm os corpos celulares de neurônios aferentes primários que inervam a pata).

5.10.1. Avaliação morfológica dos coxins plantares e DRGs lombares dissecados

Para se determinar a validade dos métodos de dissecação de coxins plantares e DRGs lombares (L3-L5) descritos, foram feitas avaliações morfológicas de secções congeladas (16 μm) desses tecidos por coloração HE, em um grupo de animais ($n = 5$). A figura 23 mostra imagens representativas dos tecidos dissecados. É importante ressaltar que, em todos os experimentos, os três DRGs coletados por animal foram agrupados para viabilizar a rotina histológica, não se discriminando, portanto, qual gânglio lombar estava sendo analisado.

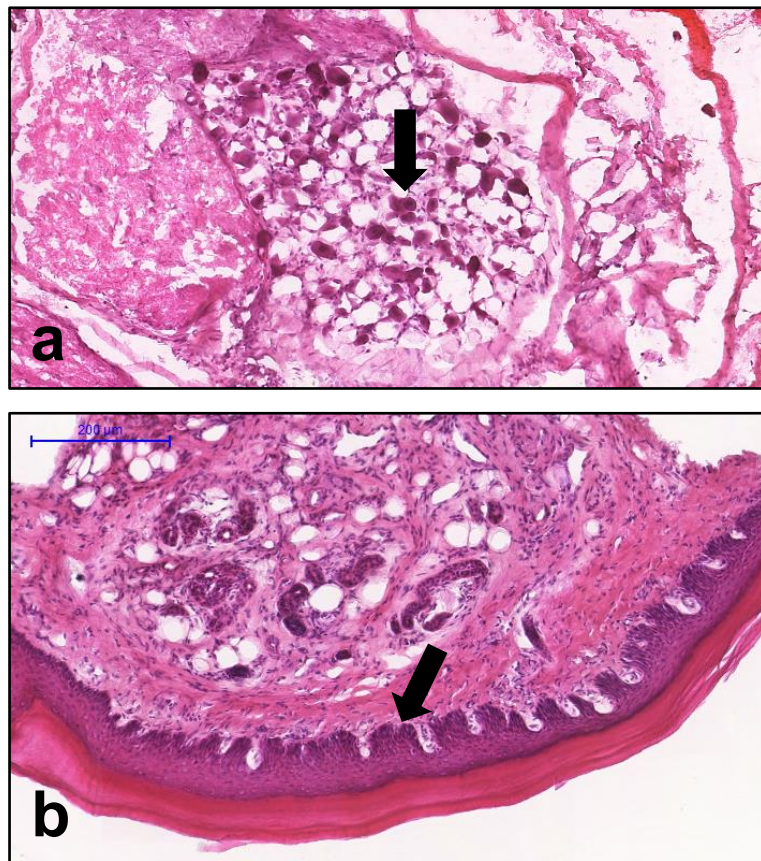


Figura 23. Secções congeladas coradas com HE. (a) DRG lombar de camundongo, indicando-se, com a ponta de seta, corpos celulares de neurônios aferentes primários, cercados de células gliais satélite (citoplasma mais claro); (b) coxim plantar de camundongo, evidenciando-se as camadas de epiderme com a ponta de seta. Note que se trata de pele glabra, logo a ausência de folículos pilosos.

É possível notar que as técnicas de dissecação propostas são adequadas, já que se obteve uma morfologia satisfatória e coerente com o que era esperado e amplamente descrito na literatura (ROSS et al., 2012). Dessa forma, procedeu-se com outras análises biomoleculares, baseadas nos métodos de coleta de tecidos de coxim plantar e DRGs lombares (L3-L5) descritos e validados.

5.10.2. Avaliação imunohistoquímica da expressão de CB₁R em tecidos de coxim plantar e DRGs lombares de camundongos

Estabelecida a técnica de dissecação, foi então caracterizada, qualitativamente, a expressão de CB₁R em secções congeladas (16 µm) de tecidos de coxim plantar e DRGs lombares (L3-L5) de camundongos. Foram utilizados dois grupos (n = 5), um recebendo o tratamento com PGE₂ três horas antes da dissecação, e outro recebendo apenas NaCl 0,9% m.V⁻¹, também três horas antes da dissecação, ambos por via intraplantar. Foi utilizado o anticorpo anti-CB₁R (Santacruz Biotechnology, sc-10066) crescido em cabra, na diluição de 1:400, conforme orientação do fabricante. A figura 24 ilustra secções representativas obtidas.

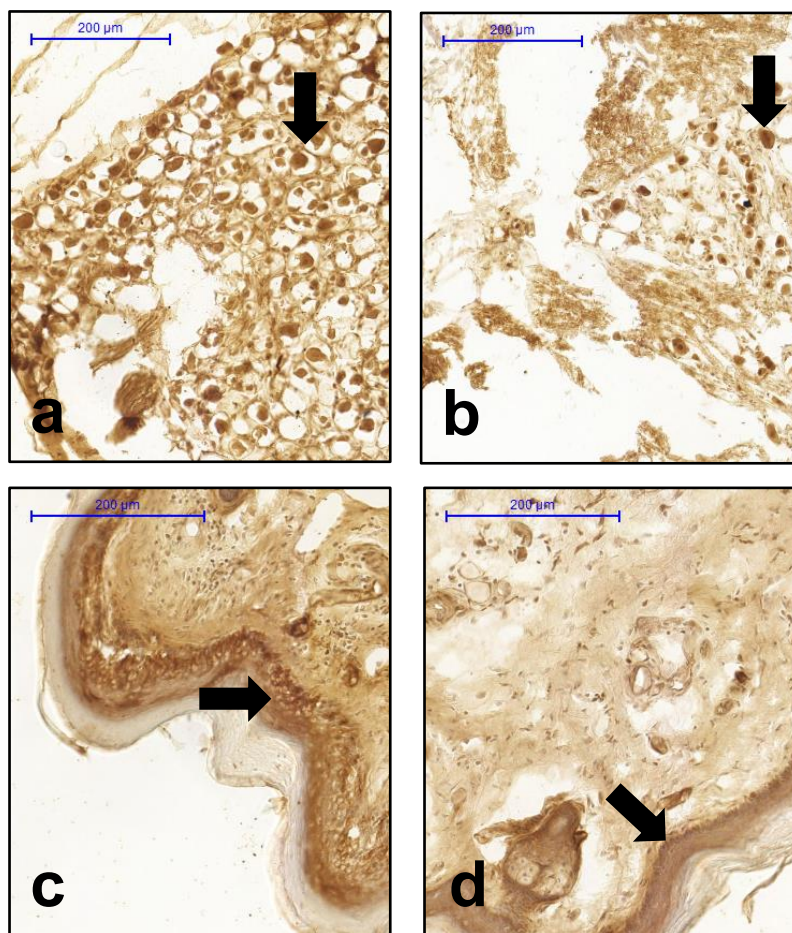


Figura 24. Avaliação imunohistoquímica da expressão de CB₁R em tecidos de DRGs lombares (L3–L5) e coxim plantar de camundongos. (a) imagem representativa de DRG lombar de grupo tratado com NaCl 0,9% m.V⁻¹. Note a forte marcação citoplasmática (seta) de corpos celulares de neurônios aferentes primários; (b) DRG lombar de grupo tratado com PGE₂. É possível notar imunomarcação forte para os corpos celulares de neurônios pseudo-unipolares, indicando a presença de CB₁R; (c) secção de coxim plantar de animal tratado com NaCl 0,9% m.V⁻¹. Nota-se marcação intensa de células da epiderme (seta), indicando expressão constitutiva desses receptores em queratinócitos; (d) corte de coxim plantar de animal tratado com PGE₂, indicando, novamente, expressão epidérmica de CB₁R.

5.10.3. Avaliação imunohistoquímica da expressão de MOR em tecidos de coxim plantar e DRGs lombares de camundongos

A caracterização qualitativa da expressão do receptor opioidérgico MOR em tecidos de coxim plantar e DRGs lombares (L3-L5) foi realizada também por técnica imunohistoquímica, empregando-se secções congeladas de 16 µm. Dois grupos de

animais (n = 5) foram tratados ou com NaCl 0,9% m.V⁻¹ ou com uma dose de 2 µg de PGE₂, via intraplantar, e os tecidos descritos foram dissecados três horas após a injeção e submetidos à rotina histológica. Foi utilizado um anticorpo anti-MOR (Santacruz Biotechnology, sc-7488) crescido em coelho, na diluição de 1:400, conforme orientação técnica do fabricante. A figura 25 ilustra as imunomarcações obtidas em ambos os tecidos.

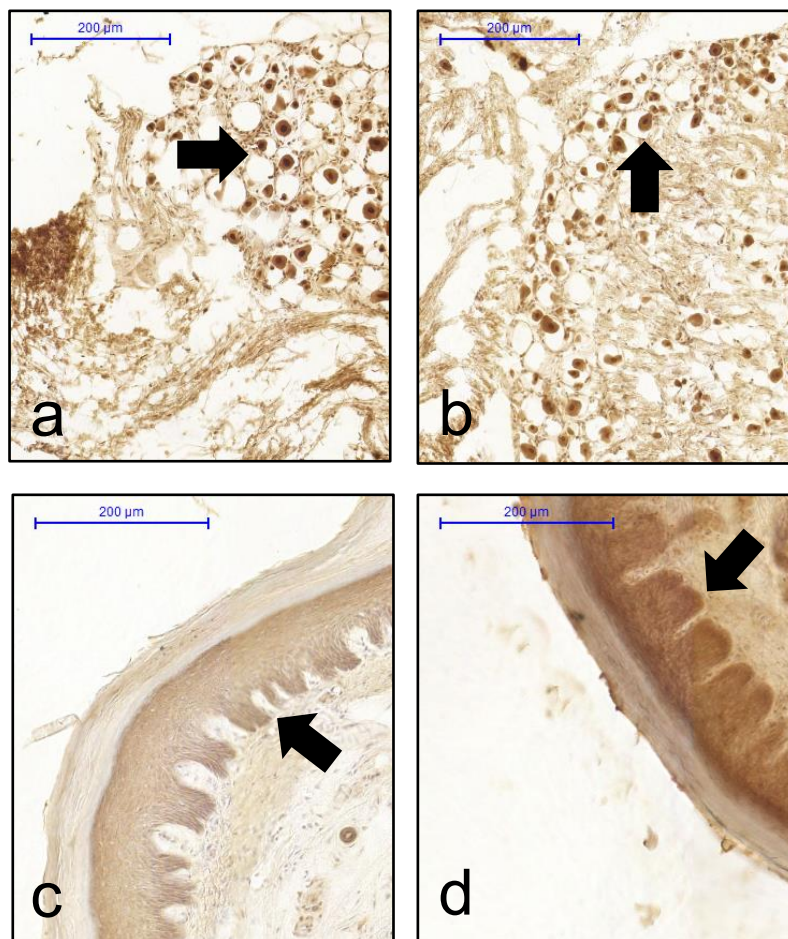


Figura 25. Análise qualitativa, por imunohistoquímica, da expressão de MOR em coxim plantar e DRGs lombares (L3-L5) de camundongos. (a) imunomarcação de DRG lombar tratado com NaCl 0,9% m.V⁻¹. Note a intensa marcação citoplasmática dos corpos celulares neuronais (seta); (b) DRG lombar de animal tratado com PGE₂, indicando (seta) forte imunomarcação para MOR nos corpos celulares neuronais; (c) secção de coxim plantar tratado com NaCl 0,9% m.V⁻¹. Nota-se marcação da camada epidérmica indicada pela seta; (d) coxim plantar tratado com PGE₂ e imunomarcado para MOR, indicando, na seta, a intensa marcação da epiderme.

5.11. Avaliação da ocorrência de heterodímeros CB₁R-MOR em neurônios DRG lombares por PLA

A confirmação imunohistoquímica da expressão de CB₁R e MOR em DRGs lombares (L3-L5) de camundongos motivou a investigação da ocorrência de heterodímeros CB₁R-MOR em neurônios cultivados desses gânglios. Foi aplicada a técnica de PLA indireto, como descrito na seção 3.8.2. O fluoróforo usado para marcação (TexasRed®) apresenta bandas de absorção e emissão iguais a 596 e 615nm, respectivamente. Os núcleos foram corados com DAPI. A leitura foi feita em microscópio confocal. A figura 26 ilustra imagens representativas obtidas. Nota-se, nos três aumentos avaliados, intensa marcação em vermelho fluorescente perinuclear, que decorre da co-localização dos GPCRs CB₁R e MOR. Considerando que a distância média entre dois antígenos, para que haja sinal de PLA, é de cerca de 16 nm (BELLUCCI et al., 2014), os resultados preliminares obtidos indicam ocorrência de heterodímeros CB₁R-MOR em neurônios DRG lombares (L3-L5) cultivados por 24 horas.

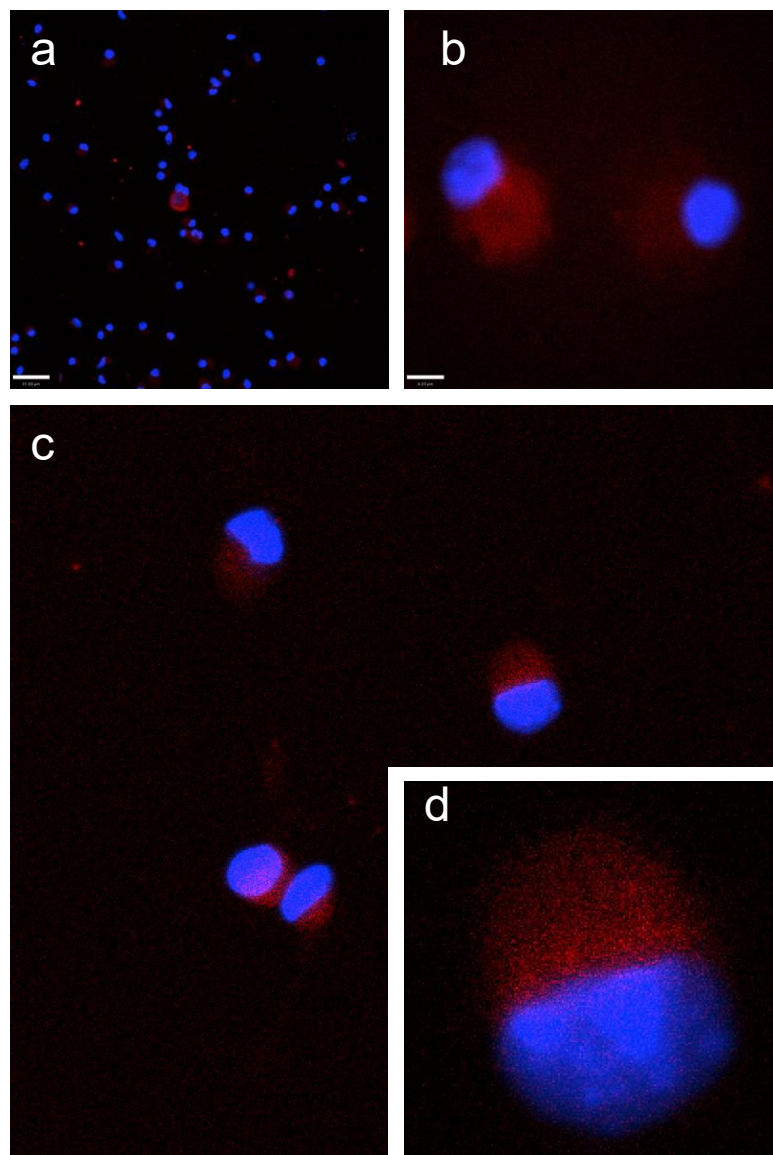


Figura 26. PLA indireto em neurônios DRG cultivados. Note a intensa marcação perinuclear em vermelho (núcleos em azul corados com DAPI). Essa pontilhação fluorescente indica co-localização de CB₁R e MOR, que podem estar heterodimerizados. (a) e (b) aumento de 10 X e 40 X, respectivamente, em tratamento com NaCl 0,9% m.V⁻¹, tomado como controle positivo; (c) aumento de 40 X em tratamento com PGE₂; (d) zoom digital em neurônio DRG tratado com PGE₂, destacando o aspecto pontilhado da imunomarcação de PLA.

6. Discussão

A técnica isobolográfica, fundamentada nos princípios de aditividade de Loewe, tem sua elaboração metodológica estritamente dependente do conhecimento das curvas dose-resposta dos fármacos administrados individualmente. Tais curvas dose-resposta são teoricamente estruturadas baseando-se na lei da ação de massas e na noção de receptores farmacológicos – específicos e saturáveis – que, em conjunto, determinam a escolha do modelo farmacodinâmico a ser utilizado (TALLARIDA, 2011).

A análise da ocorrência de sinergismo farmacológico na coadministração de agentes antinociceptivos, como AEA, XYL e DAMGO, deve levar em conta que se tratam de agonistas de GPCRs, com perfis de ligação farmacodinamicamente caracterizáveis por modelos pautados na lei da ação de massas. De fato, quando administrados periféricamente, esses agentes, isolados ou em associação, reduzem o limiar nociceptivo dos animais no teste de retirada de pata, sem, entretanto causar efeitos sistêmicos. Portanto, os efeitos desses fármacos são periféricamente modulados pela expressão de GPCRs específicos, que são seus alvos farmacológicos. Assim, caracterizou-se, através de imunohistoquímica, a expressão de CB₁R e MOR em tecido de coxim plantar de camundongo, região de administração desses fármacos. A avaliação foi qualitativa e tomada em t₃ após a administração de PGE₂ ou NaCl 0,9%*m.V*⁻¹, já que nesse intervalo não há tempo hábil para mudança dos níveis de expressão dos GPCRs em questão. Notou-se expressão, em camadas epidérmicas da pele glabra de coxim plantar, de ambos os GPCRs CB₁R e MOR. De fato, os achados para CB₁R foram concordantes com os descritos por Ständer e colaboradores (2005), que observaram intensa marcação desse GPCR em queratinócitos epidérmicos humanos. Para MOR, a imunomarcação também corrobora achados da literatura, em que a expressão desse GPCR em queratinócitos da epiderme é bem documentada (BIGLIARDI-QI et al., 2004).

Neste trabalho, optou-se por um modelo farmacodinâmico sigmoidal, que considerasse as características próprias dos GPCRs CB₁R, MOR e α_2 R: único sítio ortostérico, ligação específica a agonistas e saturável. Outro ponto interessante é que o não houve necessidade de expressar as doses usadas em escala logarítmica, já que a variação escalar da dose cobriu, no máximo, uma ordem de grandeza.

Dessa forma, fica evidente o aspecto sigmoideal das curvas dose-resposta para AEA, XYL e DAMGO obtidas, em que o coeficiente de Hill, inclinação da tangente no ponto de inflexão da curva, é maior que 1. Esse coeficiente, que mede o grau de cooperatividade na ligação, é uma generalização ao modelo hiperbólico que pressupõe $h = 1$.

As curvas obtidas demonstram que a eficácia absoluta não é de 100% para nenhum dos agentes antinociceptivos testados, ou seja, não há efeito hipoalgésico associado à administração de AEA, XYL ou DAMGO. Assim, em relação à eficácia, podem-se classificar os fármacos como: $Eficácia_{XYL} > Eficácia_{AEA} > Eficácia_{DAMGO}$. Além disso, a escala de doses utilizadas revela a potência dos agentes, expressa pelo valor, em massa, da C_{50} . Considerando que todos são fármacos de relativo baixo peso molecular, a relação entre C_{50} obtidos é direta e proporcional à potência das substâncias. Nota-se que os valores de C_{50} variam entre os tratamentos em até três ordens de grandeza, revelando diferentes aplicabilidades farmacológicas das substâncias, baseadas em seus perfis farmacodinâmicos. Podem-se classificar os agentes como: $Potência_{AEA} > Potência_{DAMGO} > Potência_{XYL}$.

O perfil de regressão não linear também foi distinto para os agentes antinociceptivos avaliados. A variabilidade, expressa como a qualidade da regressão no índice R^2 , em que $0 \leq R^2 \leq 1$, sendo $R^2 = 1$ um ajuste perfeito, foi relativamente baixa, como mostrado na tabela a seguir:

Tabela 37. Qualidade da regressão não-linear.

Agente antinociceptivo	R^2 (regressão não linear)
AEA	0,99
XYL	0,84
DAMGO	0,96

Os dados farmacodinâmicos derivados foram considerados adequados para a construção de isóbatas de aditividade referentes aos pares AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL, nos níveis de efeito 10, 30 e 50% EMP. As isóbatas, geradas a partir dos princípios de aditividade de Loewe, são via de regra tomadas como retas no plano cartesiano de combinações de doses, o que pressupõe que as

eficácias dos fármacos coadministrados sejam iguais. De fato, nota-se, pela análise de dose-resposta acima, que essa premissa não é verdadeira para os agentes antinociceptivos AEA, XYL e DAMGO no teste de retirada de pata. Portanto, apenas para AEA+XYL observa-se uma tendência linear ($R^2 > 0,99$) nas isóbatas de aditividade construídas. Para AEA+DAMGO e DAMGO+XYL, as curvas geradas desviam da linearidade, e um ajuste polinomial de grau 2, com $R^2 > 0,99$, de fato indica a natureza curva dessas isóbatas. A análise de isóbatas curvas segue a mesma racionalidade das isóbatas lineares, como extensamente descrito por Grabovisky e Tallarida (2004).

As razões de doses fixas foram determinadas empiricamente, considerando-se a variabilidade da resposta experimental que seria obtida. Dessa forma, os valores de ϕ escolhidos refletem a necessidade de se diminuir tal variabilidade, isto é, aumentar o percentual de efeito observável atribuível ao fármaco com melhor perfil farmacodinâmico. Para essa determinação, foram consideradas as variâncias de C_{50} para cada curva dose-resposta obtida, assim como o valor de R^2 . Portanto, a variabilidade na resposta esperada para cada agente antinociceptivo pode ser escalonada como: Variabilidade_{AEA} < Variabilidade_{DAMGO} < Variabilidade_{XYL}. Dessa forma, para as combinações de dose AEA+XYL e AEA+DAMGO, o percentual de efeito atribuível a AEA foi maior que aqueles para XYL e DAMGO, respectivamente. Para as combinações DAMGO+XYL, seguiu-se a mesma racionalidade e priorizou-se o efeito atribuível a DAMGO. Os dados são sumarizados na tabela a seguir:

Tabela 38. Percentuais de resposta de cada fármaco nas associações binárias.

Combinação Binária	Efeito	% Efeito AEA	% Efeito XYL	%Efeito DAMGO
AEA+XYL	E ₁₀	72%	28%	-
	E ₃₀	72%	28%	-
	E ₅₀	72%	28%	-
AEA+DAMGO	E ₁₀	67%	-	33%
	E ₃₀	60%	-	40%
	E ₅₀	63%	-	37%
DAMGO+XYL	E ₁₀	-	26%	74%
	E ₃₀	-	26%	74%
	E ₅₀	-	29%	71%

As curvas-dose resposta de efeitos aditivos teóricos foram geradas baseando-se estritamente nos princípios de aditividade de Loewe, que pressupõem:

$$Efeito(a + b) = E_{A(a+a_b)} = E_{B(b_a+b)} = E_{AB}$$

Isto é, é possível determinar doses a_b e b_a equiefetivas a doses b e a , respectivamente. Essa noção permite que se construam curvas prevendo efeitos puramente aditivos, que são considerados uma situação de idealidade. Dadas as combinações a serem testadas, desvios da idealidade (sinergismo ou sub-aditividade) são quantificáveis e estatisticamente validáveis, sem que seja feita nenhuma premissa mecanística sobre o modo de ação dos fármacos em separado. De fato, esse é um ponto que crucial para a adoção da aditividade de Loewe como referencial teórico do presente trabalho (TANG et al., 2015).

A construção das curvas-resposta teóricas determina, dessa forma, o referencial ideal de aditividade contra o qual se compara os dados experimentais obtidos. As curvas experimentais elaboradas em razões de doses fixas para AEA+XYL, AEA+DAMGO e DAMGO+XYL apresentam parâmetros farmacodinâmicos próprios, determináveis a partir de uma análise de regressão não linear como a feita para os agentes antinociceptivos em separado. De fato, essas combinações binárias, se mantida a razão de doses fixa, comportam-se como

fármacos independentes (GESSNER, 1995). Essa abordagem é importante para que sejam racionalizados regimes terapêuticos baseados na coadministração de fármacos, como por exemplo, anestésicos, em que interações farmacológicas fundamentam muito da prática dos profissionais de saúde, como nos processos de indução e manutenção de anestesia combinando-se hipnóticos (propofol, isoflurano) com agentes anestésicos (fentanil, óxido nitroso) (MINTO et al., 2000).

O IC é uma grandeza adimensional, uma razão de distâncias radiais de pontos experimentais e teóricos, respectivamente, tomados em relação à origem do plano coordenado (0,0) (RAFFA et al., 2010). Trata-se de um estimador de sinergismo bastante descrito por Chou (2010) e tomado como referência na análise de associação de fármacos. Nos experimentos descritos neste trabalho, foi observado sinergismo, expresso por um $IC < 1$, apenas para AEA+XYL e AEA+DAMGO. A combinação DAMGO+XYL elicitou apenas efeitos aditivos, como expresso pelos $IC = 1$. Esses resultados replicam achados de Tham e colaboradores (2005), que usaram um modelo de nocicepção aguda em camundongos para análise de efeitos antinociceptivos da coadministração de CP55,940 (agonista canabinoide), morfina (agonista opioide) e dexmedetomidina (agonista adrenérgico), em combinações binárias. Os autores reportam que apenas as combinações CP55,940+morfina e CP55,940+dexmedetomidina foram sinérgicas para os efeitos de nocicepção térmica observados, sendo que a coadministração de morfina+dexmedetomidina apresentou resultados aditivos.

Uma crítica ao IC é falta de validação estatística da medida. Dessa forma, faz-se necessária a comparação dos efeitos aditivos teóricos previstos com os efeitos experimentais observados. Para isso, faz-se necessário estimar a variância dos efeitos teóricos aditivos, para realização de um teste t modificado comparando as médias obtidas (TALLARIDA, 2000). Nessa estimativa, as variâncias das doses individuais dos fármacos combinados são consideradas, assim como a variação da resposta da associação em relação a cada fármaco individual (diferenciação parcial). Dessa forma, um estimador não tendencioso de variância é obtido, e procede-se com o teste de hipóteses para as médias dos efeitos preditos e observados (KAZANTIS et al., 2016). No presente estudo, as combinações AEA+XYL e AEA+DAMGO foram consideradas sinérgicas de acordo com essa abordagem, já

que os efeitos experimentais, para todas as combinações de doses testadas, foram significativamente maiores que os efeitos aditivos teóricos preditos ($p < 0,001$). É interessante notar que, diferentemente do observado pela análise do IC, os efeitos das combinações de doses DAMGO+XYL, para os níveis de efeito 10 e 50%EMP, foram também significativamente maiores que o predito teoricamente, o que indica, nessa perspectiva sinergismo. Apenas o nível de efeito 30%EMP foi aditivo nessa abordagem, como $p > 0,05$ na comparação das médias.

Tomados em conjunto, esses dados sugerem que de fato existe profundo sinergismo farmacológico decorrente da coadministração de agentes antinociceptivos canabinoidérgicos, opioidérgicos e adrenérgicos em combinações binárias, no teste algesimétrico de retirada de pata. Esses achados são relevantes se considerada a premente necessidade de se amplificar as estratégias de abordagem terapêutica da dor, que segue impactando a qualidade de vida de indivíduos afligidos (RAMALHO, 2009).

Os dados obtidos na análise isobolográfica motivaram a busca por uma justificativa molecular no sinergismo farmacológico observado. Apesar de a análise fundamentada nos princípios de aditividade de Loewe prescindirem do estrito conhecimento dos mecanismos de ação dos fármacos associados, é possível se especular sobre as causas de eventos sinérgicos. É sabido que a oligomerização de GPCRs impacta profundamente nas propriedades farmacológicas desses receptores, sobretudo na capacidade (e seletividade) das unidades protoméricas de se acoplarem a diferentes proteínas G (G_i , G_q , G_s), de sinalizarem para o interior da célula e de ocorrência de internalização dos GPCRs. Além disso, a oligomerização de GPCRs afeta os parâmetros cinéticos e dinâmicos de ligação de agonistas a esses receptores, criando uma diversidade farmacológica inesperada para os protômeros isolados (TERRILLON et al., 2004).

De fato, o reconhecimento dessas unidades heterodiméricas sinalizadoras como efetores farmacológicos com propriedades únicas motiva a busca por ligantes bivalentes, moléculas que combinam dois farmacóforos ligados a um espaçador, uma espécie de alça molecular que une ligantes de receptores distintos. Nesse sentido, encontram-se descritos na literatura diversos ligantes bivalentes, capazes, em teoria, de seletivamente ligarem-se a homo- ou heterodímeros de GPCRs, e

tendo como alvos farmacológicos diferentes oligômeros. É notável que ligantes bivalentes que combinam farmacóforos para CB₁R e MOR comportem-se, em testes algosimétricos, como potentes agentes antinociceptivos incapazes de causar tolerância (LE NAOUR et al., 2013). Outras evidências farmacológicas que suportam a hipótese de formação de heterodímeros CB₁R-MOR fundamentam-se em achados clássicos feitos pelo nosso grupo de pesquisa, em que a antinocicepção induzida por morfina é completamente revertida pelo antagonista de CB₁R AM251 (PACHECO et al., 2008), e por Manzanares e colaboradores (1999), que mostram que a analgesia induzida pelo Δ^9 -THC (agonista parcial CB₁R) pode ser bloqueada pela coadministração de naloxona, um antagonista opioidérgico inespecífico.

Nesse sentido, buscou-se, no presente trabalho, caracterizar a ocorrência de heterodímeros CB₁R-MOR em neurônios aferentes primários de DRGs lombares (L3-L5) de camundongos. Os axônios desses neurônios pseudo-unipolares formam os tratos nervosos que inervam o coxim plantar desses animais, compondo assim o nervo isquiático. Dessa maneira, são esses os neurônios, dos referidos gânglios, os responsáveis pela nocicepção periférica induzida por PGE₂. Daí a necessidade de compreensão do padrão de heterodimerização CB₁R-MOR nessas células, tanto sob condições fisiológicas (administração intraplantar de NaCl 0,9%*m.V*⁻¹ em *t*₀; dissecação e coleta dos DRGs em *t*₃), quanto em quadros hipernociceptivos farmacologicamente induzidos (administração intraplantar de PGE₂ em *t*₀; dissecação e coleta dos DRGs em *t*₃). Nesse trabalho, por limitações técnicas e de tempo, foi feita apenas avaliação qualitativa, por PLA indireto, da ocorrência de CB₁R-MOR em neurônios DRG cultivados. As etapas de padronização da técnica foram longas e desafiadoras, impossibilitando a execução de análise quantitativa em tempo hábil.

Existem distintos métodos de dissecação de DRGs murinos descritos na literatura, cada um com suas próprias vantagens e desvantagens. De fato, é uma técnica elaborada que exige treino e habilidade, sobretudo porque a dissecação é feita em lente binocular (RICHNER et al., 2017; SLEIGH et al., 2016). Dessa maneira, buscou-se confirmar adequação do método adaptado de coleta por coloração de HE, para caracterização morfológica qualitativa dos gânglios dissecados. O mesmo foi feito para tecido de coxim plantar, e observou-se, em ambos os casos, que os métodos de dissecação apresentavam-se adequados. Nota-

se, entretanto, que o citoplasma das células satélite dos DRGs aparece encolhido, o que se deve, provavelmente, ao uso de solução de sacarose 30% m.V⁻¹ como agente crioprotetor. Essa solução hipertônica desidrata profundamente o tecido, para evitar a formação de cristais de gelo no processo de congelamento para criosecção, que poderiam descaracterizar drasticamente a estrutura microscópica da amostra.

Para execução do PLA indireto, optou-se por cultivo celular de neurônios DRGs lombares (L3-L5), dissecados três horas após a administração de PGE₂ (pico de ação da prostaglandina) ou de NaCl 0,9% m.V⁻¹, tomado como um controle positivo de imunorreação. Os neurônios foram cultivados por 24h antes de se proceder com a rotina do PLA indireto, descrita na seção 3.8.2. Os resultados obtidos revelam extensa co-localização de CB₁R-MOR, inclusive no grupo tratado apenas com NaCl 0,9% m.V⁻¹. Isso provavelmente se deve à natureza dinâmica dos oligômeros de GPCRs, que estão constantemente sendo formados e desagregados, num processo coordenado por múltiplos fatores e dependente de forças intermoleculares não covalentes, que são exatamente as responsáveis pela modulação alostérica mútua dos protômeros, que tanto afeta as propriedades biológicas dos heterodímeros de GPCRs (FUXE et al., 2012). De fato, demonstra-se, *in silico*, que em uma bicamada lipídica contendo uma população de GPCRs prototípicos, cerca de 20% dessas unidades estão dinamicamente oligomerizadas, favorecendo uma noção de “oligomerização constitutiva” (SADIQ et al., 2013). Dessa forma, os resultados aqui apresentados confirmam a ocorrência *in situ* de heterodímeros CB₁R-MOR neurônios DRGs lombares (L3-L5) de camundongos cultivados.

Infelizmente, por limitações técnicas e de tempo, não foi possível estabelecer correlação direta entre a ocorrência desses heterodímeros e a atividade antinociceptiva da coadministração de AEA+DAMGO. Sugere-se, de qualquer forma, que tais heterocomplexos de GPCRs tenham alguma implicação na antinocicepção sinérgica mediada por esses agentes farmacológicos, quando usados simultaneamente. O presente trabalho abre novas perspectivas de exploração do sinergismo farmacológico e sua relação com o paradigma da oligomerização de GPCRs. Como ação futura, pode-se sugerir diversas abordagens, como análises

eletrofisiológicas da atividade sinérgica em nível celular, tratamento das culturas de neurônios DRG com os agentes utilizados e análise dos níveis de co-localização de GPCRs alvos, por PLA indireto, entre outras possibilidades de desdobramentos.

Em conclusão, pode-se inferir que a coadministração de agentes antinociceptivos AEA+XYL e AEA+DAMGO é uma estratégia promissora para se aumentar a potência e eficácia dos regimes de doses utilizados, já que existe um profundo sinergismo na ação farmacológica desses agentes. Essa ação sinérgica pode estar associada à ocorrência de heterodímeros de GPCRs, como CB1R-MOR, que possuem propriedades farmacológicas únicas e distintas dos protômeros isolados.

7. Referências Bibliográficas

- AVILA, J.R.; LEE, J.S.; TORII, K.U. Co-Immunoprecipitation of Membrane-Bound Receptors. **The Arabidopsis Book**, 2015.
- BELLUCCI, A.; FIORENTINI, C.; ZALTIERI, M.; MISSALE, C.; SPANO, PF. The “In Situ” Proximity Ligation Assay to Probe Protein-Protein Interactions in Intact Tissues. **Methods in Molecular Biology**, v. 1174, 2014.
- BETKE, K.M.; WELLS, C.A.; HAMM, H.E. GPCR Mediated Regulation of Synaptic Transmission. **Progress in Neurobiology**, v. 96, n. 3, p. 304 – 321, 2012.
- BIGLIARDI-QI, M.; SUMANOVSKI, L.T.; BÜCHNER, S.; RUFLI, T.; BIGLIARDI, P.L. Mu-Opiate Receptor and Beta-Endorphin Expression in Nerve Endings and Keratinocytes in Human Skin. **Dermatology**, v. 209, p. 183-189, 2004.
- CHOU, T.C.; Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 440-446, 2010.
- COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Neuropathic Pain: a Maladaptive Response of Nervous System to Damage. **Annual Review of Neurosciences**, v. 32, p. 1-32, 2009.
- DE FELICE, M.; OSSIPOV, M.H. Cortical and Subcortical Modulation of Pain. **Pain Management**, v. 6, n. 2, p. 111 – 120, 2016.
- EMSON, P.C. GABA(B) Receptors: Structure and Function. **Progress in Brain Research**, v. 160, p. 43 – 57, 2007.
- FERREIRA, R.C.M.; ALMEIDA-SANTOS, A.F.; DUARTE, I.D.G.; AGUIAR, D.C; MOREIRA, F.A.; ROMERO, T.R.L. Peripheral Antinociception Induced by Aripiprazole Is Mediated by the Opioid System. **Biomedical Research Int.**, 2017.
- FOUCQUIER, J.; GUEDJ, M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. **Pharmacological Research Perspectives**, v. 3, n. 3., 2015.
- FREDERIKSSON, R.; LAGERSTROM, M.C.; LUNDIN, L.G.; SCHIOTH, H.B. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogue Groups, and Fingerprints. **Molecular Pharmacology**, v. 63, n. 6, p. 1256 – 1272, 2003.

FUJITA, W.; GOMES, I.; LAKSHMI, A.D. Revolution in GPCR signalling: opioid receptor heteromers as novel therapeutic targets: IUPHAR Review 10. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 18, p. 4155-4176, 2014.

FUXE, K.; BORROTO-ESCUELA, D.O.; MARCELLINO, D.; ROMERO-FERNÁNDEZ, W.; FRANKOWSKA, M.; GUIDOLIN, D.; FILIP, M.; FERRARO, L.; WOODS, A.S.; TARAKANOV, A.; CIRUELA, F.; AGNATI, L.F.; TANGANELLI, S. GPCR Heteromers and Their Allosteric Receptor-Receptor Interactions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 353-363, 2012.

GEARY, N. Understanding Synergy. **American Journal of Physiological Endocrinology and Metabolism**, v. 304, p. E237-E253, 2012.

GOLD, M.S.; DASTMALCHI, S.; LEVINE, J.D. Alpha 2-Adrenergic Receptor Subtypes In Rat Dorsal Root and Superior Cervical Ganglion Neurons. **Pain**, v. 69, n. 1 – 2, p. 179 – 190, 1997.

GRABOVSKY, Y.; TALLARIDA, R.J. Isobolographic Analysis for Combinations of a Full and Partial Agonist: Curved Isoboles. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 3, p. 981-986, 2004.

GRECO, W.; UNKELBACH, H-D.; PÖCH, G.; SÜHNEL, J.; KUNDI, M.; BÖDEKER, W. Consensus on Concepts and Terminology for Combined-Actions Assessment: The Saariselkä Agreement. **Archives of Complex Environmental Studies**, v. 4, n. 3, p. 65-69, 1992.

GUZZO, L.S.; CASTOR, M.G.; PEREZ, A.C.; DUARTE, I.D.; ROMERO, T.R. Natural Diterpenes from Coffee, Cafestol, and Kahweol Induce Peripheral Antinociception by Adrenergic System Interaction. **Planta Medicinal**, v. 82, p. 106 – 112, 2015.

HAACK, K.K.V.; MCCARTHY, N.A. Functional Consequences of GPCR Heterodimerization: GPCRs as Allosteric Modulators. **Pharmaceuticals**. v. 4, p. 509 – 523, 2011.

HONG, Y.; ABBOTT, F.V. Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 277, n. 1, p. 21 – 28, 1995.

JI, R.R.; ZHANG, Q.; LAW, P.I.; LOW, H.H.; ELDE, R.; HOKFELT, T. Expression of μ -, δ -, and κ -Opioid Receptor-like Immunoreactivities in Rat Dorsal Root Ganglia After Carrageenan-Induced Inflammation. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 12, p. 8156 – 8166, 1995.

KAZANTZIS, N.; CASEY, S.L.; SEOW, P.W.; MITCHELL, V. A.; VAUGHAN, C.W. Opioid and cannabinoid synergy in a mouse neuropathic pain model. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, p. 2521-2531, 2016.

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**, v. 107, p. 1096–1101, 1992.

LAPRAIRIE, R.B.; BAGHER, A.M.; KELLY, M.E.M.; DENOVAR-WRIGHT, E.M. Cannabiol is A Negative Allosteric Modulator of the Cannabinoid CB1 Receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, p. 4790-4805, 2015.

LE NAOUR, M.; AKGÜN, E.; YEKKIRALA, A.; LUNZER, M.M.; POWERS, M.D.; KALYUZHNY, A.E.; PORTOGHESE, P.S. Bivalent ligands that target μ opioid (MOP) and cannabinoid1 (CB1) receptors are potent analgesics devoid of tolerance. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 13, p. 5505-5513, 2013.

LOEWE; MUISCHNEK. Effect of combinations: mathematical basis of the problem. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol**, v. 114, p. 313-326, 1926.

MANZANARES, J.; COCHERO, J.; FUENTES, J.A. Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. **Brain Research**, v. 839, n. 1, p. 173-179, 1999.

MARSHALL, F.H.; WHITE, J.; MAIN, M.; GREEN, A.; WISE, A. GABA(B) Receptors Function as Heterodimers. **Biochemical Society Transactions**, v. 27, n. 4, p. 530-535, 1999.

MARULLO, S.; BOUVIER, M. Ressonance Energy Transfer Approaches in Molecular Pharmacology and Beyond. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 8, p. 362-365, 2007.

MILLAN, M.J. The Induction of Pain: an Integrative Review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MINTO, C.F.; SCHNIDER, T.W.; SHORT, T.G.; GREGG, K.M.; GENTILINI, A. SHAFER, S.L. Response Surface Model for Anesthetic Drug Interactions. **Anesthesiology**, v. 92, p. 1603-1616, 2000.

MUDGAL, A.; PASHA, S. Role of opioid receptor heterodimerization in pain modulation and tolerance development. **World Journal of Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 144-159, 2015.

PACHECO, D.F., ROMERO, T.R., DUARTE, I.D. Central antinociception induced by ketamine is mediated by endogenous opioids and μ - and δ -opioid receptors. **Brain Research**, v. 1526, p. 69 – 75. 2014.

PACHECO, D.F.; KLEIN, A.; PEREZ, A.C.; PACHECO, C.M.F.; FRANCISCHI, J.N.; REIS, G.M.L.; DUARTE, I.D.G. Central antinociception induced by μ -opioid receptor agonist morphine, but not δ - or κ -, is mediated by cannabinoid CB₁ receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 1, p. 225-231, 2009.

RAFFA, R.B.; PERGOLIZZI, J.V.Jr.; TALLARIDA, R.J. The determination and application of fixed-dose analgesic combinations for treating multimodal pain. **The Journal of Pain**, v. 11, n. 8, p. 701-709, 2010.

RAMALHO, G.L. Tratamento da dor. Disponível em: <http://www.unimedjp.com.br/canais/saudeebemestar/informacoes/ver-consultorio-medico.php?id=324>. Acesso em: 30 de outubro de 2018

RANDALL L.O.; SELITTO J.J. A Method for Measurement of Analgesic Activity on Inflamed Tissue. **Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie**, v. 111, p. 409–419, 1957.

RICHNER, M.; JAGER, S.B.; SIUPKA, P.; VAEGTER, C.B. Hydraulic Extrusion of the Spinal Cord and Isolation of Dorsal Root Ganglia in Rodents. **Journal of Visualized Experiments**, v. 119, 2017.

ROMERO, T.R.L.; PEREZ, A.C.; FRANSISCHI, J.N.; DUARTE, I.D.G. Probable involvement of α_{2c} -adrenoceptor subtype and endogenous opioid peptides in the peripheral antinociceptive effect induced by xylazine. **European Journal of Pharmacology**, v. 608, p. 23 – 27, 2009.

ROSENBAUM, D.M.; RASMUSSEN, S.G.F.; KOBILKA, B.K. The Structure and Function of G-Protein-Coupled-Receptors. **Nature**, v. 459, p. 356 – 363, 2009.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. Histologia: Texto e Atlas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SADIQ, S.K.; GUIXÀ-GONZÁLEZ, R.; DAINESE, E.; PASTOR, M.; FABRITIIS, G.; SELENT, J. Molecular Modeling and Simulation of Membrane Lipid-Mediated Effects on GPCRs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 22-38, 2013.

SLEIGH, J.N.; WEIR, G.A.; SCHIAVO, G. A simple, Step-by-Step Dissection Protocol for The Rapid Isolation of Mouse Dorsal Root Ganglia. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 82, 2016.

SPIGELMAN, I. Therapeutic Targeting of Peripheral Cannabinoid Receptors in Inflammatory and Neuropathic Pain States. In: Kruger L.; Light A.R. (Org.). Translational Pain Research: From Mouse to Man. Boca Raton, FL, EUA: CRC Press/Taylor & Francis; 2010. Cap. 5.

STÄNDER, S.; SCHMELTZ, M.; METZE, D.; LUGER, T.; RUKWIED, R. Distribution of Cannabinoid Receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on Sensory Nerve Fibers and Adnexal Structures in Human Skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 38, p. 177-188, 2005.

STEIN, C.; SCHAFER M.; HASSAN A. H. Peripheral opioid receptors. **Annals of Medicine**, v. 27, n. 2, p. 219 - 221, 1995.

TALLARIDA, R.J. Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis. Chapman and Hall/CRC, 1ª edição, 2000.

- TALLARIDA, R.J. Quantitative methods for assessing drug synergism. **Genes Cancer**, v. 2, n. 11, p. 1003-1008, 2011.
- TANG, J.; WENNERBERG, K.; AITTOKALLIO, T. What is synergy? The Saariselkä agreement revisited. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. 181, 2015.
- TERRILLON, S.; BOUVIER, M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. **EMBO Reports**, v. 5, n. 1, p. 30-34, 2004.
- THAM, S.M.; ANGUS, J.A.; TUDOR, E.M.; WRIGHT, C.E. Synergistic and additive interactions of the cannabinoid agonist CP55,940 with μ opioid receptor and α_2 -adrenoceptor agonists in acute pain models in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, p. 875 – 884, 2005.
- VERESS, G.; MESZAR, Z.; MUSZIL, D.; AVELINO, A.; MATESZ, K.; MACKIE, K.; NAGY, I. Characterisation of Cannabinoid 1 Receptor Expression in the Perikarya, and Peripheral and Spinal Processes of Primary Sensory Neurons. **Brain Structure and Function**, v. 218, n. 3, p. 733 – 750, 2014.
- WOOLF, C.J. What Is This Thing Called Pain? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3742 – 3744, 2010.