

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

**ESTUDO SOBRE OS MECANISMOS ANTINOCICEPTIVOS PERIFÉRICOS
INDUZIDOS PELA DOPAMINA**

Bárbara Formiga Gonçalves De Queiroz

BELO HORIZONTE

2020

Bárbara Formiga Gonçalves de Queiroz

**ESTUDO SOBRE OS MECANISMOS ANTINOCICEPTIVOS PERIFÉRICOS
INDUZIDOS PELA DOPAMINA**

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

Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte

BELO HORIZONTE

2020

043

Queiroz, Bárbara Formiga Gonçalves de.

Estudo sobre os mecanismos antinociceptivos periféricos induzidos pela dopamina [manuscrito] / Bárbara Formiga Gonçalves de Queiroz. – 2020.

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

Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte.

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

1. Farmacologia. 2. Dopamina. 3. Receptores Dopaminérgicos. 4. Analgésicos Opioides. 5. Canabinoides. 6. Óxido Nítrico. I. Duarte, Igor Dimitri Gama. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615

"ESTUDO SOBRE OS MECANISMOS ANTINOCICEPTIVOS PERIFÉRICOS INDUZIDOS PELA DOPAMINA"

BÁRBARA FORMIGA GONÇALVES DE QUEIROZ

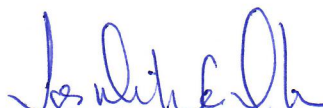
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 20 de março de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. RENES DE RESENDE MACHADO
FARMACIA/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRA. ANDREA DE CASTRO PEREZ
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. IGOR DIMITRI GAMA DUARTE
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, 20 de março de 2020

AGRADECIMENTOS

A meu orientador, professor Igor Dimitri Gama Duarte minha profunda gratidão pela orientação, pela confiança em mim depositada, pela acolhida no laboratório, incentivo e por todo conhecimento transmitido, sempre com tanta paciência, dedicação e alegria.

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

A todos os professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela competência e seriedade no ato de ensinar.

A todos os companheiros de bancada do Laboratório de Dor e Analgesia: Thaís de Menezes Noronha, Douglas Lamounier de Almeida, Daniel Portela, Vanessa Kaiser, Marla Calazans, Raquel Rodrigues, Wallace Barra, Renata Ferreira, Danielle Diniz e Willian Valadares por toda ajuda e prontidão, colaborando sempre que necessário. Sou grata não só pelo conhecimento compartilhado, mas também pela amizade que construímos. E em especial à Flávia Fonseca, por todo seu exemplo de dedicação, determinação, por me acolher e ensinar com tanto carinho desde os tempos da iniciação científica, por toda paciência, companheirismo e amizade. Além destes, minha gratidão a todos que já passaram pelo laboratório de Dor e Analgesia, e que tive a oportunidade de conviver, mesmo que por pouco tempo: Cristina da Costa Oliveira, Thamyris Santos, Caio Lopes, Loyara Rocha, Mariana Prata e Amanda Cristina Gonzaga.

Aos funcionários: bioteristas, funcionários do Cebio, da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia, e em especial a técnica Adriane.

Aos órgãos de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Aos meus pais Carlos e Neuda, minhas irmãs Larissa e Débora e ao Bernardo por todo apoio nos momentos difíceis e a todos os colegas que fizeram parte desta jornada.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Considerações gerais sobre o estudo da dor	19
1.2 Fisiopatologia da dor	20
1.3 Modulação da dor	25
1.3.1 Sistema opioide.....	27
1.3.2 Sistema endocanabinoide.....	29
1.3.3 Sistema nitrérgico.....	31
1.3.4 Canais para potássio.....	33
1.4 Dopamina	35
1.4.1 Aspectos gerais.....	35
1.4.2 Receptores dopaminérgicos.....	38
1.4.3 Dopamina e nocicepção.....	41
2. JUSTIFICATIVA	44
3. OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos específicos	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Animais de experimentação	49
4.1.1 Planejamento estatístico do n amostral.....	49
4.1.2 Eutanásia dos animais.....	50

4.2 Drogas e solventes	51
4.2.1 Agente hiperalgésico.....	51
4.2.2 Substância teste.....	51
4.2.3 Fármacos envolvidos na via dopaminérgica	51
4.2.4 Fármacos envolvidos na via opioidérgica	51
4.2.5 Fármacos envolvidos na via canabinoidérgica.....	52
4.2.6 Fármacos envolvidos na via L-arginina/NO/GMPc.....	52
4.2.7 Fármacos envolvidos nos testes com canais para potássio.....	52
4.3 Administração das drogas	53
4.4 Teste algesimétrico de mensuração do limiar nociceptivo	54
4.5 Protocolo experimental	56
4.6 Análise estatística	58
5. RESULTADOS	59
5.1 Avaliação da atividade hiperalgésica induzida pela PGE₂	60
5.2 Estudo sobre a antinocicepção periférica mediada pela dopamina	62
5.3 Avaliação dos receptores dopaminérgicos envolvidos na antinocicepção periférica mediada pela dopamina	65
5.4 Estudo sobre a participação do sistema opioidérgico na antinocicepção periférica mediada pela dopamina	75
5.5 Estudo sobre a participação do sistema canabinoidérgico na antinocicepção periférica mediada pela dopamina	81
5.6 Estudo sobre a participação da via L-arginina/NO/GMPc na antinocicepção periférica mediada pela dopamina	87
5.7 Estudo sobre a participação dos canais para potássio na antinocicepção periférica mediada pela dopamina	95
6. DISCUSSÃO	100
REFERÊNCIAS	112
ANEXO I	136

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG - 2-araquidonoil glicerol

5-HT - Serotonina

AC – adenilato ciclase

a.C. – Antes de Cristo

AEA - araquidonil etanolamina (anandamida)

AKT (ou PKB) - proteína quinase B

AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

AMPc - monofosfato cíclico de adenosina

AMT - transportador membranar de anandamida (do inglês anandamide membrane transporter)

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

ASIC – Canais iônicos sensíveis a ácido (do inglês Acid-sensitive ion channels)

ATP - adenosina trifosfato

Ca²⁺ - Cálcio

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CB₁ - receptor canabinoide do tipo 1

CB₂ - receptor canabinoide do tipo 2

CEBIO - Centro de Bioterismo

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DA - Dopamina

DAG - diacilglicerol

DAT – Transportador de dopamina

DMSO – dimetilsulfóxido

DRG - gânglio da raiz dorsal (do inglês dorsal root ganglion)

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

EPM - erro padrão da média

FAAH - amido hidrolase de ácidos graxos (do inglês fatty acid amide hydrolase)

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

GABA - ácido gama-aminobutírico (do inglês gamma-aminobutyric acid)

GDR – Gânglio da raiz dorsal

GMPc - monofosfato cíclico de guanosina

GPCRs – Receptores acoplados à proteína G (do inglês G protein-coupled receptors)

GTP - guanosina trifosfato

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês International Association for the Study of Pain)

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

IUPHAR – União Internacional de Farmacologistas (do inglês International Union of Pharmacologists)

K⁺ - Potássio

K_{ATP} - canais para potássio sensíveis ao ATP

MAGL - monoacilglicerol lipase

MAO – Monoamina oxidase

n - número de animais experimentais

Na⁺ - Sódio

NKA – Neurocinina A

NKB – Neurocinina B

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

PAG - substância cinzenta periaquedutal (do inglês periaquedutal grey)

PDE - fosfodiesterase

PG - prostaglandina

PKA - proteína quinase A

PKB (ou AKT) - proteína quinase B

PKG - proteína quinase G

SP – Sustância P

SNC - sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

TRKA – receptor A de tirosina quinase

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VGCC – Canais para cálcio dependentes de voltagem

VMAT - transportador de monoaminas vesicular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transdução nociceptiva ao longo do nociceptor	21
Figura 2. Anatomia dos nociceptores	23
Figura 3. Representação esquemática da via ascendente da dor.....	24
Figura 4. Estrutura química da dopamina.....	35
Figura 5. Neurotransmissão dopaminérgica	36
Figura 6. Representação esquemática da via de sinalização intracelular para os diferentes tipos de receptores dopaminérgicos	38
Figura 7. Administração intraplantar dos fármacos	53
Figura 8. Teste algesimétrico de mensuração do limiar nociceptivo mecânico da pata de camundongos.....	54
Figura 9. Aparelho utilizado para mensurar o limiar nociceptivo da pata de camundongos.....	55
Figura 10. Protocolo experimental.....	56
Figura 11. Protocolo experimental.....	57
Figura 12. Curva tempo-resposta da administração intraplantar de PGE ₂	61
Figura 13. Curva tempo-resposta da antinocicepção mediada pela dopamina frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	63
Figura 14. Exclusão do efeito antinociceptivo sistêmico da dopamina	64
Figura 15. Efeito do SKF 83566 na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	66
Figura 16. Efeito do SCH 23390 na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	67
Figura 17. Efeito do SKF 83566 frente a hiperalgesia induzida por DA.....	69
Figura 18. Efeito do SCH 23390 frente a hiperalgesia induzida por DA	70
Figura 19. Efeito do remoxipride na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	72

Figura 20. Efeito do U 99194 na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	73
Figura 21. Efeito do L-745,870 na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	74
Figura 22. Efeito da Naloxona na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	76
Figura 23. Efeito do NTD na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	77
Figura 24. Efeito do NorBNI na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	78
Figura 25. Efeito do CTOP na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	79
Figura 26. Efeito da Bestatina na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	80
Figura 27. Efeito do AM251 na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	82
Figura 28. Efeito do AM630 na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	83
Figura 29. Efeito do JZL na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	84
Figura 30. Efeito do MAFP na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	85
Figura 31. Efeito do VDM11 na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	86
Figura 32. Efeito do L-NOArg na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	88
Figura 33. Efeito do L-NPA na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	89
Figura 34. Efeito do L-NIL na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	90

Figura 35. Efeito do L-NIO na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	91
Figura 36. Efeito do ODQ na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	93
Figura 37. Efeito do Zaprinast na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	94
Figura 38. Efeito do TEA na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	96
Figura 39. Efeito do DQ na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	97
Figura 40. Efeito da Glib na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	98
Figura 41. Efeito da PX na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE ₂	99
Figura 42. Representação esquemática dos supostos mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva periférica da dopamina	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das fibras aferentes primárias.....	22
--	-----------

RESUMO

INTRODUÇÃO: A dopamina (DA) é um neurotransmissor abundante no Sistema Nervoso Central, exercendo funções cognitivas, motoras, além de ser apontada como importante agente na via descendente inibitória da dor, promovendo efeitos analgésicos, cujos mecanismos periféricos ainda não se apresentam bem elucidados. **OBJETIVO:** O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação antinociceptiva da DA, a nível periférico, e investigar sobre a participação dos sistemas opioide, canabinoide, nitrérgico e dos canais para potássio neste processo. **MÉTODOS:** Para isso foi utilizado o teste de retirada de pata submetido à compressão em camundongos (Swiss, machos, 30-40 g / Protocolo CEUA: 196/2018) que apresentaram a sensibilidade à dor aumentada pela administração de PGE₂. O estudo foi conduzido com o uso de ferramentas farmacológicas. Todos os fármacos foram administrados por via intraplantar, subcutâneamente, em volume de 20 µl (n=5). **RESULTADOS:** A administração de DA (5, 20, 80 ng/pata) promoveu efeito antinociceptivo, de forma dose-dependente, em animais pré-tratados com PGE₂ (2 µg/pata). Este efeito foi revertido por antagonistas dos receptores da família D₂ [D₂ – Remoxipride (4 µg/pata), D₃ – U 99194 (16 µg/pata) e D₄ – L-745,870 (16 µg/pata)], mas não por antagonistas de receptores da família D₁ [D₁ – SKF 83566 (2 µg/pata) e D₅ – SCH 23390 (1,6 µg/pata)]. No entanto, ao se administrar estes mesmos antagonistas de receptores D₁ com uma dose de DA (10 µg/pata) que causa hiperalgesia em animais, observou-se que estes antagonistas foram capazes de reverter o efeito hiperalgésico. A fim de avaliar a participação do sistema opioidérgico, administraram-se os antagonistas de receptores opioides Naloxona (12,5, 25 e 50 µg/pata), CTOP (20 µg/pata), Naltrindole (15, 30 e 60 µg/pata) e Nor BNI (50, 100 e 200 µg/pata). Todos eles promoveram a reversão da antinocicepção mediada pela DA, exceto o CTOP (antagonista de receptores µ-opioide). Para investigar sobre a participação dos peptídeos opioides endógenos no processo analisado, utilizou-se o inibidor da degradação dos mesmos, Bestatina (400 µg/pata), que foi capaz de potencializar o efeito antinociceptivo promovido por uma menor dose de DA (5 ng/pata). De forma similar, quando avaliamos a participação do sistema endocanabinoide, a utilização do inibidor da degradação do endocanabinoide 2-AG, JZL184 (4 µg/pata), promoveu potencialização da antinocicepção mediada pela DA (5 ng/pata). O mesmo não ocorreu com a

administração do inibidor da degradação de anandamida, MAFP (0,5 µg/pata), e com o inibidor de seu transportador, VDM11 (2,5 µg/pata), sugerindo a participação do endocanabinoide 2-AG, mas não de anandamina. Para avaliar a participação dos receptores canabinoides, os animais foram tratados com antagonistas CB₁ (AM251 – 20, 40 e 80 µg/pata) e CB₂ (AM630 – 100 µg/pata), e os dados obtidos sugerem, com a reversão da antinocicepção mediada pela DA, a participação dos dois receptores neste evento. O envolvimento do óxido nítrico (NO) foi confirmado pela reversão da antinocicepção mediada pela DA quando utilizados os inibidores L-NOarg (12, 18 e 24 µg/pata) e L-NPA (12, 18 e 24 µg/pata). Já os inibidores L-NIO (24 µg/pata) e L-NIL (24 µg/pata) não promoveram alteração no limiar nociceptivo. Em conformidade, a antinocicepção mediada pela DA parece depender da ação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e dos níveis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), dados obtidos pela administração do inibidor da enzima GCs, ODQ (25, 50 e 100 µg/pata), e do inibidor da enzima que degrada GMPc, Zaprinast (50 µg/pata). Adicionalmente, a antinocicepção desencadeada pela DA parece estar relacionada a abertura dos canais para potássio dependentes de voltagem e dos canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância, mas não pelos canais para potássio sensíveis ao ATP e canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância, dados obtidos através da utilização dos inibidores seletivos para estes canais: Tetraetilamônio – 30 µg/pata, Dequalínio – 50 µg/pata, Glibenclamida – 80 µg/pata e Paxilina – 20 µg/pata, respectivamente. **CONCLUSÃO:** Nossos dados sugerem que a antinocicepção periférica mediada pela DA é resultante da ativação concomitante dos receptores dopaminérgicos da família D₂, dos receptores δ e κ-opioides, dos receptores canabinoides CB₁ e CB₂ e da isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase, com a possível liberação de peptídeos opioides e do endocanabinoide 2AG. Além disso, nossos resultados indicaram o envolvimento da enzima GSc, do segundo mensageiro GMPc e a participação dos canais para potássio dependentes de voltagem e canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância neste processo.

PALAVRAS-CHAVE: dopamina, antinocicepção periférica, receptores dopaminérgicos, opioides, canabinoides, óxido nítrico.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Dopamine (DA) is an abundant neurotransmitter in the Central Nervous System, exercising cognitive and motor functions, in addition to being identified as an important agent in the descending inhibitory pathway of pain, promoting analgesic effects, whose peripheral mechanisms are not yet well understood. **OBJECTIVE:** The present study aimed to evaluate the DA antinociceptive action, at the peripheral level, and to investigate the participation of the opioid, cannabinoid, nitrergic systems and potassium channels in this process. **METHODS:** For this, the paw removal test subjected to compression in mice (Swiss, male, 30-40 g / CEUA Protocol: 196/2018) was used, which showed increased pain sensitivity by PGE₂ administration. The study was conducted using pharmacological tools. All drugs were administered intraplantarly, subcutaneously, in a volume of 20 µl (n=5). **RESULTS:** The administration of DA (5, 20, 80 ng/paw) promoted an antinociceptive effect, in a dose-dependent manner, in animals pretreated with PGE₂ (2 µg/paw). This effect was reversed by D2 family antagonists [D2 - Remoxipride (4 µg/paw), D3 - U 99194 (16 µg/paw) and D4 - L-745,870 (16 µg/paw)], but not by antagonists of receptors of the D1 family [D1 - SKF 83566 (2 µg/paw) and D5 - SCH 23390 (1.6 µg/paw)]. However, when administering these same D1 receptor antagonists with a dose of DA (10 µg / paw) that causes hyperalgesia in animals, it was observed that these antagonists were able to reverse the hyperalgesic effect. To evaluate the participation of the opioidergic system, opioid receptor antagonists Naloxone (12.5, 25 and 50 µg/paw), CTOP (20 µg/paw), Naltrindole (15, 30 and 60 µg/paw) and Nor BNI (50, 100 and 200 µg/paw). All of them promoted the reversion of DA-mediated antinociception, except CTOP (µ-opioid receptor antagonist). To investigate the participation of endogenous opioid peptides in the analyzed process, the inhibitor of their degradation, Bestatin (400 µg/paw), was used, which was able to potentiate the antinociceptive effect promoted by a lower dose of DA (5 ng/paw). Similarly, when evaluating the participation of the endocannabinoid system, the use of the endocannabinoid degradation inhibitor 2-AG, JZL184 (4 µg/paw), promoted potentiation of DA-mediated antinociception (5 ng/paw). The same did not happen with the administration of the anandamide degradation inhibitor, MAFP (0.5 µg/paw), and with the transporter inhibitor, VDM11 (2.5 µg/paw), suggesting the participation of the endocannabinoid 2-AG, but not anandamide. To assess the participation of

cannabinoid receptors, the animals were treated with CB₁ (AM251 - 20, 40 and 80 µg/paw) and CB₂ (AM630 - 100 µg/paw) antagonists, and the data obtained suggest, with mediated antinociception reversal by DA, the participation of the two recipients in this event. The involvement of nitric oxide (NO) was confirmed by the reversion of antinociception mediated by DA when the L-NOarg (12, 18 and 24 µg/paw) and L-NPA (12, 18 and 24 µg/paw) inhibitors were used. The inhibitors L-NIO (24 µg/paw) and L-NIL (24 µg/paw) did not promote changes in the nociceptive threshold. Accordingly, DA-mediated antinociception appears to depend on the action of soluble guanylate cyclase (sGC) and levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP), data obtained by administering the enzyme inhibitor sGC, ODQ (25, 50 and 100 µg/paw), and the enzyme inhibitor that degrades cGMP, Zaprinast (50 µg/paw). Additionally, the antinociception triggered by DA appears to be related to the opening of voltage-gated potassium channels and low-conductance calcium-activated potassium channels, but not by ATP-sensitive potassium channels and high-conductivity calcium-activated potassium channels, data obtained through the use of selective inhibitors for these channels: Tetraethylammonium - 30 µg/paw, Dequalinium - 50 µg/paw, Glibenclamide - 80 µg/paw and Paxilina - 20 µg/paw, respectively. **CONCLUSION:** Our data suggest that DA-mediated peripheral antinociception is the result of the concomitant activation of D2 family dopaminergic receptors, δ and κ-opioid receptors, CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors and the neuronal isoform of the nitric oxide synthase enzyme, with possible release opioid peptides and 2-AG endocannabinoid. Furthermore, our results indicated the involvement of the sGC enzyme, the second messenger cGMP and the participation of voltage-gated potassium channels and low conductance activated calcium channels in this process.

KEYWORDS: dopamine, dopaminergic receptors, peripheral antinociception, opioids, cannabinoids, nitric oxide.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre o estudo da dor

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), em 1979, definiu a dor como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (IASP, 1979). Interpretada como um fenômeno complexo, que envolve diversos mecanismos, alterações e sensações somáticas, associados a componentes psicológicos e comportamentais, a dor constitui um sinal de alerta, cuja função é ajudar a proteger o organismo. Este alerta desencadeia uma série de reações de adaptação, de ordem psicológica, autonômica e motora, visando afastar o organismo da causa da agressão (Millan, 1999), desenvolvendo reações que tem por objetivo evitar ou reduzir os estímulos que a estejam causando, e como consequência limitar possíveis danos (Woolf & Salter, 2000; Le Bars et al., 2001; Almeida et al., 2004).

Embora a dor como componente protetor seja essencial na autopreservação dos organismos vivos, a dor persistente pode causar danos, extrapolando sua função como resposta adaptativa. Estados dolorosos prolongados tornam-se patologias e comprometem a qualidade de vida do indivíduo (Hecke et al., 2013; Anastas et al., 2018). A dor tem uma conotação individual, sofre a influência de experiências anteriores (Merskey & Bogduk, 1994), e compreende dentre seus aspectos um forte componente psicoafetivo, fazendo com que a experiência de cada indivíduo seja essencialmente individual (De Felice & Ossipov, 2016).

Apesar de os animais apresentarem limitada capacidade de comunicação verbal, quando são submetidos a um estímulo doloroso, exibem respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em seres humanos. O termo “dor” engloba os componentes fisiológicos, sociais e psicológicos, enquanto que o termo “nocicepção” compreende respostas comportamentais e neurofisiológicas da dor dissociado do caráter cognitivo-afetivo. A nocicepção consiste no processo neural de codificação e processamento do estímulo pelos nociceptores que transmitem as informações ao sistema nervoso central (SNC) (Julius & Basbaum, 2001). Portanto, para se referir a animais de experimentação, a terminologia mais adequada seria “nocicepção” e “antinocicepção”.

1.2 Fisiopatologia da dor

O primeiro evento que origina o processo sensitivo-doloroso é a percepção do estímulo nódico que é captado por fibras especializadas, os chamados nociceptores, amplamente encontrados na pele, mucosa, membranas, tecido conjuntivo de órgãos viscerais, ligamentos e cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões e vasos arteriais (Almeida et al., 2004). Esses receptores são terminações nervosas livres presentes em neurônios aferentes de primeira ordem, que apresentam um limiar de ativação relativamente alto, sendo ativadas apenas por estímulos intensos, sugerindo que possuem propriedades biofísicas e moleculares que lhes permitem detectar seletivamente e responder a estímulos potencialmente prejudiciais aos tecidos, estímulos estes que podem ser de natureza mecânica, química ou térmica (Cesare & Mcnaughton, 1997; Basbaum et al., 2009). Os corpos celulares dos nociceptores estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRD) e nos gânglios trigeminiais e possuem um ramo axonal periférico e central que inerva o órgão-alvo e a medula espinhal, respectivamente (Basbaum et al., 2009).

Estímulos nocivos promovem uma série de alterações eletrofisiológicas, gerando um potencial receptor e um potencial de ação, processo denominado transdução (Figura 1). O potencial de ação gerado é transmitido ao longo do comprimento do axônio até o corno dorsal da medula espinhal. As propriedades biofísicas dos canais iônicos determinam a excitabilidade dos nociceptores, uma vez que a abertura de canais para Na^+ dependentes de voltagem resulta na despolarização e no potencial de ação (Raouf et al., 2010). A sensibilização dos nociceptores decorre de vários mecanismos, dentre eles a redução do limiar de geração dos potenciais de ação por algumas substâncias algio gênicas, incluindo a bradicina, serotonina, prostaglandinas e histamina (Woolf, 1994; Millan, 1999).

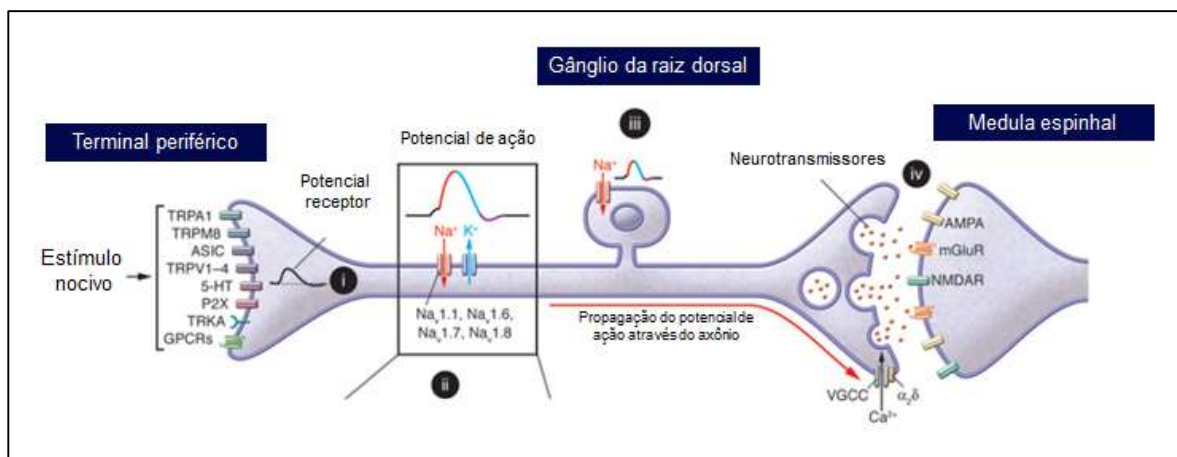


Figura 1. Transdução nociceptiva ao longo do nociceptor: Os terminais periféricos respondem a estímulos nocivos através de receptores e canais iônicos, incluindo canais TRP, canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC), receptores de serotonina (5-HT), receptores P2X bloqueados por ATP, receptor A de tirosina quinase (TRKA) e receptores acoplados à proteína G (GPCRs). (i) A percepção do estímulo nocivo promove uma série de alterações eletrofisiológicas gerando um potencial receptor. (ii) Canais para sódio (Na^+) dependentes de voltagem são ativados gerando um potencial de ação (iii) que se propaga ao longo do axônio até os terminais pré-sinápticos, onde os neurônios de primeira ordem fazem sinapse com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal. (iv) O influxo de cálcio (Ca^{2+}) através dos canais para cálcio dependentes de voltagem (VGCC) desencadeia a liberação de neurotransmissores, como por exemplo o glutamato, que ativa receptores ionotrópicos AMPA, NMDA (NMDAR) e receptores metabotrópicos (mGluR) nos terminais pós-sinápticos da medula espinhal. AMPA, alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico. NMDA, N-metil-D-aspartato. mGluR, receptor metabotrópico de glutamato (modificado de Raouf et al., 2010).

Os estímulos elétricos gerados são conduzidos à medula por diferentes tipos de fibras periféricas, podendo ser classificadas em mielínicas ou amielínicas, e apresentam velocidade de condução variada, dependente de seu diâmetro. As fibras mielinizadas conduzem a informação de forma rápida, quanto maior o seu diâmetro, maior será a velocidade de condução. São classificadas como fibras do tipo A e subdivididas em $A\alpha$, $A\beta$, $A\gamma$ e $A\delta$. As fibras de condução lenta ou amielinizadas são representadas pelas fibras do tipo C, também chamadas de nociceptores polimodais (Tabela 1).

Características das Fibras Aferentes Primárias

Tipo de fibra	A δ (fina, mielinizada)	C (sem mielina)
Diâmetro da fibra	2-5 μ m	<2 μ m
Velocidade de condução	5-15 m s ⁻¹	0,5-2 m s ⁻¹
Distribuição	Superfície corporal, músculos, articulações	Maioria dos tecidos
Sensação dolorosa	Rápida, bem localizada	Lenta, difusa
Posição da sinapse no corno dorsal da medula espinhal	Lâmina I e V	Lâmina II (substância gelatinosa)

Tabela 1. Características das fibras aferentes primárias (modificado de Steeds, 2009).

As terminações nervosas livres das fibras A δ e C constituem a região sensorial dos principais nociceptores (Mense, 1983; Almeida et al., 2004; Dubin & Patapoutian, 2010). As fibras C são responsáveis pela propagação da dor lenta, difusa e que persiste mesmo após a remoção do estímulo. As fibras A δ são responsáveis pela condução da “primeira dor” que se caracteriza por ser rápida, aguda e pontual. As fibras A δ estão localizadas na pele e membranas mucosas e as fibras C estão amplamente distribuídas nos tecidos e na pele (Julius & Basbaum, 2001; Meyer et al., 2008). Em resumo, na transmissão ascendente da dor, uma vez detectado o estímulo, o impulso nervoso é projetado da periferia até o corno dorsal da medula espinhal (Figura 2), por meio de neurônios denominados de primeira ordem (Besson, 1999; Millan, 2002).

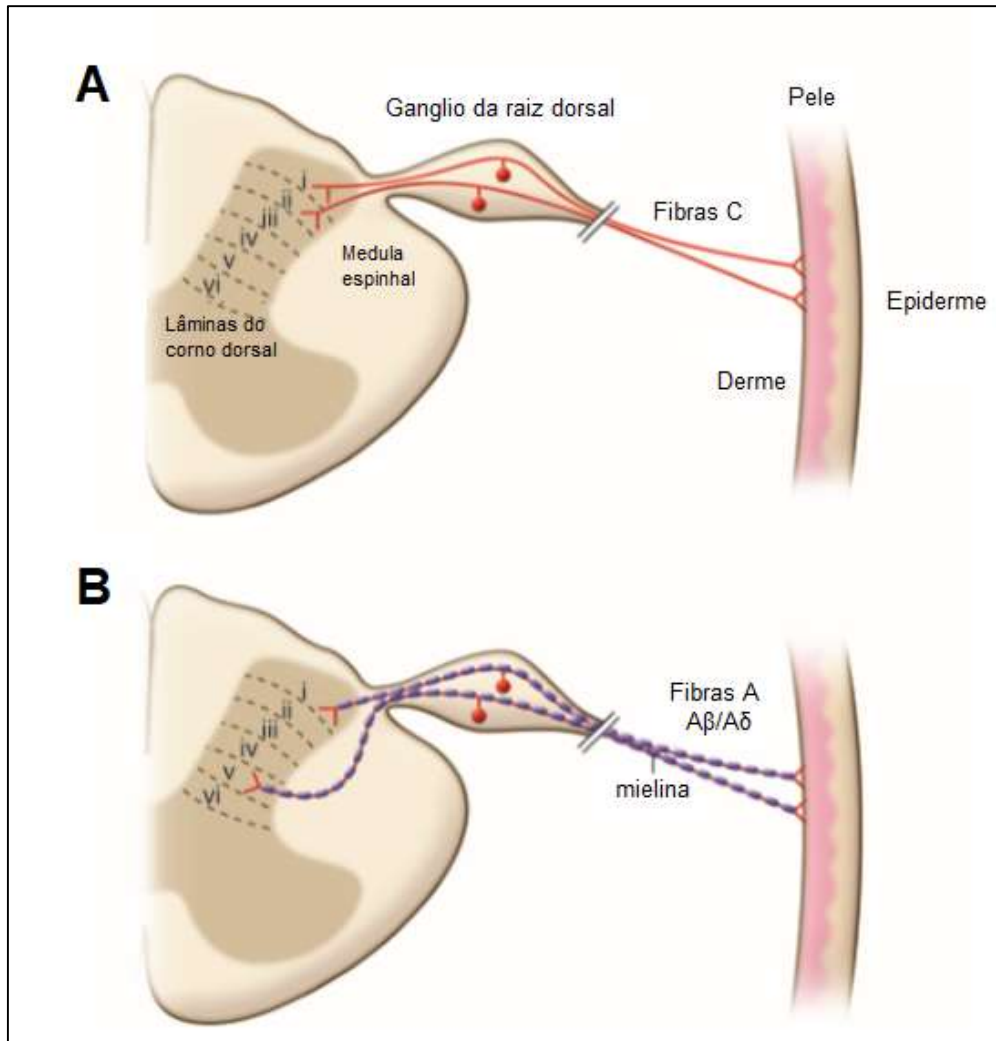


Figura 2. Anatomia dos nociceptores: Os neurônios somatossensoriais estão localizados nos gânglios periféricos, ao lado da medula. (A) Fibras C, não mielinizadas, de pequeno diâmetro (em vermelho), inervam a pele (derme e/ou epiderme) e se projetam para as lâminas superficiais I e II do corno dorsal. (B) Os nociceptores de fibras A são mielinizados e geralmente apresentam alta velocidade de condução (fibras A em vermelho, mielina em roxo). Nociceptores de fibras A projetam-se para as lâminas superficiais I e V (modificado de Dubin & Patapoutian, 2010).

A liberação de neurotransmissores pelos neurônios de primeira ordem irá ativar os chamados neurônios de segunda ordem, que cruzam a medula espinhal para ascender o trato espinotalâmico (Figura 3). Ao projetar suas fibras ao tálamo, fazem sinapse com neurônios de terceira ordem. No tálamo, neurônios de terceira ordem transmitem a informação ao córtex somatossensorial, onde a somatização do estímulo nocivo ocorre, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor (Russo & Brose, 1998). A transmissão da dor acima

descrita representa a via clássica, mas existem outras vias possíveis, envolvendo estruturas nervosas diferentes (Besson, 1999; Jabbur & Saadé, 1999).

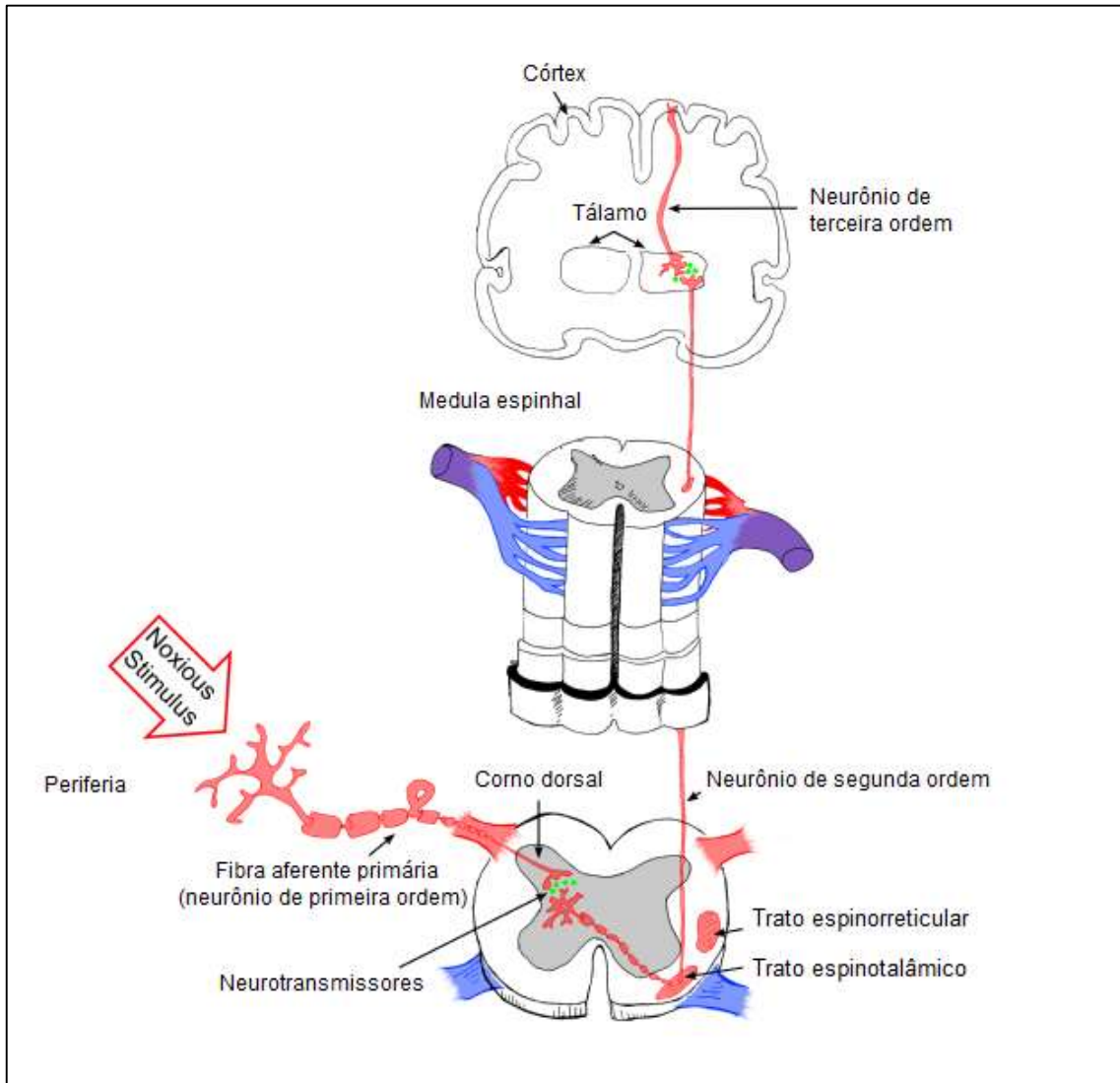


Figura 3. Representação esquemática da via ascendente da dor: Neurônios de 1ª ordem se projetam da periferia até o corno dorsal da medula espinhal, onde fazem sinapse com neurônios de 2ª ordem, os quais ascendem a medula contralateralmente, se projetando até o tálamo, onde ativam neurônios de 3ª ordem, os quais, por sua vez, se projetam até o córtex somatossensorial (modificado de Hasudungan, 2013).

1.3 Modulação da dor

Diversos são os mecanismos fisiológicos capazes de modular a sinalização dolorosa. Existem mecanismos de regulação ascendente e descendente da transmissão dos estímulos nociceptivos, determinando a intensidade da dor. A regulação ascendente age na transmissão periférica para o cérebro, já a descendente pode controlar a transmissão no sentido contrário (Basbaum et al., 2009).

A liberação de substâncias, principalmente como neurotransmissores, lipídeos, hormônios, gases, dentre outros, exerce importante papel na modulação da transmissão nociceptiva, aumentando ou reduzindo a percepção da dor. Entre tais substâncias destacam-se os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato, além de diversos outros neurotransmissores e neuropeptídeos, como as taquicininas [substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB)], peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (Calcitonin Gene-Related Peptide CGRP), óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PG), encefalinas e endorfinas (Woolf, 1994; Millan, 1999). Algumas destas moléculas sinalizadoras podem estar diretamente envolvidas com efeitos inibitórios e modulatórios da dor, ativando os sistemas analgésicos endógenos.

Melzack e Wall, em 1965, foram os primeiros a desenvolver a ideia de que informações nociceptivas que atingem o corno dorsal da medula espinhal não são automaticamente transferidas para os centros superiores. Pelo contrário, a terminologia conhecida como “portão da dor” sugere que fibras aferentes primárias e os neurônios de projeção têm a capacidade de modular a sinalização nociceptiva antes que esta seja enviada aos centros supra-espinhais. Tal modulação ocorre em razão das fibras táteis ($A\beta$), as quais, uma vez estimuladas, ativarem interneurônios inibitórios presentes na substância gelatinosa do corno dorsal da medula espinhal, os quais, por sua vez, inibem a transmissão nociceptiva. Por outro lado, a

estimulação das fibras nociceptivas A δ e C inibe os interneurônios inibitórios, facilitando a sua própria transmissão (Millan, 2002; Ossipov, 2012).

Assim como os peptídeos opioides endógenos, diferentes moléculas sinalizadoras já foram descritas como moduladores inibitórios da dor. Como exemplo, pode-se citar os endocanabinoides e o NO, que são capazes de modular ou até mesmo suprimir o processo nociceptivo. Nesse contexto, deve-se destacar a importância dos canais para potássio, uma vez que o aumento na condutividade desse íon resulta na hiperpolarização celular e na inibição da liberação do neurotransmissor, diminuindo a excitabilidade neuronal, e até mesmo impedindo a condução do impulso nervoso que seria responsável pela transmissão dolorosa (Ocaña et al., 2004).

Além dos mecanismos modulatórios descritos acima, podemos citar também as vias de sinalização monoaminérgicas, que inibem ou facilitam a transmissão dolorosa ao nível do corno dorsal da medula espinhal (Millan, 2002; Gebhart, 2004; Mason, 2005; Pertovaara, 2006; Benarroch, 2008) e apresentam papel importante nos mecanismos de dor inflamatória e neuropática (Zhuo & Gebhart, 1991; Holden et al., 1999; Ren & Dubner, 2002; Dias et al., 2015), sendo alvos para a busca do tratamento farmacológico dessas condições.

Monoaminas como a serotonina, noradrenalina e dopamina, a nível periférico, promovem diferentes efeitos dependendo dos subtipos de receptores ativados. A serotonina, quando administrada periféricamente, induz dor em humanos (Jensen et al., 1990) e ratos (Sufka et al., 1992; Taiwo & Levine, 1992). Porém, dependendo do receptor envolvido, esta amina pode ser responsável pela indução de antinocicepção periférica em modelos animais (Bingham et al., 2001; Granados-Soto et al., 2010; Diniz et al., 2015).

Mecanismos adrenérgicos periféricos também podem contribuir para a manutenção contínua da dor (Hong & Abbott, 1996), ou, pelo contrário, promover analgesia. A ativação do adrenoceptor β é responsável pela analgesia em pacientes com artrite reumatoide (Kaplan et al., 1980). Em modelos animais, a noradrenalina é

capaz de promover antinocicepção através da liberação de opioides (Binder et al., 2004) e pela ativação de receptores canabinoides (Romero et al., 2013).

Como objetivo do nosso trabalho, iremos avaliar uma destas monoaminas: a dopamina, e investigar por quais mecanismos ela induz efeitos antinociceptivos, a nível periférico. A seguir serão descritos os principais sistemas analgésicos endógenos responsáveis pela modulação e supressão dolorosa, que foram avaliados e investigados no decorrer do nosso estudo.

1.3.1 Sistema opioide

O ópio, extraído da papoula *Papaver somniferum*, tem sido utilizado desde tempos remotos, em diversas culturas, para fins medicinais ou recreativos. Desde 3400 a.C. a papoula parece ter sido cultivada na baixa Mesopotâmia. A extração do ópio é feita por pequenas escarificações em seus frutos ainda verdes, dos quais exuda (Macht, 1915; Baraka, 1982; Brownstein, 1993).

Friedrich Sertürner, em 1803, foi o primeiro a obter o principal composto ativo do ópio, o alcaloide *principium somniferum* ou morfina. Anos mais tarde, identificou-se que o sumo extraído da papoula apresentava uma variedade de componentes, onde cerca de 25% correspondem a alcaloides medicinais, em especial, a morfina (10%), além de outras substâncias como a tebaína, a codeína, a papaverina e a noscapina (Schiff Jr., 2002; Frick et al., 2005). Após a identificação e caracterização dos componentes do ópio, foi iniciada, na Alemanha, em 1827, a comercialização da morfina, estimulando o uso medicinal das substâncias derivadas do ópio e aumentando o interesse pela compreensão de seus mecanismos de ação (Martins et al., 2012). Em 1973, Snyder e colaboradores demonstraram, pela primeira vez, que os opioides são reconhecidos por receptores específicos (Pert & Snyder, 1973). Em conformidade, estudos farmacológicos indicam que existem três tipos principais de receptores opioides, chamados de μ , κ e δ , que medeiam os principais efeitos do grupo (Martin, 1983).

Os receptores opioides pertencem à classe de receptores acoplados à proteína G (subfamília $G_{i/o}$), que após ativados têm a capacidade de inibir a enzima adenilato ciclase e por consequência, reduzir o conteúdo intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (Dhawan et al., 1996). Dessa forma, não ocorre a ativação (dependente de AMPc) da proteína cinase A (PKA), enzima responsável por fosforilar e ativar canais iônicos que modulam a excitabilidade neuronal. Através desse mecanismo, os opioides promovem a abertura dos canais para potássio e inibem a abertura dos canais para cálcio regulados por voltagem. Esses efeitos reduzem tanto a excitabilidade neuronal (aumentando a condutância do potássio e provocando hiperpolarização da membrana) quanto à liberação de neurotransmissores (devido à inibição da entrada de cálcio) (North, 1986). Dessa forma, a ativação de receptores opioides é capaz de reduzir ou suprimir a sensação dolorosa. De fato, os receptores opioides estão expressos em neurônios envolvidos na transmissão da dor (trajetória ascendente sensorial), tanto no nível central quanto na periferia, presentes nas fibras C dos nervos aferentes primários sensitivos (Stein et al., 1993; Mansour et al., 1994).

Após a descoberta e caracterização dos receptores opioides, as pesquisas seguiram em direção à busca por moléculas endógenas capazes de se ligarem e ativarem estes receptores. Dois peptídeos que competem com drogas semelhantes à morfina por ligação à receptores no encéfalo, e que possuem ações farmacológicas semelhantes às da própria morfina, foram isolados em 1975 por Kosterlitz e Hughes. Este estudo esclareceu o mecanismo de ação da morfina, demonstrando sua capacidade de mimetizar as ações de uma família de mediadores endógenos, denominados então, peptídeos opioides endógenos. Os primeiros peptídeos a serem descobertos foram as encefalinas e as β -endorfinas (Hughes et al., 1975). Anos mais tarde foi identificada a dinorfina, um peptídeo cerca de 200 vezes mais potente que a morfina (Goldstein et al., 1979) e as endorfinas (Zadina et al., 1997).

Estes peptídeos, produzidos e liberados por neurônios também podem ser encontrados no interior de células imunes, sendo secretados durante a ocorrência de um processo inflamatório (Stein et al., 1990; Garcia et al., 2012). Eles estão

amplamente distribuídos no cérebro e nos tecidos periféricos (Trigo et al., 2010). Os diferentes peptídeos opioides mostram alguma preferência por diferentes receptores: β -endorfina por μ , encefalinas por δ e dinorfinas por κ (Dhawan et al., 1996). Já as endomorfina 1 e 2, possuem alta especificidade para o receptor opioide μ (Fichna, et al., 2007; Stein et al., 2009). As funções dos peptídeos endógenos se relacionam com o subtipo de receptor ativado e sua localização. Os receptores μ apresentam funções sensoriais, como a inibição das respostas aos estímulos dolorosos, além de interferir na atividade respiratória e no trânsito intestinal. Os receptores κ , além das funções de antinocicepção, são importantes agentes no processo de termorregulação, controle de diurese e secreção neuroendócrina. Já os receptores do tipo δ são responsáveis primariamente pela analgesia, mas também por modular funções cognitivas (Dhawan et al., 1996; Bodnar & Klein, 2006).

1.3.2 Sistema endocanabinoide

A *Cannabis sativa* é amplamente conhecida devido, principalmente, a seu uso recreativo e efeitos psicotrópicos. De fato, a maconha ainda é uma das drogas ilícitas de abuso mais difundidas no mundo (Adams & Martin, 1996). Além de seus efeitos psicoativos, a *Cannabis*, em 2600 a.C. já vinha sendo utilizada para o alívio das cólicas e dores reumáticas e menstruais. Seu mecanismo de ação só começou a ser melhor compreendido após a identificação de um de seus componentes, o Δ^9 -tetraidrocannabinol (Δ^9 -THC), principal princípio psicoativo desta erva, responsável pelos efeitos típicos como amnésia, sedação e sentimento de bem-estar descrito como “felicidade” (Gaoni & Mechoulam, 1964; Mechoulam, 1970). Atualmente, sabe-se que a cannabis possui mais de 60 substâncias, como o canabidiol, canabinol, canabigerol, canabicitol e canabicromeno (Mechoulam, 1970; Paton, 1975; Zuardi 2006).

O sistema endocanabinoide é composto por um aparato bioquímico capaz de sintetizar canabinoides endógenos, dentre os mais conhecidos a anandamida - AEA e o 2-araquidonilglicerol - 2-AG (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995). São responsáveis por alteração de diversos processos que incluem apetite, cognição, emoção, processamento sensorial e nocicepção (Pacher et al., 2006; De

Petrocellis & Di Marzo, 2009). Os endocanabinoides são sintetizados a partir do precursor membranar, o ácido araquidônico. Diferentemente de outros neurotransmissores, são produzidos apenas sob estímulo e não se encontram armazenados em vesículas (Wilson & Nicoll, 2001). Uma vez sintetizados, estas moléculas são rapidamente degradadas por enzimas específicas. A AEA é degradada por uma hidrolase chamada “fatty acid amide hydrolase” (FAAH), enquanto o 2-AG é degradado pela FAAH ou por uma lipase de gliceróis (“monoacylglycerol lipase”; MAGL). Possivelmente, a FAAH está localizada nos neurônios pós-sinápticos, enquanto a MAGL é expressa nos pré-sinápticos (Dinh et al., 2002; McKinney & Cravatt, 2005).

Anos mais tarde, estudos levaram à descoberta dos receptores canabinoides. Nomeados pela cronologia de descoberta, os receptores CB₁ e CB₂ são, ambos, acoplados à proteína G, e sua ativação promove a inibição da atividade da enzima adenilato ciclase solúvel (ACs), reduzindo a formação do segundo mensageiro AMPc (Devane et al., 1988; Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993). O receptor CB₁ é expresso, principalmente, a nível do sistema nervoso central e medeia os efeitos psicotrópicos dos canabinoides (Herkenham et al., 1991; Tsou et al., 1998). No cérebro, são encontrados no córtex cerebral, hipocampo (com maiores concentrações no giro dentado), amígdala, gânglios da base, segmento interno e externo do globus pallidus, cerebelo, dentre outros (Herkenham, 1995; Pertwee, 1997; Howlett et al., 2004). Em menor extensão pode ser encontrado também em tecidos periféricos, incluindo células do sistema imunológico, tecidos reprodutivos, tecidos gastrointestinais, coração, pulmão, glândulas adrenais e terminais nervosos pré-sinápticos (Galiègue et al., 1995; Pertwee, 1997; Cota et al., 2003; Osei-Hyiaman et al., 2005). De forma mais significativa para os propósitos do presente trabalho, eles são encontrados aos níveis central e periférico das vias da dor (Hohmann & Herkenham, 1999; Farquhar-Smith et al., 2000; Agarwal et al., 2007; Lever & Rice, 2007). A ativação dos receptores CB₁ pré-sinápticos em diferentes regiões do cérebro ou nas fibras aferentes primárias inibe a liberação de neurotransmissores, diminuindo a condutância para Ca²⁺ e aumentando a condutância para K⁺ (Pertwee & Ross, 2002; Romero et al., 2013).

Os receptores CB₂, localizados principalmente em órgãos e tecidos periféricos, podem ser encontrados em células do sistema imune, neurônios, baço, amígdalas e timo, tecidos responsáveis pela produção e regulação de células imunes (Munro et al., 1993; Galiègue et al., 1995; Howlett et al., 2004). Essas células imunes incluem mastócitos, células B, células T4 e T8, células microgлияis, macrófagos, e, em menor grau, monócitos e neutrófilos polimorfonucleares (Galiègue et al., 1995; Howlett et al., 2004; Pertwee, 2006). No SNC podem ser encontrados no cérebro, nos gânglios da raiz dorsal, na medula espinhal lombar, nos neurônios sensoriais e na micrógлия (Van Sickle et al., 2005; Jhaveri et al., 2007).

O potencial terapêutico dos canabinoides tem sido objeto de diversas pesquisas, uma vez que estão envolvidos em diferentes funções fisiológicas e patológicas como a regulação da ingestão de alimentos, imunomodulação, inflamação, analgesia, epilepsia, dentre outras (Pertwee, 2001; Di Marzo & De Petrocellis, 2006; Pacher et al., 2006; Guindon & Hohmann, 2009). As ações antinociceptivas periféricas dos canabinoides foram demonstradas em vários modelos de dor em animais (Silva et al., 2012; Romero et al., 2013; Ferreira et al., 2018; Oliveira et al., 2019). Esses estudos sugerem que a manipulação farmacológica dos endocanabinoides periféricos pode ser uma estratégia promissora para o tratamento da dor.

1.3.3 Sistema nitrérgico

O óxido nítrico (NO) constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (Morris & Billiar, 1994). Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais e carcinógenos potenciais (James, 1995). O interesse por suas ações biológicas se deu a partir da descoberta de que o NO estaria presente em diversos processos fisiológicos como relaxamento vascular (Moncada et al., 1988; Gewaltig & Kojda, 2002), regulação do sistema imune (Hibbs et al., 1988; Marletta et al., 1988; Kubes et al., 1991), além de sua função como neurotransmissor (Deguchi, 1974; Ferrendelli et al., 1974).

O NO é derivado da oxidação do aminoácido L-arginina (Hibbs et al., 1987; Palmer et al., 1998), pela ação de uma família de enzimas, chamadas de óxido nítrico sintase (NOS). Estas enzimas são subdivididas em duas categorias, a NOS constitutiva (NOS-c), dependente de íons cálcio (Ca^{2+}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (NOS-i), sintetizada por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (Moncada, 1991; Marletta, 1993; 1994; Förstermann & Sessa, 2011). A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (NOS-n, tipo I), presente normalmente nos neurônios (Bredt & Snyder, 1989; Knowles et al., 1989), e a NOS endotelial (NOS-e, tipo III), presente, principalmente, em células endoteliais vasculares e plaquetas (Radomski et al., 1990).

Dentre suas clássicas funções citadas acima, o NO apresenta um importante papel na modulação dolorosa. Dependendo de sua localização e concentração nos tecidos, pode apresentar função dual, sendo capaz de induzir tanto respostas nociceptivas (Miyamoto et al., 2009) como antinociceptivas (Kawabata et al., 1992), desempenhando um papel importante nos estados de dor aguda (Toriyabe et al., 2004) e crônica (Chen et al., 2010), a nível central (Duarte & Ferreira, 1992; Freire et al., 2010) e periférico (Duarte et al., 1990; Romero et al., 2011; 2012).

Já foi demonstrado que a ação analgésica do NO está relacionada a via de sinalização intracelular envolvendo o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Duarte et al., 1990). Sua capacidade de ativar a enzima GCs, responsável por catalisar a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em GMPc, resulta em níveis aumentados deste mensageiro. Este processo favorece a ativação da proteína cinase G (PKG), que por conseguinte, estimula a abertura de canais para potássio. O efluxo de potássio gerado por essa cascata de sinalização dificulta o processo de despolarização celular, e por consequência, diminui a excitabilidade neuronal, suprimindo a transmissão da informação nociceptiva (Moncada et al., 1988; Esplugues, 2002).

1.3.4 Canais para potássio

Até o momento já foram descritas quatro diferentes famílias de canais para potássio com diferentes estruturas e características funcionais. A União Internacional de Farmacologia (IUPHAR) propôs uma nomenclatura padronizada, baseada na estrutura e fisiologia das proteínas que constituem os canais (Gutman et al., 2005):

- i) Canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v ou K_v1-12), ativados em resposta à despolarização da membrana;
- ii) Canais para K^+ ativados por Ca^{2+} (KCa ou $KCa1-3$). Esses canais são sensíveis à voltagem, que é modulada pela concentração de Ca^{2+} intracelular, sendo então subdivididos em canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de alta ($BKCa$, do Inglês big conductance), intermediária ($IKCa$ do Inglês intermediate conductance) e baixa condutância ($SKCa$ do Inglês, small conductance) (Vergara et al., 1998);
- iii) Canais para K^+ retificadores de influxo (K_{ir} ou $K_{ir} 1-6$), e que estão englobados os canais para K^+ sensíveis à adenosina trifosfato (K_{ATP}) (Nichols & Lopatin, 1997);
- iv) Canais para K^+ de dois poros ($K2P$ ou $K2P1-13$), que são importantes reguladores da excitabilidade celular e fisiologicamente, podem ser regulados por fatores independentes de voltagem, como por exemplo o pH e a temperatura (Kim, 2003; Gutman et al., 2005; Enyedi & Czirjak, 2010).

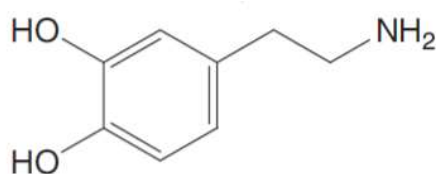
Os canais para K^+ permitem seletivamente, por difusão, um efluxo de K^+ , através da membrana plasmática. Eles desempenham um papel fundamental no controle da atividade neuronal e na propagação de sinais por todo o sistema nervoso, promovendo repolarização durante o potencial de ação e controle do disparo neuronal (Shieh et al., 2000; MacKinnon, 2003). Estudos já demonstraram que alguns agonistas de receptores acoplados à proteína G (como receptores opioides e α_2 -adrenérgicos) têm a capacidade de interagir com canais para potássio específicos (Aghajanian & Wang, 1986). Estes dados fundamentaram a hipótese de que o processo de abertura destes canais seria o mecanismo pelo qual estes agonistas são capazes de promover antinocicepção. A partir disto, os estudos foram

direcionados a identificar quais os tipos de canais para potássio poderiam estar envolvidos no processo de analgesia e quais os efeitos da utilização de bloqueadores específicos para estes canais (Ocaña & Baeyens, 1993; Galeotti et al., 1997; Clark e Tempel, 1998). Muitas pesquisas em modelos animais demonstram a participação de diferentes tipos de canais pra potássio na antinocicepção periférica (Duarte & Rodrigues, 2000; Duarte et al., 2000; Duarte & Soares, 2001; Duarte & Alves, 2002).

1.4 Dopamina

1.4.1 Aspectos gerais

A dopamina (DA) é um neurotransmissor abundante no Sistema Nervoso Central (SNC) e pertence à família das catecolaminas, juntamente com a noradrenalina e adrenalina. Como o próprio nome sugere, a estrutura básica destes neurotransmissores consiste na presença de um grupamento catecol (3,4-dihidroxibenzeno) conectado a um grupo amina por uma ponte etil, na dopamina o grupo R é a etilamina (Figura 4).



Dopamina

Figura 4. Estrutura química da dopamina: A dopamina apresenta um grupamento catecol com uma cadeia lateral de etilamina.

O precursor da DA é o aminoácido tirosina, em sua maior parte obtido da dieta, e em pequena quantidade, produzido no fígado a partir da fenilalanina. A primeira etapa da síntese de DA é a conversão de tirosina em L-DOPA, pela ação da enzima tirosina hidroxilase (Figura 5). Em seguida a L-DOPA é convertida em DA pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (Schmitz et al., 2003; Goldstein et al., 2003). Depois de sintetizada no citoplasma do neurônio, o transportador de monoaminas vesicular (VMAT) é responsável pelo transporte de DA para dentro da vesícula. Com a estimulação da célula nervosa, as vesículas de armazenamento de DA fundem-se com a membrana plasmática, de modo dependente de Ca²⁺, liberando DA na fenda sináptica (Standaert & Galanter, 2012). A DA na fenda pode ligar-se tanto a receptores de DA pós-sinápticos quanto a auto receptores do tipo D2 (pré-sinápticos), que reduzem a atividade neuronal por hiperpolarização da membrana (Schmitz et al., 2003; Sulzer & Galli, 2003).

A maior parte da DA liberada na fenda sináptica é transportada de volta à célula pré-sináptica por uma proteína, o transportador de dopamina (DAT) (Ross, 1991). Após retornar ao interior da célula, a DA pode ser reciclada em vesículas para uso subsequente na neurotransmissão (pelo VMAT) ou pode ser degradada pela ação das enzimas monoamina oxidase (MAO) (Garrick & Murphy, 1981).

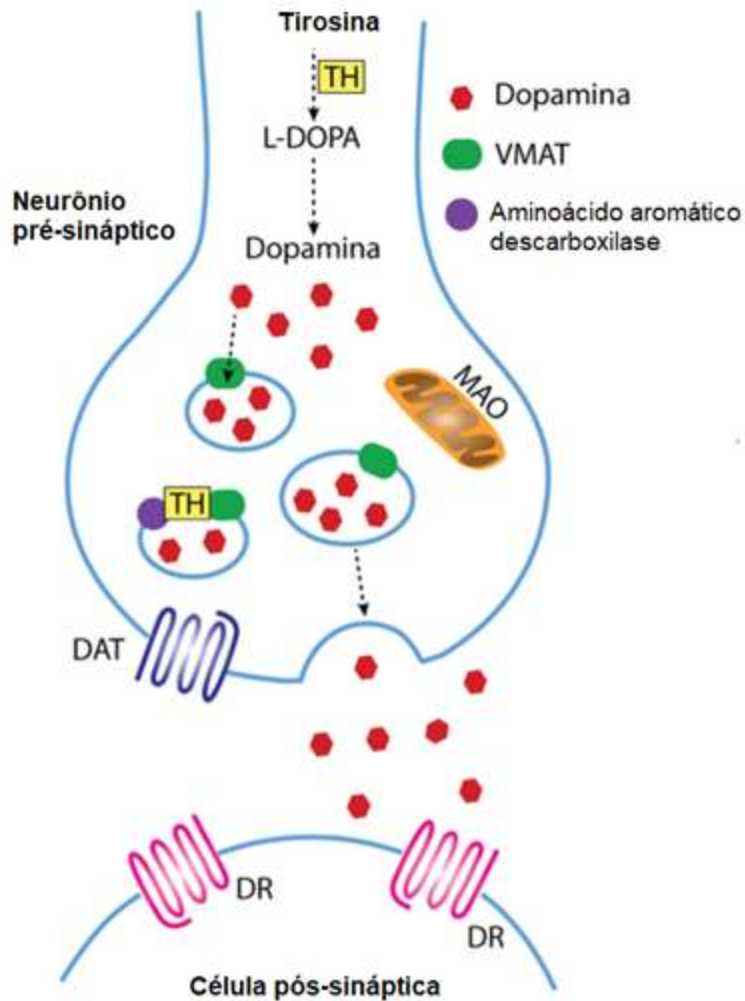


Figura 5. Neurotransmissão dopaminérgica: A DA é sintetizada no citoplasma e transportada em vesículas secretoras pela ação do transportador de monoaminas vesicular (VMAT). Com estimulação da célula nervosa, a DA é liberada na fenda sináptica, onde o neurotransmissor pode estimular receptores dopamínicos pós-sinápticos e auto-receptores dopamínicos pré-sinápticos. A DA é transportada para fora da fenda sináptica pelo transportador de dopamina (DAT). A DA citoplasmática é retransportada para dentro das vesículas secretoras pelo VMAT ou degradada pela enzima monoamina oxidase (MAO). TH= tirosina hidroxilase. DR= receptores de dopamina (modificado de Klein, 2018) .

A DA é amplamente conhecida por suas funções (Wise & Rompre, 1989; Stuchlik et al., 2007; Ott & Nieder, 2019), no SNC induz seus efeitos através de quatro vias principais. Na via nigroestriatal, ela está envolvida na geração de movimentos voluntários, modulando os sistemas de neurotransmissão implicados no controle motor (GABA, acetilcolina, glutamato, encefalina, SP e somatostatina). Na via mesolímbica, ela participa do controle das funções comportamentais, como a atenção, a emoção e o sistema de recompensa, estando implicada também na dependência a drogas ou ao álcool (Seeman, 1992; Hantraye, 1998). Os neurônios dopaminérgicos do sistema mesocortical originam-se na área tegmental ventral e projetam-se para regiões do córtex cerebral, particularmente o córtex pré-frontal. Como o córtex pré-frontal é responsável pela atenção, planejamento e comportamento motivado, foi formulada a hipótese de que esse sistema pode desempenhar um papel nos sintomas negativos da esquizofrenia (Björklund & Dunnett, 2007; Standaert & Galanter, 2012). O sistema túbero-hipofisário (ou túbero-infundibular) encontra-se envolvido no controle da secreção de hormônios hipofisários, especialmente na inibição da liberação de prolactina pelos lactótrofos da hipófise (Macleod & Lehmeyer, 1974). Neste contexto, perturbações no sistema dopaminérgico estão relacionadas a patologias como a Doença de Parkinson, Síndrome de Tourette, hiperprolactinemia e a transtornos do processo mental como a esquizofrenia.

Na periferia, a DA induz várias respostas (Thorner, 1975), a saber: suprime a liberação de aldosterona (Aguilera & Catt, 1984); estimula diretamente a excreção renal de sódio (McDonald et al., 1964); relaxa o esfíncter esofágico inferior (de Carle & Christensen, 1976); retarda o esvaziamento gástrico (Connell & George, 1969; Valenzuela, 1976); provoca dilatação da circulação arterial renal e mesentérica (Goldberg, 1972) e participa na regulação da hemodinâmica e transporte de eletrólitos, assim como na secreção de renina (Ricci et al., 2001).

1.4.2 Receptores dopaminérgicos

Sob o ponto de vista molecular e farmacológico, em 1979, Keibian e Calne propuseram dividir os receptores dopaminérgicos em duas classes distintas, de acordo com seu efeito sobre a formação de AMPc (Figura 6). São descritos 5 tipos de receptores, todos eles acoplados à proteína G e, portanto, com sete domínios transmembrana. Os receptores D₁ e D₅ pertencem à superfamília de receptores do tipo D1, e ligam-se à proteína G causando estimulação da enzima adenilato ciclase (AC), aumentando assim os níveis de AMPc intracelular. Os receptores D₂ (D_{2s} e D_{2l}), D₃ e D₄ pertencem à superfamília dos receptores do tipo D2, que se ligam à proteína G_i/G_o e ativam os canais para potássio, assim como inibem os canais para cálcio e a adenilato ciclase, reduzindo os níveis de AMPc intracelular (Cools & Van Rossum, 1976; Keibian & Calne, 1979; Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000; Estevinho & Fortunato, 2003). Assim, refletindo sobre a influência destes receptores em relação a excitabilidade celular, a ativação dos receptores D2 inibe, enquanto a ativação dos receptores D1 aumenta a atividade neuronal (Missale et al., 1998; Vallone et al., 2000).

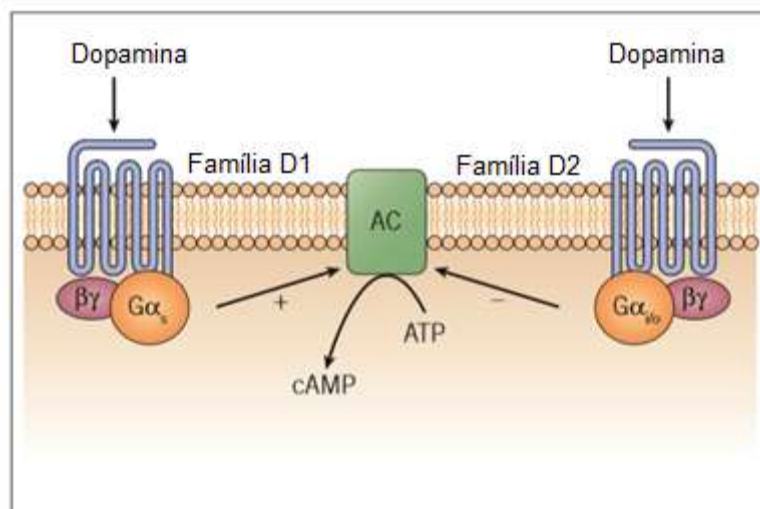


Figura 6. Representação esquemática da via de sinalização intracelular para os diferentes tipos de receptores dopaminérgicos: Os receptores de DA podem ser subdivididos em duas famílias. A família D1 (D₁ e D₅) interage com a enzima adenilato ciclase (AC) estimulando a produção de AMPc. De forma contrária, os receptores da família D2 (D₂, D₃ e D₄) promovem a inibição da produção deste segundo mensageiro (Strange & Neve, 1997).

No SNC os diferentes tipos de receptores dopaminérgicos estão amplamente distribuídos. Ambos os receptores D1 e D2 são expressos em altos níveis no estriado (núcleo caudado e putâmen), responsáveis por apresentar funções no controle motor dos núcleos basais, bem como no nucleus accumbens e tubérculo olfatório (Demchyshyn et al., 1995). Os receptores D2 também são expressos nos lactótrofos da adeno-hipófise, onde regulam a secreção de prolactina. Ocorre expressão de altos níveis dos receptores D3 no sistema límbico, incluindo o nucleus accumbens e o tubérculo olfatório (Sanger et al., 1996), enquanto os receptores D4 estão localizados no córtex frontal, diencéfalo e tronco encefálico (Kazmi et al., 2000). Os receptores D5 apresentam uma distribuição moderada, e ao contrário dos receptores D1 presentes em níveis elevados nos núcleos da base, os receptores D5 são bastante raros, sendo expressos, principalmente no hipocampo, córtex frontal e hipotálamo. Estes receptores apresentam 10 vezes mais afinidade para a dopamina quando comparados aos receptores D1 (Sunahara et al., 1991; Estevinho & Fortunato, 2003; Buttarelli et al., 2011; Standaert & Galanter, 2012).

Os receptores dopaminérgicos do tipo D1 e D2 foram também identificados na medula espinhal, corroborando a hipótese de estarem envolvidos no processo de nocicepção. A principal fonte de inervação dopaminérgica descendente do corno dorsal são os neurônios A11 do hipotálamo posterior periventricular (Holstege & Kuypers, 1982; Paulus & Trenkwalder, 2006). As fibras aferentes primárias e neurônios do corno dorsal expressam os receptores do tipo D1 e D2 (Levant & McCarson, 2001). Além disso, a existência de células produtoras de DA no gânglio da raiz dorsal (do inglês dorsal root ganglion - DRG) já foi confirmada (Price & Mudge, 1983; Weil-Fugazza et al., 1993; Bertrand & Weil-Fugazza, 1995).

Na periferia, os receptores dopaminérgicos apresentam localizações distintas, condizentes com o tipo de função que exercem. As primeiras evidências da existência de receptores dopaminérgicos no leito vascular foram observadas em cães anestesiados, nos quais foi registrada a contratilidade cardíaca, pressão arterial (PA), dentre outros. Os estudos demonstraram que receptores D1 pós-sinápticos apresentam efeito vasodilatador na artéria renal (Goldberg, 1972; Toda & Goldberg 1975; Dupont et al., 1987). Já os receptores D2 dos terminais nervosos

pós-ganglionares, promovem, indiretamente, um efeito vasodilatador da artéria femoral e redução da contratilidade cardíaca (Goldberg & Toda, 1975; Goldberg et al., 1978).

A DA não é apenas sintetizada em neurônios noradrenérgicos e dopaminérgicos, mas também em tecidos não neuronais como no rim e trato gastrointestinal. No rim, ela é sintetizada nas células do túbulo proximal pela recaptação de L-DOPA filtrada, que é rapidamente descarboxilada para DA (Soares-da-Silva et al., 1998). Ambas as famílias D1 e D2 são expressas nos sítios renais pós-sinápticos (Missale et al., 1998; Emilien et al., 1999; Carey, 2001). Além destes, já foi evidenciada a presença de receptores de DA no córtex e na medula adrenal (Norbiato et al., 1977; Carey et al., 1979; Missale et al., 1998) e também nos gânglios simpáticos (Alkhadi et al., 1984; Sabouni et al., 1986).

Além de exibir diversas funções em diferentes órgãos, estudos já demonstram a presença e distribuição dos receptores dopaminérgicos na pele. Os receptores de dopamina D1 são distribuídos particularmente na camada da derme da pele plantar humana. São numerosos nas camadas epidérmicas inferiores (com exclusão da camada corneana) e poucos no tecido subcutâneo. Pelo contrário, os receptores de dopamina D2 são proeminentes no tecido subcutâneo perto dos vasos (Denda et al., 2007; Tamaro et al., 2012;). Como os queratinócitos são conhecidos por apresentar vários receptores de neurotransmissores, estudos demonstram que os receptores do tipo D2 em queratinócitos podem estar relacionados à homeostase da barreira cutânea (Fuziwara et al., 2005).

1.4.3 Dopamina e nocicepção

Além das várias funções clássicas atribuídas ao sistema dopaminérgico, estudos demonstram que a DA endógena pode responder dinamicamente ao estresse da dor. Em 1983, Dennis e Melzack foram os primeiros a demonstrar os efeitos antinociceptivos do agonista dopaminérgico apomorfina, sugerindo um papel significativo para o sistema dopaminérgico na mediação da antinocicepção. Comprovadamente, níveis diminuídos de DA têm sido associados com sintomas dolorosos que ocorrem frequentemente na doença de Parkinson (Skogar & Lökk, 2016; Young Blood et al., 2016). Pesquisas adicionais mostraram que lesões em terminais dopaminérgicos ou neurônios dopaminérgicos mesocéfálicos levam a respostas nociceptivas pronunciadas (Saadé et al., 1997). Em modelo de dor neuropática, Cobacho e colaboradores demonstraram que mecanismos dopaminérgicos podem modular a nocicepção e percepção da dor crônica.

Assim como a serotonina e a noradrenalina, o papel da dopamina na nocicepção varia de acordo com sua concentração, com os subtipos de receptores ativados, bem como sua localização (Paulus & Trenkwalder, 2006; Benarroch, 2008). Em geral, a capacidade analgésica da dopamina ocorre como resultado da ativação de receptores D2. A estimulação dos neurônios A11 levou à redução de sensações dolorosas, um efeito antinociceptivo causado pela ativação de receptores D2 (Fleetwood-Walker et al., 1988). Experimentos em modelos animais utilizando o teste da placa quente e hiperalgesia induzida por formalina demonstraram a participação dos receptores D2 ao mostrar analgesia dose dependente provocada pela administração de agonistas seletivos para tais receptores (Lin et al., 1981; Morgan & Franklin, 1991; Altier & Stewart, 1999; Magnusson & Fisher, 2000). A explicação para a indução de antinocicepção via receptores D2 é sua ação inibitória direta em terminais de fibras aferentes primárias ou neurônios de projeção. Isso também seria consistente com a influência inibitória dos receptores D2 sobre a excitabilidade neuronal mediada via inibição da enzima adenilato ciclase e supressão e ativação de correntes de Ca^{2+} e K^+ , respectivamente (Missale et al., 2000; Vallone et al., 2000; Millan, 2002).

De forma contrária, os receptores da família D1 estão constantemente relacionados à atividade hiperalgésica. Estudos conduzidos por Kim e colaboradores demonstraram o papel dos neurônios dopaminérgicos descendentes na manutenção da plasticidade da dor patológica mediada por receptores D₁/D₅ (Kim et al., 2015). Dados da literatura sugerem a participação dessa família de receptores na dor ao demonstrar atividade hiperalgésica de agonistas dopaminérgicos como apomorfina e L-DOPA (Tulunay et al., 1975). Atualmente sabe-se que um aumento na concentração de dopamina pode ter como alvo preferencial os receptores D1 com suas características pró-nociceptivas. Estudos demonstram que na medula espinhal existem 60 vezes mais locais de ligação ao receptor de dopamina D₁ do que locais de ligação ao receptor D₃, e isso ainda é dez vezes mais que os locais de ligação ao receptor D₂ (Levant & McCarson, 2001; Paulus & Trenkwalder, 2006).

Além da influência do tipo de receptor envolvido, outro mecanismo atribuído à antinocicepção mediada pela DA corresponde a sua interação com sistemas analgésicos endógenos. Utilizando-se apomorfina, um agonista dopaminérgico, juntamente com RU 24926, agonista seletivo de receptor D₂, inibidores de peptidases que degradam encefalinas e um antagonista seletivo do receptor opioide, foi possível sugerir que o mecanismo de ação dessas drogas, possivelmente, envolve um opioide endógeno que age em receptores do tipo μ (Michael-Titus et al., 1990; Suaudeau & Costentin, 1995).

Tobaldini et al., em 2017, demonstraram que o efeito analgésico induzido pela ativação de receptores μ -opioides na Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) depende, ao menos em parte, da ativação de receptores dopaminérgicos. Adicionalmente, a antinocicepção induzida pela ativação de receptores do tipo D2 na PAG demanda a ativação de receptores opioides e provavelmente atue em mecanismos supraespinhais.

Semelhante ao que ocorre com o sistema opioide, trabalhos conduzidos por Giuffrida et al. (1999) demonstraram que a liberação de anandamida foi aumentada oito vezes no estriado dorsal de ratos em relação ao nível normal, após administração local de quinpirol, um agonista do receptor de dopamina do tipo D2,

uma resposta que foi bloqueada pelo raclopride, antagonista de receptores D2. Além disso, os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA) expressam uma enzima responsável pela síntese de 2-AG (Melis et al., 2004). Estudos sugerem que a ativação retrógrada CB₁ por 2-AG leva à inibição da liberação de GABA e desinibição da transmissão dopaminérgica (Olesons et al., 2012).

Muitos estudos investigam a participação da dopamina na antinocicepção a nível central, mas poucos demonstram por quais mecanismos periféricos esta amina induz seus efeitos, sendo este então o principal objetivo do presente trabalho.

2. JUSTIFICATIVA

Atribui-se a Hipócrates (400 a.C.), considerado o pai da medicina, a famosa frase: “*Sedare dolorem opus divinum est*” (amenizar a dor é obra divina), que coloca o alívio da dor no patamar mais alto da importância médica. A dor é um fenômeno complexo, que envolve diversos mecanismos, alterações e sensações somáticas, associados a componentes psicológicos e comportamentais. E embora seja considerada um aviso do qual o organismo utiliza para sinalizar um processo de agressão, a sua continuidade pode promover efeitos deletérios, introduzindo então o conceito de dor patológica.

A dor afeta milhões de indivíduos e torna-se o foco primário de atenção em adultos e idosos por comprometer grande parte de suas atividades diárias, sendo responsável por altas taxas de comorbidades. Está entre as principais causas de absenteísmo ao trabalho, licenças médicas, aposentadoria por doença, indenizações trabalhistas e baixa produtividade (Leeuwen et al., 2006). É um problema de saúde pública, pela prevalência, alto custo e impacto negativo que pode causar na qualidade de vida dos pacientes e de suas famílias (Paiva et al., 2006; Salvetti & Pimenta, 2007). Além disso, estudos demonstram que pacientes com dor persistente apresentam maior chance de desenvolver outros tipos de patologia, como por exemplo a depressão (Baune et al., 2008).

Tendo em vista que o tratamento analgésico pode ser responsável por uma significativa melhora na qualidade de vida e no auxílio ao retorno rápido das funções fisiológicas normais, entender os mecanismos relacionados à fisiopatologia da dor é a via principal para o desenvolvimento de terapêuticas cada vez mais eficazes. Muitos estudos já foram realizados sobre o papel da dopamina central na dor e analgesia, mas poucos avaliam seus mecanismos na atividade antinociceptiva periférica. É importante levar em consideração que novos tratamentos tendo como alvo os receptores dopaminérgicos podem ser desenvolvidos a medida em que a participação da dopamina na modulação da dor seja melhor esclarecida. Nosso trabalho irá permitir um avanço no conhecimento sobre o assunto, bem como os mecanismos envolvidos, abrindo novas perspectivas para pesquisas futuras relacionadas ao controle da dor, especialmente nos tipos de dores que não respondem aos tratamentos convencionais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ação antinociceptiva do sistema dopaminérgico frente a nocicepção induzida pela prostaglandina E₂, a nível periférico, e analisar quais os mecanismos envolvidos neste processo.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar se a dopamina, administrada perifericamente, induz antinocicepção em modelo de hiperalgisia induzida pela administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂), no modelo de retirada da pata de camundongo submetida à compressão.
- Verificar quais os receptores dopaminérgicos envolvidos na ação antinociceptiva, e a seletividade de tais receptores.
- Investigar se há a participação da via opioidérgica no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pela dopamina.
- Investigar se há a participação da via canabinoidérgica no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pela dopamina.
- Investigar se há a participação da via nitrérgica no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pela dopamina.
- Investigar se há a participação dos canais para potássio no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pela dopamina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, machos, pesando entre 30 e 40 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO-ICB/UFMG). Os animais foram alojados em caixas plásticas de dimensões 40x33x18 centímetros com cama de forragem, mantidos em temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro e escuro de 12 horas (6h - 18h), com livre acesso à água e à ração. O projeto contendo a metodologia prevista para o desenvolvimento deste trabalho foi aprovado em 09/07/2018 pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA/UFMG), sob protocolo de número 196/2018 (Anexo I).

4.1.1 Planejamento estatístico do n amostral

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

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

n = número amostral

σ = desvio padrão

Z_β = poder de teste de 80%

Z_α = nível de significância alfa = 0,05

E = erro absoluto

Assume-se para o teste de hipóteses:

$$H_0: \mu_0 = \mu_1$$

$$H_1: \mu_0 < \mu_1$$

Logo, a distribuição é unicaudal à direita. Assumindo um poder de teste de 80% ($Z_\beta = 0,84$) e nível de significância alfa = 0,05 ($Z_\alpha = 1,64$), derivou-se os tamanhos amostrais para os grupos, considerando grupos de mesmo tamanho, porém amostras não pareadas (razão = 1). A margem de erro E foi assumida como sendo 20 g, um consenso entre experimentadores experientes que realizam a técnica rotineiramente. A partir de estudos pilotos prévios, o desvio padrão das médias foi calculado como sendo igual a 12,688 g.

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

n = 4,95 (arredondamento para n=5)

$\sigma = 12,688$

$Z_{\beta} = 0,84$

$Z_{\alpha} = 1,64$

$E = 20$

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

4.1.2 Eutanásia dos Animais

A eutanásia dos animais foi realizada com sobre dose de anestésico contendo solução de ketamina (300 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg), administrada por via intraperitoneal.

4.2 Drogas e solventes

4.2.1 Agente hiperalgésico

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

4.2.2 Substância teste

- Dopamina (Sigma) em solução salina.

4.2.3. Fármacos envolvidos na via dopaminérgica

- SKF 83566 hydrobromide (Tocris, EUA), antagonista dos receptores D₁, dissolvido em solução salina;
- Remoxipride hydrochloride (Tocris), antagonista de receptores D₂, dissolvido em solução salina;
- U 99194 maleate (Tocris), antagonista de receptores D₃, dissolvido em solução salina;
- L-745,870 trihydrochloride (Tocris), antagonista de receptores D₄, dissolvido em solução salina;
- SCH 23390 (Tocris), antagonista dos receptores D₁-D₅, dissolvido em salina.

4.2.4 Fármacos envolvidos na via opioidérgica

- Naloxona (Sigma), antagonista não seletivo de receptores opioides, dissolvida em salina;
- CTOP (Tocris), antagonista seletivo dos receptores μ opioides, dissolvido em salina;
- Naltrindole (Tocris), antagonista seletivo dos receptores δ opioides, dissolvido em salina;
- Nor-binaltorfimina (Tocris), antagonista seletivo dos receptores κ opioides, dissolvida em DMSO 10% em salina;
- Bestatina (Tocris), inibidor da enzima amino peptidase N, enzima que degrada peptídeos opioides endógenos, dissolvida em salina.

4.2.5 Fármacos envolvidos na via canabinoidérgica

- AM251 (Tocris), antagonista seletivo dos receptores CB₁ canabinoides, dissolvido em DMSO 10% em salina;
- AM630 (Tocris), antagonista seletivo dos receptores CB₂ canabinoides, dissolvido em DMSO 10% em salina;
- MAFP (Tocris), inibidor da enzima ácido graxo amida hidrolase, dissolvido em acetato de metila 1% em salina;
- VDM11 (Tocris), inibidor do transportador de anandamida, dissolvido em DMSO 1% em salina;
- JZL184 (Tocris), inibidor da enzima monoacilglicerol lipase (MAGL), dissolvido em DMSO 1% em salina.

4.2.6 Fármacos envolvidos na via L-arginina/NO/GMPc

- L-NOArg (RBI, EUA), inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase (NOS), dissolvido em salina;
- L-NPA (Sigma), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOS_n), dissolvido em salina;
- L-NIO (Sigma), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOS_e), dissolvido em salina;
- L-NIL (Sigma), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS_i), dissolvido em salina;
- ODQ (RBI), inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase, dissolvido em DMSO 10% em salina;
- ZAPRINAST (Sigma), inibidor seletivo da enzima fosfodiesterase específica do GMP cíclico, dissolvido em DMSO 10% em salina.

4.2.7 Fármacos envolvidos nos testes com canais para potássio

- Glibenclamida (Sigma), bloqueador seletivo dos canais para K⁺ sensíveis ao ATP (KATP), dissolvida em DMSO 10% em salina;
- Tetraetilamônio (Sigma), bloqueador seletivo dos canais para K⁺ dependentes de voltagem (K_v), dissolvido em salina;
- Cloreto de dequalínio (Santa Cruz, EUA), bloqueador seletivo dos canais para K⁺ ativados por Ca²⁺ de baixa condutância (KCa), dissolvido em salina;

- Paxilina (Sigma), bloqueador seletivo dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de alta condutância (KCa), dissolvida em salina.

4.3 Adiministração das drogas

As drogas foram administradas em volume de 20 μ L, por via subcutânea, na superfície plantar da pata posterior direita dos animais (Figura 7). Para o teste de exclusão do efeito sistêmico a PGE_2 foi administrada em ambas as patas posteriores, e as medidas foram realizadas nas duas patas.

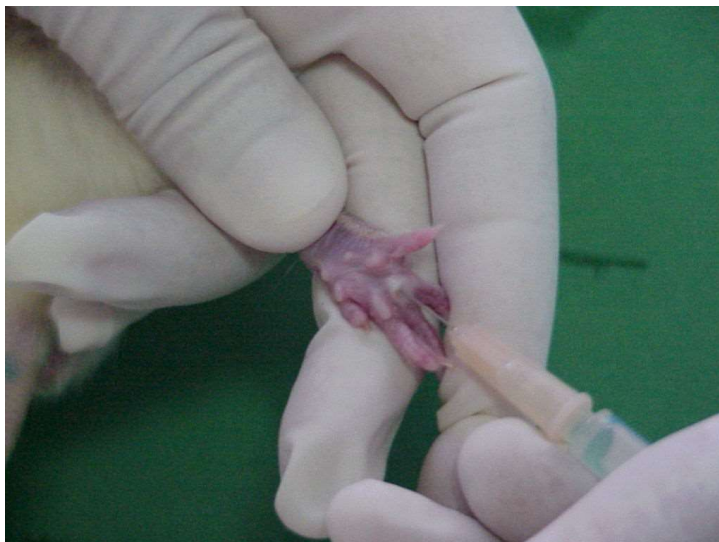


Figura 7. Administração intraplantar dos fármacos: Todos os fármacos utilizados foram administrados subcutaneamente, na superfície plantar da pata posterior dos camundongos, em solução cujo volume era de 20 μ L.

4.4 Teste algésimétrico para mensuração do limiar nociceptivo

O método experimental utilizado para mensuração do limiar nociceptivo foi o teste de retirada de pata submetido à compressão (Figura 8). Este método foi originalmente descrito por Randall e Selitto, em 1957, para ratos. Posteriormente, em 1992, foi adaptado para camundongos por Kawabata e colaboradores.

O teste consiste na aplicação de uma pressão uniformemente crescente na pata do animal para avaliar sua resposta à dor. O animal é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, enquanto a pata sob teste é colocada, por sua superfície plantar, à parte compressora do aparelho, que consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se coloca a pata do animal, e outra cônica, com uma área de 1,75 mm² na extremidade, por meio da qual é aplicada uma pressão crescente na superfície plantar da pata do animal. O experimentador aciona um pedal e a força, então, se torna crescente a medida que a régua é percorrida. A magnitude da força cresce em uma escala de 16 g a cada segundo.



Figura 8. Teste algésimétrico de mensuração do limiar nociceptivo mecânico da pata de camundongos: O limiar nociceptivo dos animais foi mensurado através do método descrito por Randall e Selitto. O teste consiste em aplicar sobre a pata do animal (superfície plantar) uma pressão uniformemente crescente. A intensidade da pressão que causa o reflexo de retirada é definida como o limiar de retirada ou limiar nociceptivo. A força necessária para que esse animal exiba tal resposta é registrada em gramas (g).

A intensidade da pressão, registrada em gramas, que causa uma reação de retirada de pata é definida como o limiar nociceptivo mecânico. O limiar nociceptivo de retirada da pata foi avaliado antes (tempo zero) e após a administração do estímulo hiperalgésico e das drogas sob teste. Quando há uma diminuição no limiar de retirada, em relação ao limiar basal, pode significar que o animal apresenta uma hipernocicepção e quando este limiar de retirada é aumentado, pode-se considerar que houve uma antinocicepção.

É importante ressaltar que os animais foram ambientalizados ao aparelho (Figura 9) dois dias antes da realização de cada experimento. Os valores encontrados são resultado de uma média aritmética de três medidas realizadas. Os resultados, em sua maioria, foram expressos pelo Δ , que representa a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção das drogas sob teste.



Figura 9. Aparelho utilizado para mensurar o limiar nociceptivo da pata de camundongos: O chamado algosímetro foi o aparelho utilizado para a mensuração do limiar nociceptivo dos camundongos. Após o acionamento do pedal, a parte compressora do aparelho aplica uma pressão uniformemente crescente na superfície plantar da pata. A força se torna crescente a medida em que a régua do aparelho é percorrida pelo peso. A magnitude da força cresce é em uma escala de 16 g a cada segundo.

4.5 Protocolo experimental

As doses e os tempos de injeção das drogas utilizadas foram baseados em experimentos preliminares (pilotos) e em dados da literatura.

Para a realização da curva antinociceptiva, dopamina ou seu veículo (salina) foi administrada 10 min antes da 3ª h da injeção de PGE₂ (pico da ação hiperalgésica). As medidas do limiar nociceptivo foram feitas na 3ª h e a cada dez minutos.

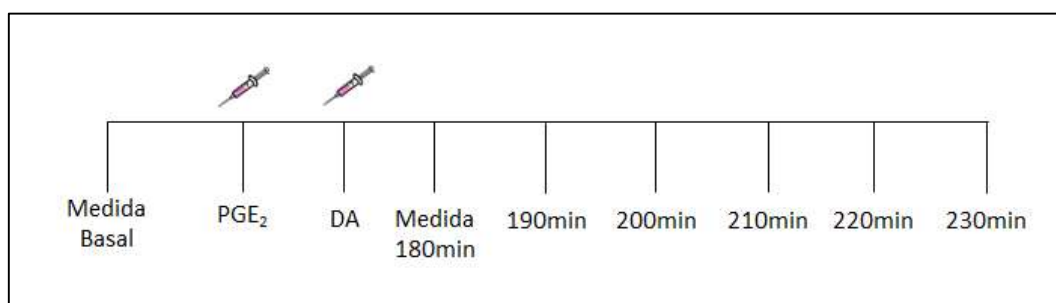


Figura 10. Protocolo experimental: A dopamina foi administrada 10 min antes da 3ª h de injeção de prostaglandina. As medidas foram realizadas na terceira hora (180min) e de 10 em 10 minutos.

Os antagonistas dos receptores dopaminérgicos foram administrados 5 minutos antes da 3ª h de PGE₂ e as medidas foram feitas de 5 em 5min até ser encontrado o pico de ação. Após encontrado o pico de ação estas drogas foram administradas em seus respectivos tempos, de modo que o pico de ação dos antagonistas coincida com o pico de ação da PGE₂ (3ª h), quando foram realizadas as medidas. Os antagonistas de receptores D₁, D₃, D₄ e D₅ (SFK 83566, SCH 23390, U 99194 e L-745, 870 respectivamente) foram administrados 5 minutos antes da DA. Já o Remoxipride, antagonista de receptores D₂, foi administrado 15 minutos antes da dopamina.

Os antagonistas dos receptores μ , δ e κ opioides (naloxona, CTOP, naltrindole e nor-binaltorfimina, respectivamente) bem como o inibidor de encefalinases (bestatina) foram administrados 30 minutos antes da dopamina.

Os antagonistas dos receptores canabinoides CB₁ e CB₂ (AM251 e AM630, respectivamente) bem como os inibidores da captação e degradação de anandamida (VDM11 e MAFP, respectivamente) e o inibidor da degradação de 2-AG (JZL184) foram administrados 10 minutos antes da dopamina.

O inibidor da enzima NO-sintase (L-NOArg), os inibidores seletivos das isoformas de NO-sintase, iNOS, eNOS e nNOS (LNIL, LNIO e LNPA, respectivamente), bem como o inibidor da enzima guanilil ciclase solúvel (ODQ) foram administrados 30 minutos antes da dopamina.

O bloqueador dos canais para potássio sensíveis a voltagem (tetraetilamônio) foi administrado 30 minutos antes da administração da dopamina. Os bloqueadores dos demais canais para potássio (glibenclamida, dequalínio e paxilina) foram administrados 5 minutos antes da administração da dopamina.

Os protocolos de administração foram registrados nas legendas de todos os gráficos.

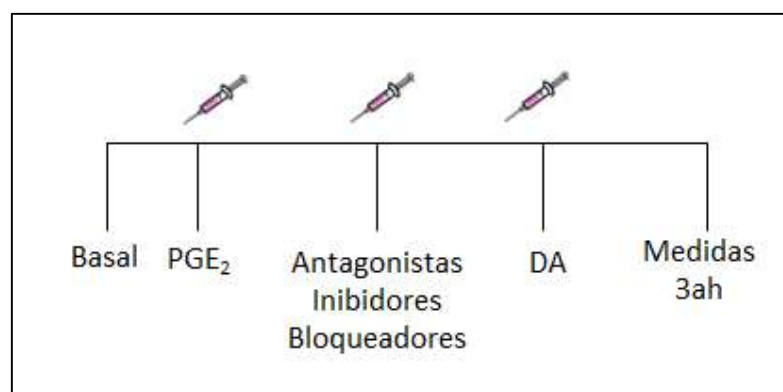


Figura 11. Protocolo experimental: A dopamina, os antagonistas, inibidores e bloqueadores utilizados foram administrados em seus respectivos tempos de forma que o pico de ação destas drogas coincidissem com o pico de ação hiperalgésico da PGE₂ (3^a h), momento em que foram feitas as medidas do limiar nociceptivo.

4.6 Análise estatística

O programa GraphPad Prism 5.00 foi utilizado para confecção dos gráficos e análise estatística dos dados obtidos. Os resultados foram expressos por meio da média \pm erro padrão da média (E.P.M.) para cada protocolo experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância one-way (para análise de desenvolvimento temporal) ou two-way seguida pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Somente valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade hiperalgésica induzida pela PGE₂

A prostaglandina E₂ (PGE₂) administrada na pata posterior direita de camundongos promoveu uma hiperalgesia de forma dependente da dose (0,5, 1 e 2 µg). As medidas foram realizadas a cada hora até o retorno ao limiar basal, que se deu na sexta hora de administração. O pico de ação foi observado 3 horas após a injeção, sendo a dose de 2 µg a que induziu efeito hiperalgésico máximo. Etanol 10% (veículo da PGE₂) foi administrado no grupo controle (Figura 12).

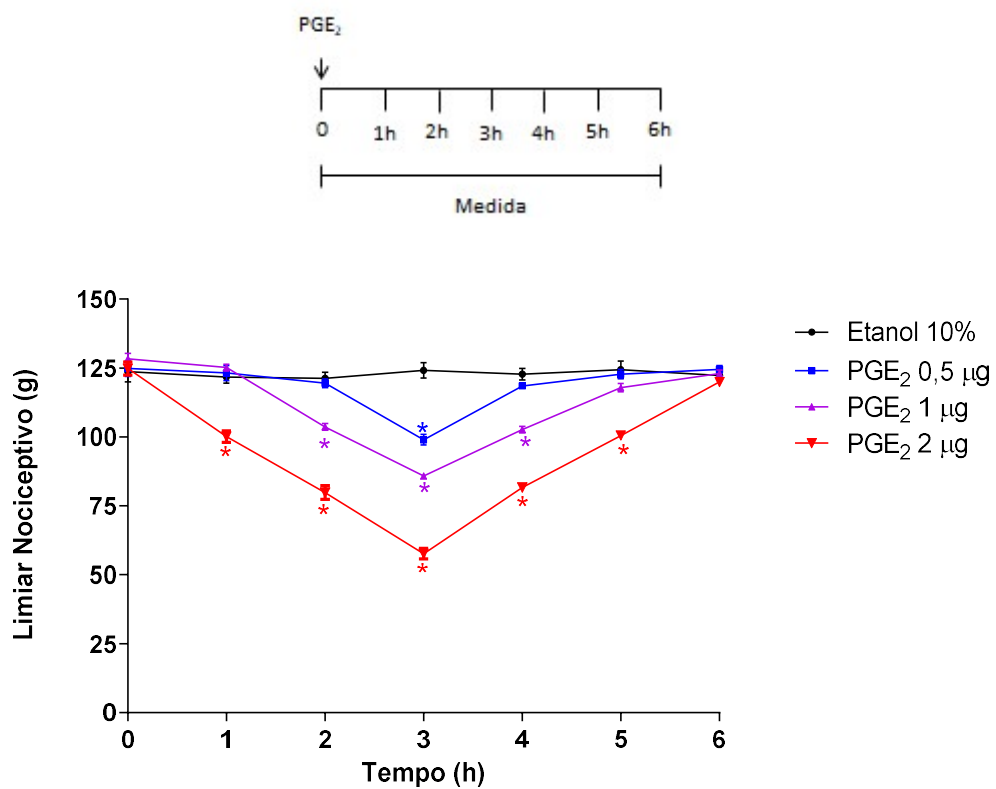


Figura 12. Curva tempo-resposta da administração intraplantar de PGE₂ : A PGE₂ (0,5, 1 e 2 µg/pata) foi administrada na pata posterior direita dos camundongos e as medições foram realizadas nos tempos indicados no gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) para n=5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo controle (Etanol 10%).

5.2 Estudo sobre a antinocicepção periférica mediada pela dopamina

A dopamina, administrada em diferentes doses (5, 20 e 80 ng), 10 minutos antes da terceira hora de injeção da PGE₂, (2 µg) promoveu a reversão da hiperalgisia, de forma dose-dependente, com efeito inibitório durando cerca de 40 minutos. Antinocicepção máxima foi observada com a dose de 80 ng/pata. O pico de ação se apresentou 5 minutos após a terceira hora de injeção da PGE₂, 15 minutos após administração da dopamina (185 min). Apesar de a maior dose de dopamina reverter completamente a hiperalgisia induzida por PGE₂, essa dose, sem a presença do estímulo nociceptivo, não alterou significativamente o limiar basal dos animais (grupo Etanol 10% + DA 80 ng). Para o grupo controle foram realizadas injeções de Etanol 10% (veículo da PGE₂) e salina (veículo da dopamina) em seus respectivos tempos (Figura 13).

Para excluir a possibilidade de um efeito sistêmico, a PGE₂ (2 µg/pata) foi administrada em ambas as patas posteriores dos animais, enquanto que a dopamina, em sua dose máxima (80 ng/pata), foi administrada na pata direita. A pata esquerda recebeu apenas salina. As medições do limiar nociceptivo foram realizadas em ambas as patas, e os resultados (Figura 14) mostram que o efeito antinociceptivo da DA ficou restrito apenas à pata em que foi administrada, não apresentando alteração na hiperalgisia provocado pela PGE₂ na pata contralateral. O grupo controle recebeu injeção de PGE₂ (2 µg/pata) e salina, em seus respectivos tempos, em ambas as patas posteriores. As medições foram realizadas apenas no pico de ação das drogas (terceira hora) e os valores foram expressos pelo Δ , que representa a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de PGE₂, DA e salina.

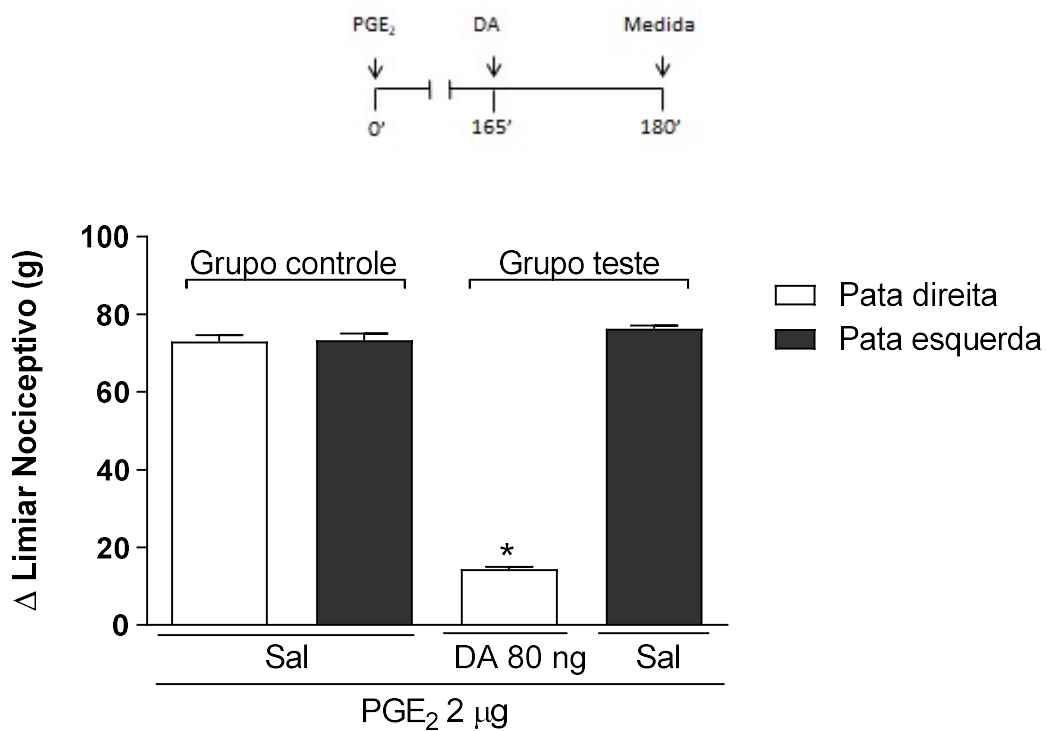


Figura 14. Exclusão do efeito antinociceptivo sistêmico da dopamina: A PGE₂ (2 μ g/pata) foi administrada em ambas as patas posteriores de 2 grupos de animais (n=5/grupo) no tempo zero. Após o pré-tratamento com PGE₂ o grupo controle recebeu salina nas duas patas posteriores, enquanto que o grupo teste recebeu dopamina (80 ng/pata) na pata direita e salina na pata esquerda, em 165 minutos. A resposta antinociceptiva foi medida, em ambas as patas, na terceira hora (180min). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g). *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μ g + Sal. Sal= Salina 0,9%.

5.3 Avaliação dos receptores dopaminérgicos envolvidos na antinocicepção periférica mediada pela dopamina

Para avaliar a participação dos receptores dopaminérgicos na atividade antinociceptiva induzida pela dopamina foram utilizados antagonistas seletivos para cada uma das famílias de receptores. A primeira avaliação foi realizada com o antagonista seletivo de receptores D₁ e D₅, o SKF 83566 e SCH 23390, respectivamente. O antagonista SKF 83566, na dose de 2 µg/pata (Figura 15), e SCH 23390, na dose de 1,6 µg/pata (Figura 16) não reverteram a antinocicepção mediada pela DA (80 ng/pata) frente a hiperalgisia induzida pela PGE₂ (2 µg/pata). Além disso, eles não foram capazes, por si só, de alterar o limiar hiperalgésico promovido pela PGE₂ ou alterar o limiar de animais tratados apenas com Etanol 10% (veículo da PGE₂) e salina (veículo da DA). O grupo controle foi tratado com Etanol 10% + salina + salina.

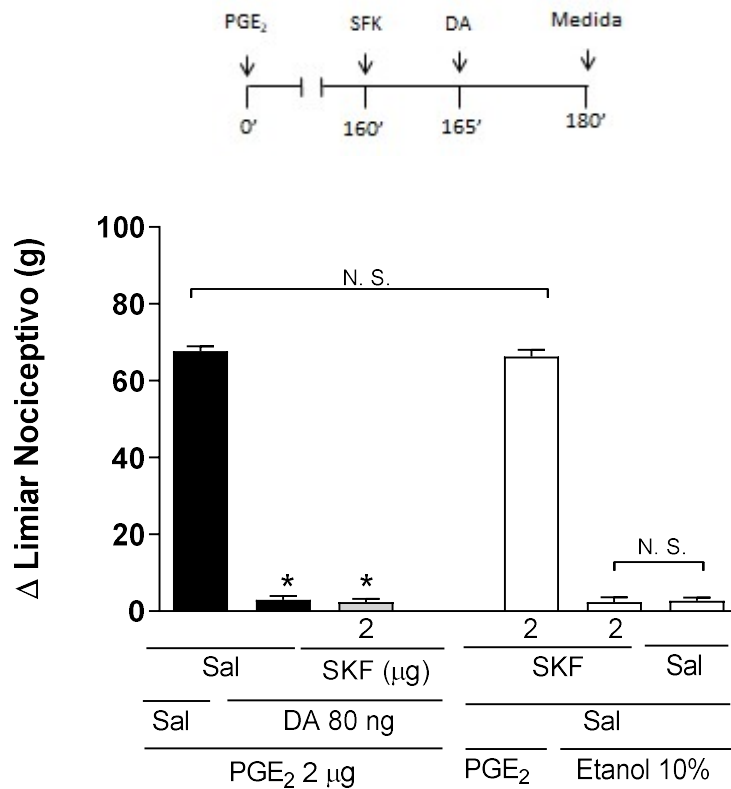


Figura 15. Efeito do SKF 83566 na antinociceção periféria mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), SKF 83566 (2 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 160 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

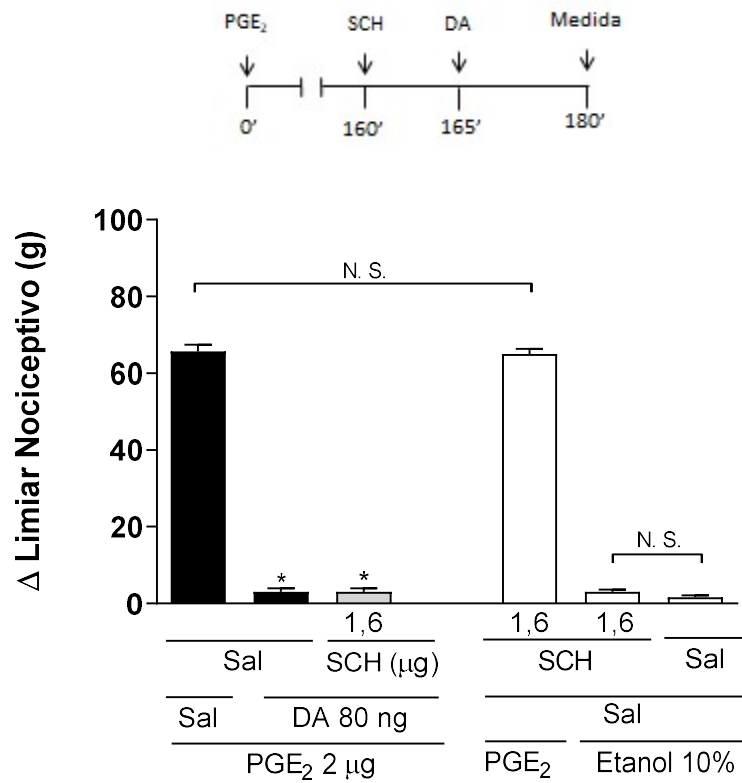


Figura 16. Efeito do SCH 23390 na antinociceção periféria mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), SCH 23390 (1,6 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 160 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

Como relatado na sessão de Introdução, a DA, em doses elevadas, pode ser capaz de induzir hiperalgesia. Sabendo disto, avaliou-se o efeito do SKF 83566 e SCH 23390 na hiperalgesia induzida pela DA (10 µg/pata). O SKF 83566 (0,5, 1 e 2 µg/pata) e o SCH 23390 (0,4, 0,8 e 1,6 µg/pata) foram capazes de reverter a hiperalgesia induzida pela DA, de forma dose-dependente (Figuras 17 e 18).

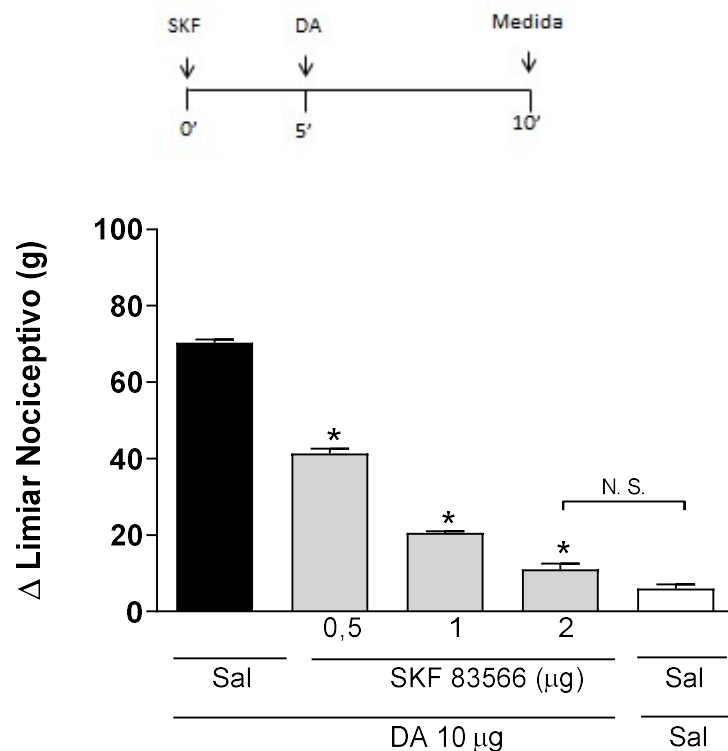


Figura 17. Efeito do SKF 83566 frente a hiperalgesia induzida pela DA: O SKF 83566 (0,5, 1 e 2 μg/pata) e a DA (10 μg/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0 e 5min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 10 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo DA 10 μg + Sal. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

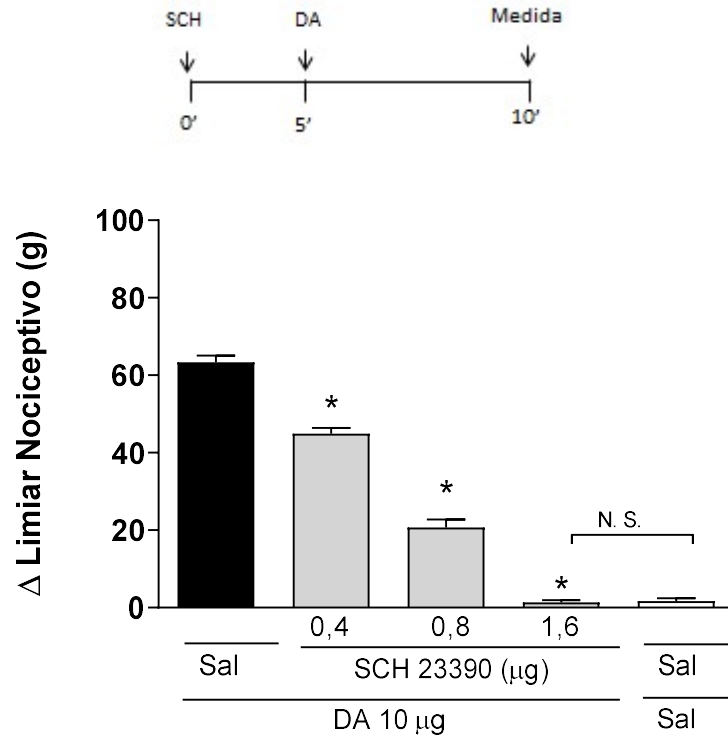


Figura 18. Efeito do SCH 23390 frente a hiperalgesia induzida pela DA: O SCH 23390 (0,4, 0,8 e 1,6 μg/pata) e DA (10 μg/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0 e 5min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 10 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo DA 10 μg + Sal. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

Os antagonistas seletivos dos receptores D₂, D₃ e D₄, Remoxipride (Remo; 1, 2 e 4 µg/pata), U 99194 (2, 4, 8, 16 e 32 µg/pata) e L-745,870 (4, 8, 16 e 32 µg/pata), respetivamente, reverteram a antinocicepção mediada pela DA (80 ng/pata) de maneira dose-dependente (Figura 19). A reversão com os antagonistas D₃ e D₄ foi parcial, mesmo com a administração do dobro da dose máxima (Figuras 20 e 21). Todos os antagonistas utilizados para avaliar a participação dos receptores dopaminérgicos não promoveram atividade nociceptiva ou antinociceptiva, quando administrados isoladamente com PGE₂ ou Etanol 10% (conjunto de resultados à direita de cada gráfico).

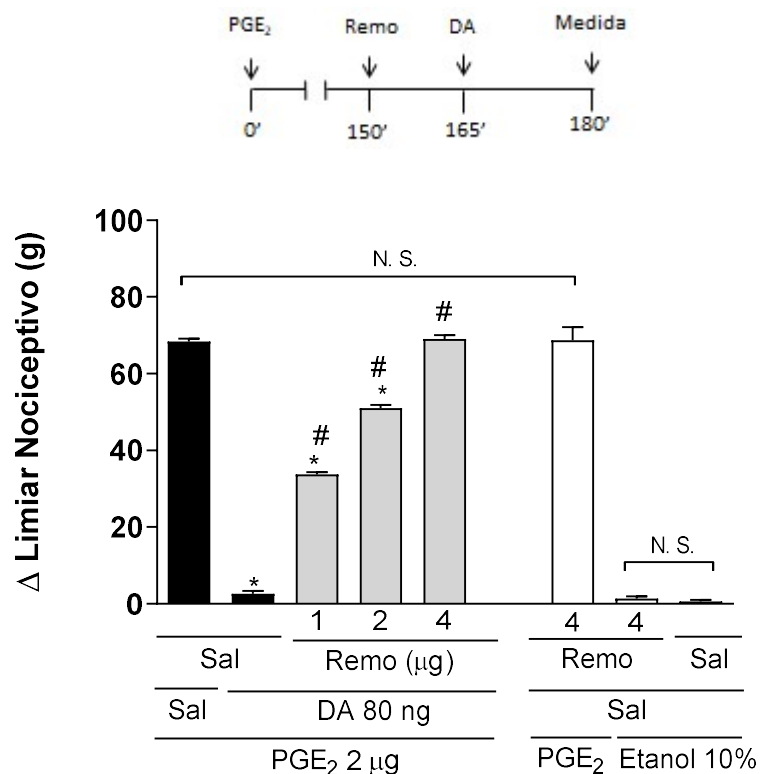


Figura 19. Efeito do Remoxipride na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), Remoxipride (1, 2 e 4 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 150 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

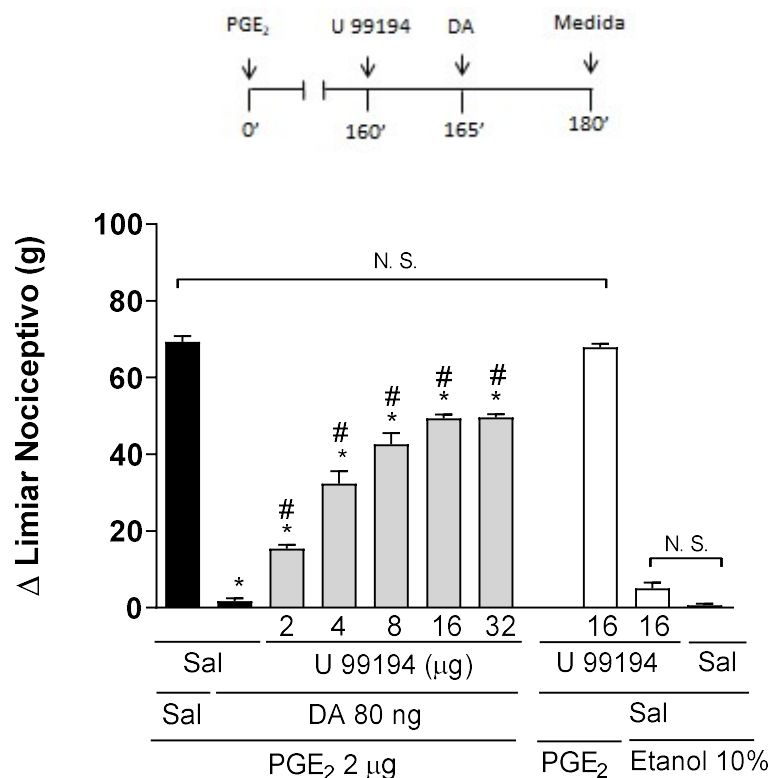


Figura 20. Efeito do U 99194 na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), U 99194 (2, 4, 8, 16 e 32 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 160 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

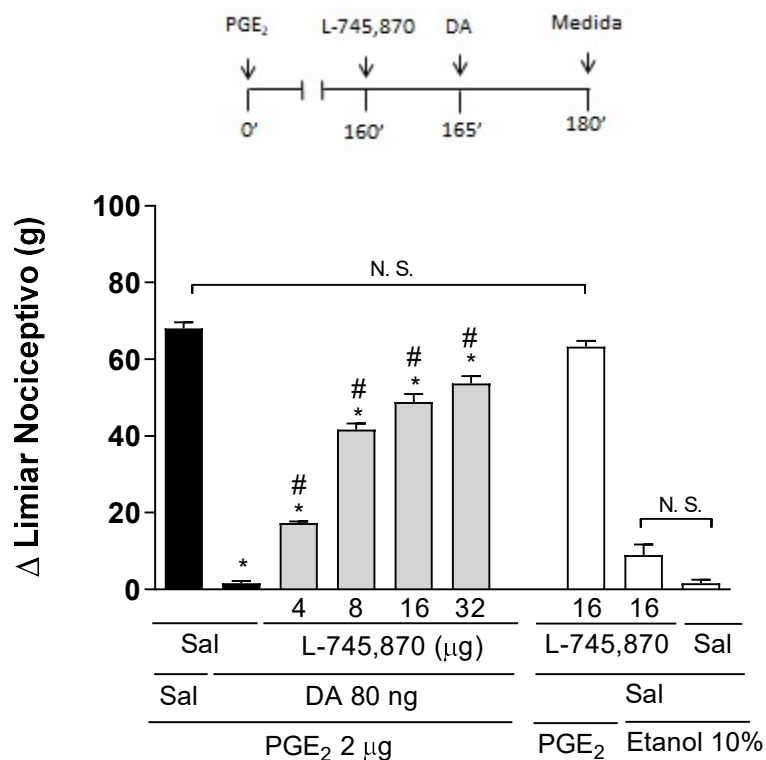


Figura 21. Efeito do L-745,870 na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), L-745,870 (4, 8, 16 e 32 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 160 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

5.4 Estudo sobre a participação do sistema opioidérgico na antinocicepção periférica mediada pela dopamina

A administração intraplantar de Naloxona (12,5, 25 e 50 µg/pata) reverteu, de forma dose-dependente, a antinocicepção mediada pela DA (80 ng/pata) frente a hiperalgesia induzida pela PGE₂. Da mesma forma, o Naltrindole (NTD; 15, 30 e 60 µg/pata), antagonista seletivo dos receptores δ e o nor-binaltorfimina (NorBNI; 50, 100 e 200 µg/pata), antagonista seletivo dos receptores κ, reverteram a antinocicepção mediada pela DA, também de forma dependente da dose (Figuras 22, 23 e 24, respectivamente).

Por outro lado, o CTOP (20 µg/pata), um antagonista seletivo dos receptores µ-opioide, não induziu nenhuma alteração na antinocicepção mediada pela DA (Figura 25). Todos os antagonistas utilizados não apresentaram efeito antinociceptivo ou nociceptivo quando administrados isoladamente, como pode-se verificar no conjunto de resultados à direita de cada gráfico.

A Bestatina (Bestati; 400 µg/pata), inibidor das encefalinases que são responsáveis pela degradação dos peptídeos opioides endógenos, promoveu uma potencialização da antinocicepção mediada por uma dose mínima de DA (5 ng) semelhante à antinocicepção induzida pela dose máxima (Figura 26). Utilizou-se uma dose de Bestatina, que, quando administrada isoladamente, não produziu antinocicepção significativa frente à hipernocicepção da PGE₂ (2 µg/pata).

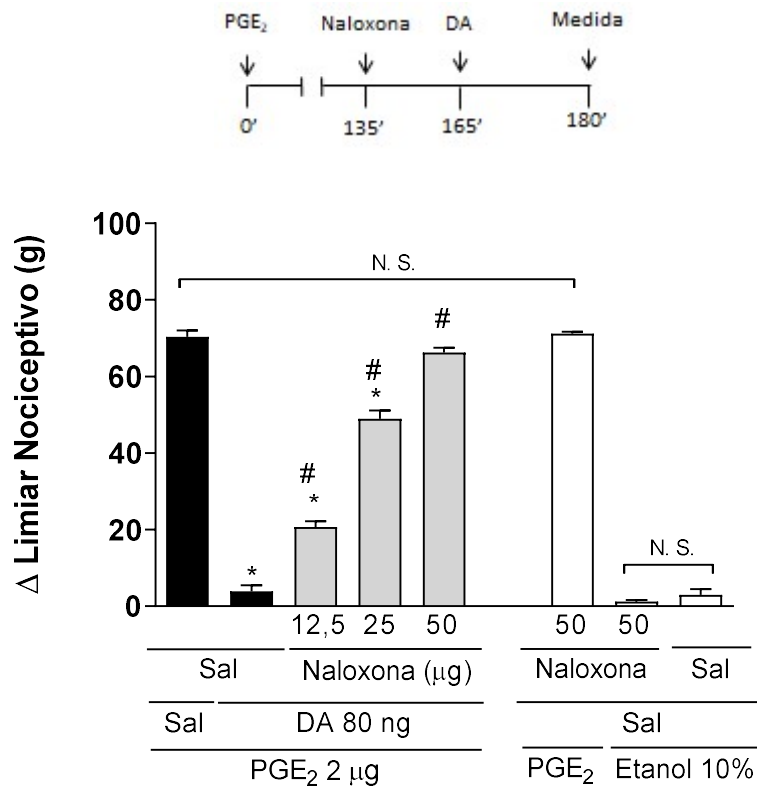


Figura 22. Efeito da Naloxona na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), Naloxona (12,5, 25 e 50 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

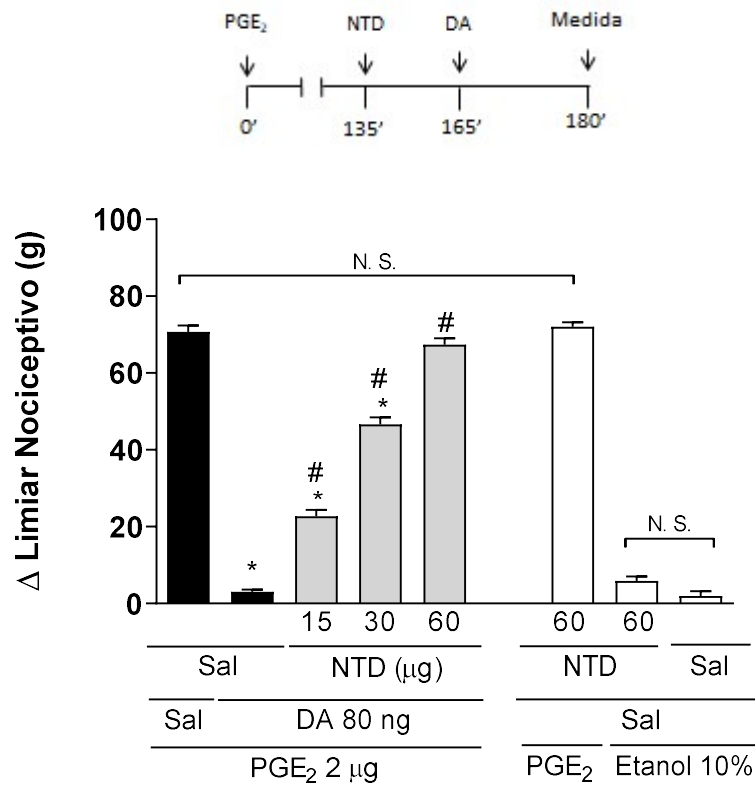


Figura 23. Efeito do Naltrindole na antinociceção periféria mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), Naltrindole (15, 30 e 60 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

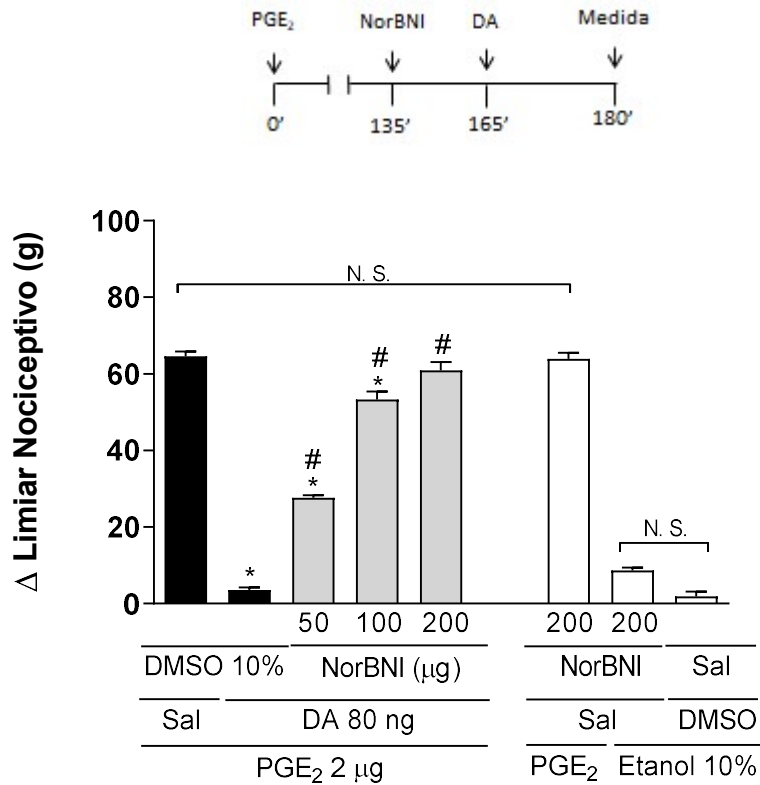


Figura 24. Efeito do NorBNI na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), NorBNI (50, 100 e 200 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + DMSO 10% + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + DMSO 10% + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%. DMSO= dimetilsulfóxido 10%.

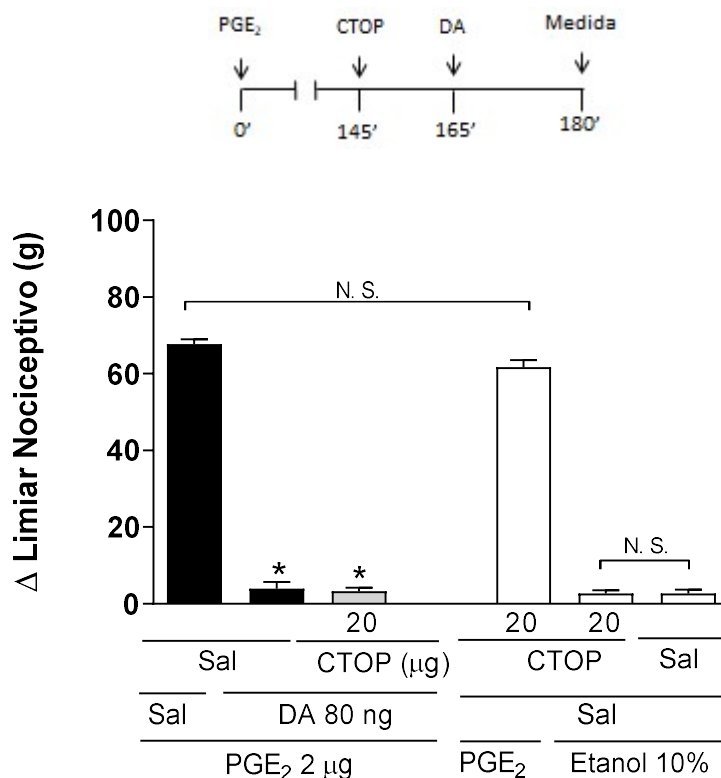


Figura 25. Efeito do CTOP na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), CTOP (20 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 145 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

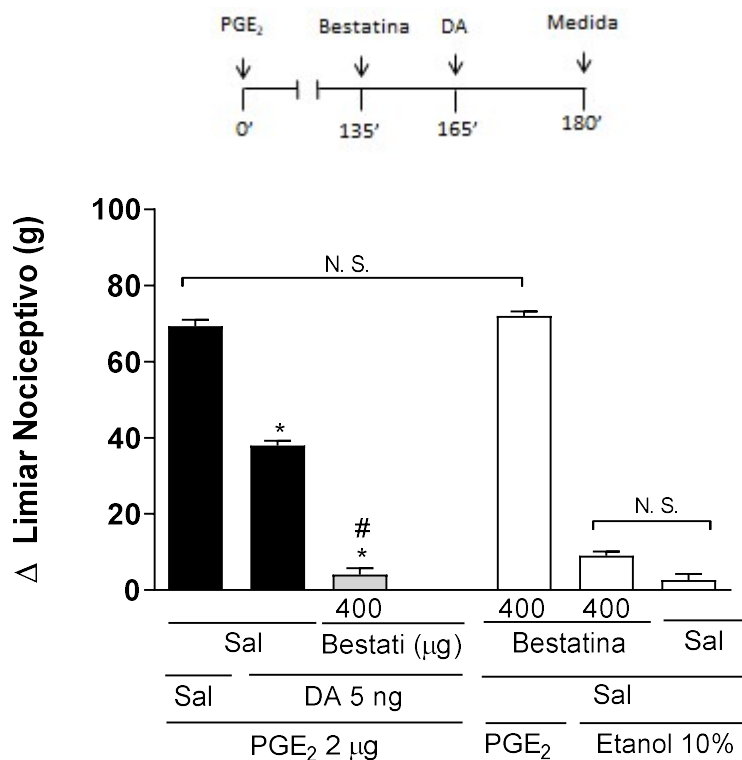


Figura 26. Efeito da Bestatina na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), Bestatina (400 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

5.5 Estudo sobre a participação do sistema canabinoide na antinocicepção periférica mediada pela dopamina

Antagonistas seletivos dos receptores canabinoides CB₁ e CB₂, AM251 (20, 40 e 80 µg/pata) e AM630 (100 µg/pata) respectivamente, bloquearam o efeito antinociceptivo periférico induzido pela DA (80 ng/pata). Os antagonistas não foram capazes, per se, de promover antinocicepção em animais pré tratados com PGE₂ ou promover nocicepção em animais tratados com veículo (Figuras 27 e 28).

Duas drogas capazes de potencializar o efeito de endocanabinoides foram utilizadas. O JZL (4 µg/pata), inibidor da enzima MAGL que degrada o endocanabinoide 2-araquidonilglicerol (2-AG), quando administrado previamente à DA foi capaz de potencializar a antinocicepção intermediária mediada pela dose de 5 ng/pata de DA (Figura 29). O mesmo não ocorreu com MAFP (0,5 µg/pata), inibidor da enzima FAAH que degrada o endocanabinoide anandamida, e com VDM11 (2,5 µg/pata), inibidor do transportador membranar de anandamida (Figura 30 e 31). Estes dois inibidores não foram capazes de alterar a resposta antinociceptiva mediada pela dose de 5 ng/pata de DA, e, quando administrados isoladamente, não promoveram alteração no limiar nociceptivo de animais hiperalgésicos ou animais tratados com veículo.

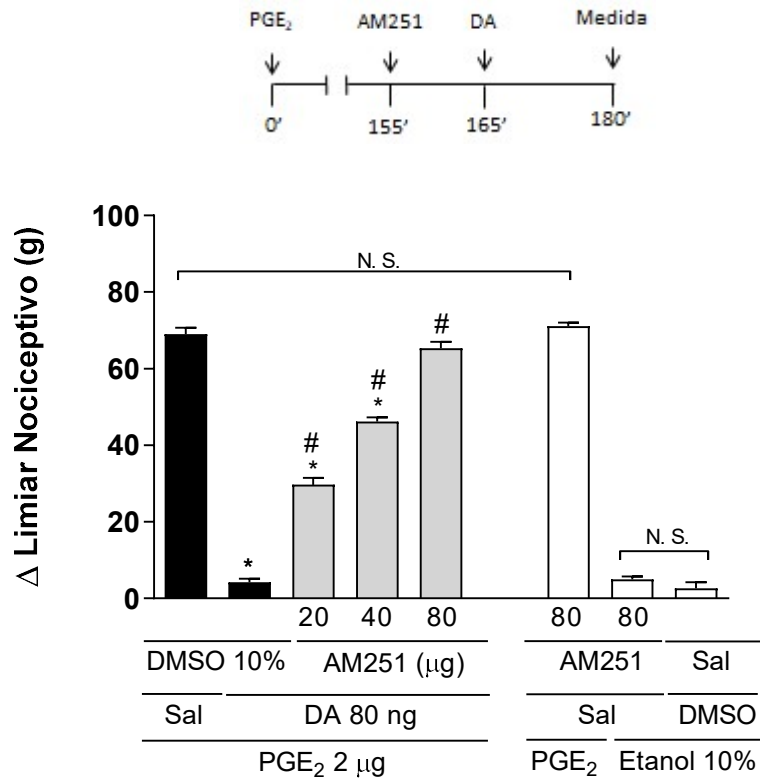


Figura 27. Efeito do AM251 na antinocicepção periféria mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), AM251 (20, 40 e 80 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 155 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + DMSO10% + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + DMSO 10% + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%. DMSO= dimetilsulfóxido 10%.

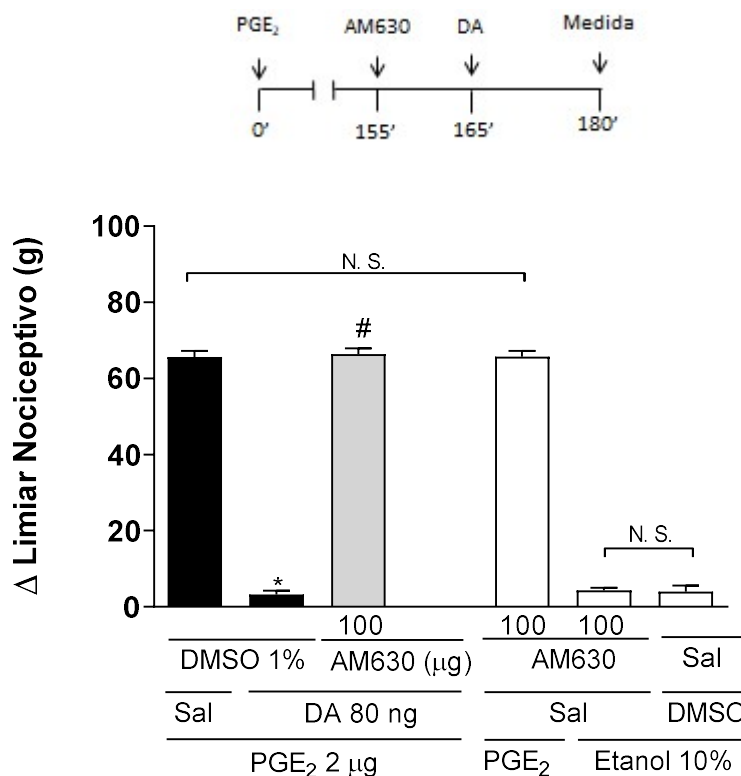


Figura 28. Efeito do AM630 na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), AM630 (100 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 155 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + DMSO 1% + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + DMSO 1% + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%. DMSO= dimetilsulfóxido 1%.

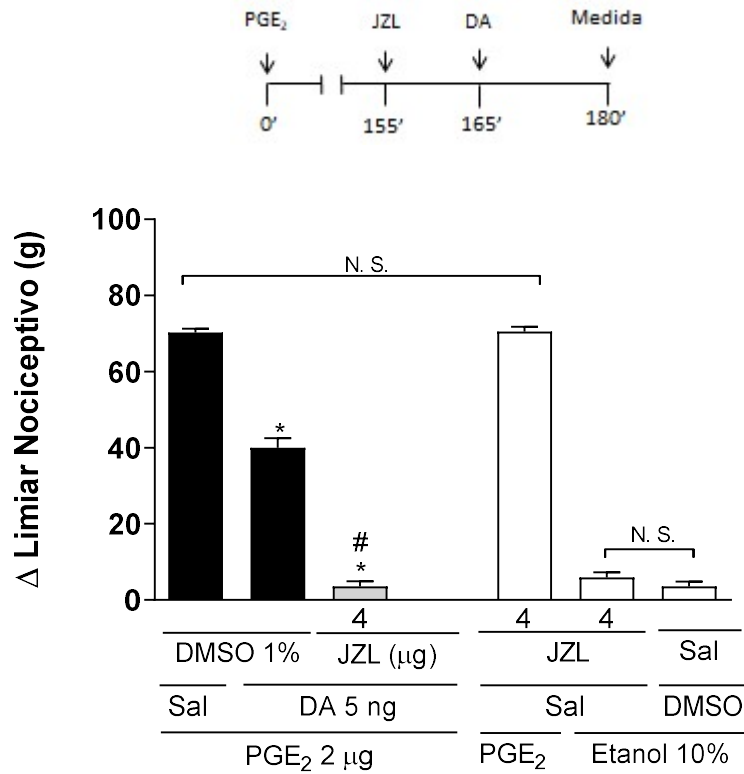


Figura 29. Efeito do JZL na antinociceção periféria mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), JZL (4 μg/pata) e DA (5 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 155 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + DMSO 1% + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + DMSO 1% + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%. DMSO= dimetilsulfóxido 1%.

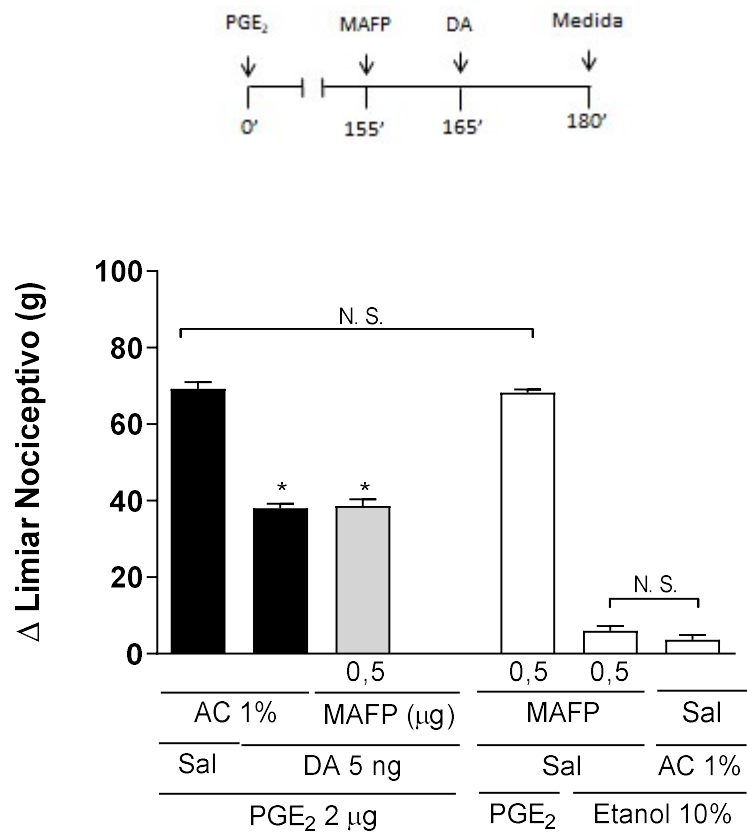


Figura 30. Efeito do MAFP na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 µg/pata), MAFP (0.5 µg/pata) e DA (5 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 155 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 µg + AC 1% + Sal. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%. AC= Acetato de metila 1%.

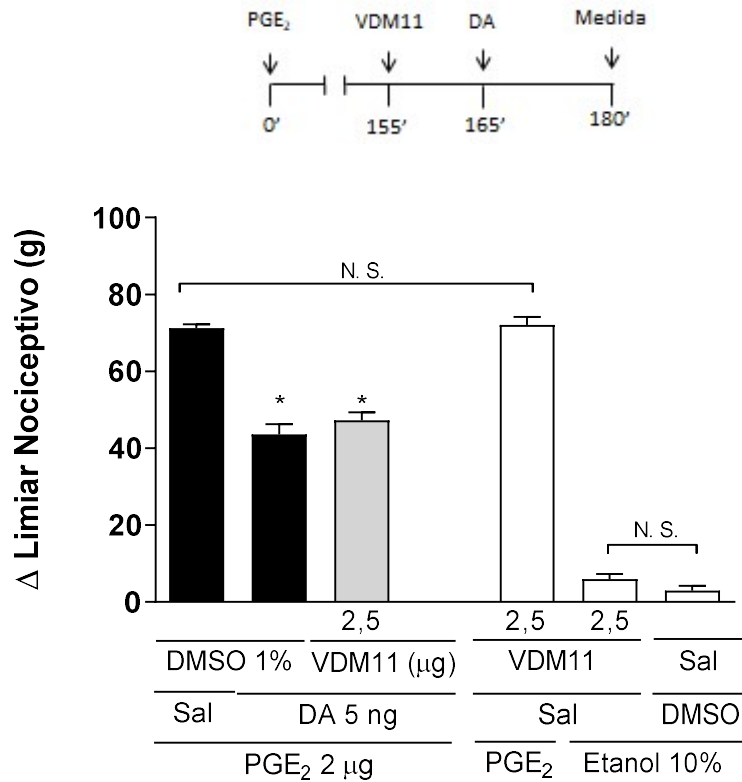


Figura 31. Efeito do VDM11 na antinocicepção periféria mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), VDM11 (2.5 μg/pata) e DA (5 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 155 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + DMSO 1% + Sal. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%. DMSO= dimetilsulfóxido 1%.

5.6 Estudo sobre a participação da via L-arginina/NO/GMPc na antinocicepção periférica mediada pela dopamina

Na figura 32 é possível verificar que o efeito antinociceptivo da DA (80 ng/pata) foi antagonizado, de forma dose-dependente, pelo L-NOArg (12, 18 e 24 µg/pata), inibidor não seletivo das enzimas NO-sintase. Similarmente, o L-NPA (12, 18 e 24 µg/pata), inibidor seletivo da enzima NO-sintase neuronal, também inibiu a ação antinociceptiva periférica da DA (80 ng/pata), de forma dose-dependente (Figura 33). Administradas de forma isolada, os inibidores não foram capazes de produzir alteração no limiar nociceptivo nos grupos controle.

Por outro lado, os inibidores seletivos das enzimas NO-sintase induzível e endotelial, L-NIL (24 µg/pata) e L-NIO (24 µg/pata), respectivamente, não proporcionaram alteração na antinocicepção mediada pela DA (80 ng/pata), frente à hiperalgesia induzida pela PGE₂ (2 µg/pata). Além disso, quando administrados isoladamente com os grupos controle, eles não foram capazes de alterar o limiar nociceptivo (Figuras 34 e 35).

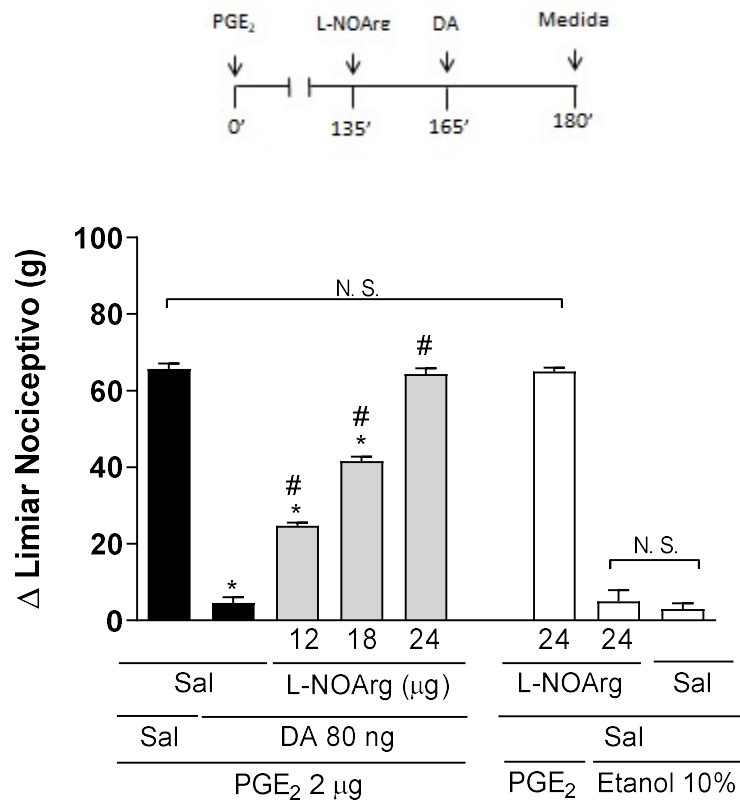


Figura 32. Efeito do L-NOArg na antinociceção periféria mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), L-NOArg (12, 18 e 24 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

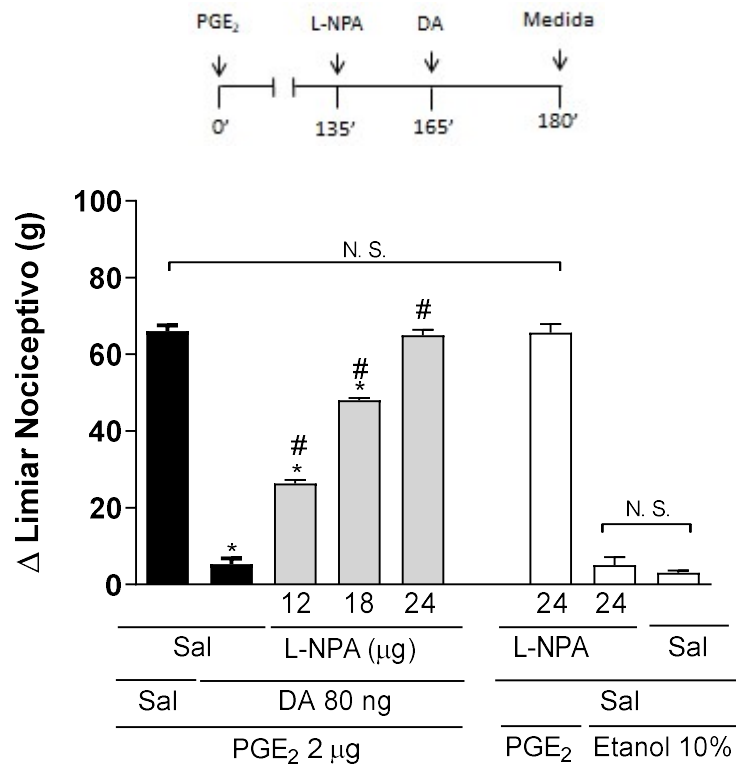


Figura 33. Efeito do L-NPA na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), L-NPA (12, 18 e 24 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

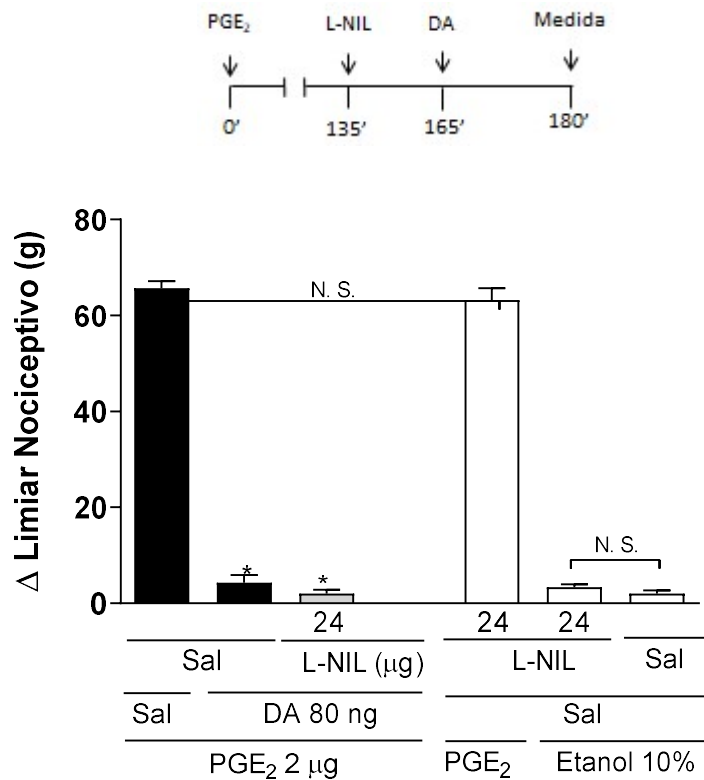


Figura 34. Efeito do L-NIL na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), L-NIL (24 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

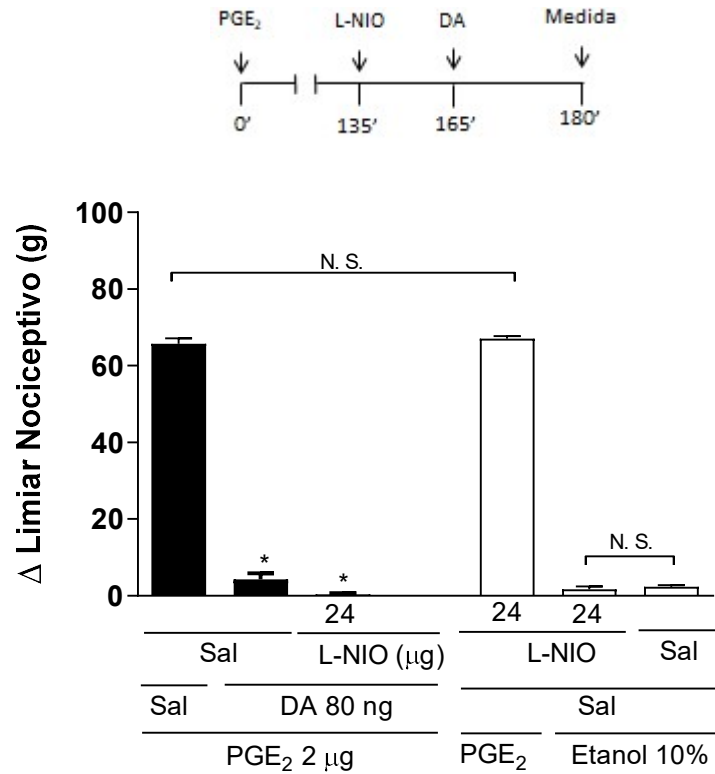


Figura 35. Efeito do L-NIO na antinociceção periféria mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), L-NIO (24 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

O ODQ (25, 50 e 100 µg/pata), inibidor da guanilato ciclase solúvel, promoveu a reversão da antinocicepção mediada pela DA (80 ng/pata) de maneira dependente da dose (Figura 36). O Zaprinast (50 µg/pata), inibidor da fosfodiesterase que degrada GMPc, intensificou o efeito antinociceptivo de uma dose mínima de DA (5 ng/pata). ODQ e Zaprinast, em maiores doses, não promoveram alteração do limiar nociceptivo quando administrados em patas previamente tratadas com PGE₂ ou Etanol 10% (grupos controle).

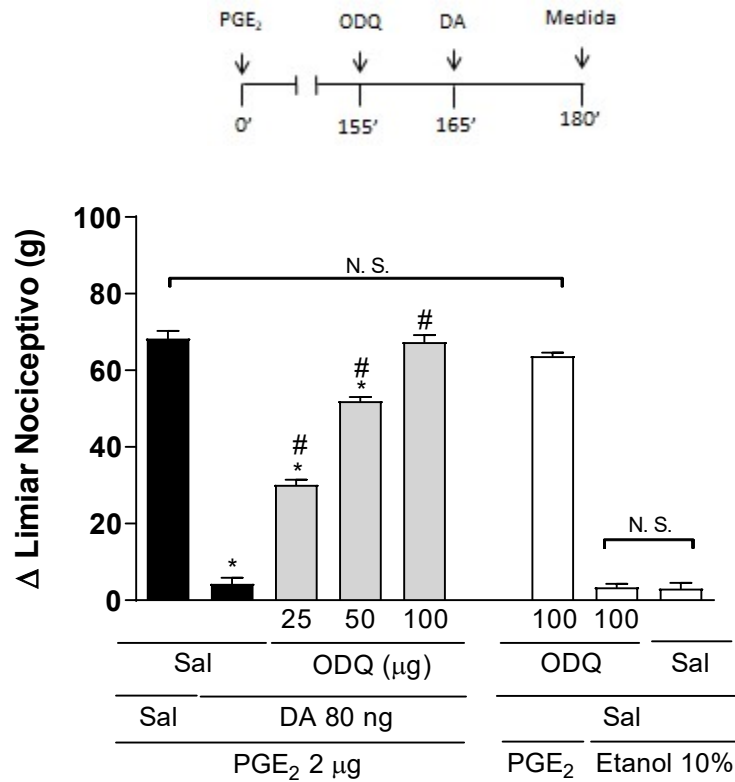


Figura 36. Efeito do ODQ na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), ODQ (25, 50 e 100 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 155 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

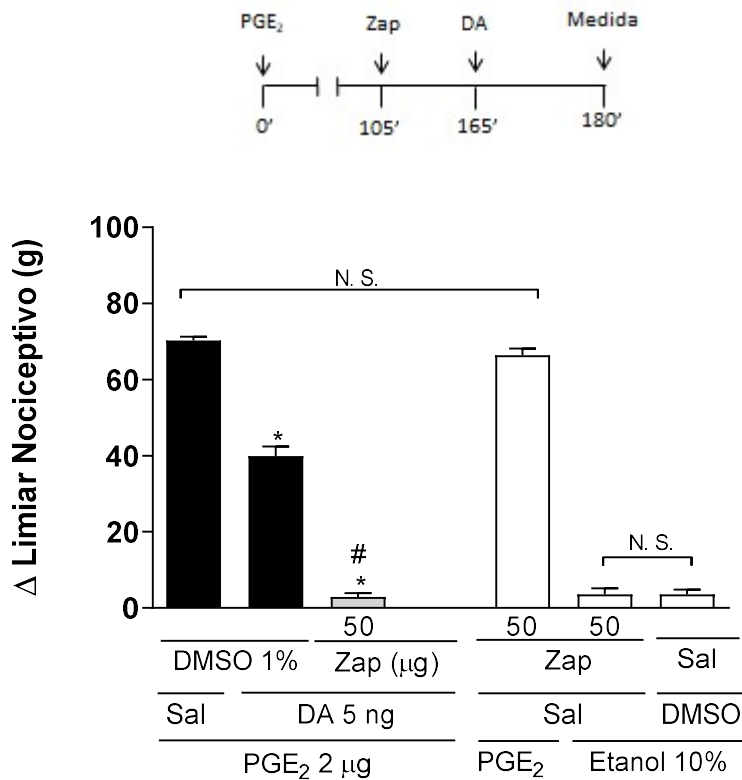


Figura 37. Efeito do Zaprinst na antinociceção periféria mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), Zaprinst (50 μg/pata) e DA (5 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 105 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%. DMSO= dimetilsulfóxido 1%.

5.7 Estudo sobre a participação dos canais para potássio na antinocicepção periférica mediada pela dopamina

O tetraetilamônio (TEA), bloqueador dos canais para potássio dependentes de voltagem, reverteu, de forma parcial (15, 30 e 60 µg/pata), a antinocicepção mediada pela DA (80 ng/pata). A dose de 60 µg/pata não foi capaz de antagonizar totalmente a antinocicepção e, além disto, não foi significativamente diferente da dose de 30 µg/pata. O dequalínio (DQ), bloqueador seletivo dos canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância, bloqueou totalmente, de forma dependente da dose (12.5, 25 e 50 µg/pata), a antinocicepção mediada pela DA (80 ng/pata). TEA e DQ, quando administrados após PGE₂ ou Etanol 10% não foram capazes de alterar o limiar nociceptivo dos animais. Estes resultados estão registrados nas Figuras 38 e 39.

De forma contrária, a glibenclamida (Glib; 80 µg/pata), bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP, e a paxilina (PX; 20 µg/pata), bloqueador seletivo dos canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância, não foram capazes de alterar a antinocicepção mediada pela DA (80 ng/pata). Glib e PX não apresentaram efeito quando injetados isoladamente em patas normais ou hiperalgésicas (Figuras 40 e 41).

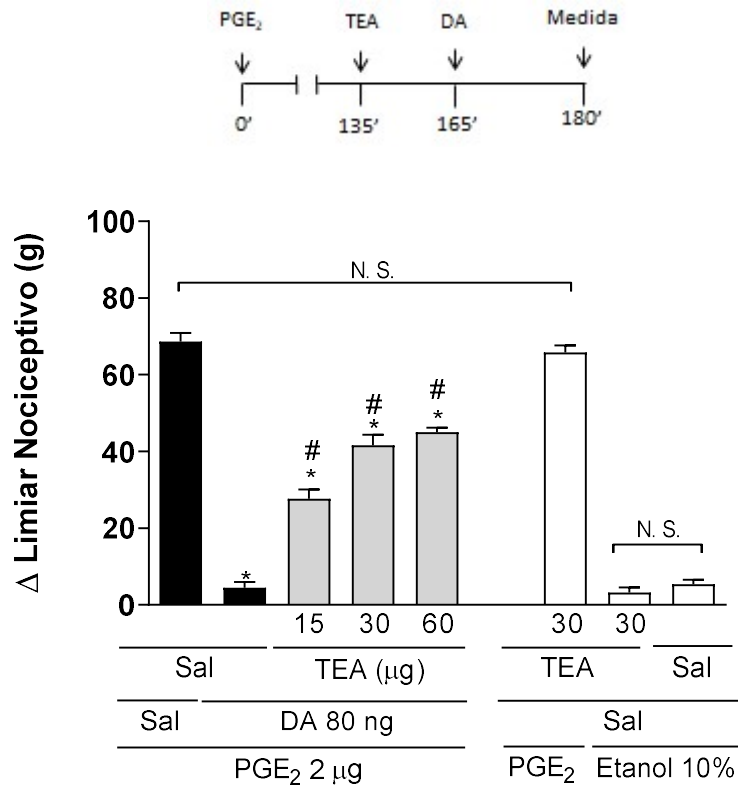


Figura 38. Efeito do TEA na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), TEA (15, 30 e 60 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 135 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

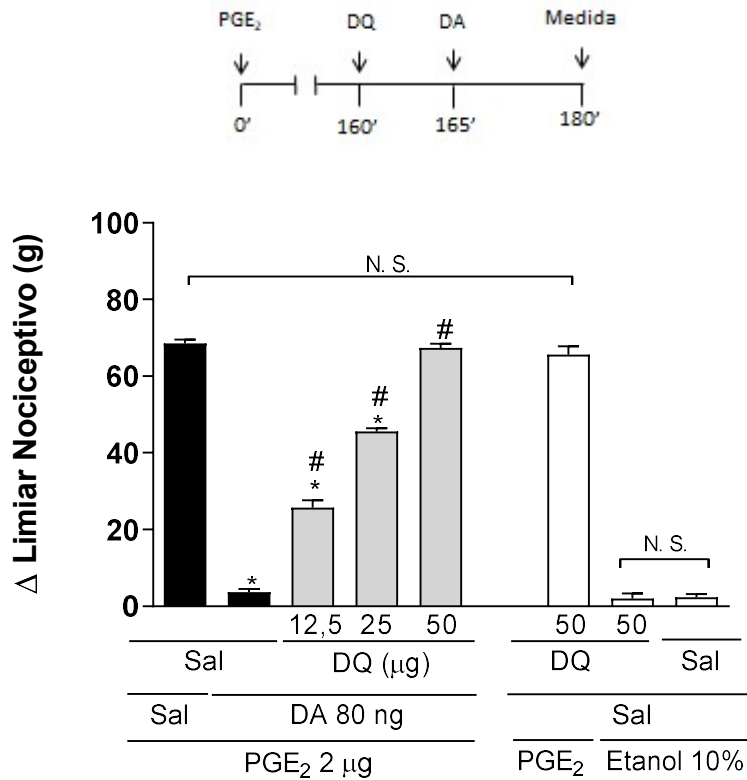


Figura 39. Efeito do DQ na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), DQ (12.5, 25 e 50 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 160 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. #p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + DA 80 ng. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

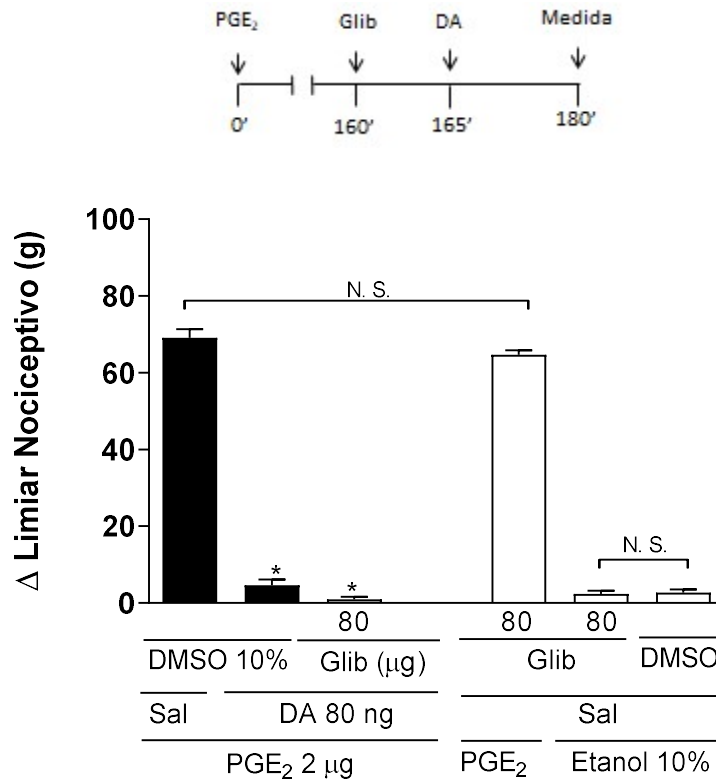


Figura 40. Efeito da Glib na antinociceção periférica mediada pela DA frente a hiperalgesia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), Glib (80 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 160 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + DMSO 10% + Sal. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%. DMSO= dimetilsulfóxido 10%.

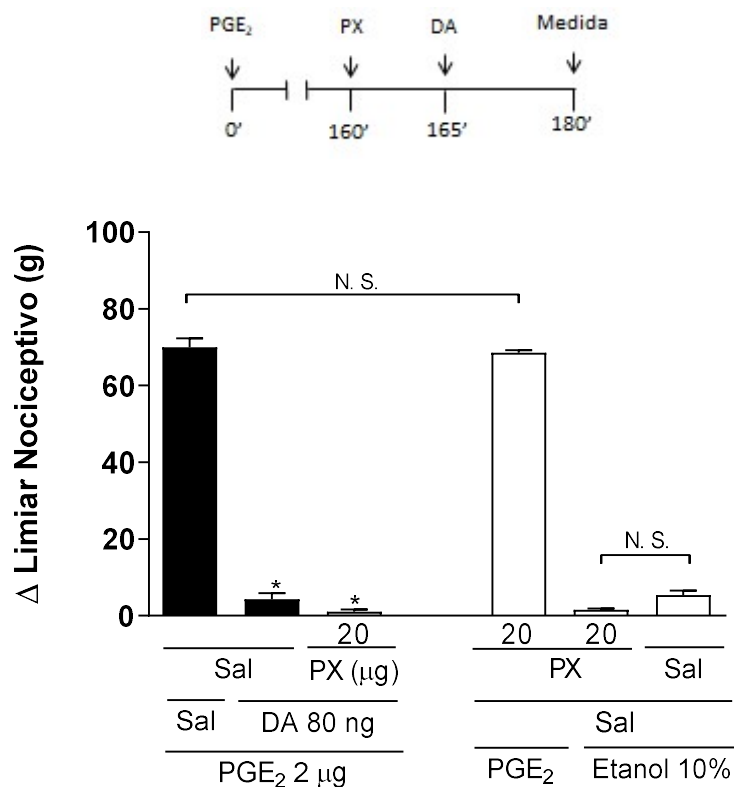


Figura 41. Efeito da PX na antinocicepção periférica mediada pela DA frente a hiperalgisia induzida por PGE₂: A PGE₂ (2 μg/pata), PX (20 μg/pata) e DA (80 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita de camundongos, nos tempos 0, 160 e 165 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo de 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para n= 5. *p<0,05 representa uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo PGE₂ 2 μg + Sal + Sal. N.S.=diferença estatisticamente não significativa. Sal= Salina 0,9%.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foi realizada uma abordagem farmacológica, utilizando o teste de retirada de pata submetida à compressão, para avaliar a atividade antinociceptiva da dopamina (DA), e investigar por quais mecanismos essa amina é capaz de induzir seus efeitos. As aminas biogênicas têm sido amplamente estudadas devido a sua capacidade de modular a condução dolorosa. Estudos demonstram que monoaminas como a serotonina, noradrenalina e dopamina interagem com seus receptores promovendo efeitos tanto pró-nociceptivos quanto antinociceptivos (Basbaum & Fields, 1984; Ren & Dubner, 2002; Mason, 2005; Pertovaara, 2005; Romero et al., 2013; Diniz et al., 2015; Dias et al., 2015; Kim et al., 2015; Dieb et al., 2016).

Além das várias funções clássicas atribuídas ao sistema dopaminérgico, a DA endógena é capaz de responder dinamicamente ao estresse induzido pela dor, como sugerido por Scott et al. (2006), que demonstraram que indivíduos saudáveis liberam dopamina nos gânglios da base em resposta à dor experimental. Alguns pacientes com dor crônica apresentam uma atividade reduzida da enzima L-aminoácido aromático descarboxilase (Hagelberg et al., 2003; Wood et al., 2007), indicando que alterações no metabolismo da dopamina podem, de fato, estar relacionadas à dor clínica. Em conformidade, drogas que facilitam a sinalização dopaminérgica são capazes de promover antinocicepção em animais submetidos a testes como formalina, contorção e ao teste mecânico de retirada de pata (Dennis & Melzack, 1983; Morgan & Franklin 1991; Frussa-Filho et al., 1996; Almeida-Santos et al., 2015).

A fim de avaliar o efeito antinociceptivo promovido pela dopamina, utilizou-se, em nosso ensaio, o agente hiperalgésico PGE₂ (2 µg/pata), na dose que promove hiperalgesia máxima em animais (Soares & Duarte, 2001; Pacheco & Duarte, 2005; Alves et al., 2012), devido a sua capacidade de diminuir o limiar de reação à dor. Através do aumento da concentração de AMPc e ativação das proteínas quinases A (PKA) e C (PKC), a PGE₂ ativa correntes de sódio e inibe canais para potássio dependentes de voltagem, aumentando assim a excitabilidade neuronal, o que diminui o limiar de ativação dos neurônios aferentes primários (Vanegas & Schaible, 2001; Kassuya et al., 2007; Sachs et al., 2009). Sua capacidade de sensibilizar

diretamente os nociceptores, sem requerer a participação de células intermediárias, constitui uma vantagem em relação a outros tipos de agentes hiperalgésicos, como por exemplo a carragenina. Dessa forma, em nosso modelo experimental, a administração de PGE₂ elimina a possibilidade da liberação ou ação de mediadores produzidos durante um processo inflamatório (Vinegar et al., 1987).

Em conjunto com a PGE₂, administrou-se DA (5, 20 e 80 ng/pata), periféricamente, na pata posterior direita dos animais. Os dados obtidos corroboram com os achados da literatura ao demonstrarem que a DA apresentou efeito antinociceptivo, promovendo a reversão da hiperalgesia induzida pela prostaglandina, de forma dependente da dose. A dose de 80 ng/pata foi capaz de reverter totalmente a hiperalgesia, retornando o limiar nociceptivo a níveis basais. Além disso, esta mesma dose promoveu seu efeito apenas localmente, não havendo participação de vias centrais neste evento, em conformidade com nosso objetivo de avaliar os mecanismos de ação apenas a nível periférico.

A DA induz seus efeitos pela ativação de cinco diferentes tipos de receptores (Vallone et al., 2000). Os receptores da família D2, acoplados à proteína G_{i/o}, apresentam a capacidade de reduzir os níveis de AMPc intracelular, promovendo diminuição da excitabilidade neuronal e inibição pré-sináptica da liberação de neurotransmissores. Esta família de receptores está constantemente relacionada à atividade antinociceptiva. Liu e colaboradores demonstraram, em 2019, que os receptores do tipo D2 medeiam o efeito antinociceptivo produzido pela via dopaminérgica descendente em modelo de dor neuropática trigeminal. Além deste estudo, há vários relatos (Ben-Sreti et al., 1983; Rooney & Sewell, 1989; Zarrindast & Moghaddampour, 1989) de que os agonistas D2 potencializam a antinocicepção opioidérgica. Em conformidade, em nosso modelo experimental, confirmamos a participação da família D2 na antinocicepção periférica mediada pela DA. De fato, o uso de Remoxipride, U 99194 e L-745,870, antagonistas dos receptores D₂, D₃ e D₄, respectivamente, revertem a antinocicepção de camundongos tratados com DA, sugerindo a participação destes receptores no processo antinociceptivo mediado pela DA.

De forma contrária, a família de receptores do tipo D1 (D₁ e D₅), acoplados à proteína G_s, promovem um aumento na excitabilidade neuronal. Para avaliar a participação dos receptores D1 na antinocicepção periférica mediada pela DA, utilizamos os antagonistas dos receptores D₁ e D₅, SKF 83566 e SCH 23390, respectivamente. Os dois antagonistas não foram capazes de alterar o limiar nociceptivo dos animais após a administração de DA, sugerindo que estes receptores parecem não participar deste evento.

Apesar de não apresentarem efeitos antinociceptivos, achados da literatura sugerem a participação dos receptores D1 em eventos pró-nociceptivos a nível central (Millan, 2002). Em conformidade, Rooney e Sewell, em 1989, mostraram que a administração intracerebroventricular do agonista seletivo do receptor da dopamina D₁, SKF 38393, induziu um estado hiperalgésico, enquanto a administração do agonista seletivo do receptor da dopamina D₂, quinpirol, provocou uma resposta antinociceptiva. Bourgoin e colaboradores demonstraram que agonistas de receptores D1 podem potencializar a liberação de mediadores, como CGRP e SP, pelas fibras aferentes primárias, transmitindo mensagens nociceptivas dentro do corno dorsal da medula espinhal. Além disso, quando administrados a nível periférico, antagonistas de receptores D1 se mostraram eficientes na reversão da hiperalgesia induzida por carragenina (Nakamura & Ferreira, 1987), e da dor induzida pelo ácido acético (Duarte et al., 1988).

Os efeitos da dopamina na nocicepção podem depender de sua concentração local. Baixos níveis podem promover efeitos antinociceptivos, enquanto que o aumento da dose de DA promove hiperalgesia em animais. Sabendo disto, utilizamos a DA (10 µg/pata) como agente hiperalgésico e administramos os antagonistas dos receptores D₁ e D₅, em mesma dose utilizada anteriormente, como uma forma de controle positivo. O observado foi que estes antagonistas foram capazes de reverter a hiperalgesia mediada por altas doses de DA. Como esperado, estes resultados demonstram a participação dos receptores da família D1 na nocicepção. Embora os receptores D1 sejam expressos em maior quantidade que os receptores D₂, os receptores D₂ apresentam maior afinidade, sendo ativados por concentrações mais baixas de dopamina. Portanto, baixas doses de DA podem

ativar os receptores antinociceptivos do tipo D2, enquanto altos níveis ativam os receptores pró-nociceptivos do tipo D1 (Paulus & Trenkwalder, 2006).

No Sistema Nervoso Central (SNC), a ativação de receptores D2 e a atividade antinociceptiva derivada desta ativação é amplamente relacionada à liberação de opioides endógenos. Anatomicamente, os sistemas opioidérgicos e dopaminérgicos estão intimamente relacionados (Khachaturian & Watson, 1982). Do ponto de vista fisiológico, os opioides podem influenciar na liberação de dopamina (Wood et al., 1980; Wood, 1983; Wood & Pasternak, 1983). Em conformidade, pesquisas demonstram que o agonista do receptor D2 - RU24926 - promove antinocicepção em camundongos e esta resposta é bloqueada por antagonistas deste receptor e pelo antagonista opioide naloxona (Michael-Titus et al., 1990; Suaudeau & Costentin, 1995). Os efeitos de agonistas opioides se fazem via ativação de seus receptores. Estes receptores são acoplados à proteína G_i e conseqüentemente, diminuem os níveis de AMPc intracelular, impedindo a ação dos canais para cálcio voltagem dependentes, atenuando, desta forma, a excitabilidade neuronal (Kieffer et al., 2002).

Pelo exposto acima, nosso próximo passo foi avaliar a participação do sistema opioide endógeno na antinocicepção periférica mediada pela dopamina, especificamente quais os receptores e ligantes opioides endógenos teriam envolvimento no processo avaliado. Em nossos experimentos, observou-se que a administração de naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opioides, previamente à administração de DA, promoveu reversão da antinocicepção periférica induzida por esta amina. Para avaliar os receptores de forma mais específica, utilizamos antagonistas seletivos. Os antagonistas para os receptores κ e δ promoveram a reversão total dessa antinocicepção. De fato, existem evidências experimentais de que a ativação de receptores κ e δ -opioides produz analgesia periférica, que também é dependente da produção de NO (Pacheco et al., 2005; Funez et al., 2008). De forma contrária, o antagonista seletivo do receptor μ não alterou significativamente a antinocicepção mediada pela dopamina. No entanto, o CTOP, antagonista utilizado, em mesma dose, foi capaz de reverter a ação antinociceptiva periférica do agonista μ opioide DAMGO (Zambelli et al., 2014).

Desta forma, podemos sugerir que a dopamina, para promover seus efeitos antinociceptivos periféricos, em nosso modelo, parece não interagir com receptores opioides do tipo μ , mas sim com receptores do tipo κ e δ . De fato, o receptor μ -opioide está relacionado com a maioria dos efeitos adversos produzidos por seus agonistas. Dentre eles estão a depressão respiratória, além de tolerância e dependência (Jaffe & Martin, 1996; Aley & Levine, 1997; Ossipov et al., 2003; Merrer et al., 2009). Já foi demonstrado que a ativação de receptores κ e δ -opioides produz analgesia periférica, levando a efeitos adversos de forma limitada (Rapaka & Porreca, 1991). O desenvolvimento de analgésicos potentes desprovidos dos efeitos adversos limitantes tem sido objetivo de diversas linhas de pesquisa.

Os receptores opioides são ativados por um conjunto de peptídeos chamados de opioides endógenos. Eles variam não apenas na sua especificidade para receptores, mas também na sua eficácia sobre os diferentes tipos de receptores. Até o momento foram identificadas as endorfinas, encefalinas e dinorfinas, todas estas amplamente distribuídas pelo SNC e periférico (Hughes et al., 1975; Van Ree et al., 2000). Para avaliar se a dopamina apresenta a capacidade de recrutar estas moléculas com função analgésica, utilizamos a Bestatina, um inibidor das encefalinases que degradam os peptídeos opioides. De forma esperada, nossos dados demonstram que a antinocicepção periférica promovida por DA (5 ng/pata) foi potencializada pela injeção de Bestatina, sugerindo a participação dos opioides endógenos nesta antinocicepção. Tendo em vista que os diferentes peptídeos opioides mostram certa preferência pelos diferentes receptores, pelos resultados obtidos podemos inferir que, em nosso modelo de estudo, os opioides relacionados a antinocicepção dopaminérgica seriam as encefalinas e dinorfinas, visto que estas são capazes de ativar os receptores δ e κ -opioide, envolvidos na antinocicepção da DA (Dhawan et al., 1996; Stein et al., 2009). Por exclusão, já que não houve participação dos receptores do tipo μ , a β -endorfina não foi relacionada a este efeito antinociceptivo mediado pela DA.

A associação entre depressão, dor crônica e ansiedade tem se tornado interesse de estudo devido às altas taxas de comorbidade detectadas (McCracken,

et al., 1992; Dersh, et al., 2002). O sistema endocanabinoide têm sido comprovadamente importante como nova estratégia para tratamento de pacientes com dores que não respondem a tratamentos convencionais. Além disso, demonstrou-se que diferentes canabinoides sintéticos e endógenos produzem efeitos antinociceptivos em diferentes espécies animais (Lichtman & Martin, 1991; Calignano et al., 1998). Dentre seus mecanismos analgésicos já descritos, evidências sugerem que os canabinoides podem ativar neurônios dopaminérgicos (Diana et al., 1998; Melis et al. 2000) aumentando a liberação de dopamina. Esses achados mostram que a dopamina pode ter um papel nos efeitos antinociceptivos induzidos por canabinoides. Carta e colaboradores, em 1999, relacionaram os efeitos antinociceptivos do Δ^9 -THC com a ativação concomitante de receptores canabinoides e dopaminérgicos, inferindo que agonistas de receptores de dopamina podem ser úteis para potencializar a analgesia induzida por este sistema.

Dito isto, avaliou-se, em nosso modelo, se a dopamina, para induzir seus efeitos antinociceptivos periféricos, seria capaz de ativar o sistema endocanabinoide. Sabendo que os canabinoides produzem seus efeitos antinociceptivos através dos receptores CB₁ e CB₂ (Lichtman & Martin, 1991), em nossos experimentos, utilizamos os antagonistas AM251 e AM630, e observamos que após administração de DA, os dois tipos de receptores em questão foram ativados. Esta ativação é feita através de ligantes endógenos, dentre os mais importantes a anandamida (AEA) e o 2-AG. A anandamida é hidrolisada pela enzima FAAH, localizada em neurônios pós-sinápticos (Seierstad & Breitenbucher, 2008), tendo como produtos o ácido araquidônico e a etanolamina (Di Marzo, 1994). Já o 2-AG é hidrolisado pela MAGL, presente em neurônios pré-sinápticos (Dinh et al., 2002; Guindon & Hohmann, 2009), tendo como produtos o ácido graxo e glicerol. Inibidores seletivos de FAAH ou MGL apresentam a característica de potencializar a ativação de receptores CB, aumentando os níveis cerebrais de endocanabinoides (Moreira et al., 2008). Dessa forma, utilizamos esta ferramenta farmacológica para investigar se os endocanabinoides AEA e 2-AG, estariam envolvidos no evento estudado.

O VDM11, inibidor do transportador de anandamida (De Petrocellis et al., 2000), e o MAFP, inibidor irreversível da enzima FAAH (Deutsch et al., 1997), quando administrados em conjunto com uma dose submáxima de DA que causa antinocicepção de forma intermediária, não foram capazes de incrementar o limiar nociceptivo dos animais, contrariando dados da literatura que demonstraram que a liberação de anandamida foi aumentada oito vezes no estriado dorsal de ratos em relação ao nível normal, após administração local de quinpirol, um agonista do receptor de dopamina do tipo D2 (Giuffrida et al., 1999). No entanto, MAFP e VDM11 foram utilizados, em mesma dose, com sucesso pelo nosso grupo de pesquisa, sendo capazes de potencializar a ação antinociceptiva periférica mediada pelo resveratrol (Oliveira et al., 2019).

Por outro lado, o JZL184, um inibidor da MAGL (Long et al., 2009), promoveu a potencialização da antinocicepção periférica induzida pela DA, sugerindo que o endocanabinoide 2-AG deve ser o principal responsável pela ativação dos dois receptores CB, quando da administração de dopamina, e sugerindo que a anandamina parece não estar envolvida neste processo, em consonância com Pertwee & Ross (2002), que descreveram dupla afinidade do endocanabinoide 2-AG.

Além dos sistemas opioide e endocanabinoide, o proposto trabalho teve como objetivo avaliar a participação da via L-arginina/NO/GMPc na antinocicepção mediada pela DA, uma vez que opioides (Rodrigues & Duarte, 2000; Pacheco et al., 2005) e canabinoides (Reis et al., 2011; Romero et al., 2012) induzem antinocicepção periférica também pela ativação desta via. Diversos trabalhos demonstram que efeitos analgésicos de variadas substâncias podem ser dependentes da ação do óxido nítrico (NO) (Ferreira et al., 1991; Maegawa & Tonussi, 2003; Pacheco et al., 2005; Reis et al., 2009; Romero et al., 2012).

A biossíntese de NO é regulada por uma classe de enzimas chamadas de óxido nítrico sintases (NOS). Estudos prévios têm demonstrado a localização tanto periférica, quanto central destas enzimas (Förstermann et al., 1998; Freire et al., 2009). Para avaliar a participação do NO em nosso modelo, utilizamos um inibidor

não seletivo das enzimas NOS. O N^G-Nitro-L-arginina (L-NOArg), análogo da L-arginina inibe competitivamente as enzimas NOS, e assim bloqueia a síntese de NO (Iacopucci et al., 2012). Nossos resultados demonstram que o bloqueio das NOSs preveniu a antinocicepção periférica da DA, sugerindo o envolvimento desse tipo enzimático no efeito antinociceptivo associado a DA.

Estas enzimas são subdivididas, de acordo com sua localização, em neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS), sendo as três isoformas localizadas periféricamente. Portanto, para avaliar especificamente quais dos subtipos enzimáticos estariam sintetizando NO, em nosso modelo, foram utilizados inibidores específicos para cada uma das enzimas. O inibidor L-NPA, responsável por inativar a enzima NOS do tipo neuronal, foi o único capaz de reverter a antinocicepção mediada pela DA, enquanto que os inibidores L-NIL e L-NIO, responsáveis por inibir as enzimas NO-sintase induzível e NO-sintase endotelial, respectivamente, não promoveram alteração no limiar nociceptivo dos camundongos tratados com DA. É importante salientar que os inibidores L-NIL e L-NIO, administrados em mesma dose, foram capazes de reverter a antinocicepção mediada pelos ácidos epoxieicosatrienólicos (EETs) em modelo de nocicepção periférica em camundongos (dados em fase de publicação) realizado por nosso grupo de pesquisa.

O NO produzido interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GC), acarretando uma alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa. Com o intuito de investigar se a DA é capaz de induzir indiretamente a ativação desta enzima, utilizamos o ODQ. Este inibidor foi capaz de reverter a antinocicepção mediada pela DA, demonstrando que a dopamina é capaz de induzir a síntese de NO, com consequente ativação dessa enzima. A GC, responsável por catalisar a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento desse segundo mensageiro está relacionado com o efeito antinociceptivo periférico de vários analgésicos opioides (Ferreira et al., 1991; Duarte et al., 1992).

O nucleotídeo GMPc é rapidamente degradado por uma fosfodiesterase específica (Rybalkin et al., 2002). Substâncias que inibem a fosfodiesterase

específica para GMPc podem prevenir a degradação do mesmo, prolongando assim seus efeitos (Duarte & Ferreira, 1992). Nesse contexto, utilizamos um inibidor da fosfodiesterase GMPc específica, o Zaprinast, para avaliar o envolvimento do GMPc na antinocicepção periférica da DA. A administração desse inibidor resultou na potencialização da antinocicepção induzida pela DA (5 ng/pata). Portanto, os resultados sugerem que essa amina aumenta os níveis de NO, sintetizado pela ação da enzima nNOS, com consequente ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e aumento dos níveis de GMPc, em nosso modelo.

O segundo mensageiro GMPc, depois de sintetizado, promove diversos efeitos, dentre eles a fosforilação da proteína kinase G (PKG), que por conseguinte, estimula a abertura de canais para potássio. O efluxo de potássio gerado por essa cascata de sinalização dificulta o processo de despolarização celular, e por consequência, diminui a excitabilidade neuronal, suprimindo a transmissão da informação nociceptiva (Duarte et al., 1990; Duarte et al., 1992). O efeito antinociceptivo promovido pela ativação da via L-arginina/NO/GMPc está frequentemente relacionado com a abertura de diferentes tipos de canais para potássio. Diversos estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa têm demonstrado a relação entre a ativação desta via e dos canais para potássio promovendo antinocicepção periférica (Soares et al., 2000; Rodrigues & Duarte, 2000; Soares & Duarte, 2001). Sabe-se que os receptores de dopamina do tipo D2 ativam os canais para K⁺ nas células da hipófise (Einhorn et al., 1991). Estes mesmos receptores são capazes de mediar a hiperpolarização da membrana, ativando a condutância de K⁺ em neurônios contendo dopamina na substância negra (Lacey et al., 1987), e como consequência, ocorre a inibição do disparo celular (Bunney et al., 1973).

No presente estudo avaliamos se a atividade antinociceptiva provocada pela DA dependia da ativação de algum dos tipos de canais para potássio. Após a administração de bloqueadores específicos para os diferentes tipos de canais avaliados, sugerimos que a atividade antinociceptiva periférica da dopamina é dependente da ativação dos canais para potássio dependentes de voltagem (Tetraetilamônio), além dos canais para potássio ativados por cálcio de baixa

condutância (Dequalínio). Wolfart e colaboradores, em 2001, demonstraram que a dopamina tem a capacidade de interagir com canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância para promover seus efeitos. Por outro lado, os bloqueadores seletivos dos canais para K^+ sensíveis ao ATP (Glibenclamida) e dos canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância (Paxilina), não promoveram mudança no efeito antinociceptivo periférico induzido pela DA. É importante ressaltar que as doses avaliadas nesses experimentos já foram anteriormente testadas, com sucesso, pelo nosso grupo de pesquisa, mostrando que a Glibenclamida foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo periférico da ketamina (Romero & Duarte, 2013), da palmitoletanolamina (Romero & Duarte, 2012) e da dipirona (Alves & Duarte, 2002).

Como conclusão (Figura 42), nossos dados indicam que a dopamina parece ser capaz de induzir antinocicepção periférica, em camundongos. Este efeito é comprovadamente mediado pela ativação dos receptores dopaminérgicos da família D2. Além disso, sugerimos a participação dos receptores da família D1 na hiperalgesia mediada por esta amina. Para produzir seu efeito antinociceptivo a dopamina foi capaz de promover a ativação de receptores opioides (κ e δ) e canabinoides (CB_1 e CB_2), pela consequente liberação de peptídeos opioides endógenos (encefalina e dinorfina) e endocanabinoides (2-AG).

Além disso, a dopamina parece ativar a via L-arginina/NO/GMPc, promovendo antinocicepção, através da síntese de NO pela enzima nNOS. Também observamos em nosso estudo que a DA promoveu a ativação da enzima GC e aumento dos níveis do segundo mensageiro GMPc. Adicionalmente, a antinocicepção periférica mediada pela DA parece estar relacionada à abertura de canais para potássio dependentes de voltagem e canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância. Este estudo demonstrou a interação que a dopamina faz com sistemas analgésicos endógenos para modular a resposta antinociceptiva, a nível periférico, e o envolvimento desses mecanismos mostra uma promessa considerável para dissociar os efeitos terapêuticos dos efeitos adversos indesejados do SNC.

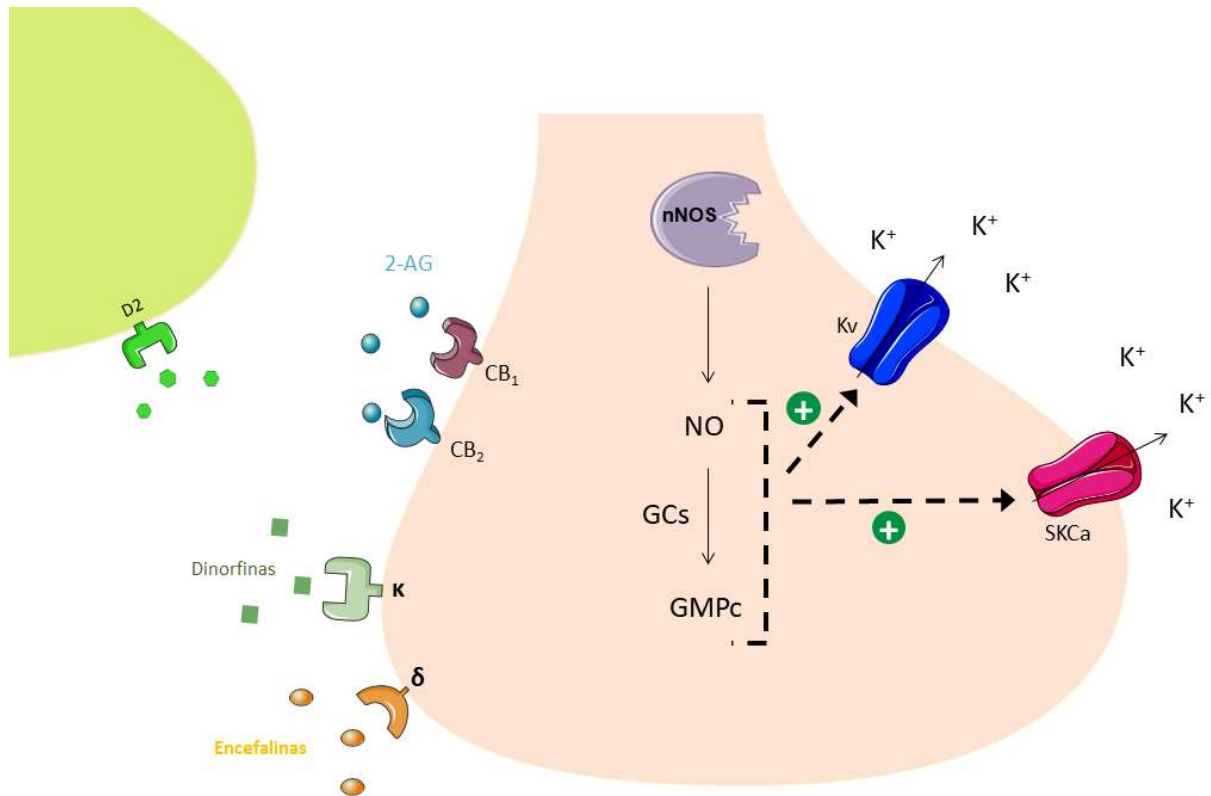


Figura 42. Representação esquemática dos supostos mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva periférica da dopamina: Dopamina, para promover seus efeitos antinociceptivos periféricos, ativa receptores dopaminérgicos do tipo D2, com conseqüente liberação de encefalinas, dinorfinas e 2-AG que, por sua vez, promovem ativação, respectivamente, de receptores opioides δ e κ , além dos receptores canabinoides CB₁ e CB₂. A ativação da oxido nítrico sintase neuronal inicia a via L-arginina/NO/GMPc, promovendo ativação da enzima Guanilato ciclase solúvel e aumento dos níveis do segundo mensageiro GMPc, com conseqüente abertura de canais para potássio dependentes de voltagem e canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância.

REFERÊNCIAS

Adams, I. B.; Martin B. R. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*, v.91(11), p.1585-1614, 1996.

Agarwal, N.; Pacher, P.; Tegeder, I.; Amaya, F.; Constantin, C. E.; Brenner, G. J.; Rubino, T.; Michalski, C. W.; Marsicano, G.; Monory, K.; Mackie, K.; Marian, C.; Batkai, S.; Parolaro, D.; Fischer, M. J.; Reeh, P.; Kunos, G.; Kress, M.; Lutz, B.; Woolf, C. J.; Kuner, R. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nature Neuroscience*, v.10, p.870–879, 2007.

Aghajanian, G. K.; Wang, Y. Y. Pertussis toxin blocks the outward currents evoked by opiate and $\alpha 2$ agonists in locus coeruleus neurons. *Brain Research*, v.371, p.390-394, 1986.

Aguilera, G.; Catt, K. J. Dopaminergic Modulation of Aldosterone Secretion in the Rat. *Endocrinology*, v.114(1), p.176–181, 1984.

Aley, K. O.; Levine, J. D. Different Mechanisms Mediate Development and Expression of Tolerance and Dependence for Peripheral μ -Opioid Antinociception in Rat. *The Journal of Neuroscience*, v.17(20), p.8018–8023, 1997.

Alkhadi, K. A.; Sabouni, M. H.; Lokhandwala, M. F. Characterization of dopamine-receptors in a mammalian sympathetic-ganglion. *Federation Proceedings*, v.43, p.1094 (abstract), 1984.

Almeida, T. F.; Roizenblatt, S.; Tufik, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research*, v.1000(1-2), p.40-56, 2004.

Almeida-Santos, A.; Ferreira, R. C. M.; Duarte, I. D.; Aguiar, D. C.; Romero, T. R. L.; Moreira, F. A. The antipsychotic aripiprazole induces antinociceptive effects: Possible role of peripheral dopamine D2 and serotonin 5-HT1A receptors. *European Journal of Pharmacology*, v.765, p.300-306, 2015.

Altier, N.; Stewart, J. The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia. *Life Sciences*, v.65(22), p.2269–2287, 1999.

Alves, D. P.; Da Motta, P. G.; Lima, P. P.; Queiroz-Junior, C. M.; Caliari, M. V.; Pacheco, D. F., Pacheco, C. F.; Francischi, J. N.; Duarte, I. D. Inflammation mobilizes local resources to control hyperalgesia: the role of endogenous opioid peptides. *Pharmacology*, v.89, p.22–28, 2012.

Alves, D. P.; Duarte, I. D. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrrone. *European Journal of Pharmacology*, v.444, p.47–52, 2002.

Anastas, T. M.; Meints, S. M.; Gleckman, A. D.; Hirsh, A. T. Social Influences on Peer Judgments about Chronic Pain and Disability. *Journal of Pain*, p.1–8, 2019.

Baraka, A. Historical aspects of opium. *Middle East Journal of Anaesthesiology*, v.6(5), p.289-302, 1982.

Basbaum, A. I.; Bautista, D. M.; Scherrer, G.; Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, v.139, p.267-284, 2009.

Basbaum, A. I.; Fields, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, v.7, p.309–338, 1984.

Baune, B. T.; Caniato, R. N.; Garcia-Alcaraz, M. A.; Berger, K. Combined effects of major depression, pain and somatic disorders on general functioning in the general adult population. *Pain*, v.138(2), p.310–317, 2008.

Benarroch, E. E. Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. *Neurology*, v.71, p.217–21, 2008.

Bertrand, A.; Weil-Fugazza, J. Sympathectomy does not modify the levels of dopa or dopamine in the rat dorsal root ganglia. *Brain Research.*, v.681, p.201–204, 1995.

Besson, J. M. The neurobiology of pain. *The Lancet*, v.353(9164), p.1610–15, 1999.

Binder, W.; Mousa, S. A.; Sitte, N.; Kaiser, M.; Stein, C.; Schafer, M. Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. *European Journal of Neuroscience*, v.20(1), p.92–100, 2004.

Bingham, S.; Davey, P. T.; Sammons, M.; Raval, P.; Overend, P.; Parsons, A. A. Inhibition of Inflammation-Induced Thermal Hypersensitivity by Sumatriptan through Activation of 5-HT_{1B/1D} Receptors. *Experimental Neurology*, v.167(1) p.65–73, 2001.

Björklund, A.; Dunnett, S. B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences*, v.30, p.194–202, 2007.

Bodnar, R. J.; Klein, G. E. Endogenous opiates and behavior: 2005. *Peptides*, v.27(12), p.3391–3478, 2006.

Borowsky, B.; Hoff, B. J. Neurotransmitter transporters: molecular biology, function, and regulation. *International Review of Neurobiology*, v.38, p.139–199, 1995.

Bourgoin, S.; Pohl, M.; Mauborgne, A.; Benoliel, J. J.; Collin, E.; Hamon, M.; Cesselin, F. Monoaminergic control of the release of calcitonin gene-related peptide and substance P-like materials from rat spinal cord slices. *Neuropharmacology*, v.32, p.633–640, 1993.

Bredt, D. S.; Snyder, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.86(22), p.9030-9033, 1989.

Brownstein, M. J. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.90(12), p.5391-5393, 1993.

Bunney, B. S.; Walters, J. R.; Roth, R. H.; Aghajanian, G. K. Dopaminergic neurons: effect of antipsychotic drugs and amphetamine on single cell activity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.185(3), p.560-571, 1973.

Butarelli, F. R.; Fanciulli, A.; Pellicano, C.; Pontieri, F. E. The Dopaminergic System in Peripheral Blood Lymphocytes: From Physiology to Pharmacology and Potential Applications to Neuropsychiatric Disorders. *Current Neuropharmacology*, v.9, p.278-288, 2011.

Calignano, A.; La Rana, G.; Giuffrida, A.; Piomelli, D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, v.394, p.277–281, 1998.

Cao, C.; Matsumura, K.; Yamagata, K. Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain. Its possible role in the febrile response. *Brain Research*, v.697, p.187-196, 1995.

Carey, R. M. Renal Dopamine System. *Hypertension*, v.38(3), p.297–302, 2001.

Carey, R. M.; Thorner, M. O.; Ortt, E. M. Effects of metoclopramide and bromocriptine on the renin-angiotensin-aldosterone system in man. Dopaminergic control of aldosterone. *The Journal of Clinical Investigation*, v.63(4), p.727-35, 1979.

Carlsson, A.; Jndqvist, M. Effect of chlorpromazine and haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, v.20, p.140-144, 1963.

Carta, G.; Gessa, G. L.; Nava, F. Dopamine D receptor antagonists prevent 2 D9-tetrahydrocannabinol-induced antinociception in rats. *European Journal of Pharmacology*, v.384, p.153–156, 1999.

Cesare, P.; Mcnaughton, P. Peripheral pain mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, v.7, p.493-499, 1997.

Chen, Y.; Boettger, M. K.; Reif, A.; Schmitt, A.; Uceyler, N.; Sommer, C. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. *Molecular Pain*, v.6, p.13, 2010.

Clark, J. D.; Tempel, B. L. Hyperalgesia in mice lacking the Kv1.1 potassium channel gene. *Neuroscience Letters*, v.251, p.121–124, 1998.

Cobachoa, N.; Calleb, J. L.; Paínoa, C. L. Dopaminergic modulation of neuropathic pain: Analgesia in rats by a D2-type receptor agonist. *Brain Research Bulletin*, v.106, p.62–71, 2014.

Cohen, M.; Quintner, J.; Rysewyk, S. Reconsidering the International Association for the Study of Pain definition of pain. *Pain Reports*, v.3(2), p.643, 2018.

Connell, A. M.; George, J. D. Effect of metoclopramide on gastric function in man. *Gut*, v.10, p.678-680, 1969.

Cools, A. R.; Van Rossum, J. M. Excitation-mediating and inhibition-mediating dopamine-receptors: A new concept towards a better understanding of electrophysiological, biochemical, pharmacological, functional and clinical data. *Psychopharmacologia*, v.45, p.243-254, 1976.

Cota, D.; Marsicano, G.; Tschop, M.; Grubler, Y.; Flachskamm, C.; Schubert, M.; Auer, D.; Yassouridis, A.; Thöne-Reineke, C.; Ortman, S.; Tomassoni, F.; Cervino, C.; Nisoli, E.; Linthorst, A. C.; Pasquali, R.; Lutz, B.; Stalla, G. K.; Pagotto, U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, v.112, p.423–431, 2003.

de Carle, O. J.; Christensen, J. A dopamine receptor in esophageal smooth muscle of the opossum. *Gastroenterology*, v.70, p.216-219, 1976.

De Felice, M.; Ossipov, M. H. Cortical and subcortical modulation of pain. *Pain Management*, v.6(2), p.111–120, 2016.

Deguchi, T. Endogenous activating factor for guanylate cyclase in synaptosomal soluble fraction of rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*, v.252, p.7617-7619, 1977.

Demchyshyn, L. L.; Sugamori, K. S.; Lee, F. J.; Hamadanizadeh, A. S.; Niznik, H. B. The dopamine D1 receptor. Cloning and characterization of three pharmacologically distinct D1-like receptors from Gallus Domesticus. *The Journal of Biological Chemistry*, v.270, p.4005-4012, 1995.

Denda, M.; Nakatani, M.; Ikeyama, K.; Tsutsumi, M.; Denda, S. Epidermal keratinocytes as the forefront of the sensory system. *Experimental Dermatology*, v.16(3), p.157–161, 2007.

Dennis, S. G.; Melzack, R. Effects of cholinergic and dopaminergic agents on pain and morphine analgesia measured by three pain tests. *Experimental Neurology*, v.81, p.167–176, 1983.

De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.23(1), p.1–15, 2009.

De Petrocellis, L.; Bisogno, T.; Davis, J. B.; Pertwee, R. G.; Di Marzo, V. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Letters*, v.483, p.52–56, 2000.

Dersh, P. B.; Polatin, R. J.; Gatchel, L. REVIEW chronic pain and psychopathology: research findings and theoretical considerations. *Psychosomatic Medicine*, v.82(2), p.126-137, 2002.

Deutsch, D. G.; Omeir, R.; Arreaza, G.; Salehani, D.; Prestwich, G. D.; Huang, Z.; Howlett, A. Methyl arachidonyl fluorophosphonate: a potent irreversible inhibitor of anandamide amidase. *Biochemical Pharmacology*, v.53(3), p.255-60, 1997.

Devane, W. A.; Dysarz, F. A.; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; Howlett, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, v.34, p.605–613, 1988.

Devane, W. A. L.; Hanus, L.; Breuer, A.; Roger, G.; Pertwee, L. A.; Stevenson, L. A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, v.258(5090), p.1946–1949, 1992.

Diana, M.; Melis, M.; Muntoni, A. L.; Gessa, G. L. Mesolimbic dopaminergic decline after cannabinoid withdrawal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.95(17), p.10269–10273, 1998.

Dias, E. V.; Sartori, C. R.; Mariaio, P. R.; Vieira, A. S.; Camargo, L. C.; Athie, M. C.; Pagliusi, M. O.; Tambeli, C. H.; Parada, C. A. Nucleus accumbens dopaminergic neurotransmission switches its modulatory action in chronification of inflammatory hyperalgesia. *European Journal of Neuroscience*, v.42, p.2380–2389, 2015.

Di Marzo, V.; De Petrocellis L. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annual Review of Medicine*, v.57, p.553–574, 2006.

Di Marzo, V.; Fontana, A.; Cadas, H.; Schinelli, S.; Cimino, G.; Schwartz, J. C.; Piomelli, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, v.372(6507), p.686-91, 1994.

Dieb, W.; Ouachikh, O.; Durif, F.; Hafidi A. Nigrostriatal dopaminergic depletion produces orofacial tactile mechanical allodynia. *European Journal of Pain*, v.20, p.196–205, 2016.

Dinh, T. P.; Freund, T. F.; Piomelli, D. A role for monoglyceride lipase in 2 arachidonoylglycerol inactivation. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.121(1-2), p.149-158, 2002.

Diniz, D. A.; Petrocchi, J. A.; Navarro, L. C.; Souza, T. C.; Castor, M. G. M.; Perez, A. C.; Duarte, I. D.; Romero, T. R. L. Serotonin induces peripheral mechanical antihyperalgesic effects in mice. *European Journal of Pharmacology*, v.767, p.94–97, 2015.

Dhawan, B. N.; Cesselin, F.; Raghbir, R.; Reisine, T.; Bradley, P. B.; Portoghese, P. S.; Hamon, M. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacological Reviews*, v.48(4), p.567-92, 1996.

Duarte, I. D. G.; Alves, D. Involvement of ATP-sensitive potassium channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron. *European Journal of Pharmacology*, v.444(1), p.47-52, 2002.

Duarte, I. D. G.; Ferreira, S. H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *European Journal of Pharmacology*, v.221(1), p.171-174, 1992.

Duarte, I. D. G.; Lorenzetti, B. B.; Ferreira, S. H. Peripheral analgesia and activation of nitric oxide-cyclic GMP pathway. *European Journal of Pharmacology*, v.186(1), p.289-293, 1990.

Duarte, I. D. G.; Rodrigues, A. R. A. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive potassium channels. *British Journal of Pharmacology*, v.129(1), p.110-114, 2000.

Duarte, I. D. G.; Soares, A. C. Dibuttyryl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K⁺ channels in the PGE (2)- induced hyperalgesic paw. *British Journal of Pharmacology*, v.134(1) p.127-131, 2001.

Duarte, I. D. G.; Soares, A. C.; Tatsuo, M. A. F.; Leite, R. Activation of ATP-sensitive K⁺ channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the NO donor, sodium nitroprusside. *European Journal of Pharmacology*, v.400, p.67-71, 2000.

Duarte, I. D. G.; Dos Santos, I. R.; Lorenzetti, B. B.; Ferreira, S. H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *European Journal of Pharmacology*, v.217, p.225-227, 1992.

Duarte, I. D. G.; Ferreira, S. H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *European Journal of Pharmacology*, v.221(1), p.171-174, 1992.

Duarte, I. D. G.; Lorenzetti, B. B.; Ferreira, S. H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway, *European Journal of Pharmacology*, v.186, p.289-293, 1990.

Duarte, I. D. G.; Nakamura, M.; Ferreira, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.21(2), p.341-343, 1988.

Dubin, A. E; Patapoutian, A. Review series Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation*, v.120(11), p.3760-3772, 2010.

Dupont, A. G.; Lefebvre, R. A.; Bogaert, M. G. Identification and Characterization of Peripheral Neuronal Dopamine Receptors in the Rat. *Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice*, v.9(5-6), p.913-929, 1987.

Einhorn, L. C.; Gregerson, K. A.; Oxford, G. S. D2 Dopamine receptor activation of potassium channels in identified rat lactotrophs: wholecell and single-channel recording. *The Journal of Neuroscience*, v.11(12), p.3727-3737, 1991.

Emilien, G. Dopamine receptors - physiological understanding to therapeutic intervention potential. *Pharmacology & Therapeutics*, v.84(2), p.133-156, 1999.

Enyedi, P.; Czirják, G. Molecular Background of Leak K⁺ Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels. *Physiological Reviews*, v.90(2), p.559-605, 2010.

Esplugues, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. *British Journal of Pharmacology*, v.135, p.1079–1095, 2002.

Etevinho, M. F.; Fortunato, J. M. S. Dopamina e Receptores. *Revista Portuguesa de Psicossomática*, v.5, p.21-31, 2003.

Farquhar-Smith, W. P.; Egertová, M.; Bradbury, E. J.; McMahon, S. B.; Rice, A. S.; Elphick, M. R. Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v.15, p.510–521, 2000.

Ferreira, R. C. M.; Almeida-Santos, A. F.; Duarte, I. D. G.; Aguiar, D. C.; Moreira, F. A.; Romero, T. R. L. Role of Endocannabinoid System in the Peripheral Antinociceptive Action of Aripiprazole. *Anesthesia & Analgesia*, v.129, p.1-268, 2018.

Ferreira, S. H.; Duarte, I. D.; Lorenzetti, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *European Journal of Pharmacology*, v.201, p.121-122, 1991.

Ferrendelli, J. A.; Chang, M. M.; Kinscherf, D. A. Elevation of cyclic GMP levels in central nervous system by excitatory and inhibitory amino acids. *Journal of Neurochemistry*, v.22(4), p.535–540, 1974.

Fichna, J.; Janecka, A.; Costentin, J.; Do Rego, J.-C. The Endomorphin System and Its Evolving Neurophysiological Role. *Pharmacological Reviews*, v.59(1), p.88–123, 2007.

Fleetwood-Walker, S. M.; Hope, P. J.; Mitchell, R. Antinociceptive actions of descending dopaminergic tracts on cat and rat dorsal horn somatosensory neurones. *The Journal of Physiology*, v.399, p.335–348, 1988.

Förstermann, U.; Boissel, J.; Kleinert, H. Expressional control of the “constitutive” isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *The FASEB Journal*, v.12(10), p.773–790, 1998.

Forstermann, U.; Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, v.33(7), p.829–837, 2011.

Freire, M. A.; Guimaraes, J. S.; Leal, W. G.; Pereira, A. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. *Frontiers in Neuroscience*, v.3, p.175–181, 2009.

Frick, S.; Kramell, R.; Schmidt, J.; Fist, A. J.; Kutchan, T. M. Comparative qualitative and quantitative determination of alkaloids in narcotic and condiment *Papaver somniferum* cultivars. *Journal of Natural Products*, v.68(5), p.666-673, 2005.

Frussa-Filho, R.; Rocha, J. B.; Conceicao, I. M.; Mello, C. F.; Pereira, M. E. Effects of dopaminergic agente sonvisceral pain measured by the mouse writhing test. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, v.331(1), p.74–93, 1996.

Funez, M. I.; Ferrari, L. F.; Duarte, D. B.; Sachs, D.; Cunha, F. Q.; Lorenzetti, B. B.; Ferreira, S. H. Teleantagonism: A pharmacodynamic property of the primary nociceptive neuron. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.105(49), p.19038–19043, 2008.

Fuziwara, S.; Suzuki, A.; Inoue, K.; Denda, M. Dopamine D2-like receptor agonists accelerate barrier repair and inhibit the epidermal hyperplasia induced by barrier disruption. *Journal of Investigative Dermatology*, v.125, p.783–789, 2005.

Galeotti, N.; Ghelardini, C.; Capaccioli, S.; Quattrone, A.; Nicolini, A.; Bartolini, A. Blockade of clomipramine and amitriptyline analgesia by an antisense oligonucleotide to mKv1.1, a mouse Shakerlike K⁺ channel. *European Journal of Pharmacology*, v.330, p.15–25, 1997.

Galiègue, S.; Mary, S.; Marchand, J.; Dussossoy, D.; Carrière, D.; Carayon, P.; Bouaboula, M.; Shire, D.; Le Fur, G.; Casellas, P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European Journal of Biochemistry*, v.232, p.54–61, 1995.

Gaoni, Y.; Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, v.86(8), p.1646–1647, 1964.

Garcia, J. B. S.; Cardoso, M. G. de M.; Dos-Santos, M. C. Opioids and the Immune System: Clinical Relevance. *Brazilian Journal of Anesthesiology*, v.62(5), p.709–718, 2012.

Garrick, N. A.; Murphy, D. L. Differences in the preferential deamination of *l*-norepinephrine, dopamine and serotonin by MAO in rodent and primate brains. In: Usdin E, Weiner N, Youdim MBH (eds) *Function and regulation of monoamine enzymes. Basic and clinical aspects*, p.517–525, 1981.

Gebhart, G. F. Descending modulation of pain. *Neuroscience and Biobehavioral*, v.27, p.729–737, 2004.

Gewaltig, M. T.; Kojda, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovascular Research*, v.55, p.250–60, 2002.

Giuffrida, A.; Parsons, L. H.; Kerr, T. M.; Rodriguez de Fonseca, F.; Navarro M.; Piomelli, D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nature Neuroscience*, v.2, p.358–363, 1999.

Goldberg, L. I. Cardiovascular and renal actions of dopamine: potential applications. *Pharmacological Reviews*, v.24, p.1–29, 1972.

Goldberg, L. I.; Toda, N. Dopamine induced relaxation of isolated canine renal, mesenteric, and femoral arteries contracted with prostaglandin F₂-alpha. *Circulation Research*, v.36(6), p.97–102, 1975.

Goldberg, L. I.; Volkman, P. H.; Kohli, J. D. A Comparison of the Vascular Dopamine Receptor with Other Dopamine Receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v,18(1), p.57–79, 1978.

Goldstein, A.; Tachibana, S.; Lowney, L. I.; Hunkapiller, M.; Hood, L. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.76(12), p.6666–6670, 1979.

Goldstein, D. S., Eisenhofer, G.; Kopin, I. J. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.305, p.800–811, 2003.

Gonzalez-Rios, F.; Vlaičulescu, A.; Ben Natan, L.; Protais, P.; Costentin, J. Dissociated effects of apomorphine on various nociceptive responses in mice. *Journal of Neural Transmission*, v.67, p.87-103, 1986.

Granados-Soto, V.; Argüelles, C. F.; Rocha-González, H. I.; Godínez-Chaparro, B.; Flores-Murrieta, F. J.; Villalón, C. M. The role of peripheral 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats. *Neuroscience*, v.165(2), p.561–568, 2010.

Guindon, J.; Hohmann, A. G. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, v.8(6), p.403-21, 2009.

Gutman, G. A.; Chandy, K. G.; Grissmer, S.; Lazdunski, M.; Mckinnon, D.; Pardo, L. A.; Robertson, G. A.; Rudy, B.; Sanguinetti, M. C.; Hmer, W. S.; Wang, X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews*, v.57(4), p.473–508, 2005.

Hagelberg, N.; Forssell, H.; Aalto, S.; Rinne, J. O.; Scheinin, H.; Taiminen, T.; Nagren, K.; Eskola, O.; Jaaskelainen, S.K. Altered dopamine D₂ receptor binding in atypical facial pain. *Pain*, v.106, p.43–48, 2003.

Hantraye, P. Modeling dopamine system dysfunction in experimental animals. *Nuclear Medicine and Biology*, v.25(8), p.721-772, 1998.

Hasudungan, A. (2013), 'Nociceptors - an introduction to pain' (Explains the ascending pathway, very easy to understand), [Youtube Video](#), (accessed 16.1.2020).

Hecke, O. V.; Torrance, N; Smith, B. H. Chronic pain epidemiology and its clinical relevance. *British Journal of Anaesthesia*, v.111(1), p.13–18, 2013.

Herkenham, M. Localization of cannabinoid receptors in brain and periphery. In: Pertwee, R. G., editor. *Cannabinoid receptors*. London: *Academic Press*, p.145–166, 1995.

Herkenham, M.; Lynn, A. B.; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; Costa, B.R.; Rice, K. C. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative

in vitro autoradiographic study. *The Journal of Neuroscience*, v.11(2), p.563–583, 1991.

Hibbs, J. B.; Taintor, R. R.; Vavrin, Z.; Rachlin, E. M. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.157(1), p.87–94, 1988.

Hibbs, J. B.; Vavrin, Z.; Taintor, R. R. L-arginine is required for the expression of the activated metabolic in target cells. *The Journal of Immunology*, v.138, p.550-565, 1987.

Hohmann, A. G.; Herkenham, M. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience*, v.92, p.1171–1175, 1999.

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

Holden, J. E.; Schwartz, E. J.; Proudfit, H. K. Microinjection of morphine in the A7 catecholamine cell group produces opposing effects on nociception that are mediated by alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Neuroscience*, v.91, p.979–990, 1999.

Holstege, G.; Kuypers, H. G. The anatomy of brain stem pathways to the spinal cord in cat: a labeled amino acid tracing study. *Progress in Brain Research*, v.57, p.145–175, 1982.

Hong, Y.; Abbott, F. V. Contribution of peripheral α 1A-adrenoceptors to pain induced by formalin or by α -methyl-5-hydroxytryptamine plus noradrenaline. *European Journal of Pharmacology*, v.301(1-3), p.41–48, 1996.

Howlett, A. C.; Breivogel, C. S.; Childers, S. R.; Deadwyler, S. A.; Hampson, R. E.; Porrino, L. J. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*, v.47(1), p.345–358, 2004.

Hughes, J.; Smith, T. W.; Kosterlitz, H. W. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, v.258, p.577-579, 1975.

Iacopucci, A. P.; Mello, R. O.; Barbosa-Silva, R.; Melo-Thomas, L. LNOarg-induced catalepsy can be influenced by glutamatergic neurotransmission mediated by NMDA receptors in the inferior colliculus. *Behavioural Brain Research*, v.234(2), p.149-154, 2012.

IASP (International Association for the Study of Pain), 1979. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org>>. Acesso em: 22 de Janeiro de 2020.

Jabbur, S. J.; Saadé, N. E. From electrical wiring to plastic neurons: evolving approaches to the study of pain. *Pain*, v.6, p.587-592, 1999.

James, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiological Reviews*, v.59(4), p.533-547, 1995.

Jeffe, J. H.; Martin, W. R. Opioid Analgesics And Antagonists. In: Hardman, J. G.; Gilman, G.; Limbird, L. E.; Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9a ed. New York: The McGraw Hill, p.485-521, 1996.

Jensen, K.; Tuxen, C.; Pedersen-Bjergaard, U.; Jansen, I.; Edvinsson, L.; Olesen, J. Pain, wheal and flare in human forearm skin induced by bradykinin and 5-hydroxytryptamine. *Peptides*, v.11(6), p.1133–1138, 1990.

Jhaveri, M. D.; Sagar, D. R.; Elmes, S. J.; Kendall, D. A.; Chapman, V. Cannabinoid CB₂ receptor-mediated anti-nociception in models of acute and chronic pain. *Molecular Neurobiology*, v.36, p.26–35, 2007.

Jordan, B.; Devi, L. A. Molecular mechanisms of opioid receptors signal transduction, *British Journal of Anaesthesia*, v.81, p.12–19, 1998.

Julius, D.; Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v.413, p.203-210, 2001.

Kaplan, R.; Robinson, C. A.; Scavulli, J. F.; Vaughn, J. H. Propranolol and the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v.23(2), p.253–255, 1980.

Kassuya, C. A.; Ferreira, J.; Claudino, R. F.; Calixto, J. B. Intraplantar PGE₂ causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Br J Pharmacol.*, v.150, n.6, p.727-37, 2007.

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(4), p.1096–1101, 1992.

Kazmi, M. A.; Snyder, L. A.; Cypess, A. M.; Graber, S. G.; Sakmar, T. P. Selective reconstitution of D4 dopamine receptor variants with Gi alpha subtypes. *Biochemistry*, v.39, p.3734-3744, 2000.

Kebabian, J. W.; Calne, D. B. Multiple receptors for dopamine. *Nature*, v.277, p.93-96, 1979.

Khachaturian, H.; Watson, S. J. Some perspectives on monoamine opioid peptide interaction in rat central nervous system. *Brain Research Bulletin*, v.9, p.441–462, 1982.

Kieffer, B. L.; Gavériaux-Ruff, C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in Neurobiology*, v.66(5), p.285–306, 2002.

Kim, D. Fatty acid-sensitive two-pore domain K⁺ channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.24, p.648– 654, 2003.

Kim, J. Y.; Tillu, D. V.; Quinn, T. L.; Mejia, G. L.; Shy, A.; Asiedu, M. N.; Murad, E.; Schumann, A. P.; Totsch, S. K.; Sorge, R. E.; Mantyh, P. W.; Dussor, G.; Price, T. J. Spinal dopaminergic projections control the transition to pathological pain plasticity via D1/D5-mediated mechanism. *Journal of Neuroscience*, v.35, p.6307–6317, 2015.

Klein, M. O.; Battagello, D. S; Cardoso, A. R.; Hauser, D. N.; Bittencourt, J. C.; Correa, R. G. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v.39, p.31–59, 2019.

Knowles, R. G.; Palacios, M.; Palmer, R. M.; Moncada, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.86(13), p.5159–5162, 1989.

Koob, G. F.; Le Moal, M. Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropharmacology*, v.24, p.97-129, 2001.

Kubes, P.; Suzuki, M.; Granger, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.88(11), p.4651–4655, 1991.

Lacey, M. G.; Mercuri, N. B.; North, R. A. Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *The Journal of Physiology*, v.392(1), p.397–416, 1987.

Landberg, L.; James, B. Fisiologia e farmacologia do sistema nervoso autônomo. Harrison et al (14^aed). *Medicina Interna*. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 1998.

Le Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S. W. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, v.53, p.597-652, 2001.

Leeuwen, M. T.; Blyth, F. M.; March, L. M.; Nicholas, M. K.; Cousins, M. J. Chronic pain and reduced work effectiveness: The hidden cost to Australian employers. *European Journal of Pain*, v.10(2), p.161–161, 2006.

Levant, B.; McCarson, K. E. D(3) dopamine receptors in rat spinal cord: implications for sensory and motor function. *Neuroscience Letters*, v.303, p.9–12, 2001.

Lever, I. J.; Rice, A. S. Cannabinoids and pain. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v.177, p.265–306, 2007.

Lichtman, A. H.; Martin, B. R. Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.258(2), p.517-523, 1991.

Lin, M. T.; Wu, J. J.; Chandra, A.; Tsay, B. L. Activation of striatal dopamine receptors induces pain inhibition in rats. *Journal of Neural Transmission*, v.51, p.213–222, 1981.

Liu, S.; Tanga, Y.; Shua, H.; Tatum, D.; Baia, Q.; Crawford, J.; Xing, Y.; Lobo, M. K.; Bellinger, L.; Kramer, P.; Tao, F. Dopamine receptor D2, but not D1, mediates descending dopaminergic pathway-produced analgesic effect in a trigeminal neuropathic pain mouse model. *Pain*, v. 160, p. 334–344, 2019.

Long, J. Z.; Li, W.; Booker, L.; Burston, J. J.; Kinsey, S. G.; Schlosburg, J. E.; Pavón, F. J.; Serrano, A. M.; Selley, D. E.; Parsons, L. H.; Lichtman, A. H.; Cravatt, B. F. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nature Chemical Biology*, v.5, p.37-44, 2009.

Macht, D. I. The history of opium and some of its preparations and alkaloids. *Journal of the American Medical Association*, v.6, p.477, 1915.

Macleod, R. M.; Lehmeyer, J. E. Studies on the Mechanism of the Dopamine-Mediated Inhibition of Prolactin Secretion. *Endocrinology*, v.94(4), p.1077–1085, 1974.

Mackinnon, R. Potassium channels. *FEBS Letters*, v.555, p.62– 65, 2003.

Maegawa, F. A.; Tonussi, C. R. The L-arginine/nitric oxide/cyclic-GMP pathway apparently mediates the peripheral antihyperalgesic action of fentanyl in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.36, p.1701–1707, 2003.

Magnusson, J. E.; Fisher, K. The involvement of dopamine in nociception: the role of D(1) and D(2) receptors in the dorsolateral striatum. *Brain Research*, v.855, p.260 – 266, 2000.

Mansour, A.; Fox, C. A.; Burke, S.; Meng, F.; Thompson, R. C.; Akil, H.; Watson, S. J. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: An in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*, v.350(3), p.412–438, 1994.

Marletta, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, v.268(17), p.12231-12234, 1993.

Marletta, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, v.78, p.927-30, 1994.

Marletta, M. A.; Yoon, P. S.; Iyengar, R.; Leaf, C. D.; Wishnok, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, v.27(24), p.8706–8711, 1988.

Martin, W. R. Pharmacology of opioids. *Pharmacological Reviews*, v.35(4), p.283-323, 1983.

Martins, R. T.; Almeida, D. B.; Monteiro, F. M. R.; Kowacs, P. A.; Ramina, R. Receptores opioides até o contexto atual - Opioid receptors to date. *Revista Dor*, v.13(1), p.75–79, 2012.

Mason, P. Deconstructing endogenous pain modulations. *Journal of Neurophysiology*, v.94, p.1659–1663, 2005.

Matsuda, L. A.; Lolait, S. J.; Brownstein, M. J.; Young, A. C.; Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, v.346(6284), p.561–564, 1990.

McCracken, L. M.; Zayfert, C.; Gross, R. T. The Pain Anxiety Symptoms Scale: development and validation of a scale to measure fear of pain. *Pain*, v.50, p.167–73, 1992.

McDonald, R. H.; Goldberg, L. I.; McNay, J. L.; Tuttle, E. P. Effects of Dopamine in Man: Augmentation of Sodium Excretion, Glomerular Filtration Rate, and Renal Plasma Flow. *Journal of Clinical Investigation*, v.43(6), p.1116-1124, 1964.

McKinney M. K.; Cravatt, B. E. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annual Review of Biochemistry*, v.74, p.411–432, 2005.

Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N. E.; Schatz, A. R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B. R.; Compton, D. R.; Pertwee, R. G.; Griffin, G.; Bayewitch, M.; Barg, J.; Vogel, Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, v.50(1), p.83–90, 1995.

Mechoulam, R. Marijuana chemistry. *Science*, v.168(936), p.1159–1166, 1970.

Melis, M.; Gessa, G. L.; Diana, M. Different mechanisms for dopaminergic excitation induced by opiates and cannabinoids in the rat midbrain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v.24(6), p.993–1006, 2000.

Melis, M.; Pistis, M.; Perra, S.; Muntoni, A.L.; Pillolla, G.; Gessa, G. L. Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB₁ receptors. *Journal of Neuroscience*, v.24, p.53–62, 2004.

Melzack, R.; Wall, P. D. Pain Mechanisms: A New Theory. *Science*, v.150(3699), p.971–979, 1965.

Mense, S. Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia. *The American Journal of Medicine*, v.75(5), p.4–14, 1983.

Merrer, J.; Becker, J. A. J.; Befort, K.; Kieffer, B. L. Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *Physiological Reviews*, v.89, p.1379–1412, 2009.

Merskey, H.; Bogduk, N. Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms, *IASP Press*, p.210, 1994.

Meyer, R. A.; Ringkamp, M.; Campbell, J. N.; Raja, S. N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In Wall and Melzack's Textbook of Pain, S. B. McMahon e M. Koltzenburg, eds. *Philadelphia: Elsevier*, p.3–34, 2008.

Michael-Titus, A.; Boussemame, R.; Costentin, J. Stimulation of dopamine D2 receptors induces an analgesia involving an opioidergic but non enkephalinergic link. *European Journal of Pharmacology*, v.187, p.201-207, 1990.

Millan, M. J. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, v.66(6), p.355-474, 2002.

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

Missale, C.; Nash, S. R.; Robinson, S. W.; Jaber, M.; Caron, M. G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, v.78, p.189– 225, 1998.

Miyamoto, T.; Dubin, A. E.; Petrus, M. J.; Patapoutian, A. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS ONE*, v.4, p.e7596, 2009.

Mlost, J.; Wasik, A. Starowicz, K.. Role of endocannabinoid system in dopamine signalling within the reward circuits affected by chronic pain. *Pharmacological Research*, v.143, p.40–47, 2019.

Moncada, S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, v.43(2), p.109-142, 1991.

Moncada, S.; Radomski, M. W.; Palmer, R. M. J. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochemical Pharmacology*, v.37, p.2495-2501, 1988.

Moreira, F. A.; Aguiar, D. C.; Campos, A.C.; Lisboa, S. F.; Terzian, A. L.; Resstel, L. B.; Guimarães F. S. Antiaversive Effects of Cannabinoids: Is the Periaqueductal Gray Involved? *Neural Plasticity*, v.2009, p.1-11, 2008.

Morgan, M. J.; Franklin, K. B. J. Dopamine receptor subtypes and formalin test analgesia. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, v.40, p.317-322, 1991.

Morris, S. M.; Billiar, T. R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. *American Journal of Physiology*, v.266, p.829-39, 1994.

Munro, S.; Thomas, K. L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, v.365(6441), p.61-65, 1993.

Nakamura, M.; Ferreira, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *European Journal of Pharmacology*, v.135(2), p.145–153, 1987.

Nichols, C. G.; Lopatin, A. N. Inward rectifier potassium channels. *Annual Review of Physiology*, v.59, p.171– 191, 1997.

Norbiato, G.; Bevilacqua, M.; Raggi, U.; Micossi, P.; Moroni, C. Metoclopramide increases plasma aldosterone concentration in man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.45(6), p.1313–1316, 1977.

North, A. R. Opioid receptor types and membrane ion channels. *Trends in Neurosciences*, v.9, p.114–117, 1986.

Ocaña, M.; Baeyens, J. M. Differential effects of K⁺ channel blockers on antinociception induced by α₂-adrenoceptor, GABAB and n-opioid receptor agonists. *British Journal of Pharmacology*, v.110, p.1049–1054, 1993.

Ocaña, M.; Cendán, C. M.; Cobos, E. J.; Entrena, J. M.; Baeyens, J. M. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *European Journal of Pharmacology*, v.500, p.203–219, 2004.

Oleson, E. B.; Beckert, M. V.; Morra, J. T.; Lansink, C. S.; Cachope, R.; Abdullah, R. A.; Loriaux, A. L.; Schettters, D.; Pattij, T.; Roitman, M. F.; Lichtman, A. H.; Cheer, J. F. Endocannabinoids Shape Accumbal Encoding of Cue-Motivated Behavior via CB₁ Receptor Activation in the Ventral Tegmentum. *Neuron*, v.73(2), p.360–373, 2012.

Oliveira, C. C.; Castor, M. G. M.; Castor, C. G. M.; Costa, A. F.; Ferreira, R. C. M.; Silva, J. F.; Pelaez, J. M. N.; Capettini, L. S. A.; Lemos, V. S. Duarte, I. D. G.; Perez, A. C.; Santos, S. H. S.; Romero, T. R. L. Evidence for the involvement of opioid and cannabinoid systems in the peripheral antinociception mediated by resveratrol. *Toxicology And Applied Pharmacology*, v.369, p.30-38, 2019.

Osei-Hyiaman, D.; DePetrillo, M.; Pacher, P.; Liu, J.; Radaeva, S.; Batkai, S.; Harvey-White, J.; Mackie, K.; Offertáler, L.; Wang, L.; Kunos, G. Endocannabinoid activation at hepatic CB₁ receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *Journal of Clinical Investigation*, v.115, p.1298–1305, 2005.

Ossipov, M. H. The perception and endogenous modulation of pain. *Scientifica*, v.2012, p.1-25, 2012.

Ossipov, M. H.; Lai, J.; Vanderah, T. W.; Porreca, F. Induction of pain facilitation by sustained opioid exposure: relationship to opioid antinociceptive tolerance. *Life Sciences*, v.73, p.783-800, 2003.

Ott, T.; Nieder, A. Dopamine and Cognitive Control in Prefrontal Cortex. *Trends in Cognitive Sciences*, v.23(3), p.213-234, 2019.

Pacheco, D. F.; Reis, G. M. L.; Francischi, J. N.; Castro, M. S. A.; Perez, A. C.; Duarte, I. D. G. δ-Opioid receptor agonist SNC80 elicits peripheral antinociception via δ₁ and δ₂ receptors and activation of the l-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Life Sciences*, v.78(1), p.54–60, 2005.

Pacheco, D. F.; Duarte I. D. G. Delta-opioid receptor agonist SNC80 induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *European Journal of Pharmacology*, v.512(1), p.23-82, 2005.

Pacher, P.; Bártkai, S.; Kunos, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, v.58(3), p.389–462, 2006.

Paiva, E. S.; Cuginotti, V.; Müller, C. S.; Parchen, C. F.; Urbaneski, F. Manejo da dor. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.46(4), p.292-296, 2006.

Palmer, R. M. J.; Ashton, D. S.; Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, v.333, p.664-666, 1988.

Papadopolou, S.; Hartmann, P.; Lips, K. S.; Kummer, W.; Haberberger, R. V. Nicotinic receptor mediated stimulation of NO generation in neurons of rat thoracic dorsal root ganglia. *Neuroscience Letters*, v.361(1-3), p.32-35, 2004.

Paton, W. D. M. Pharmacology of marijuana. *Annual Review of Pharmacology*, v.15, p.191–220, 1975.

Paulus, W.; Trenkwalder, C. Less is more: pathophysiology of dopaminergic-therapy-related augmentation in restless legs syndrome. *The Lancet Neurology*, v.5, p.878–886, 2006.

Pert, C. B.; Snyder, S. H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science*, v.179(4077), p.1011-1014, 1973.

Pertovaara, A. Noradrenergic pain modulation. *Progress in Neurobiology*, v.80, p.53–83, 2006.

Pertwee, R. G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *British Journal of Pharmacology*, v.147, p.163–171, 2006.

Pertwee, R. G. Cannabinoid receptors and pain. *Progress in Neurobiology*, v.63(5), p.569–611, 2001.

Pertwee, R. G. Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, v.74, p.129–180, 1997.

Pertwee, R. G.; Ross, R. A. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, v. 66, p.101–121, 2002.

Price, J.; Mudge, A. W. A subpopulation of rat dorsal root ganglion neurones is catecholaminergic. *Nature*, v.301, p.241–243, 1983.

Radomski, M. W.; Palmer, R. M.; Moncada, S. An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.87, p.5193-5197, 1990.

Randall, L. O.; Selitto J. J. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, v.111(4), p.409 – 419, 1957.

Rapaka, R. S.; Porreca, F. Development of delta opioid peptides as nonaddicting analgesics. *Pharmacology Research*, v.8, p.1–8, 1991.

Raouf, R.; Quick, K.; Wood, J. N. Pain as a channelopathy. *The Journal of Clinical Investigation*, v.120(11), p.3745–3752, 2010.

Reis, G. M.; Ramos, M. A.; Pacheco, D. F.; Klein, A.; Perez, A. C.; Duarte, I. D. G. Endogenous cannabinoid receptor agonist anandamide induces peripheral antinociception by activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Life Sciences*, v.88(5-16), p.653-657, 2011.

Ren, K.; Dubner, R. Descending modulation in persistent pain: an update. *Pain*, v.100, p.1–6, 2002.

Ricci, A. F.; Rossodivita, I.; Avola, R.; Tayiebati, S. K. The dopaminergic system in hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, v.23, p.15-24, 2001.

Rodrigues, A. R. A.; Duarte, I. D. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. *British Journal of Pharmacology*, v.129(1), p.110-114, 2000.

Romero, T. R. L.; Duarte, I. D. Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by ketamine. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, v.40, p.419–424, 2013.

Romero, T. R. L.; Duarte, I. D. N-palmitoyl-ethanolamine (PEA) induces peripheral antinociceptive effect by ATP-sensitive K⁺-channel activation. *Journal of Pharmacological Sciences*, v.118, p.156–160, 2012.

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

Romero, T. R. L.; Resende, L. C.; Duarte, I. D. The neuronal NO synthase participation in the peripheral antinociception mechanism induced by several analgesic drugs. *Nitric Oxide*, v.1, p.1, 2011.

Romero, T. R. L.; Galdino, G. S.; Silva, G. C.; Resende, L. C.; Perez, A. C.; Cortes, S. F.; Duarte, I. D. Involvement of the L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in peripheral antinociception induced by N-palmitoyl-ethanolamine in rats. *Journal of Neuroscience Research*, v.90, p.1474-11479, 2012.

Romero, T. R. L.; Luciana, S. G.; Resende, L. C.; Duarte, I. D. CB₁ and CB₂ Cannabinoid Receptor Agonists Induce Peripheral Antinociception by Activation of the Endogenous Noradrenergic System. *Anesthesia & Analgesia*, v.116, p.463-472, 2013.

Romero, T. R. L.; Pacheco, D. F.; Duarte, I. D. Probable involvement of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels (CaCCs) in the activation of CB₁ cannabinoid receptors. *Life Sciences*, v.92, p.815-820, 2013.

Rooney, K. F.; Sewell, R. D. E. Evaluation of selective actions of dopamine D-1 and D-2 receptor agonists and antagonists on opioid antinociception. *European Journal of Pharmacology*, v.168(3), p.329–336, 1989.

Ross, S. B. Synaptic concentration of dopamine in the mouse striatum in relationship to the kinetic properties of the dopamine receptors and uptake mechanism. *Journal of Neurochemistry*, v.56, p.22–29, 1991.

Russo, C. M.; Brose, W. G. Chronic pain. *Annual Review of Medicine*, v.49, p.123-133, 1998.

Rybalkin, S. D.; Rybalkina, I. G.; Feil, R.; Hofmann, F.; Beavo, J. A. Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, v.277(5), p.3310–3317, 2002.

Saadé, N. E.; Atweh, S. F.; Bahuth, N. B.; Jabbur, S. J Augmentation of nociceptive reflexes and chronic deafferentation pain by chemical lesions of either dopaminergic terminals or midbrain dopaminergic neurons. *Brain Research*, v.751, p.1–12, 1997.

Sabouni, M. H.; Alkadhi, K. A.; Lokhandwala, M. F. Pharmacological characterization of dopamine receptors in the stellate ganglia with selective DA₁ and DA₂ receptor agonists and antagonists. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.236, p.65-70, 1986.

Sachs, D.; Villarreal, C. F.; Cunha, F. Q.; Parada, C. A.; Ferreira, S. H. The role of PKA and PKC ϵ pathways in prostaglandin E₂-mediated hypernociception. *British Journal of Pharmacology*, v.156, p.826–834, 2009.

Salveti, M. G.; Pimenta, C. A. M. Dor crônica e a crença de autoeficácia. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v.41(1), p.135-40, 2007.

Sanger, D. J.; Depoortere, R.; Perrault, G. G. Evidence for role for dopamine D3 receptor in the effects of dopamine agonists on operant behaviour in rats. *Behavioural Pharmacology*, v.7, p.477-482, 1996.

Sawynok, J. Topical and Peripherally Acting Analgesics. *Pharmacological Reviews*, v.55, p.1-20, 2003.

Schiff, P. L. Jr. Opium and Its Alkaloids. *American Journal of Pharmaceutical Education*, v.66(2), p.186-194, 2002.

Schmitz, Y.; Benoit-Marand, M.; Gonon, F.; Sulzer, D. Presynaptic regulation of dopaminergic neurotransmission. *Journal of Neurochemistry*, v.87, p.273–289, 2003.

Scott, D. J.; Heitzeg, M. M.; Koeppe, R. A.; Stohler, C. S.; Zubieta, J. K. Variations in the human pain stress experience mediated by ventral and dorsal basal ganglia dopamine activity. *The Journal of Neuroscience*, v.26, p.10789– 10795, 2006.

Seeman, P. Dopamine receptors sequence: Therapeutic levels of neuroleptics occupancy D2 receptors, clozapine occupancies D4. *Neuropsychopharmacol*, v.7, p.261-284, 1992.

Seierstad, M.; Breitenbucher, J. G. Discovery and development of fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.51, p.7327-43, 2008.

Shieh, C. C.; Coghlan, M.; Sullivan, J. P.; Gopalakrishnan, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacological Reviews*, v.52, p.557– 594, 2000.

Silva, L. C. R.; Romero, T. R. L.; Guzzo, L. S.; Duarte, I. D. Participation of cannabinoid receptors in peripheral nociception induced by some NSAIDs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research on line*, v.45, p.1240-1243, 2012.

Skagerberg, G.; Lindvall, O. Organization of diencephalic dopamine neurons projecting to the spinal cord in the rat. *Brain Research Bulletin*, v.9, p.237-244, 1985.

Skogar, O.; Lökk, J. Pain management in patients with Parkinson's disease: challenges and solutions. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, v.9, p.469–479, 2016.

Soares-Da-Silva, P.; Serrão, M. P.; Vieira-Coelho, M. A. Apical and basolateral uptake and intracellular fate of dopamine precursor l-dopa in LLC-PK1 cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, v.274(2), p.243–251, 1998.

Soares, A. C.; Duarte, I. D. Dibutyl- γ -butyrolactone induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K⁺ channels in the rat PGE₂-induced hyperalgesic paw. *British Journal of Pharmacology*, v.134, p.127-131, 2001.

Standaert, D. G.; Galanter, J. M. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. In: Golan, D. E.; Tashjian, A. H.; Armstrong, E. J.; Armstrong, A. W. *Princípios da Farmacologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.166-185, 2012.

Steeds, C. E. The anatomy and physiology of pain. *Surgery (Oxford)*, v.27(12), p.507–511, 2009.

Stein, C.; Clark, J. D.; Oh, U.; Vasko, M. R.; Wilcox, G. L.; Overland, A. C.; Vanderah, T. W.; Spencer, R. H. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain research reviews*, v.60, p.90–113, 2009.

Stein, C.; Hassan, A. H. S.; Lehrberger, K.; Stein, C.; Giefing, J.; Yassouridis, A. Local analgesic effect of endogenous opioid peptides. *The Lancet*, v.342(8867), p.321–324, 1993.

Stein, C.; Hassan, A. H.; Przewlocki, R.; Gramsch, C.; Peter, K.; Herz, A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.87(15), p.5935–5939, 1990.

Stuchlik, A.; Rehakova, L.; Rambousek, L.; Svoboda, J.; Vales, K. Manipulation of D2 receptors with quinpirole and sulpiride affects locomotor activity before spatial behavior of rats in an active place avoidance task. *Neuroscience Research*, v.58, p.133-139, 2007.

Suaudeau, C.; Costentin, J. Analgesic effect of the direct D2 dopamine receptor agonist RU 24926 and cross tolerance with morphine. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v.9, p.147-152, 1995.

Sufka, K. J.; Schomburg, F. M.; Giordano, J. Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.41(1), p.53–56, 1992.

Sulzer, D.; Galli, A. Dopamine transport currents are promoted from curiosity to physiology. *Trends in Neurosciences*, v.26, p.173–176, 2003.

Sunahara, R. H.; Guan, H. C.; O'Dowd, B. F.; Seeman, P.; Laurier, L. G.; NG, G.; George, S. R.; Torchia, J.; Van Told, H. H.; Niznik, H. B. Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*, v.350, p.614-619, 1991.

Taiwo, Y. O.; Levine, J. D. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. *Neuroscience*, v.48(2), p.485–490, 1992.

Tammaro, A.; Cavallotti, C.; Gaspari, A. A.; Narcisi, A.; Parisella, F. R. Dopaminergic receptors in the human skin. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, v.26(4), p.789-795, 2012.

Teixeira, M. J. Physiopathology of Nociception and Pain Suppression. *JBA*, v.1(4), p.329-334, 2001.

Thorner, M. O. Dopamine Is An Important Neurotransmitter In The Autonomic Nervous System. *The Lancet*, v.305(7908), p.662–665, 1975.

Tobaldini, G.; Reis, R. A.; Sardi, N. F.; Lazzarim, M. K.; Tomim, D. H.; Lima, M. M. S.; Fischer, L. Dopaminergic mechanisms in periaqueductal gray-mediated antinociception. *Behavioural Pharmacology*, v.29(1), p.225-233, 2017.

Toda, N.; Goldberg, L. I. Effects of dopamine on isolated canine coronary arteries. *Cardiovascular Research*, v.9(3), p.384–389, 1975.

Toriyabe, M.; Omote, K.; Kawabata, T.; Namiki, A. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. *Anesthesiology*, v.101, p.983–990, 2004.

Trigo, J. M.; Martin-Garcia, E.; Berrendero, F.; Robledo, P.; Maldonado, R. The endogenous opioid system: A common substrate in drug addiction. *Drug and alcohol dependence*, v.108(3), p.183-194, 2010.

Tsou, K.; Brown, S.; Sañudo-Peña M. C.; Mackie K.; Walker J. M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, v.83(2), p.393–411, 1998.

Tulunay, F. C.; Sparber S. B.; Takemori, A. E. The Effect Of Dopaminergic Stimulation And Blockade On The Nociceptive And Antinociceptive Responses Of Mice. *European Journal of Pharmacology*, v.33, p.65-70, 1975.

Turjanski, N.; Lees, A. J.; Brooks, D. J. Striatal dopaminergic receptor dysfunction in patients with restless legs syndrome: 18F-dopa and 11C-raclopride PET studies. *Neurology*, v.52, p.932–937, 1999.

Valenzuela, J. E. Dopamine as A Possible Neurotransmitter in Gastric Relaxation. *Gastroenterology*, v.71(6), p.1019–1022, 1976.

Vallone, D.; Picetti, R.; Borrelli, E. Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v.24, p.125–132, 2000.

Van Ree, J. M.; Niesink, R. J.; Van Wolfswinkel, L.; Ramsey, N. F.; Kornet, M. L. M. W.; Van Furth, W. R.; Vanderschuren, L. J. M. J.; Gerrits, M. F.; Van den Berg, C. L. Endogenous opioids and reward. *European Journal of Pharmacology*, v.405(1-3), p.89–101, 2000.

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

Van Sickle, M. D.; Duncan, M.; Kingsley, P. J.; Mouihate, A.; Urbani, P.; Mackie, K.; Stella, N.; Makriyannis, A.; Piomelli, D.; Davison, J. S.; Marnett, L. J.; Di Marzo, V.; Pittman, Q. J.; Patel, K. D.; Sharkey, K. A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors. *Science*, v.310, p.329–332, 2005.

Vergara, C.; Latorre, R.; Marrion, N. V.; Adelman, J. P. Calcium activated potassium channels. *Current Opinion in Neurobiology*, v.8, p.321– 329, 1998.

Vinegar, R.; Truax, J. F.; Selph, J. L.; Johnston, P. R.; Venable, A. L.; McKenzie, K. K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Federation Proceedings*, v.46, p.118–126, 1987.

Waisbrod, H.; Waisbrod, H.; Hansen, D.; Gerbershagen, H. U. Chronic pain in paraplegics. *Neurosurgery*, v.15, p.993-994, 1984.

Weil-Fugazza, J.; Onteniente, B.; Audet, G.; Philippe, E. Dopamine as a trace amine in the dorsal root ganglia. *Neurochemical Research*, v.18, p.965– 969, 1993.

Wilson, R. I.; Nicoll, R. A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, v.410(6828), p.588–592, 2001.

Wise, R. A.; Rompre, P. P. Brain dopamine and reward. *Annual Review of Psychology*, v.40, p.191-225, 1989.

Wood, P. L. Opioid regulation of CNS dopaminergic pathways: a review of methodology, receptor types, regional variations, and species differences. *Peptides*, v.4, p.595–601, 1983.

- Wood, P. L.; Pasternak, G. W. Specific 2 opioid isoreceptor regulation of nigrostriatal neurons: in vivo evidence with naloxonazine. *Neuroscience Letters*, v.37, p.291–293, 1983.
- Wood, P. B.; Patterson, J. C.; Sunderland, J. J.; Tainter, K. H.; Glabus, M. F.; Lilien, D. L. Reduced presynaptic dopamine activity in fibromyalgia syndrome demonstrated with positron emission tomography: a pilot study. *The Journal of Pain*, v.8, p.51–58, 2007.
- Wood, P. L.; Stotland, M.; Richard, J. W.; Rackham, A. Actions of μ , κ , δ and agonist/antagonist opiates on striatal dopaminergic function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.215, p.697–703, 1980.
- Wood, P. B.; Schweinhardt, P.; Jaeger, E.; Dagher, A.; Hakyemez, H.; Rabiner, E. A.; Bushnell, M. C.; Chizh, B. A. 484 Sex, Gender, and Pain: A Review of Recent Clinical and Experimental Findings Fibromyalgia patients show an abnormal dopamine response to pain. *European Journal of Neuroscience*, v.25, p.3576-3582, 2007.
- Woolf, C. J. A new strategy for the treatment of inflammatory pain prevention or elimination of central sensitization. *Drugs*, v.47, p.1-9, 1994.
- Woolf, C. J.; Salter, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, v.288, p.1765-1769, 2000.
- Wolfart, J.; Neuhoff, H.; Franz, O.; Roeper, J. Differential Expression of the Small-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channel SK3 Is Critical for Pacemaker Control in Dopaminergic Midbrain Neurons. *The Journal of Neuroscience*, v.21(10), p.3443–3456, 2001.
- Wright, A. D. The history of opium. *Transactions and studies of the College of Physicians of Philadelphia*, v.29(1), p.22-27, 1961.
- Young Blood, M. R.; Ferro, M. M.; Munhoz, R. P.; Teive, H. A. G.; Camargo, C. H. F. Classification and Characteristics of Pain Associated with Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease*, v.2016, p.1–8, 2016.
- Zadina, J. E.; Hackler, L.; Ge, L.-J.; Kastin, A. J. A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature*, v.386(6624), p.499–502, 1997.
- Zambelli, V. O.; Fernandes, A. C. D. O.; Gutierrez, V. P.; Ferreira, J. C. B., Parada, C. A.; Mochly-Rosen, D., Cury, Y. Peripheral Sensitization Increases Opioid Receptor Expression and Activation by Crotaiphine in Rats. *PLoS One*, v.9(3), p.e90576, 2014.
- Zhuo, M.; Gebhart, G. F. Spinal serotonin receptors mediate descending facilitation of a nociceptive reflex from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *Brain Research*, v.550, p.35–48, 1991.
- Zuardi, A. W. History of cannabis as a medicine: a review. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.28(2), p.153–157, 2006.

ANEXO I

Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética para uso de animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 196/2018
Título do projeto: Estudo sobre os mecanismos antinociceptivos periféricos induzidos pela dopamina
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Igor Dimitri Gama Duarte
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Farmacologia

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

Aprovado na reunião do dia 09/07/2018. Validade: 09/07/2018 à 08/07/2023
Belo Horizonte, 09/07/2018.

Atenciosamente,

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

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