

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

**Estudo da modulação da via PI3K γ /AKT/NOS/NO/GCs/GMPc e
canais para potássio sobre a dor neuropática em ratos submetidos
a constrição do nervo ciático**

Daniel Portela Dias Machado

Belo Horizonte

2021

DANIEL PORTELA DIAS MACHADO

**Estudo da modulação da via
PI3K γ /AKT/NOS/NO/GCs/GMPc e canais para potássio
sobre a dor neuropática em ratos submetidos a constrição do
nervo ciático**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero

Belo Horizonte

2021

043

Machado, Daniel Portela Dias.

Estudo da modulação da via PI3K γ /AKT/NOS/NO/GCs/GMPc e canais para potássio sobre a dor neuropática em ratos submetidos a constrição do nervo ciático [manuscrito] / Daniel Portela Dias Machado. – 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero.

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

1. Dor. 2. Analgesia. 3. Óxido Nítrico. 4. Neuropatia Ciática. 5. Nervo Isquiático. 6. Nociceptividade. 7. Analgésicos. I. Romero, Thiago Roberto Lima. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615

21/05/2021

SEI/UFMG - 0711373 - Folha de Aprovação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE DE N° 338 DE **DANIEL PORTELA DIAS MACHADO**

"Estudo da Modulação da Via PI3Ky/AKT/NOS/NO/GCs/GMPc e Canais para Potássio
Sobre a dor Neuropática em Ratos Submetidos a Constrição do Nervo Ciático"

DANIEL PORTELA DIAS MACHADO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **10 de maio de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Célia Maria de Oliveira, HC/Universidade Federal de Minas Gerais
Prof. Dr. André Klein, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais
Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza, ICM/Universidade Federal de Alfenas
Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida, CCS/Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Orientador

Belo Horizonte, 06 de maio de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Roberto Lima Romero, Professor do Magistério Superior**, em 11/05/2021, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Klein, Professor do Magistério Superior**, em 11/05/2021, às 11:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Regina de Castro Almeida, Usuário Externo**, em 11/05/2021, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Giovane Galdino de Souza, Usuário Externo**, em

22/06/2021

SEI/UFMG - 0711373 - Folha de Aprovação



11/05/2021, às 14:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celia Maria de Oliveira, Membro**, em 11/05/2021, às 19:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0711373** e o código CRC **B9FE3EF2**.

Referência: Processo nº 23072.223208/2021-90

SEI nº 0711373

“Se fosse fácil achar o caminho das pedras, tantas pedras no caminho não seria ruim.”

(Trecho da música *Outras Frequências* de Humberto Gessinger)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me guiou, me sustentou e me protegeu. Abriu portas e me levou por caminhos que muitos momentos eu não podia entender, mas que no final se mostraram tão melhores do que as escolhas que eu teria feito sozinho.

Agradeço ao meu orientador Thiago Roberto Lima Romero que lá no início me trouxe de volta, quando eu já imaginava que meu caminho seria outro. Agradeço o conhecimento que me proporcionou, que vai além da vida acadêmica. Agradeço a forma que conduziu o meu doutorado e o respeito, a gentileza, a atenção e a empatia que nunca faltou, mas ficaram ainda mais evidentes nesse momento tão difícil em que o mundo passa.

Agradeço ao professor Igor Dimitri Gama Duarte por ter me trazido para a academia. Agradeço o conhecimento e sabedoria que além de parecerem infinitos, é passado de uma forma muito natural e disponível. Agradeço por todos os trabalhos que realizamos juntos, pelas aulas que me permitiu ministrar e pelo carinho que tem pelos membros do laboratório.

Agradeço a professora Andrea de Castro Perez pelas oportunidades e por me passar um pouco do seu enorme conhecimento o que me proporcionou crescer e melhorar muito. Obrigado por lembrar do meu nome em alguns dos seus trabalhos e me abrir essas portas.

À professora Silvia Carolina Guatimosim Fonseca e seu aluno André Luis Lima Monteiro, que abriram seu laboratório e me deram apoio para que eu pudesse finalizar meus experimentos.

Aos professores Stêfany Bruno de Assis Cau, Marina Gomes Miranda e Castor Romero e a todos os integrantes do LAFACI, que me receberam tão bem quando precisei. Todos sempre foram cordiais, solícitos e atenciosos.

A todos os professores que integram o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia.

A Professora Doutora Amanda Maria Sena Reis que além de ser uma esposa maravilhosa, que cuida de mim com carinho, dedicação e amor, contribuiu ativamente para meu doutorado, me ajudando nos experimentos e me cedendo o espaço do seu laboratório o que me permitiu trabalhar com segurança e tranquilidade. Sem ela do meu lado tudo seria muito mais difícil.

Agradeço a minha mãe Denise Portela Machado pelo esforço e carinho. Sem ela não seria possível estar aqui hoje e mesmo em momentos que não compreendia muito o que eu estava fazendo não faltou o seu apoio.

Agradeço ao meu pai César Augusto Dias Machado pelo esforço e sustento. Sei que mesmo de longe torce por mim e me apoia. Agradeço a confiança na minha escolha e por contribuir com ela.

Aos meus irmãos e a esposa do meu pai pelo apoio e carinho que recebo deles.

Aos meus amigos e colegas de laboratório pelo convívio do dia a dia, pela ajuda em diversas situações da vida, pelos momentos alegres e os momentos de tensão. Vocês me ajudaram a passar por esse período de pós-graduação e chegar até aqui bem melhor. Aprendi muito com todos, desde aqueles que me acompanharam desde o início e estão comigo até hoje, até aqueles que passaram só por alguns momentos. Desculpa não citar nomes, mas são muitos e tenho medo de não falar de todos.

Aos colegas e amigos de pós-graduação que me abriram portas, contribuíram com minha formação e me ajudaram em tantas coisas.

Aos colegas da representação discente e aos professores e discentes da Comissão de Acompanhamento Estudantil na qual eu aprendi muito sobre o funcionamento da pós-graduação e pude ajudar um pouco os estudantes.

As pessoas que trabalham nos laboratórios, na pós, no departamento, no ICB e na UFMG. Em especial a Adriane Aparecida Pereira não só pelas atividades que faz no laboratório, mas pelas caronas, pelas conversas divertidas e por tudo que faz por nós. Aos bioteristas Rinaldo Nascimento e Wellington de Sousa Palhares por cuidarem dos nossos animais. Aos secretários que resolvem nossos problemas com tanta dedicação em especial a Cintya Menezes Fonseca, Thiago Abílio e Janaína Edwiges Miranda. Ao pessoal do CEBIO, eu não tenho palavras para agradecer a forma com que conduziam tudo, permitindo com que todos trabalhassem com animais de qualidade.

Aos animais, que deram suas vidas pela ciência.

Por fim, agradeço às agências 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) pelo auxílio financeiro.

Lista de Abreviaturas

AKT (ou PKB) - proteína quinase B

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

ATP - adenosina trifosfato

BK - canal para potássio de alta condutância ativado por cálcio

BSA - albumina de soro bovino (do inglês bovine serum albumin)

Ca²⁺ - íon cálcio

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEBIO - Centro de Bioterismo

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CNC – constrição do nervo ciático

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COX - 2 - ciclo-oxigenase tipo 2

DMSO - dimetilsulfóxido

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

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

EPM - erro padrão da média

et al - e outros (do latim et alli)

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

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

Gi – proteína G inibitória

GMPc - monofosfato cíclico de guanosina

GTP - guanosina trifosfato

HIV – vírus da imunodeficiência humana (do inglês human immunodeficiency vírus)

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

K_{ATP} - canal para potássio sensível ao ATP

KV – canal para potássio voltagem dependente

LDA - Laboratório de Dor e Analgesia

mTOR – proteína alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês mammalian target of rapamycin)

n - número de animais experimentais

NMDA - N-metil-D-aspartato

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

PEA - palmitoiletanolamida

PI3K - fosfatidilinositol-3-quinase

PI3K γ - fosfatidilinositol-3-quinase gama

PKA - proteína quinase A

PKB (ou AKT) - proteína quinase B

PKG - proteína quinase G

SCP - substância cinzenta periaquedutal

SK - canal para potássio de baixa condutância ativado por cálcio

SNC - sistema nervoso central

SP - substância P

TRP₁ – proteína relacionada a tirosinase tipo 1

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

A dor neuropática é induzida por uma lesão no sistema nervoso somatossensorial que inicialmente desencadeia um processo inflamatório e causa alterações de plasticidade neuronal defeituosa, que mantém a dor de forma crônica e intensa. Associadas a processos inflamatórios e as respostas de plasticidade maladaptativas, ocorrem também modificações nos sistemas endógenos de controle da dor. Muitos sistemas analgésicos têm como um de seus mecanismos de ação a ativação de receptores acoplados a proteína G_i , que sinaliza via PI3K γ /Akt/NOS/NO/GCs/GMPc. Esta transdução de sinal promove a abertura dos canais para potássio e o efluxo deste íon induzindo hiperpolarização neuronal, impedindo a condução de impulsos nervosos. Desta forma, o presente trabalho avaliou a participação da via PI3K γ /Akt/NOS/NO/GCs/GMPc e dos canais para potássio na modulação endógena da dor neuropática. Para tal foram utilizados ratos Wistar, pesando 180 g para cirurgia de constrição do nervo ciático. Tais animais foram tratados com injeção pela via intraplantar de AS605240 (90 μ g/pata), inibidor da enzima PI3K γ ; ODQ (100 μ g/pata), inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel e os bloqueadores de canais para potássio; dequalínio (50 μ g/pata) que bloqueia os sensíveis ao cálcio de baixa condutância; Paxilina (50 μ g/pata) que bloqueia os sensíveis ao cálcio de alta condutância; tetraetilamônio (30 μ g/pata) que bloqueia os canais dependentes de voltagem e glibenclamida (80 μ g/pata) que bloqueia os canais sensíveis ao ATP. Após aplicação dos tratamentos, eles foram submetidos ao teste algesimétrico de compressão da pata. Também foram quantificados pela técnica de western blot as enzimas Akt e óxido nítrico sintase induzível além dos canais para potássio sensíveis ao ATP no mesencéfalo e na pata de animais neuropáticos e saudáveis. Por fim, foi quantificado de forma indireta os níveis de óxido nítrico em pata e mesencéfalo de animais neuropáticos e NAIVE através da Reação de Griess. Para todos os nossos resultados, consideramos significativos os valores que apresentavam $P < 0,05$. Inicialmente verificamos que a dor neuropática induz uma hipoalgesia muito intensa que decai gradativamente chegando ao limiar basal por volta do 5º dia, sendo observado a hiperalgesia a partir do 6º dia pós constrição. O limiar nociceptivo continua diminuindo gradativamente até por volta do 10º dia, mantendo-se constante, indicando que a dor neuropática está consolidada. Assim inibimos alguns componentes da via PI3K γ /Akt/NOS/NO/GCs/GMPc, e os canais para potássio nos dias 6 e 12 pós constrição para avaliar indução e a dor neuropática já consolidada respectivamente. Com a inibição dos componentes da via estudada verificamos que PI3K γ participa de processos analgésicos tanto na indução quanto na neuropatia consolidada, já nNOS participa de processos analgésicos na indução e de hiperalgésicos na neuropatia enquanto iNOS e a guanilato ciclase solúvel tem papel analgésico durante todos os momentos. Com o bloqueio dos canais, observamos que os canais para potássio dependentes de voltagem não participam em momento algum da neuropatia. Os canais dependentes de cálcio de baixa condutância participam da analgesia, mas somente na fase de indução

enquanto os de alta condutância participam dos eventos hiperalgésicos na neuropatia consolidada. Já os canais para potássio sensíveis ao ATP participam em todas as fases de processos analgésicos. A quantificação de Akt revela níveis elevados no momento da indução tanto na pata quanto no mesencéfalo, mas os níveis não se mantem na neuropatia consolidada. O mesmo ocorre com iNOS na pata, mas no mesencéfalo os níveis dessa proteína já estão baixos no 6º dia após a constrição do nervo ciático. Já a quantificação dos canais para potássio sensíveis ao ATP mostrou na pata um aumento destes canais nos animais neuropáticos em relação aos animais saudáveis no primeiro dia e já no 6º os níveis voltaram aos valores de animais não neuropáticos. Enquanto isso, no mesencéfalo houve um aumento gradual e no 12º dia atingiu os níveis mais altos em relação aos dias avaliados neste estudo. Ao dosarmos o NO através da dosagem de nitrito, observamos que, na pata e no mesencéfalo, a concentração aumenta durante a indução, mas retorna aos níveis basais durante a neuropatia consolidada. Sendo assim, podemos concluir que há um papel dual da via PI3K γ /Akt/NOS/NO/GCs/GMPc em que em alguns momentos componentes dessa via podem atuar em processos analgésicos e em outros momentos em processos hiperalgésicos. E finalmente, observamos também que os canais para potássio sensíveis ao ATP participam da modulação da dor neuropática de forma analgésica e a sustentação dos altos níveis desse canal no sistema nervoso central pode indicar uma possibilidade de tratamento de forma direta, sem passar pelas dualidades das vias estudadas. APOIO FINANCEIRO: CAPES, CNPq, FAPEMIG. Protocolo do CEUA: 173/2014.

Palavras-chave: Dor. Analgesia. Óxido nítrico. Neuropatia. Nervo ciático. Antinocicepção. Nocicepção.

ABSTRACT

Neuropathic pain is induced by an injury to the somatosensory nervous system closely related to changes in defective neuronal plasticity, which keeps the pain chronic and intense. Associated with maladaptive plasticity responses, changes also occur in endogenous pain control systems. Many analgesic systems have as one of their mechanisms of action the activation of receptors coupled to Gi protein, which signals via PI3K γ / Akt / NOS / NO / GCs / cGMP. This signal transduction promotes the opening of the channels for potassium and the efflux of this ion, inducing neuronal hyperpolarization, preventing the conduction of nerve impulses. Thus, the present work evaluated the participation of the PI3K γ / Akt / NOS / NO / GCs / GMPc pathway and of the potassium channels in the endogenous modulation of neuropathic pain. For this, Wistar rats, weighing 180 g, were used for sciatic nerve constriction surgery. These animals were treated with intraplantar injection of AS605240 (90 μ g / paw), PI3K γ enzyme inhibitor, ODQ (100 μ g / paw), soluble guanylate cyclase enzyme inhibitor and channel blockers for potassium, dequalinium (50 μ g / paw) which blocks sensitive to low conductance calcium, Paxilin (50 μ g / paw) which blocks sensitive to high conductance calcium, tetraethylammonium (30 μ g / paw) which blocks voltage dependent and glibenclamide (80 μ g / paw) that blocks ATP-sensitive channels. After the treatments were applied, they were submitted to an algometric paw compression test. Akt, inducible nitric oxide synthase and ATP-sensitive potassium channels in the midbrain and in the paws of healthy and neuropathic animals were also quantified by the western blot technique. Finally, the levels of nitric oxide in the paw and midbrain of neuropathic and healthy animals were indirectly quantified through the Griess Reaction. Initially, we found that neuropathic pain induces a very intense hypoalgesia that gradually declines reaching the baseline threshold around the 5th day, with hyperalgesia being observed from the 6th day after constriction. The nociceptive threshold continues to gradually decrease until around the 10th day, remaining constant, indicating that neuropathic pain is consolidated. Thus, we inhibit some components of the PI3K γ / Akt / NOS / NO / GCs / cGMP pathway and potassium channels on days 6 and 12 post-constriction to assess induction and already consolidated neuropathic pain, respectively. With the inhibition of the components of the studied pathway, we verified that PI3K γ participates in analgesic processes both in induction and in consolidated neuropathy, nNOS already participates in analgesic processes in induction and of hyperalgesics in neuropathy while iNOS and soluble guanylate cyclase always play an analgesic role. With the blocking of the channels, we observed that the voltage-gated potassium channels do not participate in neuropathy at any time. Low-conductance calcium-dependent channels participate in analgesia, but only in the induction phase, while high-conductance channels participate in hyperalgesic events in consolidated neuropathy. The

ATP-sensitive potassium channels, on the other hand, participate in all phases of analgesic processes. Akt quantification reveals a high concentration at the time of induction both in the paw and in the midbrain, but the levels are not maintained in consolidated neuropathy. The same occurs with iNOS in the paw, but in the midbrain the concentrations are already low on the 6th day after the sciatic nerve constriction. The quantification of potassium channels sensitive to ATP showed an increase in these paws in neuropathic animals compared to healthy animals on the first day and on the 6th, the levels returned to the values of non-neuropathic animals. Meanwhile, in the midbrain there was a gradual increase and on the 12th day it reached the highest levels in relation to the days evaluated in this study. When dosing NO through the measurement of nitrite, we observed that, in the paw and in the midbrain, the concentration increases during induction, but returns to non-neuropathic levels during consolidated neuropathy. Therefore, we can conclude that there is a dual role for the IP3K γ / Akt / NOS / NO / GCs / GMPc pathway, in which at some moments components of this pathway can act in analgesic processes and at other times in hyperalgesic processes. And finally, we also observed that the ATP-sensitive potassium channels participate in the modulation of neuropathic pain in an analgesic way and the support of the high levels of this channel in the central nervous system may indicate a possibility of direct treatment, without going through the dualities of the studied pathways. FINANCIAL SUPPORT: CAPES, CNPq, FAPEMIG. CEUA Protocol: 173/2014.

Keywords: Pain. Analgesia. Nitric oxide. Neuropathy. Sciatic nerve. Antinociception. Nociception.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura publicada por René Descartes.....	20
Figura 2. Representação das vias da dor.....	22
Figura 3: Produção de NO pela NOS.	26
Figura 4: Representação esquemática da via PI3K / AKT / NOS atuando sobre os canais para potássio sensíveis ao ATP.	30
Figura 5: Classificação dos tipos de dor.	33
Figura 6: Fármacos inibidores da via PI3K/Akt/NOS.....	45
Figura 7: Fármacos da via NOS/NO/GMPc.	46
Figura 8: Fármacos bloqueadores dos canais para potássio.	47
Figura 9: Administração intraperitoneal.....	48
Figura 10: Administração intraplantar.....	48
Figura 11: Algesímetro.....	50
Figura 12: Esquema da cirurgia de constrição crônica do nervo ciático descrita por Benett e Xie (1988)	52
Figura 13: Esquema do procedimento experimental para avaliação do desenvolvimento da dor neuropática.....	53
Figura 14: Esquema do procedimento experimental dos dias de aplicação dos fármacos.	54
Figura 15: Esquema do procedimento experimental do uso dos fármacos.	55
Figura 16: Mecanismo da reação envolvida na dosagem de nitrito [NO ₂ ⁻] pelo método de Griess.	57
Figura 17: Avaliação temporal da dor neuropática periférica induzida por constrição crônica do nervo ciático.	60
Figura 18: Efeito da administração intraplantar do inibidor da PI3Kγ.	61
Figura 19: Efeito da administração intraplantar do inibidor da nNOS.....	62
Figura 20: Efeito da administração intraplantar do inibidor de iNOS.....	63
Figura 21: Efeito da administração intraplantar do inibidor da guanilato ciclase solúvel.	64
Figura 22: Efeito da administração intraplantar do bloqueador do canal para potássio sensível ao cálcio de baixa condutância.	66
Figura 23: Efeito da administração intraplantar do bloqueador do canal para potássio sensível ao cálcio de alta condutância.	66
Figura 24: Efeito da administração intraplantar do bloqueador dos canais para potássio voltagem dependentes.....	67
Figura 25: Efeito da administração intraplantar do bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP.	68
Figura 26: Expressão de Akt _{total} e Akt _{fosf.} em pata de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.	70
Figura 27: Expressão de Akt _{total} e Akt _{fosf.} em mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.	71
Figura 28: Expressão de iNOS na pata de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.	72
Figura 29: Expressão de iNOS em mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.	73
Figura 30: Expressão de Kir 6.2 em pata de ratos submetidos a constrição do nervo ciático..	74
Figura 31: Expressão de Kir 6.2 em mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.	75

Figura 32: Concentração de nitrito (NO_2^-) na pata de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.	76
Figura 33: Concentração de nitrito (NO_2^-) em mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.	77
Figura 34: Representação esquemática dos supostos mecanismos envolvidos na via PI3K/Akt/NOS/NO/GC/GMPc/ K_{ATP} um dia após constrição do nervo ciático.....	95
Figura 35: Representação esquemática dos supostos mecanismos envolvidos na via PI3K/Akt/NOS/NO/GC/GMPc/ K_{ATP} seis dias após constrição do nervo ciático.	96
Figura 36: Representação esquemática dos supostos mecanismos envolvidos na via PI3K/Akt/NOS/NO/GC/GMPc/ K_{ATP} doze dias após constrição do nervo ciático.....	97

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Classificação da dor quanto ao fator etiológico segundo a IASP.....	32
Tabela 2: Resumo do efeito da inibição dos componentes das vias.....	78
Tabela 3: Resumo do efeito do bloqueio dos canais para potássio.	78
Tabela 4: Resumo dos resultados do western blot realizados na pata.	79
Tabela 5: Resumo dos resultados de western blot realizados no mesencéfalo.....	79
Tabela 6: Resumo dos resultados da dosagem de nitrito pela reação de Griess.....	80
Quadro 1: Sintomas positivos e negativos da dor neuropática.....	36

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	XV
SUMÁRIO.....	XVI
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Dor	19
1.2 Sistema nitrérgico	24
1.3 Classificação da dor quanto ao fator etiológico.....	31
1.4 Dor Neuropática.....	34
2. JUSTIFICATIVA.....	40
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivos específicos:	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Animais de experimentação:.....	44
4.2 Fármacos e solventes:	44
4.2.1 Fármacos utilizados para analgesia e anestesia durante a cirurgia de constrição do nervo ciático	44
4.2.2 Fármacos envolvidos nas vias PI3K γ /Akt//NOS/NO/GCs/GMPc.....	44
4.2.3 Fármacos bloqueadores dos canais para potássio (Figura 8):	46
4.3 Administração das drogas:.....	47
4.4 Teste algesimétrico de mensuração da hiperalgesia da pata de rato:.....	48
4.5 Modelo de Indução de Dor Neuropática: Constrição do Nervo Ciático (CNC)...	50
4.5.1 Materiais.....	50
4.5.2 Técnica cirúrgica	51
4.6 Procedimentos Experimentais.....	53
4.6.1 Modulação endógena da dor neuropática.....	53
4.7 Análise da expressão de Akt, iNOS e canais para potássio sensíveis ao ATP	55
4.8 Dosagem de Nitrito pela Reação de Griess	56
4.9 Análise Estatística.....	57
5. RESULTADOS	59
5.1 Desenvolvimento temporal do efeito da constrição do nervo ciático	59
5.2 Avaliação farmacológica sobre o envolvimento da via PI3K γ /Akt.....	61
5.3 Avaliação farmacológica das óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), óxido nítrico sintase indutível (NOSi), e da guanilato ciclase solúvel.....	62
5.4 Avaliação farmacológica dos canais para potássio.....	65

5.4.1 - Efeito dos bloqueadores dos canais para potássio ativados por Ca^{2+} de baixa e alta condutância sobre o limiar nociceptivo após constrição do nervo ciático.	65
5.4.2 -Efeito dos bloqueadores dos canais para potássio dependentes de voltagem sobre o limiar nociceptivo após constrição do nervo ciático.	67
5.4.3 -Efeito dos bloqueadores dos canais para potássio sensíveis ao ATP sobre o limiar nociceptivo após constrição do nervo ciático.	68
5.5 Expressão de Akt, iNOS e do canal para potássio sensível ao ATP em pata e mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.	69
5.5.1 -Expressão de Akt em pata e mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.	69
5.5.2 -Expressão de iNOS em pata e mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.	72
5.5.3 -Expressão de canais para potássio sensíveis ao ATP em pata e mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.	74
5.6 Quantificar a concentração de óxido nítrico na pata e mesencéfalo pela dosagem de nitrito em ratos submetidos a constrição do nervo ciático.	76
5.7 Resumo dos resultados.	78
6. DISCUSSÃO.	82
7. REFERÊNCIAS	99
8. ANEXO I.	119

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor

Sentir dor, está intimamente atrelado à manutenção da vida. Sua característica naturalmente desagradável e presente nos momentos de sofrimento das pessoas e de muitos seres vivos levou a uma série de interpretações do que causaria de fato a dor e o que ela representava. Um dos pensamentos mais primitivos, é que a dor seria um castigo de seres superiores, como deuses, que diante de sua fúria por atitudes que os irritassem, castigavam com essa desagradável sensação. Esse pensamento ainda está presente na sociedade, pois mesmo com o avanço do conhecimento, muitas pessoas ainda consideram a dor um castigo (MERSKEY, 1980).

Com o desenvolvimento da sociedade, inclusive na forma de pensar, uma das teorias, dentre muitas elaboradas pelos filósofos gregos, foi a de Aristóteles em que ele classificou a sensação de dor como uma das “paixões da alma” e que ela estaria fortemente relacionada com os sentidos (visão, audição, olfato, paladar e tato), mais especificamente, seria um desequilíbrio intenso em algum dos sentidos. Já Platão argumentou que a dor era percebida no fígado e no coração e seria devido uma ação e reação de um violento impacto dos 4 elementos (terra, ar, fogo e água) com os átomos do corpo. Apesar dos filósofos não pensarem em um sistema nociceptivo com atuação central, para o conhecimento que se tinha na época, foi um avanço gigantesco, pois nesse momento a humanidade começa a entender a dor como algo próprio do organismo (MERSKEY, 1980).

No entanto, foi somente no século XVII que surgiu a primeira definição formal de dor quando Descartes postulou que, corpo e alma apesar de separados interagem entre si, promovendo o sentimento final da dor. Além disso, Descartes foi o primeiro a propor formalmente que haveria ligação entre os tecidos e o cérebro por feixes que integrariam a periferia com o sistema nervoso central. Assim, informações como dor e calor poderiam ser interpretadas e processadas (Figura 1) (MERSKEY, 1980).

Com o avanço no conhecimento da anatomia e da fisiologia, no século XIX, iniciou-se a possibilidade de assumir a existência do componente emocional na dor. Também neste século foram publicadas as primeiras teorias que formaram a base para definir que a dor possuía uma via própria e não seria uma exacerbação dos sentidos (MERSKEY, 1980).

Em 1973, com a missão de unir cientistas, médicos, profissionais da saúde em geral e políticos para estimular e apoiar o estudo da dor e traduzir esse conhecimento em melhorias em todo o mundo, John J. Bonica fundou a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP). Essa associação em 1979 definiu a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial de tecidos, ou descrita em termos de tal

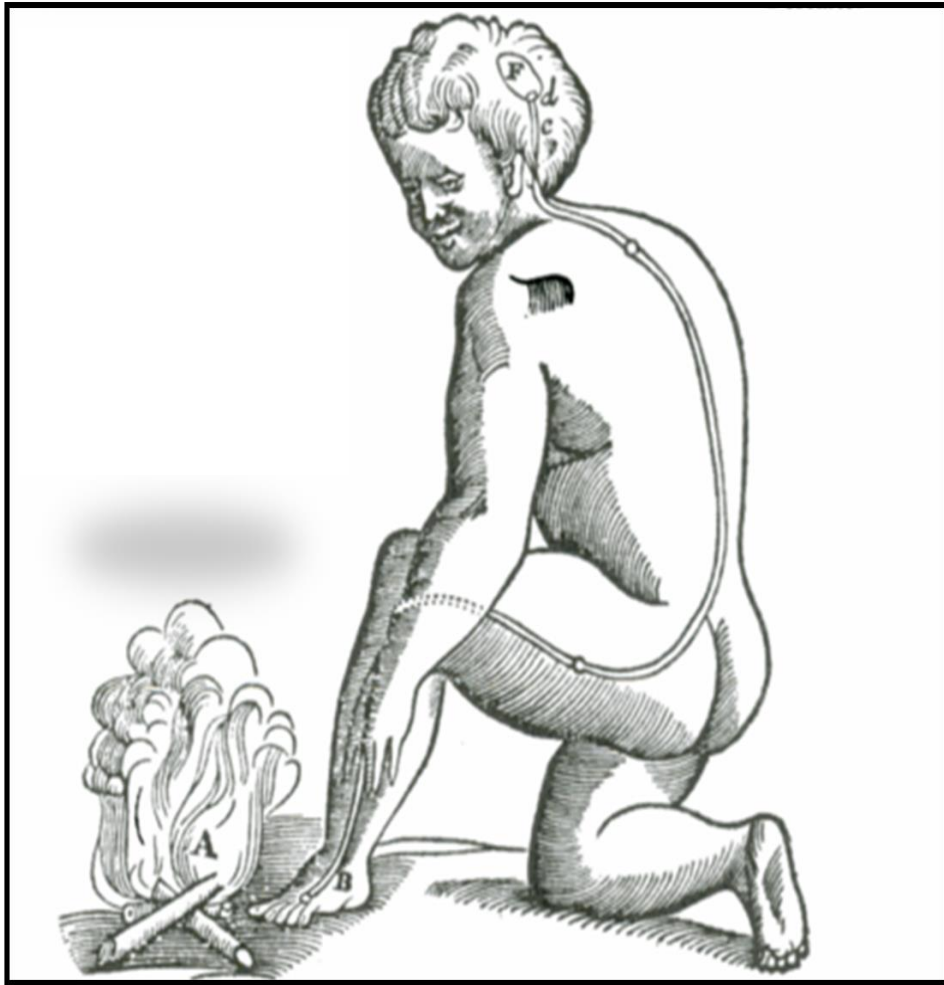


Figura 1. Figura publicada por René Descartes.

A figura de Descartes descreve bem a sua ideia de que uma fonte externa (A) emitiria partículas que estimulariam a região periférica (B) que gera uma informação, conduzida por feixes (C) e chega ao cérebro (F) através de uma estrutura central (D).

Fonte: *L’Homme de René Descartes et un Traité de la formation du fœtus*. 1664; p 27.

dano” (KOPF; PATEL, 2010). E em 2020 a IASP atualizou a definição da dor para “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a, dano real ou potencial ao tecido” (RAJA et al., 2020).

Um estímulo nocivo, como uma forte pressão ou um corte na pele, pode iniciar a transmissão do sinal neuronal da dor. Isso ocorre devido a presença de receptores especiais

chamados de nociceptores. No início do século XX, Sherrington verificou que diferentes tipos de estímulos em uma área receptiva ou sensorial levam a respostas diferentes. Um desses estímulos possui intensidade e qualidade suficientes para disparar automaticamente reflexo de fuga ou de evasão da ameaça e dor. Sherrington utilizou diferentes estilos de experimentos para descobrir que essa dor era uma reação nociceptiva e era sentida por receptores específicos denominados nociceptores. (GEBHART, 2004; JULIUS; BASBAUM, 2001). Tais estruturas seriam fibras aferentes que em situações normais disparam o impulso nervoso somente quando há um estímulo com potencial nocivo (BURGESS; PERL, 1967; JULIUS; BASBAUM, 2001). Muitos autores consideram que os nociceptores são estruturas localizadas na extremidade dos neurônios primários e não o neurônio primário como um todo (KANDASAMY; PRICE, 2015; PACE et al., 2018; PINHO-RIBEIRO; CHIU, 2019).

Após a geração, o impulso nervoso é conduzido por fibras específicas do tipo C, que são amielínicas, e do tipo A δ , que possuem uma fina camada de mielina (Figura 2B). Vale ressaltar que quanto menor a quantidade de mielina mais lento é a condução do impulso nervoso, por tanto, as fibras C e as A δ possuem velocidades diferentes de condução do impulso nervoso, mas ambas são de condução lenta se comparadas com a transmissão das demais fibras nervosas que não estão envolvidas, em situações normais, com a nocicepção (CRIADO, 2009). Apesar disso, a dor pode ser considerada como rápida ou lenta, utilizando como referencial apenas as fibras do tipo C e A δ . A dor de condução rápida é sentida cerca de 0,1 s após o estímulo doloroso. Os impulsos dolorosos são transmitidos pelos nervos periféricos para a medula espinhal pelas fibras aferentes primárias mielinizadas A δ , com velocidade de condução entre 12 e 30 m/s. Por outro lado, a dor de condução lenta começa após 1 segundo ou mais e aumenta lentamente, sendo os impulsos conduzidos por fibras aferentes primárias não mielinizadas do tipo C, com velocidade de 0,5 a 2,0 m/s (MILLAN, 1999; NEUMANN et al., 1996).

As fibras do tipo C e A δ fazem parte do complexo neural que conduzem os impulsos de caráter nocivo. Esse complexo inicia com as fibras aferentes primárias que conduzem os impulsos nervosos até o corno dorsal da medula espinhal, mais especificamente até as lâminas I e II, mais superficiais, à lâmina V, mais profunda (SLUKA, 2016) e à lâmina X (circuncanular) (MILLAN, 2002). No corno dorsal, as terminações nervosas das fibras primárias formam sinapses com os neurônios de segunda ordem, que vão continuar a condução da mensagem e com outras estruturas neurais como terminais de fibras descendentes, interneurônios excitatórios ou inibitórios, que modulam a transmissão do impulso a nível medular (MILLAN, 2002).

Os neurônios secundários carregam o impulso nervoso da medula até o tálamo e transferem a informação nociceptiva para os neurônios terciários que distribuem a mensagem até o córtex somatossensorial onde esse impulso nervoso é interpretado. Dessa forma ocorre a transmissão ascendente da dor, que permite o processamento da informação nociceptiva à nível cortical (Bushnell et al., 1999, Vanderah, 2007) (Figura 2A).

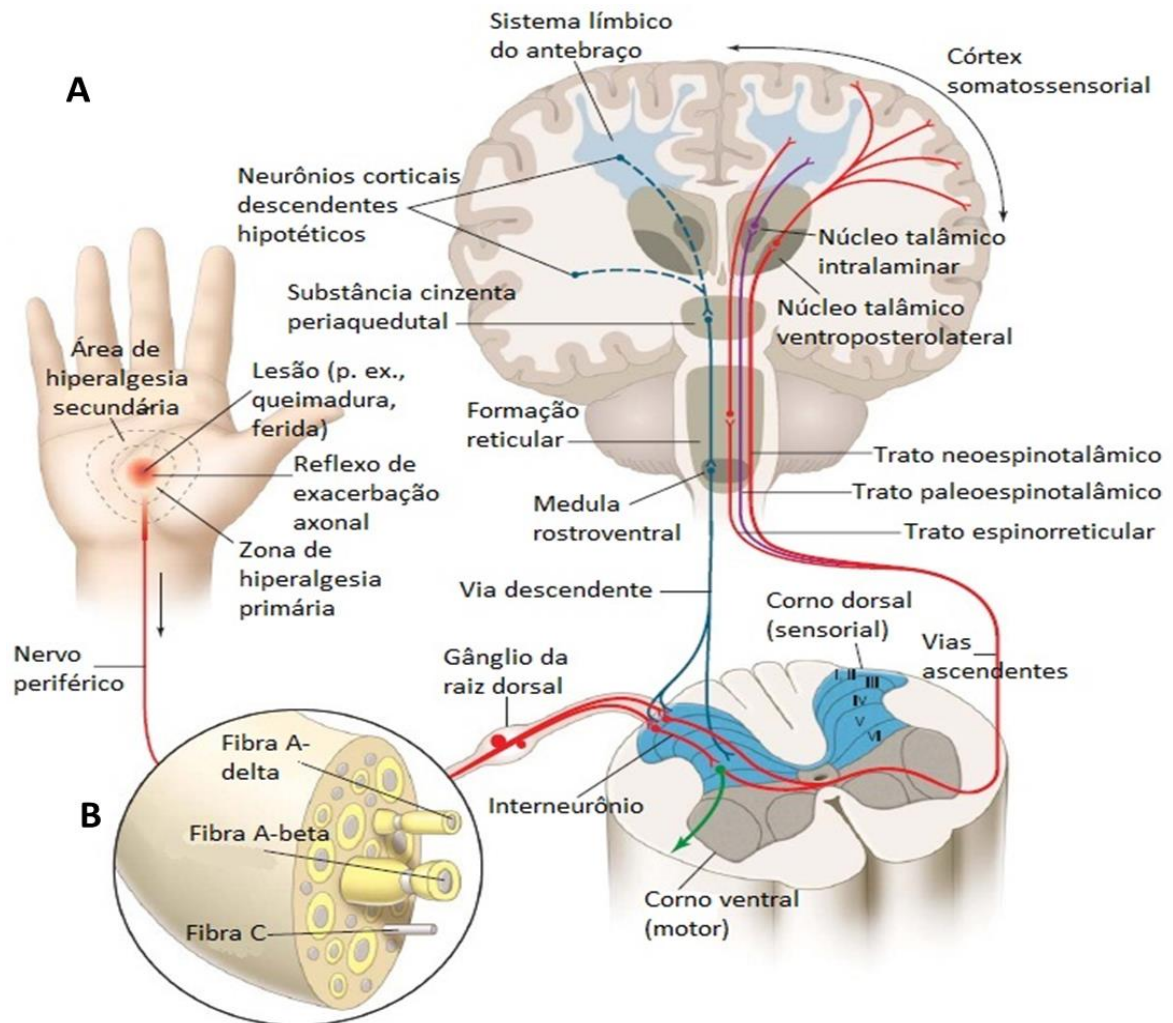


Figura 2. Representação das vias da dor.

Após um estímulo nocivo o impulso nervoso é conduzido pela via ascendente da dor, representado pela linha verde, até o córtex somatossensorial onde é interpretado. A via descendente (representada pela linha verde, controla a chegada do impulso nervoso, podendo dificultar ou facilitar a condução nervosa (A). As fibras sensitivas podem ser do tipo A-beta ($A\beta$), A-delta ($A\delta$) e C, sendo que as duas últimas são as que participam da via da dor (B). Adaptado de Oaklander et al. Chronic pain. ACP Medicine. 2011;1-19.

O mecanismo nociceptivo é mais complexo do que somente a condução do impulso nervoso gerado nos nociceptores. O organismo se adapta, fazendo uma série de modulações

durante a ascendência do impulso e esse pode chegar ao córtex somestésico muito diferente do que foi gerado no início da nocicepção (MELZACK; WALL, 1965; MILLAN, 1999, 2002).

Uma das modulações, explica a sabedoria popular e até intuitiva de que quando se toca perto de lesões a dor diminui. Esse fato pode ocorrer devido a teoria proposta em 1965 por Melzack & Wall; a “teoria do portão da dor”. Nela foi proposto que a informação neuronal nociceptiva que chegava ao corno dorsal da medula espinhal, não era transmitida sem nenhuma alteração para o sistema nervoso supra-espinhal, sofrendo forte influência modulatória (MELZACK; WALL, 1965; MILLAN, 2002). Melzack e Wall (1965), propuseram que havia uma espécie de barreira que poderia ser aberta ou fechada como um portão ou comporta, daí surgiu o nome da teoria. Trata-se na verdade, de uma barreira neuroquímica em que neurotransmissores inibem ou estimulam a transmissão ascendente através da ação destes sobre os interneurônios inibitórios. A via ascendente é capaz de “abrir” o portão da dor conduzindo seus próprios impulsos e inibindo os interneurônios inibitórios. Já as vias táteis são capazes de estimular os interneurônios inibitórios, “fechando” o portão da dor (BARBARO; HAMMOND; FIELDS, 1985; BASBAUM; FIELDS, 1984).

O sistema nervoso central também envia informações para os interneurônios inibitórios através de uma via neuronal, que por conduzir o impulso nervoso no sentido oposto da via ascendente, recebeu o nome de via descendente da dor. Essa via pode aumentar ou diminuir o débito dos impulsos nervosos, dependendo da intensidade que o impulso chega no local da modulação. Existem mecanismos facilitadores e dificultadores como as células “on” ou “off” do sistema serotoninérgico. Quando o impulso é muito intenso, as células dificultadoras são ativadas e diminuem a intensidade do impulso nervoso. Já quando o impulso é muito fraco, células facilitadoras amplificam a mensagem neuronal. A modulação descendente também ocorre através dos interneurônios inibitórios, em que, ao inibir os interneurônios, facilita a passagem do impulso nervoso e ao excitá-los, dificulta a passagem da mensagem nervosa na via ascendente. Esse processo envolve diversos sistemas modulatórios, por exemplo os sistemas opioidérgico, serotoninérgico e canabinoideérgico (MILLAN, 2002).

Neste contexto, a substância gelatinosa funciona como um sistema de controle que modula os padrões de sinais aferentes. Esses sinais que passam pela porção dorsal da coluna espinhal funcionam como ativadores do sistema nervoso central de seletivos processos no cérebro que influenciam as propriedades modulatórias do sistema do portão da dor. A estimulação cerebral ativa fibras eferentes descendentes que podem influenciar na condução dos impulsos nervosos desde os primeiros níveis sinápticos do sistema somestésico (JULIUS; BASBAUM, 2001; MELZACK; WALL, 1965; MILLAN, 2002).

Diversas estruturas estão ligadas a modulação endógena da dor, Reynolds em 1969 demonstrou que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (SCP) em ratos, era capaz de causar intensa analgesia mantendo outras respostas comportamentais, e que apesar de exercer um controle da dor importante, essa função não está restrita a medula. Além da SCP, outras estruturas já foram demonstradas como integrantes desse sistema descendente modulatório analgésico. Entre elas estão hipotálamo, o núcleo rostral ventromedial, o qual inclui o núcleo magno da rafe e o núcleo reticular paragigantocelular, o núcleo parabraquial, o locus coeruleus, o núcleo do trato solitário e o núcleo reticular dorsal (MILLAN, 2002; SANDKÜHLER, 1996).

O estudo das estruturas envolvidas na modulação descendente da dor também levou à descoberta de diversas substâncias endógenas que participam desse processo (HOSOBUCHI; ADAMS; LINCHITZ, 1977; PEYRON et al., 1995). Os opioides endógenos como β -endorfinas, dinorfinas e encefalinas, foram os primeiros a serem relatados como moduladores da transmissão nociceptiva e a partir daí outros sistemas como noradrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e canabinoidérgico foram considerados integrantes da via descendente da dor (MILLAN, 2002; MILLER, 1981; SANDKÜHLER, 1996).

Alguns sistemas analgésicos presentes na via descendente e também substâncias exógenas que são agonistas nesses sistemas tem seus efeitos através de ligação em receptores acoplados a proteína G_i , como é o caso do sistema opioidérgico e canabinoidérgico (CHEN et al., 1993a, 1993b; DOS SANTOS et al., 2016; EVANS et al., 1992; FUKUDA et al., 1993; KIEFFER et al., 1992; LI et al., 1993; MCALLISTER; GLASS, 2002; MENG et al., 1993; YASUDA et al., 1993). O acionamento desse receptor induz através da via PI3K γ /Akt/NOS a formação de óxido nítrico (NO) que é responsável por parte da analgesia desses sistemas através da modulação da atividade de canais para potássio (ALVES et al., 2013; CUNHA et al., 2010; RODRIGUES; DUARTE, 2000; ROMERO; DUARTE, 2012)

1.2 Sistema nitrérgico

O óxido nítrico é um pequeno radical livre e desempenha papel regulador em diversos processos fisiológicos importantes como na homeostase cardiovascular, resposta imune, metabolismo ósseo, neurotransmissão e exibe um potencial terapêutico excepcional por exemplo no câncer (KANO et al., 1998; LALA, 1998; MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; RALSTON, 1997).

O NO foi descoberto pela primeira vez por Joseph Priestly em 1722 e foi considerado um poluente ambiental. No entanto, em 1987, as pesquisas do seu efeito sobre a vasculatura, especialmente a relação com o fator de relaxamento do endotélio mudaram a perspectiva científica sobre esse composto (YETIK-ANACAK; CATRAVAS, 2006). Em 1998, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina foi concedido em conjunto a Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro e Ferid Murad, o que tornou o NO uma molécula muito visada e suas pesquisas na área biomédica se aprofundaram. Os estudos em relação a liberação de NO, métodos de detecção, interação com as células e interação célula-NO-materiais se tornaram os principais pontos de pesquisa deste composto (YANG; ZHAO; HE, 2019).

O óxido nítrico (NO) exerce vários efeitos moduladores sobre a dor e desempenha um papel fundamental na regulação das respostas imunológicas. Eles afetam praticamente todas as etapas do desenvolvimento da inflamação. Por exemplo, em baixas concentrações, produzidas por sintases de óxido nítrico constitutivas inibem a expressão de moléculas de adesão, síntese de citocinas e quimiocinas e adesão e transmigração de leucócitos. Já em grandes quantidades de NO, geradas principalmente pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS), podem ser tóxicas e pró-inflamatórias. No entanto, as ações do óxido nítrico não dependem principalmente da fonte enzimática, mas sim do contexto celular e da concentração de NO (dependente da distância da fonte) (SANDNER et al., 2019; TOLPPANEN; PONIKOWSKI, 2019).

Em tecidos animais, o NO é gerado enzimaticamente por sintases (NOS), que oxidam L-arginina a L-citrulina (Fig.) (IGNARRO, 2002; MICHEL; FERON, 1997). Existem 3 isoformas de NOS (KOUROSH-ARAMI et al., 2020; MICHEL; FERON, 1997) que são a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) ou NOS I (IGNARRO, 2002), a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) ou NOS II (WEST et al., 2001) e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) ou NOS III (IGNARRO, 2002). Todas as três isoformas têm uma estrutura molecular semelhante e apesar da identidade geral da sequência de aminoácidos ser de 55%, há uma homologia muito maior se for considerado apenas os sítios catalíticos (WEST et al., 2001).

As três isoenzimas NOS (neuronal, endotelial e indutível) são flavoproteínas que atuam como dioxigenases usando oxigênio molecular e NADPH para transformar L-arginina em L-citrulina e NO (Figura 3) Elas são homólogas ao citocromo p 450 redutase e contêm um grupo heme e um cofator chave para a produção de NO que é a tetrahidrobiopterina (BH₄). A BH₄ é muito importante, porque na sua ausência, NOS produz superóxido, em vez de óxido nítrico (ALP et al., 2003; CHACHLAKI; PREVOT, 2020; GANTNER; LAFOND; BONINI, 2020; GUZIK et al., 2000).

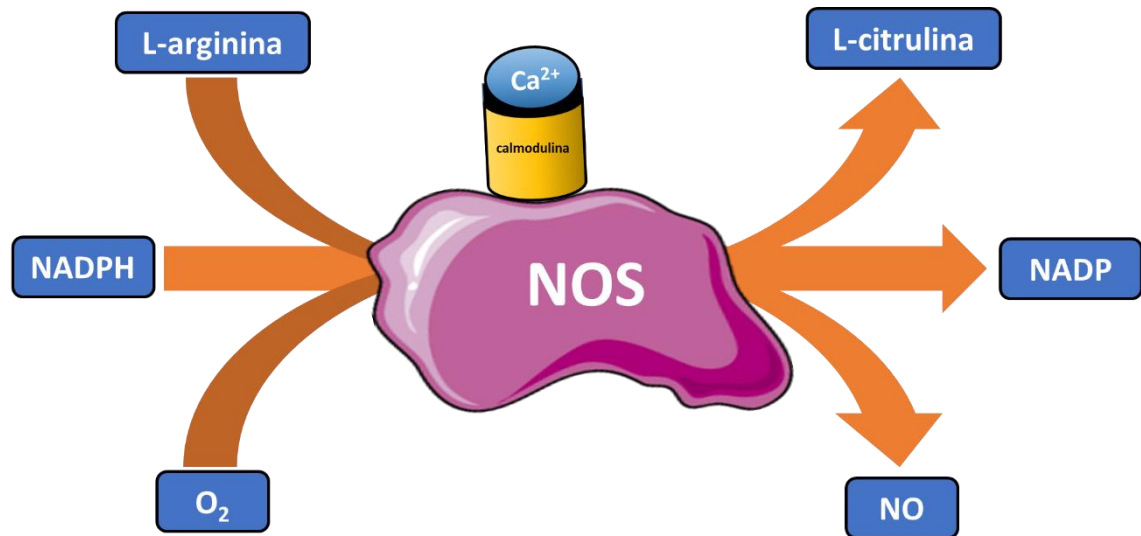


Figura 3: Produção de NO pela NOS.

A oxido nítrico sintase (NOS) utiliza L-arginina, NADPH e O_2 para produzir o oxido nítrico, L-citrulina e NADP. A calmodulina ativa a NOS e as enzimas constitutivas precisam da ligação com o íon cálcio, mas a induzível não precisa de cálcio para a ativação.

As isoformas neuronais e endoteliais são ativadas pela ligação da proteína reguladora de cálcio-calmodulina e para essas enzimas, a concentração de cálcio é muito importante e por isso são consideradas dependentes de cálcio (CHACHLAKI; PREVOT, 2020; GRIFFITH; STUEHR, 1995; WEST et al., 2001). Por exemplo, a nNOS em neurônios centrais é ativada pela ligação do glutamato aos receptores NMDA com um aumento subsequente em $[Ca_2^+]_i$ devido à abertura dos canais de cálcio de voltagem, enquanto a eNOS é ativada por tensão de cisalhamento sanguíneo ou estimulação de muscarínico endotelial, purinérgico, cinina, substância P ou receptores de trombina. Isso desencadeia um aumento da $[Ca_2^+]_i$ às custas da liberação de Ca_2^+ do retículo endoplasmático (CHACHLAKI; PREVOT, 2020; SCHMIDT et al., 1992).

Na isoforma induzível, a calmodulina é ligada com uma afinidade muito alta e ocorre em níveis basais de cálcio, o que a torna independente dos níveis desse cátion (GRIFFITH; STUEHR, 1995; WEST et al., 2001). Devido a isso, em monócitos e macrófagos, por exemplo, a indução de iNOS e a presença de L-arginina são suficientes para iniciar a geração de NO. A indução de iNOS pode ser iniciada por citocinas inflamatórias $IFN\gamma$, $TNF-\alpha$ ou IL-1 (HEBA et al., 2001). No entanto, o indutor mais reconhecido é o lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina de *Escherichia coli*, que é sabidamente responsável pelo desenvolvimento da Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) no curso da sepse por bactérias gram negativas (XIE; NATHAN, 1994).

As células mieloides têm um receptor para LPS em sua membrana celular, a proteína m-CD14. LPS, usando uma "proteína de ligação a LPS" (LBP), é ancorado a m-CD14 e, em seguida, desencadeia uma cadeia de fosforilação de proteína que eventualmente leva à ativação do fator de transcrição NFκB que é responsável pela transcrição do mRNA iNOS. Em células sem m-CD14, a indução de iNOS é completada por um complexo de s-CD14 solúvel com LBP e o próprio LPS (MATSUNO et al., 1998; XIE; NATHAN, 1994).

De maneira semelhante, o LPS também pode induzir COX-2. Embora o NO cumpra mais funções parácrinas do que autoendócrinas, no caso da iNOS, grandes quantidades de NO formado localmente podem inibir a própria iNOS, bem como a COX-2, em uma reação de feedback negativo. A ativação do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma pode desempenhar um papel importante na regulação da indução de iNOS. Foi demonstrado que a ativação do PPARgamma com um agonista sintético específico, a ciglitazona, leva a uma diminuição acentuada da apoptose, geração de NO e expressão de NOS-2. Os glicocorticosteroides e algumas citocinas, como TGF-β, IL-4 ou IL 10, inibem a indução de iNOS (GIVALOIS; LI; PELLETIER, 2002; SLOMIANY; SLOMIANY, 2002, 2003).

A cinética de produção de óxido nítrico é diferente entre as isoformas constitutivas e induzíveis. Enquanto a iNOS produz quantidades muito grandes e tóxicas de NO de maneira sustentada, as isoformas de NOS constitutivas produzem NO em segundos e suas atividades são diretas e de ação curta (SALVEMINI; ISCHIROPOULOS; CUZZOCREA, 2003). A ativação da guanilato ciclase leva a um aumento no monofosfato de guanosina cíclico intracelular (cGMP), que por sua vez ativa as proteínas quinases dependentes de cGMP que medeiam as ações do NO, incluindo vasorrelaxamento, aumento da permeabilidade vascular, bem como efeitos anti-proliferativo, antiplaquetário e antioxidante do óxido nítrico (LUGNIER; KERAVIS; ECKLY-MICHEL, 1999).

O NO formado por isoformas constitutivas de NOS é armazenado como um nitrosotiol na albumina e pode atuar fisiologicamente como N-nitrosoglutationa e N-nitrosocisteína (MARCINKIEWICZ, 1997; MORO et al., 1994). A eNOS, aparentemente produz NO para citoproteção, possivelmente devido às suas propriedades redox características, os locais que atingem e quantidades produzidas (XIE; NATHAN, 1994). Além disso, o NO gerado pela eNOS é essencial para manter a perfusão tecidual com o sangue, por oferecer citoproteção na circulação pulmonar e coronariana contra lipídios tóxicos liberados pelo LPS (GRYGLEWSKI et al., 1998).

A iNOS produz grande quantidade de NO durante o curso de uma inflamação, a concentração resultante dessa produção ultrapassa muito a concentração fisiológica gerada

pelas isoformas constitutivas (XIE; NATHAN, 1994). Produzido por macrófagos entre outras células imunologicamente ou quimicamente ativadas, essa quantidade diferenciada é importante para exercer atividades que são diferentes das produzidas constitutivamente, como matar microrganismos e nitrosilar macromoléculas (CHANNON; GUZIK, 2002; GUZIK et al., 2002).

O NO produzido pela iNOS nas células mieloides geralmente são gerados junto com grandes quantidades de ânion superóxido (O_2^-). Estes dois podem formar peroxinitrito ($ONOO^-$) (CHANNON; GUZIK, 2002; GUZIK et al., 2002) que medeia os efeitos citotóxicos do NO, como dano ao DNA, oxidação de LDL, formação de isoprostano, tirosinanitração, inibição da aconitase e respiração mitocondrial (ISCHIROPOULOS; AL-MEHDI, 1995).

As propriedades tóxicas do óxido nítrico são fundamentais na patogênese do choque séptico. A superprodução de NO pela iNOS durante a septicemia é considerada responsável por hipotensão arterial irreversível, vasoplegia (perda de resposta à noradrenalina), acidose láctica, necrose e apoptose (PARRATT, 1997; SAHA; BURNS, 2020). No entanto, é importante lembrar que o NO produzido pela iNOS é benéfico para a reação de defesa do hospedeiro ao contribuir para a morte microbiana. Grandes quantidades de NO podem ter como alvo inúmeras proteínas e enzimas essenciais para a sobrevivência e sinalização celular. Estes incluem moléculas de sinalização envolvidas na sinalização de citocinas como proteínas JAK ou STAT, via $NK\kappa B / I\kappa B$, bem como MAPK, algumas proteínas G e fatores de transcrição. A nitração de cisteínas nessas proteínas pode levar à sua ativação ou inativação (BOGDAN, 2001; COLEMAN, 2001; MOILANEN; VAPAATALO, 1995).

Em princípio, haveria um dilema fisiológico sobre a toxicidade do NO em relação as células que o produz. Elas estão envolvidas na maior concentração e por isso, poderiam ser as mais afetadas, mas não é o que ocorre. Elas possuem mecanismos de autodefesa, por exemplo os sistemas antioxidantes GSH-GSSG protegem os macrófagos contra grandes quantidades de NO gerados pela iNOS (COLEMAN, 2001). Da mesma forma, as células endoteliais não são os principais alvos do NO produzido pela eNOS, que é constitutiva e não produz tanto como a induzível, mas o que é produzido tem sua maior concentração no endotélio. Isso é possível devido ao fato de que os aumentos de cálcio intracelular que medeiam a ativação da eNOS também são capazes de inibir a atividade da guanilato ciclase (KNOWLES et al., 1989).

O óxido nítrico também está envolvido na regulação da liberação de hormônios que comprovadamente controlam o processo inflamatório centralmente. Por exemplo, o NO desempenha um papel inibitório acentuado na secreção de ACTH induzida por CRH e inibe a secreção de corticosterona (GIVALOIS; LI; PELLETIER, 2002).

A Guanilato Ciclase Solúvel (GCs) é a molécula que o NO interage, funcionando como um receptor intracelular. A ativação de GCs resulta na conversão de Guanosina Trifosfato (GTP) para o segundo mensageiro monofosfato de Guanosina cíclico (GMPc). O GMPc modula uma série de cascatas por meio da ativação de uma variedade de efetores, como a Fosfodiesterase (PDE), a Proteína Quinase G (PKG) e os Canais de Íons com Nucleotídeo Cíclico. A via NO/GCs/GMPc desempenha papéis significativos em vários processos fisiológicos, incluindo agregação de plaquetas, relaxamento do músculo liso e liberação de neurotransmissores (SANDNER et al., 2019; TOLPPANEN; PONIKOWSKI, 2019).

Além dos processos já citados a via nitrérgica também está envolvida em eventos inflamatórios e nociceptivos (ESPLUGUES, 2002; PARADISE et al., 2010), com atividades na dor aguda e crônica (PARADISE et al., 2010; TORIYABE et al., 2004), tanto a nível central quanto periférico desempenhando um complexo e dual papel modulatório no evento nociceptivo (FREIRE et al., 2009; MIYAMOTO et al., 2009).

O processo inflamatório possui características hiperalgésicas e nesses processos há a participação nitrérgica (ESPLUGUES, 2002; PARADISE et al., 2010), mas esse sistema também está envolvido na antinocicepção (CURY et al., 2011). Muitos trabalhos demonstraram que o NO é capaz de induzir analgesia e mediar a ação de sistemas analgésicos como opioides e de substâncias exógenas como anti-inflamatórios não esteroidais e produtos naturais (CUNHA et al., 2010; DE CARVALHO VELOSO et al., 2015; GOMES; CUNHA; CUNHA, 2020; REIS; ROCHA, 2006).

Fica claro que o NO possui um efeito dual no processo nociceptivo, sendo sua concentração tecidual um dos fatores responsáveis. Geralmente, altas concentrações de NO estão associadas a processos dolorosos, enquanto baixas concentrações são relacionadas com mais frequência a atividades analgésicas (CURY et al., 2011).

Um dos processos analgésicos praticado pelo NO é relativo ao acionamento de receptores acoplados a proteína Gi, que como já descrevemos em partes, há um acionamento da via PI3K γ /Akt/NOS e haverá produção de NO pela ativação de NOS (CUNHA et al., 2010) (Figura 4). O NO produzido agirá na própria célula produtora, um neurônio da via nociceptiva, interagindo com a GCs que por sua vez converterá GTP em GMPc que induzirá PKG e essa ativará canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) aumentando a corrente deste íon e causando hiperpolarização e dificultando a formação do impulso nervoso (CUNHA et al., 2010; GOMES; CUNHA; CUNHA, 2020). Além da ativação da via GTP/GMPc/PKG, o NO também pode agir diretamente nos canais K_{ATP} através de S-nitrosilação direta da subunidade SRU1 do canal e provocar os mesmos efeitos observados na ativação dessa via (KAWANO et al., 2009).

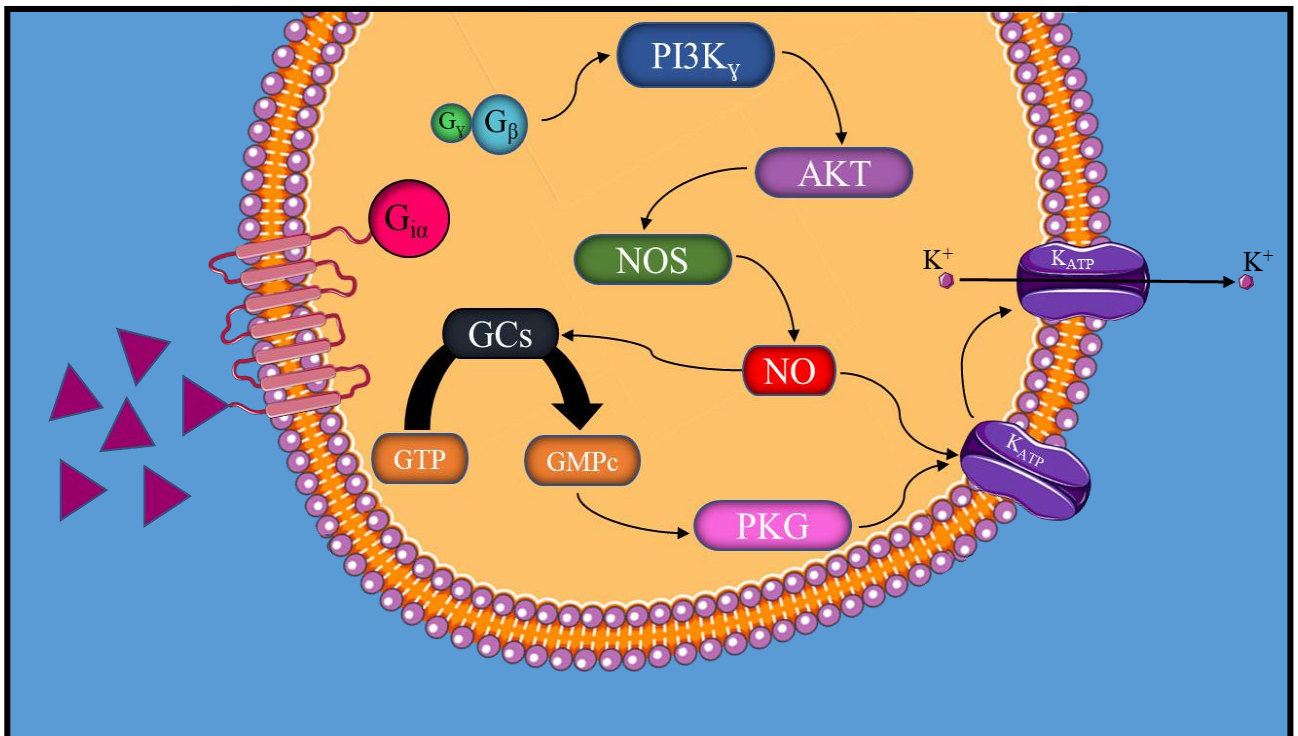


Figura 4: Representação esquemática da via PI3K / AKT / NOS atuando sobre os canais para potássio sensíveis ao ATP.

A ativação de receptores acoplados a proteína G_i de sistemas analgésicos em neurônios nociceptivos desencadeia a ativação da via PI3K_γ / AKT / NOS que, por sua vez, aumenta a produção de NO. O NO, pode levar a abertura dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) ou induzir essa ação indiretamente através da estimulação da via GMPc / PKG. A abertura de K_{ATP} leva a um efluxo de íons potássio e promove a hiperpolarização de neurônios.

O estudo da via PI3K_γ/Akt/NOS está bem consolidado na dor inflamatória (ALVES et al., 2013; CUNHA et al., 2010; RODRIGUES; DUARTE, 2000; ROMERO; DUARTE, 2012). No entanto, a dor neuropática possui mecanismos complexos que podem interferir diretamente com os eventos nitrérgicos ou com a atuação dos sistemas analgésicos e por consequência alterar o contexto com que o NO atua no processo nociceptivo neuropático (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009). Por essas questões, se torna importante entender a classificação da dor e seus conceitos para esse estudo.

1.3 Classificação da dor quanto ao fator etiológico

Como já foi dito, a dor tem função importante na manutenção da vida, sendo sua função fisiológica ligada a proteção. A dor não só tem a função de dar consciência ao indivíduo sobre um possível estímulo danoso, mas também por sua característica desagradável, ela induz uma reação mediante a ameaça à integridade física e/ou orgânica. Essa função protetora pode ocorrer quando o organismo está íntegro e algum agente promove um estímulo intenso suficiente para colocar essa integridade em risco ou em tecidos lesados em reparação, em que há sensibilização local e os estímulos não precisam ser tão intensos para desencadear a sensação dolorosa. Nos dois casos citados as dores são agudas e não são consideradas patologias, apesar de poderem estar associadas a elas (BASBAUM; FIELDS, 1984).

Em algumas situações, a dor permanece além de sua função protetiva e se torna crônica e debilitante. Neste contexto, estimulações constantes da via nociceptiva e alterações plásticas ao nível periférico e central promovem a transição da dor aguda para a dor crônica (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Seja aguda ou crônica, a dor sempre é uma experiência pessoal que é influenciada em vários graus por fatores biológicos, psicológicos e sociais e por isso, apesar das definições formais, os indivíduos acabam “aprendendo” o que é dor por suas experiências de vida (RAJA et al., 2020). Assim, fica muito claro a diferença prática entre o conceito de nocicepção, que segundo a IASP é o processo neural de codificação de estímulos nocivos, e a dor, que demanda uma soma de processos, desde o estímulo, geração e condução do impulso nervoso e a interpretação. Um outro ponto a ressaltar, é que, além de depender desses processos, eles podem variar e em algumas situações nem existir, por exemplo na síndrome do “membro fantasma” que ocorre em casos de amputações de membros e os pacientes sentem dor na região que foi amputada (MACIVER et al., 2008). Por outro lado, lesões teciduais que certamente levariam à sensação dolorosa, mas em determinadas situações, como medo ou estresse extremo, não causam dor (ELDABE et al., 2015; LIMA, 2002; RHUDY; MEAGHER, 2000; WALL, 1979).

Além do tempo em que persiste, a dor pode ser classificada quanto ao fator etiológico que induzem os mecanismos biológicos geradores dos diferentes tipos de dores. Clifford Woolf em 2004, definiu a dor em 4 tipos, nociceptiva, inflamatória, neuropática ou funcional como mostra a figura 3 (WOOLF, 2004a).

A dor nociceptiva é a que tem origem em estímulos físicos, térmicos, químicos ou até mesmo lesões em órgãos como o infarto do miocárdio, permanecendo enquanto forem mantidas as agressões. A dor inflamatória é caracterizada pela ação dos mediadores

inflamatórios nos nociceptores, ativando-os ou sensibilizando-os. A dor neuropática é originada por lesões no sistema nervoso somatossensorial que alteram a sua estrutura e função, de modo a induzir dor espontânea, ou por estímulos inofensivos, ou mesmo amplificar a dor em estímulos nocivos. E por fim a dor idiopática/funcional em que não se conhece a causa (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; MILLAN, 1999; WOOLF, 2004a).

Uma atualização em 2011 feita pela IASP, confirmou o conceito de dor neuropática, mas redefiniu a dor nociceptiva para dor que surge de dano real ou potencial ao tecido não neural e é devido à ativação de nociceptores. Essas definições colocam o sistema nervoso somatossensorial como diferencial para classificação e qualquer condição de dor em que não fosse encontrado lesão nesse sistema seria classificado como nociceptiva. No entanto, nem todas as situações em que não se detectava lesões nervosas era possível ter certeza na ativação dos nociceptores. Pensando nisso, Eva Kosek propôs em 2016 um novo conceito, o de dor nociplástica que consiste na dor que surge da nocicepção alterada, apesar de nenhuma evidência clara de dano real ou potencial do tecido causando a ativação de nociceptores periféricos ou evidência de doença ou lesão do sistema somatossensorial causando a dor. Esse conceito foi aceito pela IASP que reclassificou a dor quanto aos fatores etiológicos (Figura 5). Dessa forma, a classificação ficou de acordo com a Tabela 1 (KOSEK et al., 2016).

Tabela 1: Classificação da dor quanto ao fator etiológico segundo a IASP

Classificação	Definição
Dor nociceptiva	Dor que surge de dano real ou potencial ao tecido não neural e é devido à ativação de nociceptores
Dor Neuropática	Dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial
Dor Nociplástica	Dor que surge da nocicepção alterada, apesar de não haver evidência clara de dano tissular real ou potencial causando a ativação de nociceptores periféricos ou evidência de doença ou lesão do sistema somatossensorial causando a dor

Fonte: IASP (<https://www.iasp-pain.org/terminology?navItemNumber=576>)

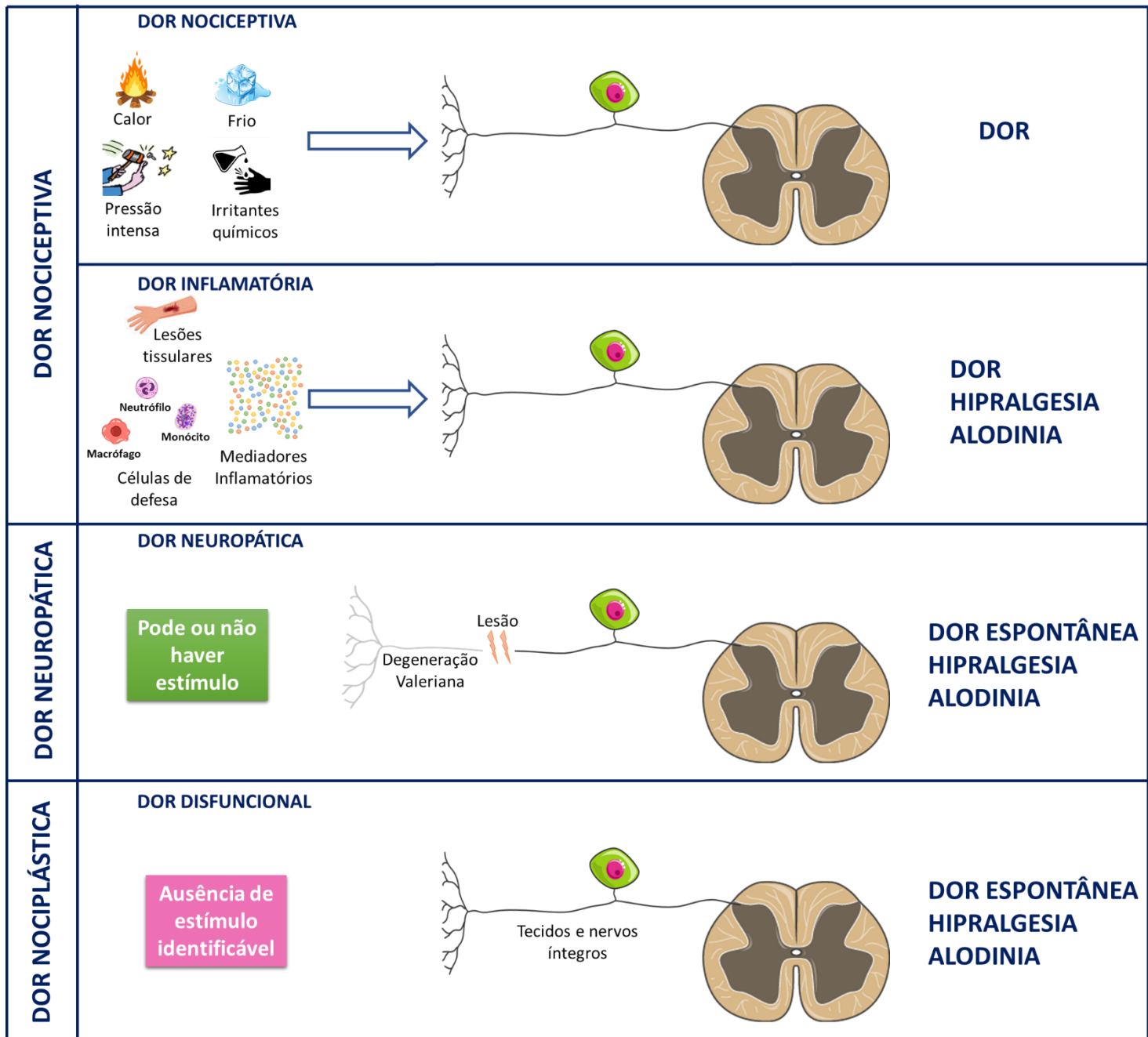


Figura 5: Classificação dos tipos de dor.

Classificação de dor proposta por Kosek em 2016, e aceita pela IASP, está representada na primeira coluna e a classificação segundo Woolf 2004 representada na segunda coluna, mostrando que a classificação mais moderna agrupou a dor nociceptiva e inflamatória no mesmo grupo e substituiu o conceito de dor disfuncional pelo de dor nociplástica.

1.4 Dor Neuropática

A Dor Neuropática é uma descrição clínica, e não propriamente um diagnóstico, que resulta de lesões ou doenças no sistema nervoso somatossensorial (RAJA et al., 2020). Ela pode ser central ou periférica, dependendo de onde ocorre tais lesões, no sistema nervoso central ou no periférico. Na periferia pode ser causada por: trauma mecânico, doença metabólica, produtos químicos neurotóxicos, infecção microbológica, ou invasão tumoral e envolve múltiplas alterações fisiopatológicas (DWORKIN et al., 2003; LIN et al., 2020; WOOLF; MANNION, 1999). Dor neuropática central geralmente resulta da lesão da medula espinhal, acidente vascular cerebral, ou esclerose múltipla (DUCREUX et al., 2006).

É possível que na prática clínica, o paciente neuropático seja classificado e tratado tomando como cerne a doença de base, no entanto, a abordagem baseada na etiologia pode deixar de lado uma questão fundamental a respeito da dor neuropática, que é a plasticidade mal adaptativa do sistema nervoso. A doença primária e o dano neural provocado são apenas os iniciadores de uma cascata de mudanças que levam e sustentam esse tipo de dor, embora o tratamento orientado para a patologia primária é obviamente essencial (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

A síndrome neuropática possui etiologias altamente prevalentes na população em geral, entre elas estão doenças metabólicas como a diabetes mellitus que afeta mais de 14 milhões de pessoas só nos Estados Unidos e desse montante de pessoas cerca de 20 a 24% manifestam a neuropatia diabética dolorosa (SCHMADER, 2002). Doenças virais também são capazes de levar a uma neuropatia dolorosa como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SCHIFITTO et al., 2002) e o herpes zoster, sendo que esse último atinge um número estimado de 800.000 pessoas a cada ano nos EUA, a maioria dos quais são idosos ou imunossuprimidos. Dentre estes 25% e 50% dos adultos com mais de 50 anos desenvolvem neuralgia pós herpética, dependendo da precocidade da terapia antiviral para herpes zoster (SCHMADER, 2002). Doenças comportamentais também podem ocasionar a síndrome neuropática, o alcoolismo está entre elas levando ao que se chama de neuropatia alcoólica (KOIKE et al., 2003).

Uma outra síndrome comum é a do túnel do carpo, ela é um conjunto de sinais e sintomas, entre eles a dor neuropática e envolve uma combinação de trauma mecânico, aumento da pressão e dano isquêmico ao nervo mediano dentro do túnel do carpo, comum em pessoas que praticam movimentos repetitivos no seu dia a dia (ATROSHI et al., 2003; GENOVA et al., 2020).

Mas não só moléstias originam a dor neuropática, procedimentos cirúrgicos também podem ser a causa (MACRAE, 2001), incluindo herniorrafia em que ocorre em 30% dos pacientes submetidos a esse procedimento (POOBALAN et al., 2001), toracotomia em que muitos pacientes desenvolvem dor crônica (GOTODA et al., 2001; PERTTUNEN; TASMUTH; KALSO, 1999) ou mastectomia que neste caso a incidência de dor crônica varia, por exemplo a reconstituição sem implante teve incidência menor de dor pós-cirúrgica e outra variante foi a técnica utilizada em que o implante submuscular foi de maior incidência do que o subglandular (WALLACE et al., 1996). Além de procedimentos cirúrgicos, tratamentos quimioterápicos também podem causar neuropatia, drogas como cisplatina, oxaliplatina e carboplatina estão associadas a lesões neurais e subsequente dor crônica (QUASTHOFF; HARTUNG, 2002).

Esta síndrome se manifesta não só com fenômenos sensoriais positivos, tais como dor, alodinia, disestesia, parestesia e hiperalgesia, mas também com fenômenos negativos sensoriais, tais como hipoestesia, anestesia, analgesia e hipoalgesia (BACKONJA, 2003). Os sinais comuns da dor neuropática (Quadro 1), além dos já citados são: queimação, sensação de choque elétrico e dor paroxística (JENSEN et al., 2001; MARCHETTINI et al., 2006).

Quadro 1: Sintomas positivos e negativos da dor neuropática

Tipo	Sintoma	Conceito	
Positivos	Dor espontânea	Sensação dolorosa sem estímulo aparente	
	Evocados	Alodinia	Dor gerada por estímulo não doloroso
		Hiperalgisia	Dor exagerada a um estímulo doloroso
	Espontâneos	Disestesia	Alteração na sensibilidade dos sentidos, sobretudo do tato
		Parestesia	Sensações cutâneas subjetivas vivenciadas com ausência de estimulação
Negativos	Hipoestesia	Diminuição da sensibilidade a estímulos	
	Anestesia	Perda total da sensibilidade	
	Analgesia	Ausência de dor em resposta a estímulos normalmente dolorosos	
	Hipoalgisia	Resposta diminuída a um estímulo doloroso	

Fonte: Adaptado de Baron, Binder e Wasner (2010)

O exame clínico rotineiro muitas vezes é incapaz de diferenciar a dor neuropática da não neuropática (RASMUSSEN et al., 2004). Para que os diagnósticos fossem mais precisos foram criados questionários como o *LANSS Pain Scale*, ele é baseado na análise de descrição sensorial e em exames comuns da disfunção sensorial que fornecem informações imediatas em contextos clínicos (BENNETT, 2001).

A lesão nervosa também leva a uma intensa liberação de mediadores inflamatórios, o que gera a facilitação periférica, que emana grande quantidade de impulsos nervosos para a medula e cérebro e gera o processo de facilitação central (VISWANATH et al., 2020). No sistema nervoso central o que se observa são alterações como necrose, apoptose, gliose, desmielinização, e cavitação, e tardiamente pode ocorrer, por exemplo, a formação siringe (formação de cisto) após lesão medular (PROFYRIS et al., 2004).

Durante o estabelecimento da dor neuropática alterações patológicas ocorrem tanto no sistema nervoso central quanto na periferia. No nervo afetado pela agressão primária observa-se degeneração walleriana (degeneração neuronal da porção distal de uma lesão em neurônios), brotamentos, formação de neuromas (crescimento ou tumor de tecidos nervosos) e atrofia devido a compressão (WOOLF, 2004b).

As alterações patológicas acabam por alterar o contexto fisiológico. Talvez a mais emblemática seja a geração de impulsos ectópicos a partir da lesão, no neuroma, ou no gânglio da raiz dorsal (DRG) (SERRA et al., 2012; WOOLF, 2004b; WOOLF; MANNION, 1999). O neuroma que está completamente formado a partir do oitavo dia após a lesão nervosa tem características semelhantes as terminações nervosas de nervos comuns que enervam a pele e funcionalmente possuem propriedades heterogêneas que lembram as mecanossensoriais, polimodais e nociceptiva. Isso ocorre devido a tentativa de regeneração, e supõe-se que as diferenças entre o neuroma e as terminações nervosas da pele seriam devido ao isolamento das fibras do neuroma de fatores que agiriam na pele e são responsáveis pela maturação e manutenção das atividades nervosas locais (RIVERA et al., 2000; WELK; LEAH; ZIMMERMANN, 1990).

O aumento de atividade nervosa também contagia as fibras tipo C vizinhas às fibras lesadas, contribuindo para a ampliação do sinal nervoso patológico (WU et al., 2001). Múltiplos canais para íons podem estar envolvidos na geração dos impulsos ectópicos e entre eles estão os canais para sódio sensíveis a tetrodotoxina, para potássio e para cálcio (LIU et al., 2001). O aumento no número dos canais para sódio, a redução no número dos canais para potássio (CHRISTOPH et al., 2008; HOFFMANN et al., 2008) e a diminuição no limiar dos canais iônicos TRP₁ (SHEETS et al., 2008), tem um papel importante na geração e manutenção desse aumento de atividade neuronal (CHRISTOPH et al., 2008; HOFFMANN et al., 2008; SHEETS et al., 2008).

Seguindo as alterações periféricas, também ocorrem mudanças a nível central. A sensibilização central é uma alteração importante que está bastante relacionada com os sintomas da síndrome neuropática (JI et al., 2003; WOOLF; MANNION, 1999). Muito se deve a facilitação sináptica, que é o que parece predominar nos indivíduos com dor neuropática (CAMPBELL; MEYER, 2006). Para que ocorra esse aumento da força sináptica ocorre alterações na síntese de neurotransmissores e neuromoduladores (OBATA et al., 2003; ROSENBERGER et al., 2020) e na densidade de canais de cálcio (HENDRICH et al., 2008; LI et al., 2004). No neurônio pós-sináptico ocorre uma fosforilação de subunidades de N-metil-D-aspartato (NMDA) (ROSENBERGER et al., 2020; ULTENIUS et al., 2006) e aumento da densidade desse receptor (CHENG et al., 2008; IWATA et al., 2007; MIYABE; MILETIC; MILETIC, 2006; TAKASUSUKI et al., 2007; TAO et al., 2003). Observada inicialmente no DRG, também foram encontradas alterações sinápticas parecidas em regiões do cérebro envolvidas com a interpretação e aspectos emocionais da dor, como amígdala, córtex do giro anterior e córtex pré-frontal (FU et al., 2008; PEDERSEN; SCHEEL-

KRÜGER; BLACKBURN-MUNRO, 2007). Há uma hipótese de que o processo de sensibilização central, permite que o sistema nervoso central mantenha a dor independente de qualquer entrada contínua periférica (DEVOR, 2006).

Além dos neurônios, diretamente envolvidos na dor neuropática, parte da responsabilidade pela geração e manutenção dos sintomas tem sido atribuído as células da glia como microglia e astrócitos. Estes grupos celulares liberariam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, que são um dos principais componentes de mediação ou na manutenção de hiperalgisia e alodinia (VISWANATH et al., 2020; WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001).

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A dor é considerada uma questão de saúde pública, sendo a principal causa de busca por atendimento médico e ausências ao trabalho. Por isso acaba por gerar muitos gastos governamentais e perda de produtividade tanto em órgãos públicos quanto na iniciativa privada (CARR et al., 2019; CHENG et al., 2008). A prevalência de dor neuropática devido a lesão nervosa periférica varia de 5% a 15,7% (KUFFLER, 2020) e aproximadamente 8% da população adulta apresenta dor com características neuropáticas. Se considerarmos as estatísticas dentro das populações com morbidades passíveis de levar a neuropatias, a prevalência de dor neuropática sobe muito, chegando a por exemplo 25% da população diabética e 35% dos portadores de HIV (MURNION, 2018).

A dor neuropática ainda apresenta um fator complicador, por ser crônica e ser de difícil tratamento, submete o indivíduo a uma qualidade de vida indesejável, prejuízos no contexto familiar, social e profissional, com prognóstico desfavorável, utilizando normalmente fármacos em doses altas e sem grande eficácia, principalmente antidepressivos e gabapentanoides, mas também em muitos casos são utilizados anti-inflamatórios não esteroidais e opioides (JIANG; LIU; GAO, 2020; WOOLF; MANNION, 1999; MACHADO, 2016).

Devido ao exposto acima, se torna importante o estudo da participação de possíveis vias intracelulares de controle da dor neuropática, como a via PI3K γ /AKT/NOS/NO/GCs/GMPc. O estudo dessa via analgésica pode gerar conhecimento para o desenvolvimento de novos protocolos farmacológicos eficazes para o tratamento da dor neuropática.

Objetivos

3. OBJETIVOS

Tendo em vista os conhecimentos envolvendo o desenvolvimento da dor neuropática induzida em modelo experimental de constrição do nervo ciático em ratos, bem como estudos sobre a modulação endógena periférica, esse projeto teve como objetivo verificar o papel da via PI3K γ /Akt/NOS//NO/GCs/GMPc e canais para potássio na modulação da dor neuropática induzida pela constrição do nervo ciático em ratos Wistar.

3.1 Objetivos específicos:

- 1) Avaliar o curso temporal da dor neuropática na pata de ratos induzida pela constrição do nervo ciático.
- 2) Avaliar farmacologicamente o envolvimento da via PI3K γ /Akt com o controle da dor neuropática na pata de ratos induzida pela constrição do nervo ciático.
- 3) Avaliar farmacologicamente o envolvimento das enzimas óxido nítrico sintase neuronal (NOS_n), óxido nítrico sintase indutível (NOS_i), e da guanilato ciclase solúvel (GCs) com o controle da dor neuropática na pata de ratos induzida pela constrição do nervo ciático.
- 4) Avaliar farmacologicamente o envolvimento dos canais para K⁺ dependentes de voltagem (K_v), ativados por Ca²⁺ de baixa e alta condutância e sensíveis ao ATP (K_{ATP}) com o controle da dor neuropática na pata de ratos induzida pela constrição do nervo ciático.
- 5) Quantificar os níveis de proteínas para Akt, iNOS e o canal para potássio sensível ao ATP (K_{ATP}) em pata e mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.
- 6) Quantificar a concentração de nitrito na pata e mesencéfalo em ratos submetidos a constrição do nervo ciático.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação:

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 160 e 180 g para cirurgia de constrição do nervo ciático. Os animais foram provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Cebio-ICB/UFMG). Tais foram alojados em caixas plásticas de dimensões 30x16x12 centímetros (4/caixas) com cama de forragem, com livre acesso à ração e água. Onde receberam a mesma ração comercial. Os ratos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (23 a 26°C), em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e um dia antes submetidos ao teste algesimétrico para ambientalização. Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG) sob número de protocolo 173/2014 (ANEXO I), além de estar de acordo com as recomendações internacionais para experimentação em dor em animais (ZIMMERMANN, 1983).

4.2 Fármacos e solventes:

4.2.1 Fármacos utilizados para analgesia e anestesia durante a cirurgia de constrição do nervo ciático

- - Cloridrato de Ketamina 10% (Dopalen, Vetbrands, Brasil).
- - Xilazina 2% (Dopaser, Calier, Brasil)

Observação: Todas as cirurgias foram realizadas sob anestesia geral, com solução anestésica de ketamina 10% (80 mg/Kg) e xilazina 2% (16 mg/Kg), sendo injetada por via intraperitoneal, em volume de 0,1 ml por 100 g de peso do animal.

4.2.2 Fármacos envolvidos nas vias PI3K γ /Akt//NOS/NO/GCs/GMPc

- **AS 605240:** (5-[6-Quinoxalinylmethylene]-2,4-thiazolidinediona) (Sigma, EUA), inibidor potente e seletivo de PI3K γ . Mantido no freezer (-20° C) em solução estoque, solubilizado em DMSO 100%. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina atingindo a concentração de DMSO 10%. A dose utilizada foi de 90 μ g / pata.

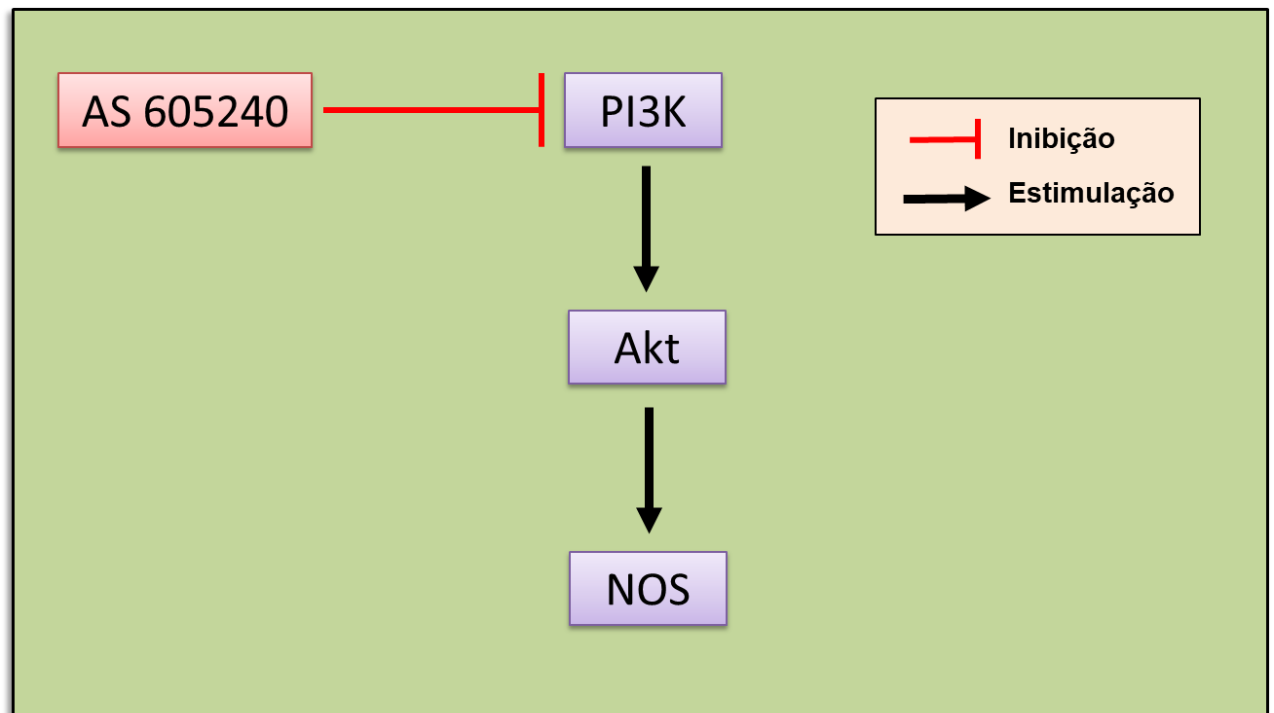


Figura 6: Fármacos inibidores da via PI3K/Akt/NOS

- **L-NPA:** (Nw-Propil-L-arginina) (Sigma, EUA), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), solubilizado em salina. Mantido no freezer (-20° C) em solução estoque, dissolvido em NaCl 0,9%. A dose utilizada foi de 24 µg / pata.
- **L-NIL:** (hidrocloridrato de N6-(1-Iminoetil)-L-lisina) (Sigma), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), Mantido no freezer (-20° C) em solução estoque, dissolvido em NaCl 0,9%. A dose utilizada foi de 24 µg / pata.
- **ODQ:** (1H-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a]quinoxalina-1-ona) (RBI), inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel. Mantido no freezer (-20° C) em solução estoque, solubilizado em DMSO 100%. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina atingindo a concentração de DMSO 10%. A dose utilizada foi de 100 µg / pata.

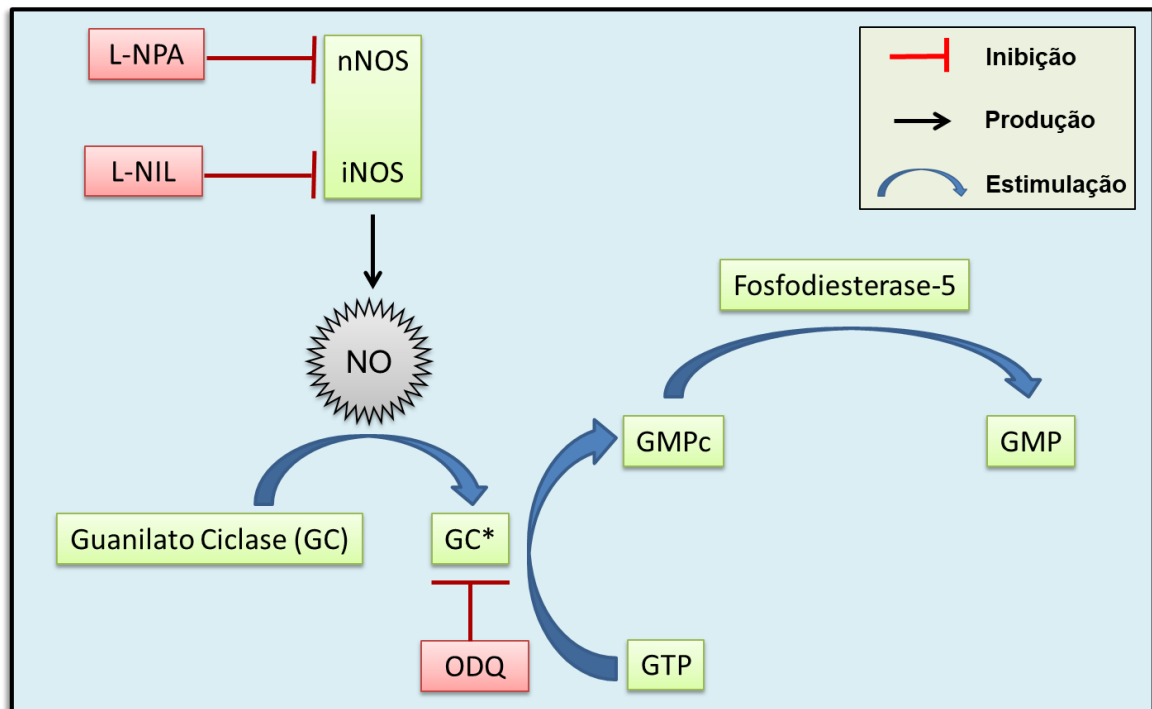


Figura 7: Fármacos da via NOS/NO/GMPc.

4.2.3 Fármacos bloqueadores dos canais para potássio (Figura 8):

- **Glibenclamida:** (Sigma), bloqueador seletivo dos canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), solubilizado em Tween 20 1% em salina. Mantido em geladeira ($4^\circ C$) em pó. É solubilizada no momento do uso para formar uma solução em DMSO 10%. A dose utilizada foi de $80 \mu g / pata$.
- **Tetraetilamônio:** (Sigma), bloqueador seletivo dos canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v). Mantido no freezer ($-20^\circ C$) em solução estoque, dissolvido em NaCl 0,9%. A dose utilizada foi de $30 \mu g / pata$.
- **Dequalíneo:** (Santa Cruz, EUA), bloqueador seletivo dos canais para K^+ ativados por Ca^{+2} de baixa condutância (KCa). Mantido no freezer ($-20^\circ C$) em solução estoque, dissolvido em NaCl 0,9%. A dose utilizada foi de $50 \mu g / pata$.

- **Paxilina:** (Sigma), bloqueador seletivo dos canais para K^+ ativados por Ca^{+2} de alta condutância (KCa). Mantido no freezer ($-20^{\circ} C$) em solução estoque, dissolvido em NaCl 0,9%. A dose utilizada foi de $50 \mu g / pata$.

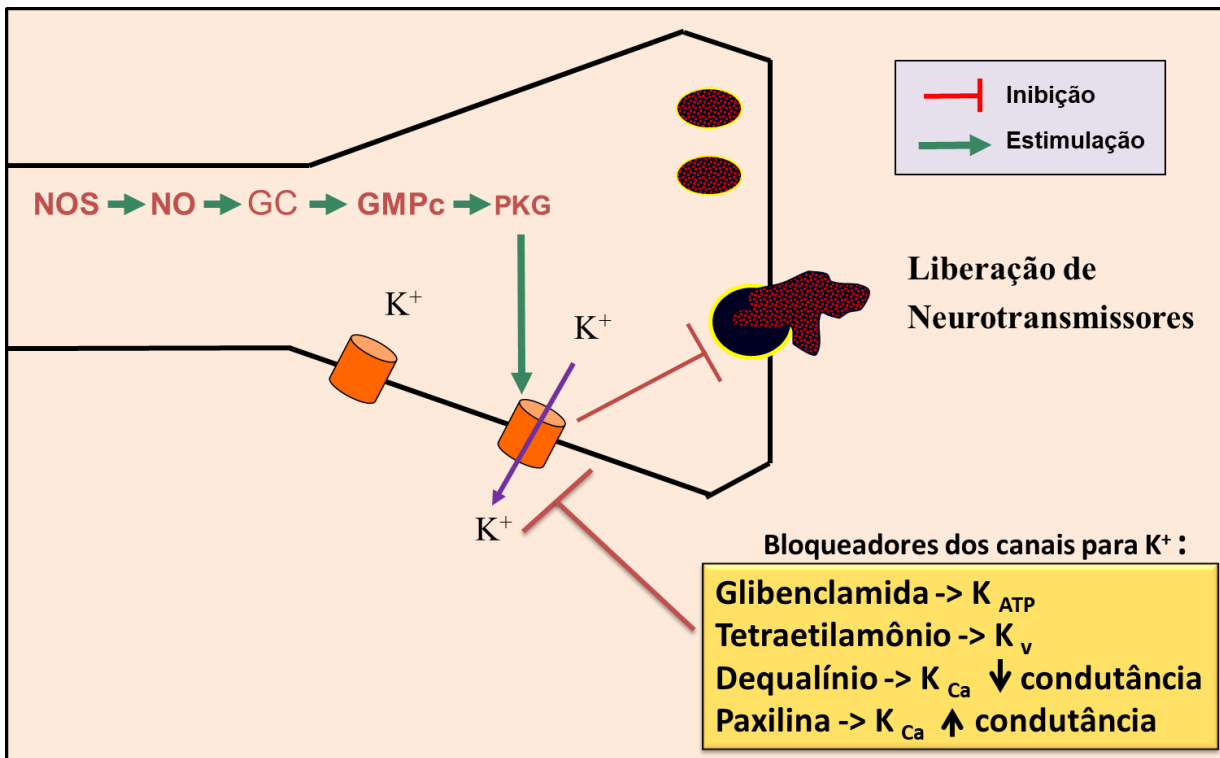


Figura 8: Fármacos bloqueadores dos canais para potássio.

Os bloqueadores dos canais para potássio não permitem a saída do íon potássio pelo canal bloqueado o que causa hiperpolarização da célula e dificulta a condução do impulso nervoso e por consequência inibe a liberação de neurotransmissores nas sinapses.

4.3 Administração das drogas:

Os fármacos usados para anestesia dos animais operados foram administrados por via intraperitoneal (Figura 9) em solução única dos dois anestésicos na dose de 0,1 ml por cada 100 g de peso vivo.



Figura 9: Administração intraperitoneal.

Anestésicos foram administrados pela via intraperitoneal.

Os fármacos utilizados para avaliação dos sistemas testados foram administrados através de injeção subcutânea na superfície plantar da pata no membro pélvico do rato (via intraplantar), no volume de 50 μ l (Figura 10).



Figura 10: Administração intraplantar

Fármacos e veículos foram administrados na pata posterior direita na via subcutânea na região plantar.

4.4 Teste algométrico de mensuração da hiperalgesia da pata de rato:

O método de retirada da pata submetida a compressão, foi utilizado para a mensuração da hiperalgesia periférica em ratos (RANDALL; SELITTO, 1957).

Para realização do teste, o animal foi cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a pata sob teste foi apresentada, por sua superfície plantar, à parte compressora do aparelho. A parte compressora 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 na superfície plantar da pata do animal.

Quando o experimentador aciona um pedal ligado ao aparato, um peso começa a deslocar através de uma rosca sem fim sobre uma régua numerada. Por um sistema de alavanca a intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 32 g/segundo de forma que cada unidade marcada na régua numerada do aparelho indica acréscimo de 20 g de força sobre a região plantar da pata do animal até induzir uma reação de aversão ao estímulo compressivo (reflexo de retirada de pata). Ao observar a resposta nociceptiva do animal, o experimentador desacionará o pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta à pata, sendo que o último valor, que corresponde ao limiar nociceptivo, fica indicado no aparelho e deve ser multiplicado por 20 para expressar o valor em gramas (g) (Figura 11).

É importante ressaltar que o animal é ambientalizado ao aparelho no dia que antecede o teste. Essa ambientalização consiste em submeter o animal à mesma situação que será vivenciada no dia do experimento. Esse procedimento é importante para permitir uma melhor observação da resposta nociceptiva do animal, que durante o teste deve permanecer quieto, evitando que desenvolva uma reação aversiva simplesmente devido à situação estranha imposta a ele.

Para dar maior credibilidade as medidas, foram realizadas comprovações por teste cego, isto é, um experimentador sem envolvimento com o trabalho, porém experiente, fez mensurações do limiar nociceptivo sem saber quais as drogas foram administradas e nem mesmo se o animal era operado ou naive.

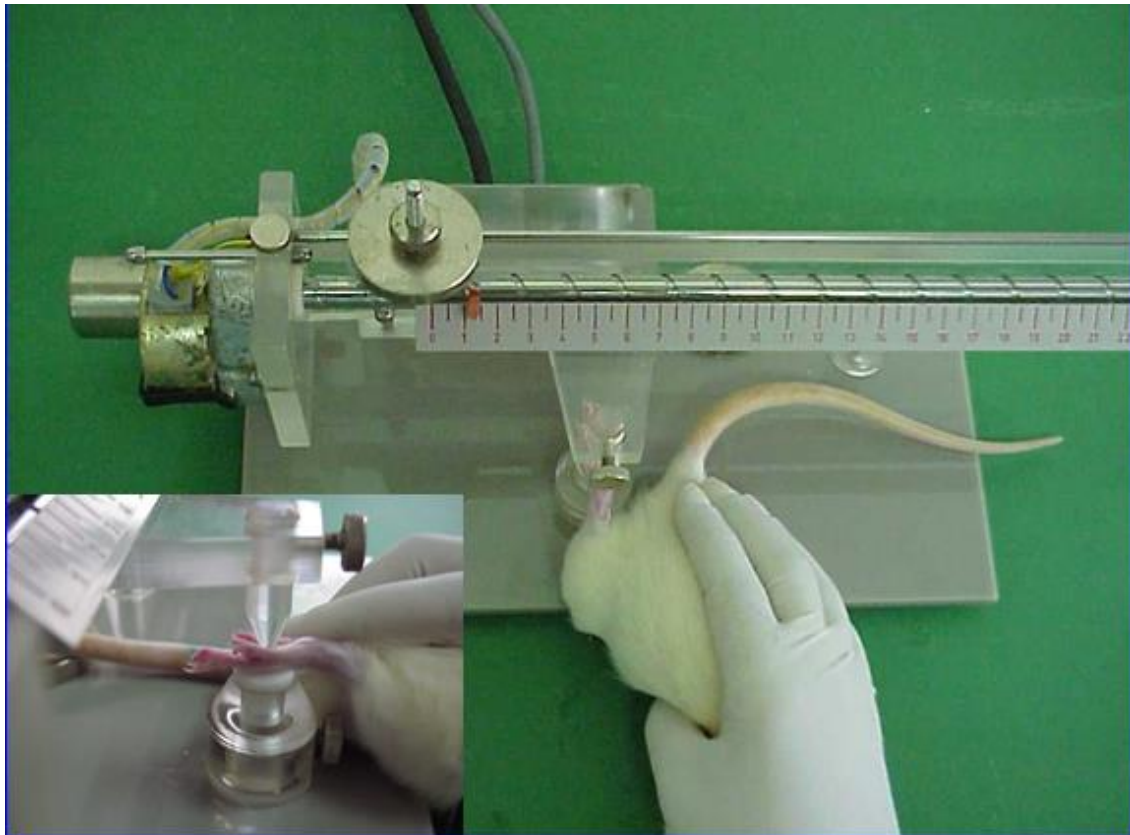


Figura 11: Algesímetro

Aparelho utilizado para medir o limiar nociceptivo de ratos, em que a pata do animal é colocada como mostra a imagem e é realizada uma pressão que aumenta gradativamente na velocidade de 32 gramas por segundo até que o animal retire a pata.

4.5 Modelo de Indução de Dor Neuropática: Constrição do Nervo Ciático (CNC)

4.5.1 Materiais

- Fio flexível resinado (Fio dental hillo, Hillo industria e Comércio Ltda, Brasil).
Composição: resina termoplástica, cera mineral, BHT e ionol;
- Fio de sutura de nylon agulhado 5.0 (Medico (Huaian) Comércio Ltda, China);
- Tesoura Quinelato Íris - QT 822-11 (Schobell Industrial Ltda, Brasil);
- Pinça porta-agulha Derf Serrilha - 12 cm (EDLO S/A Produtos Médicos, Brasil);
- Pinça de Dissecção Adson sem dente – 12cm (EDLO S/A Produtos Médicos, Brasil);
- Pinça Clínica - 12cm (Golgran Ind. Com. Instr. Odontológico Ltda, Brasil);

- Aplicador de Dycal Simples - 12cm (Golgran Ind. Com. Instr. Odontológico Ltda, Brasil).

Observação: Todos os instrumentais e materiais foram previamente esterilizados, para a realização da cirurgia.

4.5.2 Técnica cirúrgica

Os animais foram anestesiados com solução de Cloridrato de Ketamina 10% (Dopalen, Vetbrands, Brasil) na dose de 50 mg / Kg e Cloridrato de Xilazina 2% (Dopaser, Calier, Brasil) com a dose de 5 mg / Kg, injetados por via intraperitoneal na dose de 0,1 ml por cada 100 g de peso vivo.

Existem diversas técnicas para estudar a dor neuropática, algumas delas apresentam dinâmicas de indução da dor neuropática diferentes, por exemplo no tempo de desenvolvimento da dor neuropática, e visam estudar com métodos diferentes, uma síndrome com etiologias diferentes. (BENNETT; XIE, 1988; BIANCHI et al., 1996; CAMPBELL; MEYER, 2006; KRAYCHETE; GOZZANI; KRAYCHETE, 2008). A técnica cirúrgica empregada foi a constrição frouxa do nervo ciático, adaptada de Bennett & Xie (1988). Dessa forma foi feita a utilização de um fio flexível resinado que é mais inerte do que o gut cromado (utilizado por Bennett & Xie) para tentar mimetizar ainda mais as situações reais de doenças como a síndrome do carpo, uma vez que, o gut cromado é um fio absorvível e seria consumido, enquanto em muitas moléstias, a compressão do nervo é contínua. Além disso, o cromo contribui para o desenvolvimento da dor neuropática (MAVES et al., 1993) e a proposta neste trabalho é de causar a neuropatia por compressão e não por toxicidade. Em adição, o fio flexível resinado já mostrou bom resultado em outro trabalho (MOTTA et al., 2011).

Após ser anestesiado, o animal foi colocado em uma mesa cirúrgica, na posição de decúbito dorsal. A região medial da coxa direita foi tricotomizada e o animal foi posicionado de forma que fique exposta toda a região ventral do quadril e medial da coxa. Inicialmente, com auxílio de uma pinça e uma tesoura de ponta afiada, foi realizada uma incisão na pele sobre os músculos adutor do quadril e o semimembranáceo. Em seguida, com ajuda de uma tesoura, foi feita divulsão dos músculos da região até acessar o nervo ciático. Com auxílio de um instrumento curvo sem ponta, todo o nervo foi liberado de qualquer aderência e exposto. Quatro ligaduras frouxas, com fio flexível resinado, foram colocadas ao redor do nervo, separadas uma da outra por aproximadamente dois milímetros (Figura 12). Feito isso, a ferida cirúrgica foi suturada com fio de nylon agulhado 5.0.

Os animais “naive” não receberam nenhum tipo de manipulação cirúrgica. Os animais falsos operados foram submetidos a todos os procedimentos experimentais, exceto a constrição do nervo ciático, em que serão realizadas duas manobras diferentes originando dois grupos diferentes:

-**Falso operado sem fio:** o nervo ciático será apenas liberado das aderências com auxílio de um instrumento curvo.

-**Falso operado com fio:** o nervo ciático será liberado das aderências, com auxílio de um instrumento curvo, e o fio será passado em volta do nervo e deixado no local, sem a constrição.

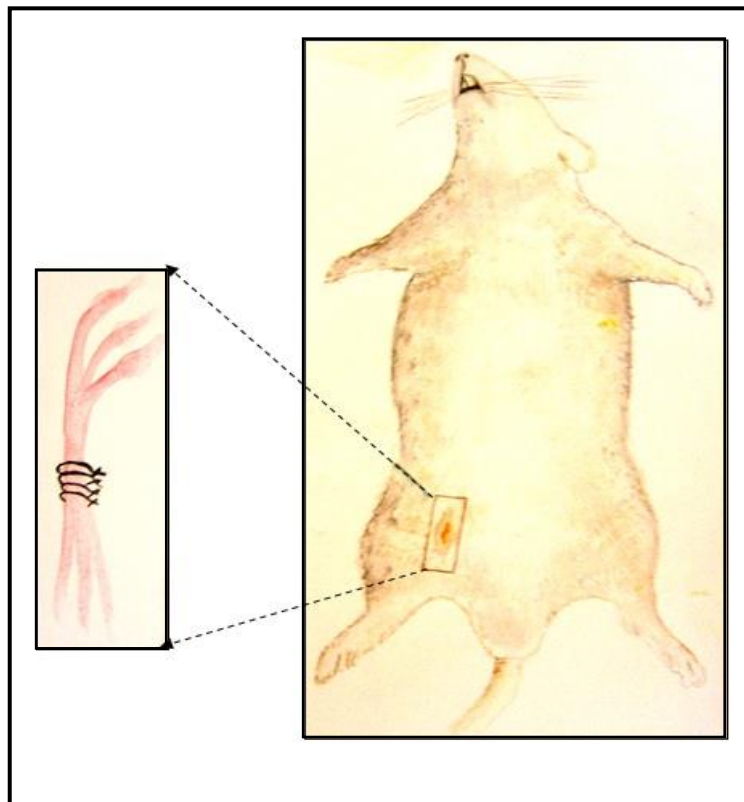


Figura 12: Esquema da cirurgia de constrição crônica

Incisão realizada na porção ventral da coxa do rato e após exposição do nervo ciático colocação de quatro ligaduras frouxas com fio flexível resinado.

4.6 Procedimentos Experimentais

4.6.1 Avaliação da modulação endógena da dor neuropática

Nesse protocolo experimental foi avaliado se a via PI3K γ /Akt/NOS/NO/GCs /GMPc, os canais para potássio participavam da modulação da dor neuropática induzida pela constrição do nervo ciático (CNC).

Antes dos procedimentos cirúrgicos ou de aplicação de qualquer fármaco foi mensurado o limiar de resposta à compressão aplicada à pata de cada animal por três vezes. Após a terceira medida, calculava-se a média dos três valores, sendo considerada como o valor da medida basal. Esse procedimento foi realizado em todos os grupos de animais (“naive”, falsos operados e operados). Em seguida, os animais foram submetidos à cirurgia de constrição do nervo ciático ou submetidos aos procedimentos de falso operados. Inicialmente, com o objetivo de avaliar o desenvolvimento da dor neuropática, foi realizado medidas diárias do limiar nociceptivo por 15 dias (Figura 13).

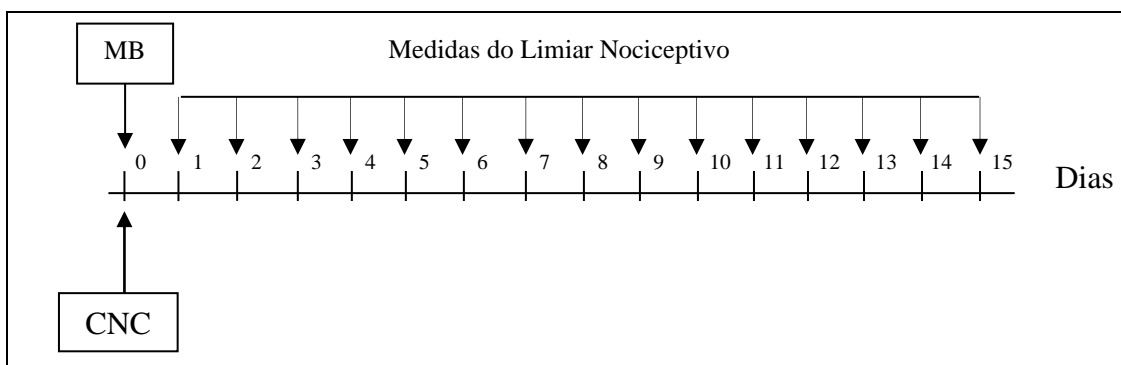


Figura 13: Esquema do procedimento experimental para avaliação do desenvolvimento da dor neuropática.

Avaliação do desenvolvimento da dor neuropática. CNC é constrição do nervo ciático, MB é medida basal. Foram realizadas medidas diárias até 15 dias após a constrição do nervo ciático.

Os fármacos utilizados para estudar a via PI3K γ /Akt/NOS/NO/GCs/GMPc, os canais para potássio, foram administrados no 6^o e 12^o dia após a realização das cirurgias e no dia da aplicação, as medidas eram realizadas no tempo em que o fármaco atingia o pico de ação (Figura 14 e 15). Para cada um desses dias, havia grupos de animais para o experimento e seus controles, de forma que os animais em experimentação no 6^o dia não eram os mesmos experimentados no 12^o dia.

Em cada dia que foi realizado o experimento, novas medidas do limiar nociceptivo dos animais foram registradas antes e após a administração de qualquer fármaco. Antes da aplicação de qualquer droga também foi feito um exame físico nos animais operados, com o intuito de avaliar se o animal estava apto para participar do experimento, avaliar se o animal apresentava os indicadores de neuropatia (tais como alterações na marcha, sensibilidade aumentada e em muitos casos atrofia do membro constricto). Com a mensuração do limiar foi verificado se o fármaco aplicado aumentava ou diminuía o limiar nociceptivo, e assim verificou-se a participação ou não dos componentes da via PI3K γ /Akt/NOS//NO/GCs/GMPc ou dos tipos de canais para potássio, na modulação durante o desenvolvimento da dor neuropática e na fase em que essa já se encontra consolidada. O tempo de administração das drogas, o intervalo das medidas do limiar nociceptivo, assim como as doses utilizadas foram baseadas em trabalhos anteriores (ALMEIDA et al., 2017; ALVES et al., 2013; ROMERO et al., 2011; ROMERO; DUARTE, 2013; ROMERO; RESENDE; DUARTE, 2011).

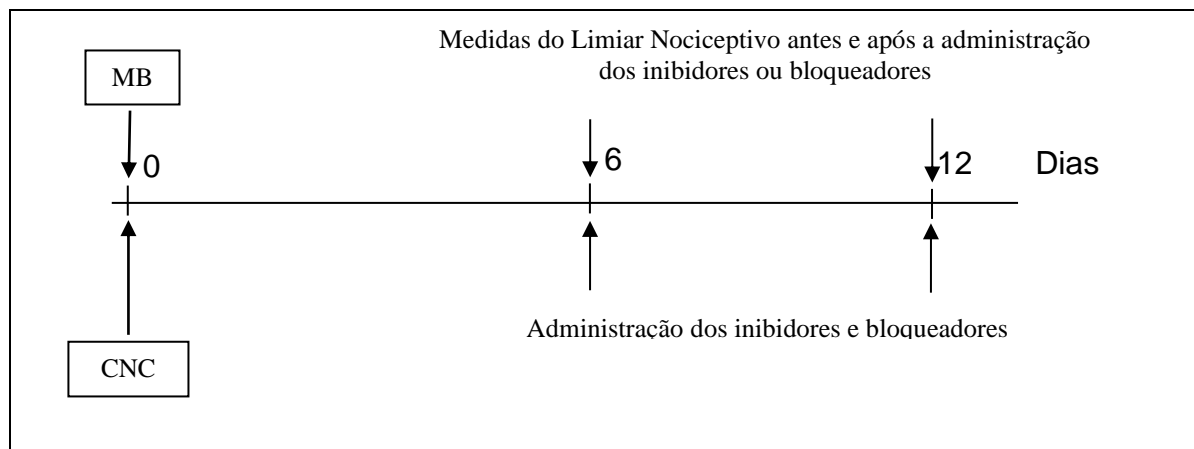


Figura 14: Esquema do procedimento experimental dos dias de aplicação dos fármacos.

Avaliação da modulação endógena da dor neuropática pelas vias PI3K γ /Akt/NOS/NO/GCs/GMPc, e canais para potássio através da administração de inibidores e bloqueadores dos canais. CNC é constrição do nervo ciático e MB é medida basal.

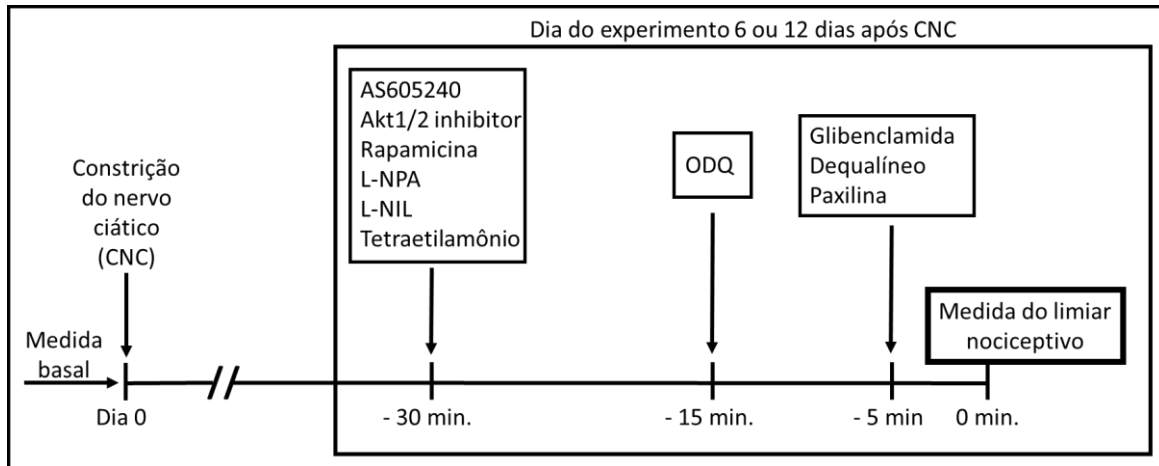


Figura 15: Esquema do procedimento experimental do uso dos fármacos.

Cada droga foi aplicada em grupos de animais separados de forma que nenhum animal recebeu mais que uma droga e o momento da medida do limiar nociceptivo foi no pico de ação da droga injetada, assim, proporcionou seu efeito máximo.

4.7 Análise da expressão de Akt, iNOS e canais para potássio sensíveis ao ATP

Foram analisados 4 grupos, naive e animais 1 dia, 6 dias e 12 dias após a constrição do nervo ciático. Os ratos foram eutanasiados, por sobre dose de anestésicos, e a superfície plantar da pata e o mesencéfalo dos mesmos foram coletados e divididos entre material para western blot e reação de Griess. Os tecidos designados para esta etapa foram homogeneizados individualmente em 500 µl de tampão RIPA (180 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de TrisHCl, 0,5 mmol/L de EDTA.2Na, 1 mmol/L de MgCl₂, 0,3% de Triton X-100, 0,5% de SDS, pH 7.4), contendo inibidores de proteases (SigmaFAST®, Sigma). Posteriormente, foi feita a centrifugação a 16000 x g durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado. O teor de proteína foi determinado pelo uso do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Quantidades iguais de proteína (50 µg) foram desnaturadas em tampão de carga a 95°C durante 5 min e submetidas a SDS-PAGE usando gel de poliacrilamida a 10% (para Akt e canais para potássio) e 7,5% (para iNOS). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Cytiva Life Science, MA, EUA). As membranas foram bloqueadas à temperatura ambiente com BSA a 5% em TBS-T (NaCl 1,6 M e Tris 0,2 M enriquecido com Tween 20 0,1%) antes da incubação com anticorpo monoclonal anti-Akt (produzido em camundongo, diluído 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EUA; cat. n° SC-5298), monoclonal anti-Akt (Ser 473) (produzindo em camundongo, diluído 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EUA, cat. n° SC-24500), policlonal anti-iNOS (phospho Y151) (produzindo em coelho, diluído 1:1000; Abcam, Cambridge, UK, cat. n° ab-3280) e monoclonal anti-β-Actina

(produzindo em camundongo, diluído 1:2000; Abcam, Cambridge, UK, cat. n° ab-182640). As membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo primário seguido de 3 lavagens em agitação constante com TBS-T de 5 minutos e incubação com anticorpos secundários conjugados com peroxidase durante 2h à temperatura ambiente. Os imunocomplexos foram detectados por reação quimioluminescente (Luminata™ Forte Western HRP Substrato, Millipore, MA), seguido de análises densitométricas com o software ImageJ 1.46r (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

4.8 Dosagem de Nitrito pela Reação de Griess

Os níveis de nitrito foram mensurados através da reação de Griess (GREEN et al., 1982) e os mesmos grupos da técnica de western blot (naive e animais com 1 dia, 6 dias e 12 dias após a constrição do nervo ciático) foram utilizados nesta etapa, mas a preparação do tecido foi adequada para cada técnica.

Os ratos foram eutanasiados, por sobredose de anestésico, e a superfície plantar da pata e o mesencéfalo dos mesmos foram coletados. Os tecidos foram homogeneizados individualmente em 900 µl de solução tampão contendo: Tris-HCl 30 mM, pH 6,8, EDTA 5 mM, sacarose 250 mM, KCl 30 mM, b-mercaptoetanol a 2%, PMSF (100 µg/ml), benzamidina (5 µg/ml), aprotinina (2 µg/ml) e leupeptina (2 µg/ml). As amostras foram centrifugadas (12000g, 4°C, 15 min). Resumidamente, foram aplicados 100 µl do sobrenadante a um poço de placa de ELISA, seguido por 100 µl de reagente de Griess (2% [p/v] de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% [v/v] e 0,2% [p/v] naftiltilenodiamina) (RAMOS et al., 2006) (Figura 16). Após 10 minutos de desenvolvimento de cor à temperatura ambiente, a absorvância foi medida com um leitor de microplacas (Espectrofotômetro de Microplacas Epoch™; BioTek, Winooski, VT, EUA) a um comprimento de onda de 545 nm. Cada amostra foi ensaiada em poços triplicados. As curvas de referência padrão de nitrito foram feitas com nitrito de sódio em água destilada em concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 e 1,56 µM. O limite de detecção do ensaio é de $\approx 1,5$ µmol/litro.

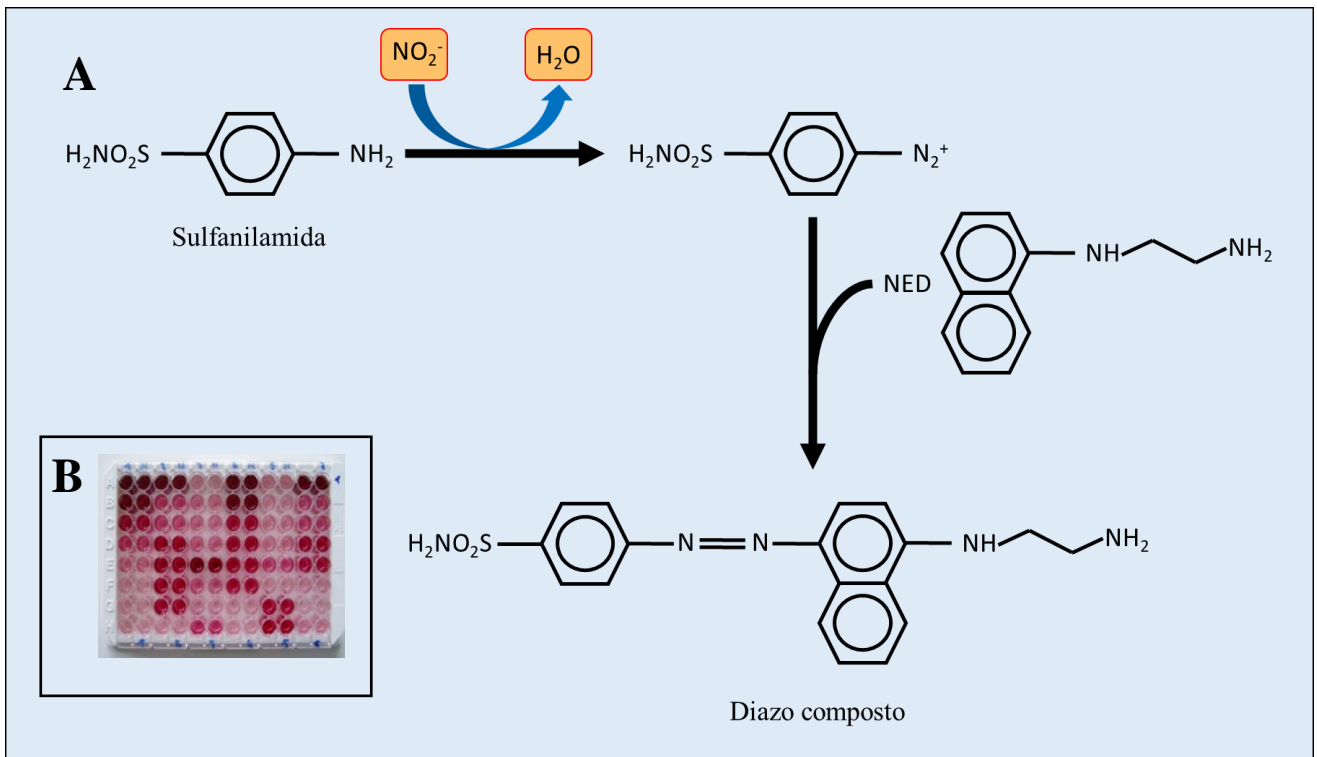


Figura 16: Mecanismo da reação envolvida na dosagem de nitrito $[\text{NO}_2^-]$ pelo método de Griess. O nitrito reage sequencialmente com sulfanilamida e NED (“reagente de Griess”), gerando um composto, o diazo composto (A), de coloração vermelha intensa (B). NED, naftililenodiamina. Adaptado de Ramos et al. (2006).

4.9 Análise Estatística

Os resultados são apresentados como a média e erro padrão da média (EPM) do limiar nociceptivo, expresso em gramas (g). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância *one-way* ou *two-way* seguida do teste de Bonferroni para verificar a significância das diferenças entre as médias. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram feitas usando o programa GraphPad Prism 8.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Desenvolvimento temporal do efeito da constrição do nervo ciático

Para avaliar a dinâmica da indução da dor neuropática, foram realizadas durante 15 dias medidas diárias dos limiares nociceptivos na pata direita do membro pélvico de animais que passaram pela cirurgia de constrição do nervo ciático. Também foram aferidas medidas dos limiares nociceptivos dos controles (falsos operados e naive). Foi observado que no 1º dia de constrição os animais apresentaram um efeito hipoalгésico, reduzido até o 4º dia, se mantendo estabilizado no 4º e 5º dia. A partir do 6º dia os animais começaram a apresentar hiperalgesia, com valores de limiar significantes abaixo do basal e a cada dia esses valores foram reduzidos, sendo estabilizados ao 10º dia, e se manteve constante até o 15º dia pós CNC. Os grupos falsos operados com e sem fio não demonstraram diferença significativa quando comparado com o grupo naive. Também os grupos falsos operados não apresentaram diferença estatística entre eles quando comparados entre si (Figura 16). Mediante os valores encontrados foram escolhidos para avaliar a participação da via PI3K γ /Akt/NOS/NO/GCs/GMPc e dos canais para potássio o dia 6, por ser o primeiro dia que apresenta hiperalgesia e representar um momento que a dor ainda está em processo de desenvolvimento; e o dia 12 pelo fato da dor já está estabilizada, e nesse momento ela já está consolidada (Figura 16).

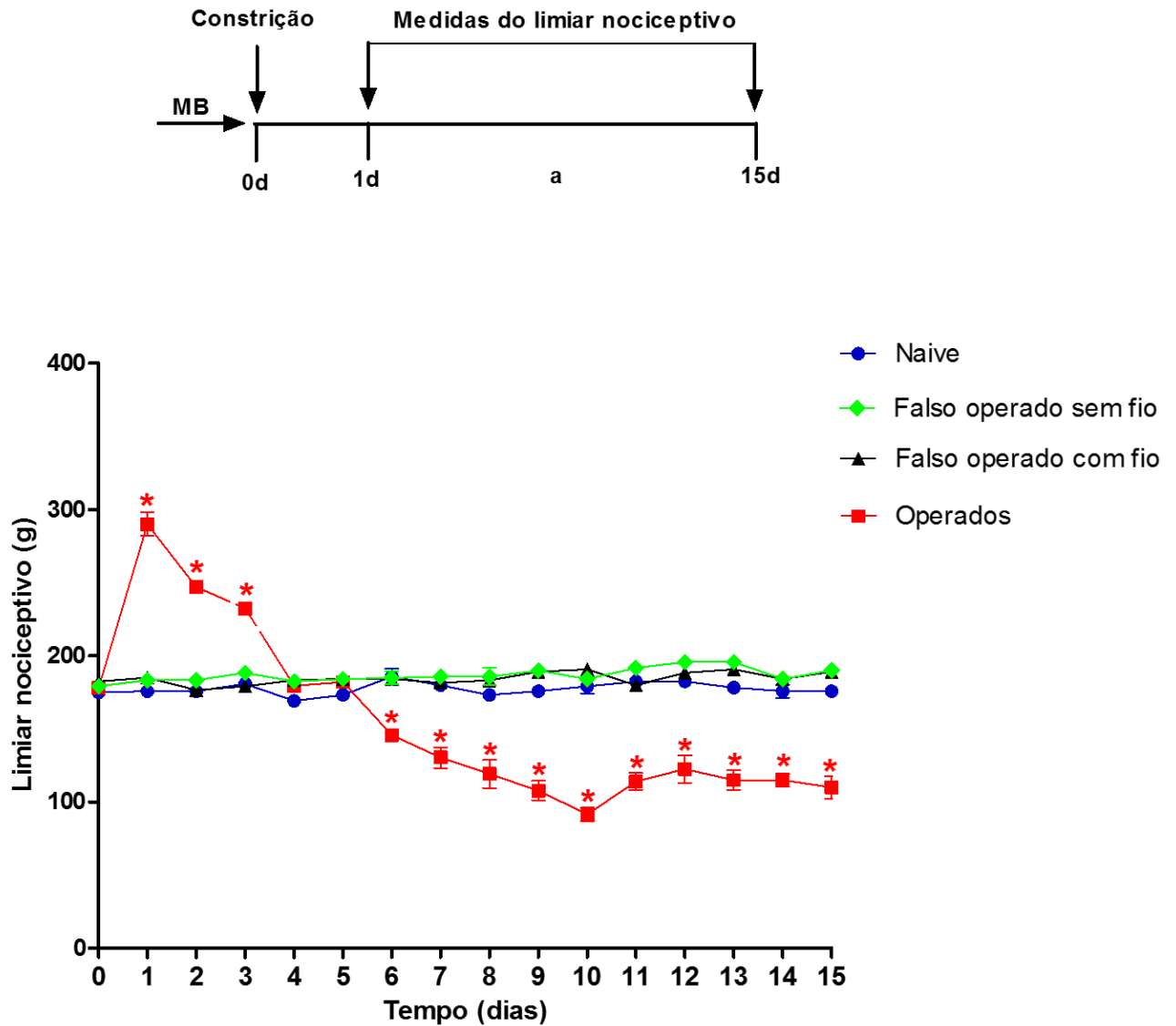


Figura 17: Avaliação temporal da dor neuropática periférica induzida por constrição crônica do nervo ciático.

Na parte superior da figura está representado o protocolo do experimento. Os símbolos representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a cinco animais. * expressa a significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo Naive. Foi utilizado *two-way* anova.

5.2 Avaliação farmacológica sobre o envolvimento da via PI3K γ /Akt

Quando se fala da atuação endógena desta via, em especial pelas isoformas γ da PI3K, ainda existe a necessidade de estudos para esclarecer a atuação desta via sobre a neuropatia. A aplicação do inibidor da PI3K γ , AS605240 na dose de 90 μ g por pata, pela via intraplantar, no membro pélvico direito 30 minutos antes do teste algométrico, causou no 6° e no 12° dia após CNC, redução do limiar nociceptivo, isto é, a dor ficou mais intensa quando a PI3K γ não participa do processo (Figura 18).

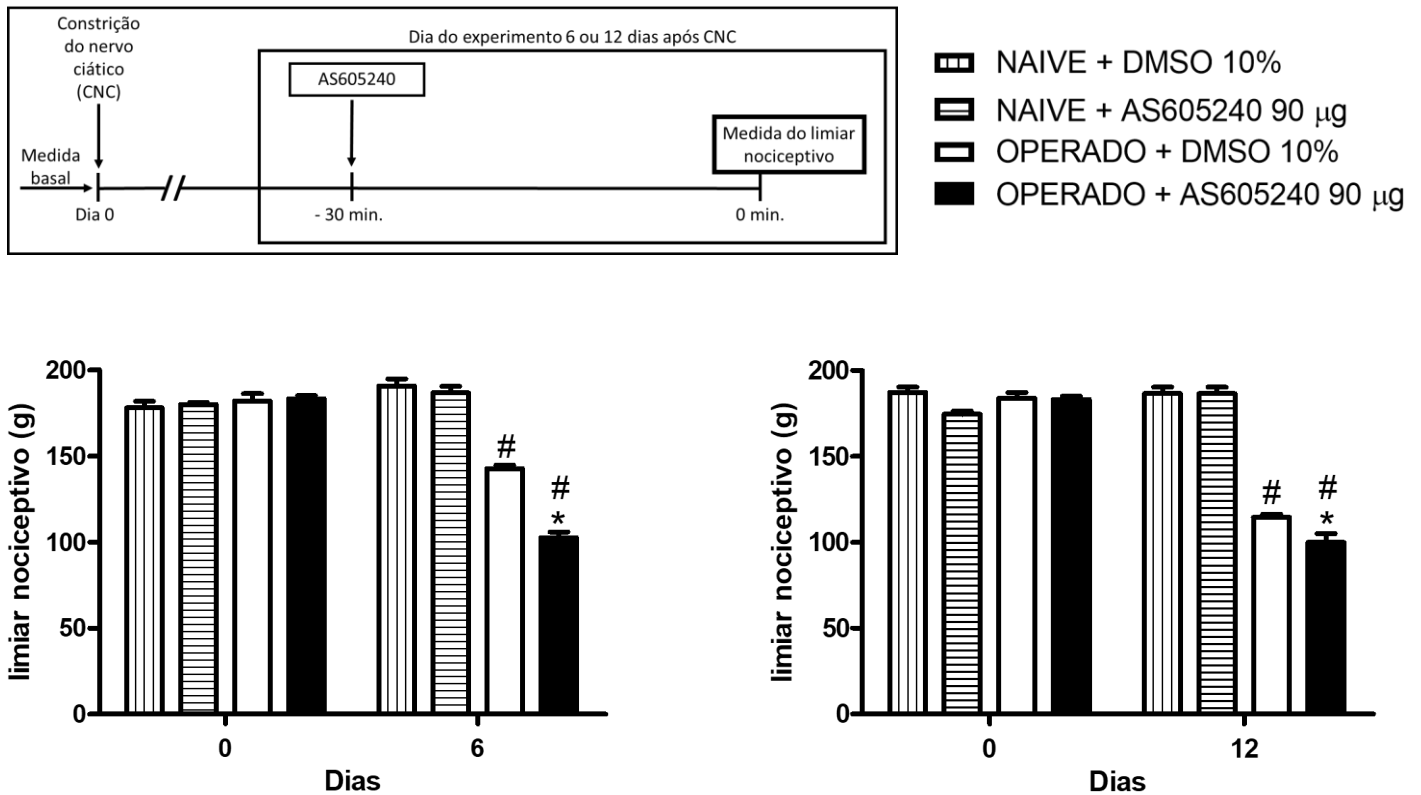


Figura 18: Efeito da administração intraplantar do inibidor da PI3K γ .

As barras representam a média \pm E.P.M. das medidas do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a cinco animais. * expressa significância estatística ($P < 0.05$) comparado com o grupo OPERADO + DMSO 10% e # simboliza significância estatística ($P < 0.05$) comparados com os grupos NAÏVE + DMSO 10% e NAÏVE + AS605240 90 μ g. Foi utilizado *one-way* anova.

5.3 Avaliação farmacológica das óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), óxido nítrico sintase indutível (NOSi), e da guanilato ciclase solúvel.

O inibidor da nNOS, L-NPA, via intraplantar, 24 μg por animal e 30 minutos antes da mensuração do limiar nociceptivo, revelou uma ação dual da ação da nNOS. No 6^o dia pós constrição houve redução do limiar nociceptivo, em relação aos animais que neuropáticos que receberam apenas o veículo (salina), assim, constatamos que nesse momento, a nNOS tem uma participação em eventos analgésicos. Já no 12^o dia, ao inibirmos a ação da nNOS, o limiar aumentou e isso indica que nesse momento há uma participação da isoforma neuronal em eventos hiperalgésicos diferentemente no que observamos na fase de indução (6^o dia) em que ela participava de eventos analgésicos (Figura 19).

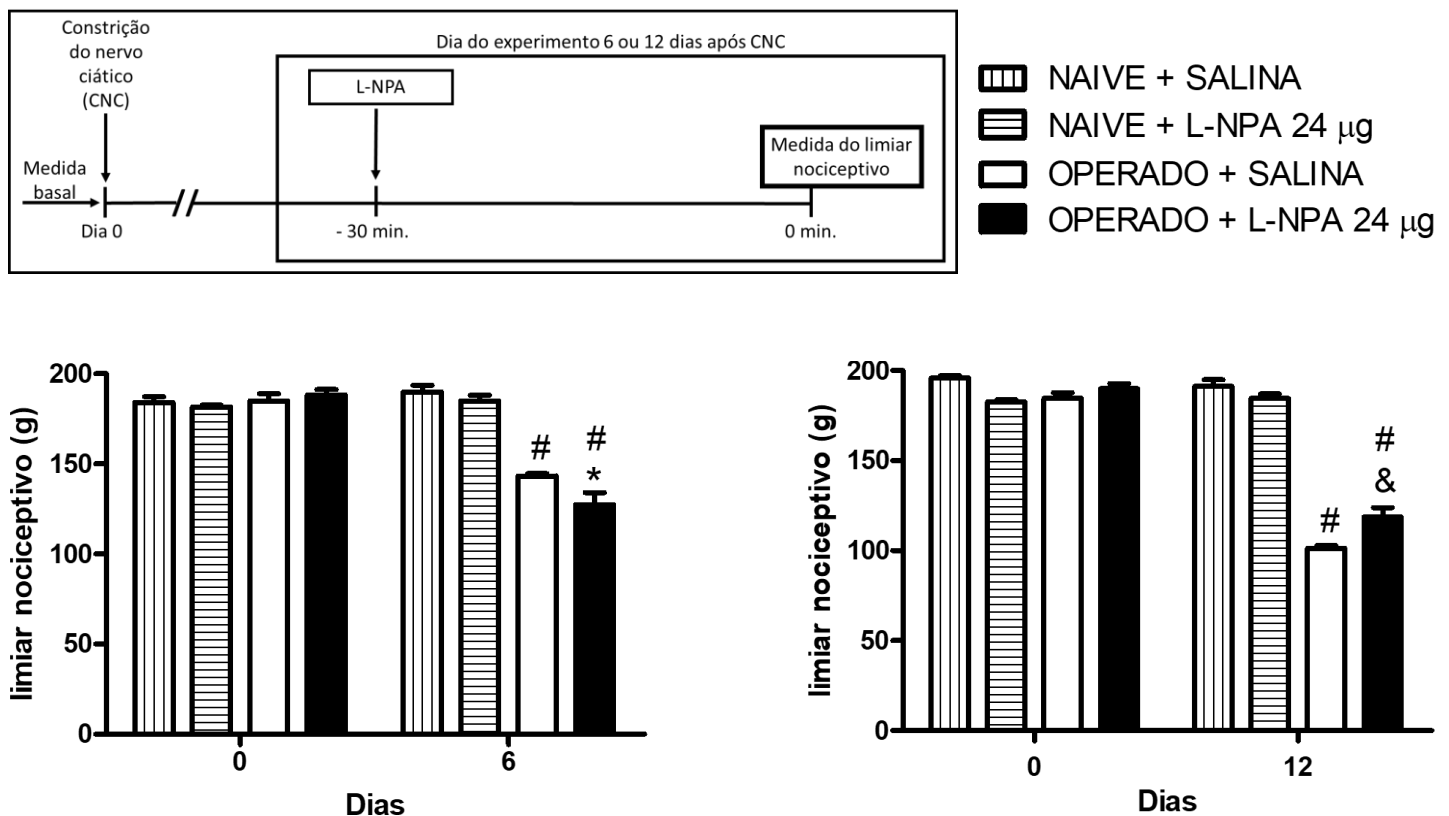


Figura 19: Efeito da administração intraplantar do inibidor da nNOS.

As barras representam a média \pm E.P.M. das medidas do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a cinco animais. & expressa significância estatística hiperalgésica ($P < 0.05$) e * expressa significância estatística hipoalgésica ($P < 0.05$) comparado com o grupo OPERADO + SALINA e # simboliza significância estatística ($P < 0.05$) comparados com os grupos NAÏVE + SALINA e NAÏVE + L-NPA 24 μg . Foi utilizado *one-way* anova.

Já o inibidor da iNOS, L-NIL, revela um resultado um pouco diferente da inibição da nNOS. Quando administrado por via intraplantar, 30 minutos antes das mensurações algométricas, na dose de 24 μg , o limiar nociceptivo em relação aos neuropáticos que receberam o veículo (salina) diminuiu no 6º dia como ocorreu com nNOS, mas no 12º dia também houve redução do limiar diferentemente dos animais testados para nNOS que aumentaram nesse momento. Isso mostra que em animais neuropáticos a iNOS está envolvida em processos endógenos analgésicos, tanto na fase de indução da neuropatia quanto na fase em que essa já se encontra consolidada (Figura 20)

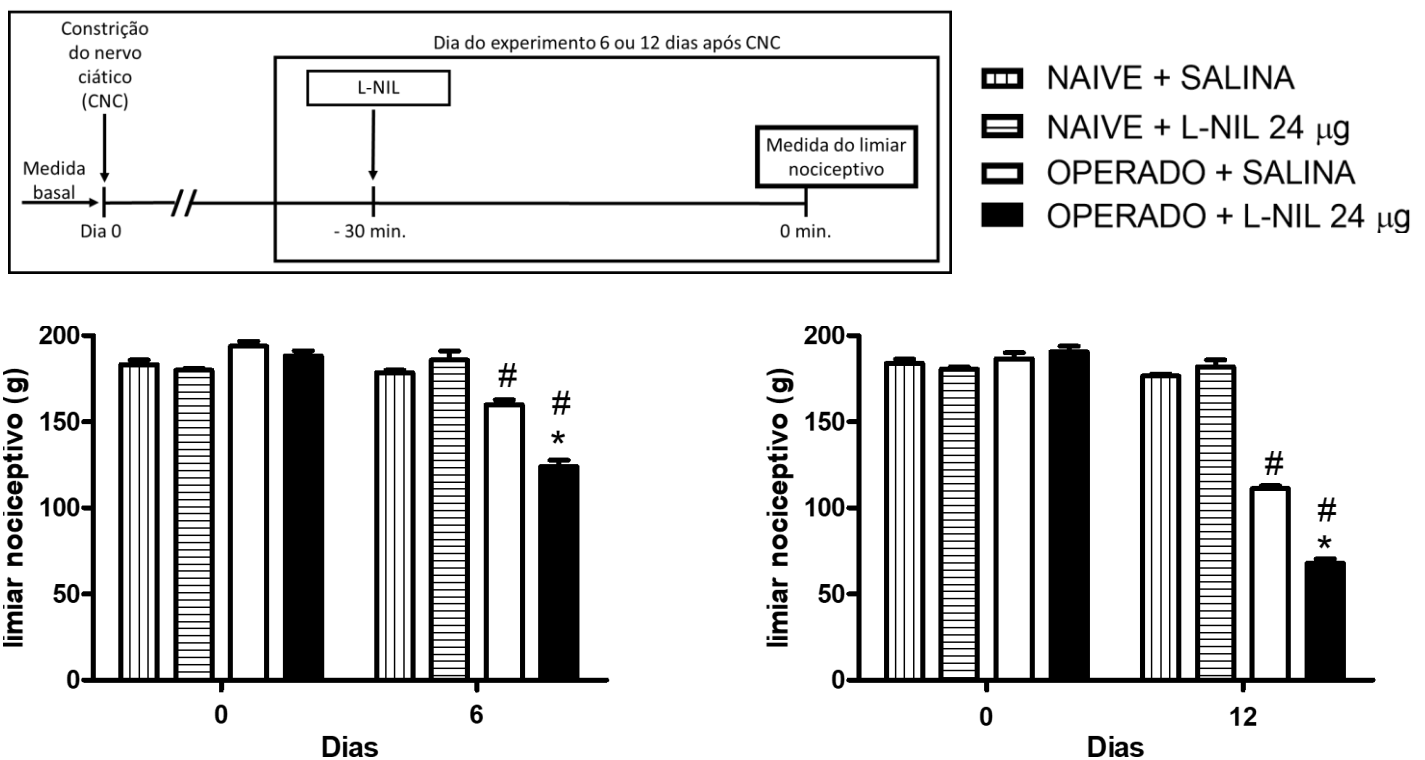


Figura 20: Efeito da administração intraplantar do inibidor de iNOS.

As barras representam a média \pm E.P.M. das medidas do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a cinco animais. * expressa significância estatística ($P < 0.05$) comparado com o grupo OPERADO + SALINA e # simboliza significância estatística ($P < 0.05$) comparados com os grupos NAÏVE + SALINA e NAÏVE + L-NIL 24 μg . Foi utilizado *one-way* anova.

O inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, quando administrada em animais, que foram submetidos à CNC, na dose de 100 µg por animal, por via intraplantar e 15 minutos antes do teste algosimétrico, mostrou redução do limiar nociceptivo em relação aos animais tratados apenas com DMSO 10% tanto no momento de indução (6º dia) quanto na dor neuropática já consolidada (12º dia) (Figura 21). Isso indica que a guanilato ciclase solúvel participa do controle analgésico endógeno durante todo processo neuropático.

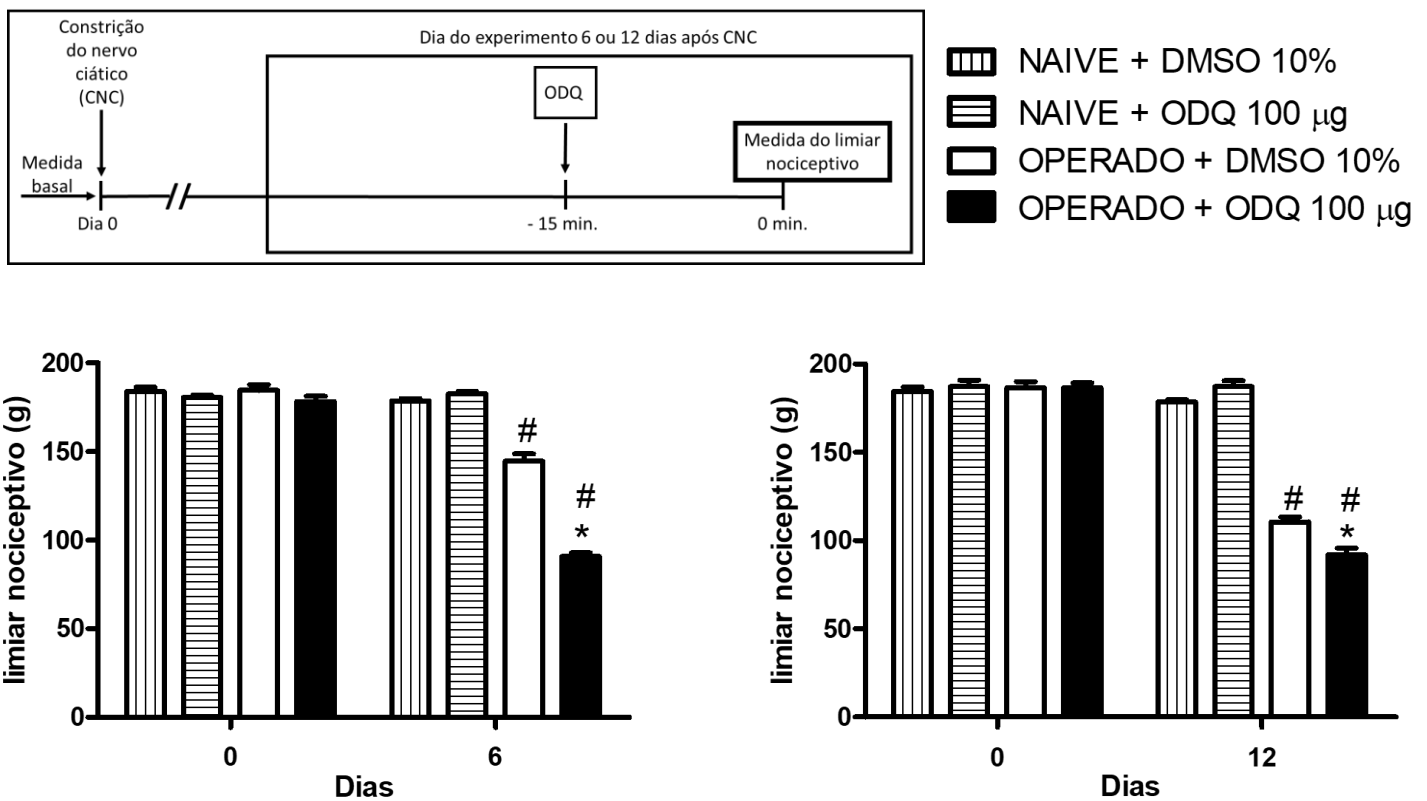


Figura 21: Efeito da administração intraplantar do inibidor da guanilato ciclase solúvel.

As barras representam a média \pm E.P.M. das medidas do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a cinco animais. * expressa significância estatística ($P < 0.05$) comparado com o grupo OPERADO + DMSO 10% e # simboliza significância estatística ($P < 0.05$) comparados com os grupos NAÏVE + DMSO 10% e NAÏVE + ODQ. Foi utilizado *one-way* anova.

5.4 Avaliação farmacológica dos canais para potássio.

Devido ao já comprovado efeito antinociceptivo dos canais para potássio no controle da dor inflamatória seria intuitivo pensar que teria o mesmo efeito na dor neuropática, mas com todas as adaptações no desenvolvimento da dor neuropática, seria possível que a modulação endógena nesse tipo de dor pelos canais para K^+ apresente mudanças em relação aos outros tipos de dor.

5.4.1 - Efeito dos bloqueadores dos canais para potássio ativados por Ca^{2+} de baixa e alta condutância sobre o limiar nociceptivo após constrição do nervo ciático na pata de ratos.

A administração intraplantar dos bloqueadores de canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância, dequalínio, na dose de 50 μ g por animal, 5 minutos antes da medida do limiar nociceptivo mostrou redução do limiar nociceptivo no 6º dia, indicando que esse canal para potássio tem papel analgésico durante a fase de indução. No entanto durante a neuropatia já consolidada os resultados mostram que não há diferença significativa entre os grupos neuropáticos, o que indica que, em nossas condições, o canal para potássio ativado por Ca^{2+} não está envolvido na modulação da dor neuropática na neuropatia consolidada (Figura 22).

Enquanto os canais para potássio ativados por Ca^{2+} de baixa condutância participam na fase de indução da neuropatia, podemos observar que nas mesmas condições aplicadas, o efeito da injeção do bloqueador seletivo dos canais para potássio ativados por Ca^{2+} de alta condutância, paxilina, intraplantar na dose de 50 μ g por animal, 5 minutos antes da aferição do limiar nociceptivo não provocou redução dos valores do limiar em relação ao operado com veículo (salina) no 6º dia após CNC. No entanto, no 12º dia após constrição do nervo ciático, com a aplicação da paxilina, o limiar aumenta, indicando que esse canal tem ação hiperalgésica na dor neuropática consolidada (Figura 23).

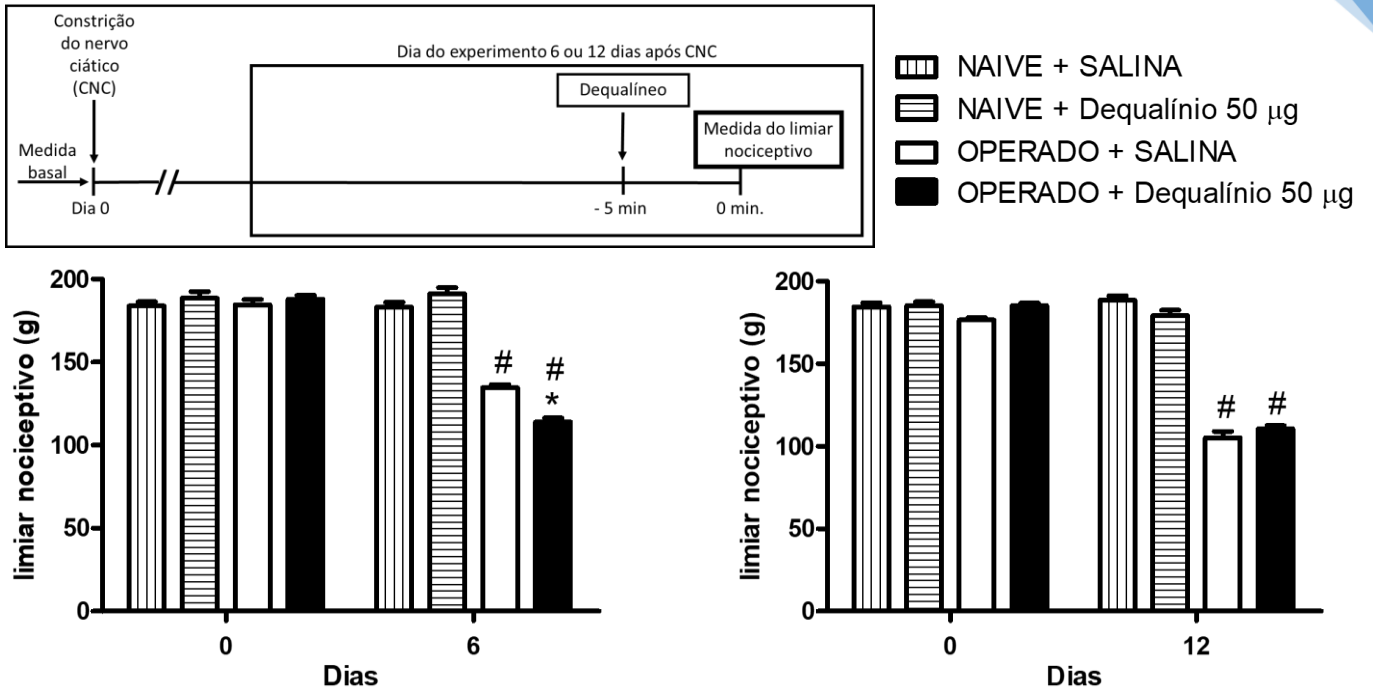


Figura 22: Efeito da administração intraplantar do bloqueador do canal para potássio sensível ao cálcio de baixa condutância.

As barras representam a média \pm E.P.M. das medidas do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a cinco animais. * expressa significância estatística ($P < 0.05$) comparado com o grupo OPERADO + SALINA e # simboliza significância estatística ($P < 0.05$) comparados com os grupos NAÏVE + DMSO 10% e NAÏVE + Dequalinone 50 µg. Foi utilizado *one-way* anova.

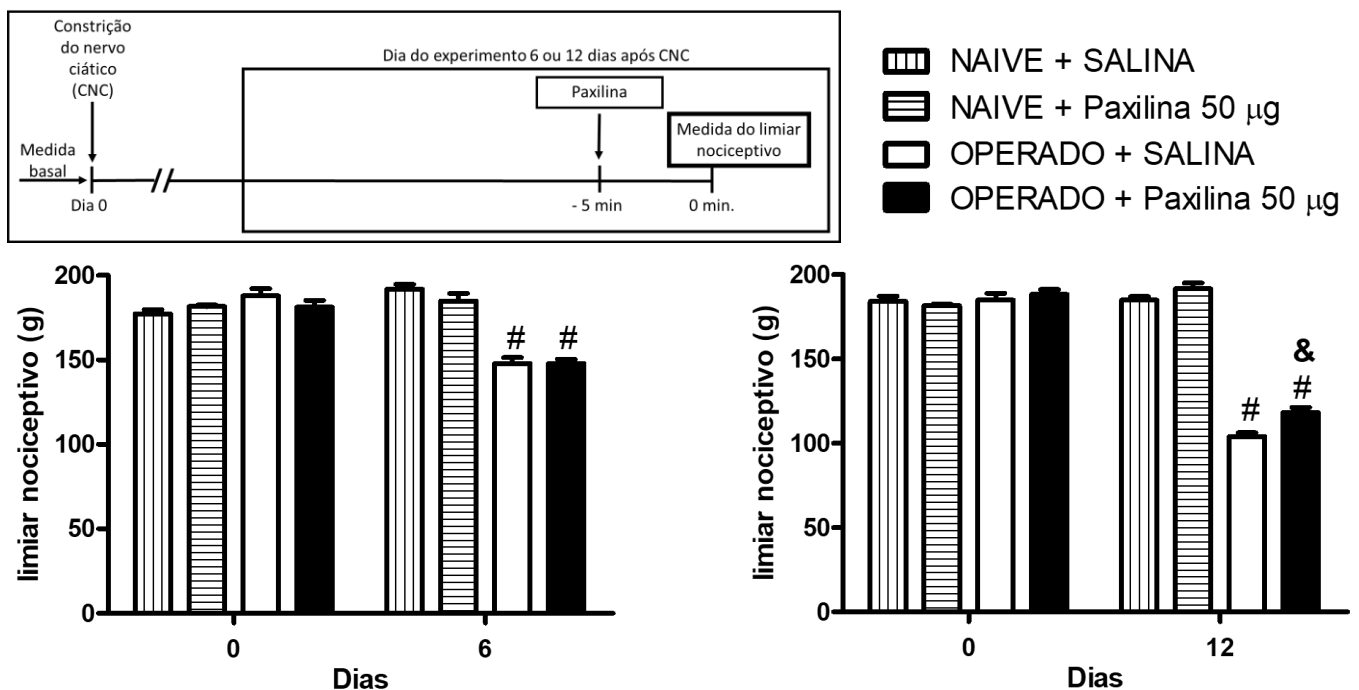


Figura 23: Efeito da administração intraplantar do bloqueador do canal para potássio sensível ao cálcio de alta condutância.

As barras representam a média \pm S.E.M. das medidas do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a cinco animais. * expressa significância estatística ($P < 0.05$) comparado com o grupo OPERADO + SALINA e # simboliza significância estatística ($P < 0.05$) comparados com os grupos NAÏVE + DMSO 10% e NAÏVE + Paxilina 50 µg. Foi utilizado *one-way* anova.

5.4.2 -Efeito dos bloqueadores dos canais para potássio dependentes de voltagem sobre o limiar nociceptivo após constrição do nervo ciático na pata de ratos.

Foi observado na aplicação intraplantar do bloqueador de canais para potássio dependentes de voltagem (Kv), na dose de 30 μg por animal, 30 minutos antes das leituras de limiar nociceptivo, não provoca nenhum efeito em animais neuropáticos em todos os dias testados (Figura 24). Então podemos inferir que esse tipo de canal não participa da modulação periférica da dor neuropática por CNC.

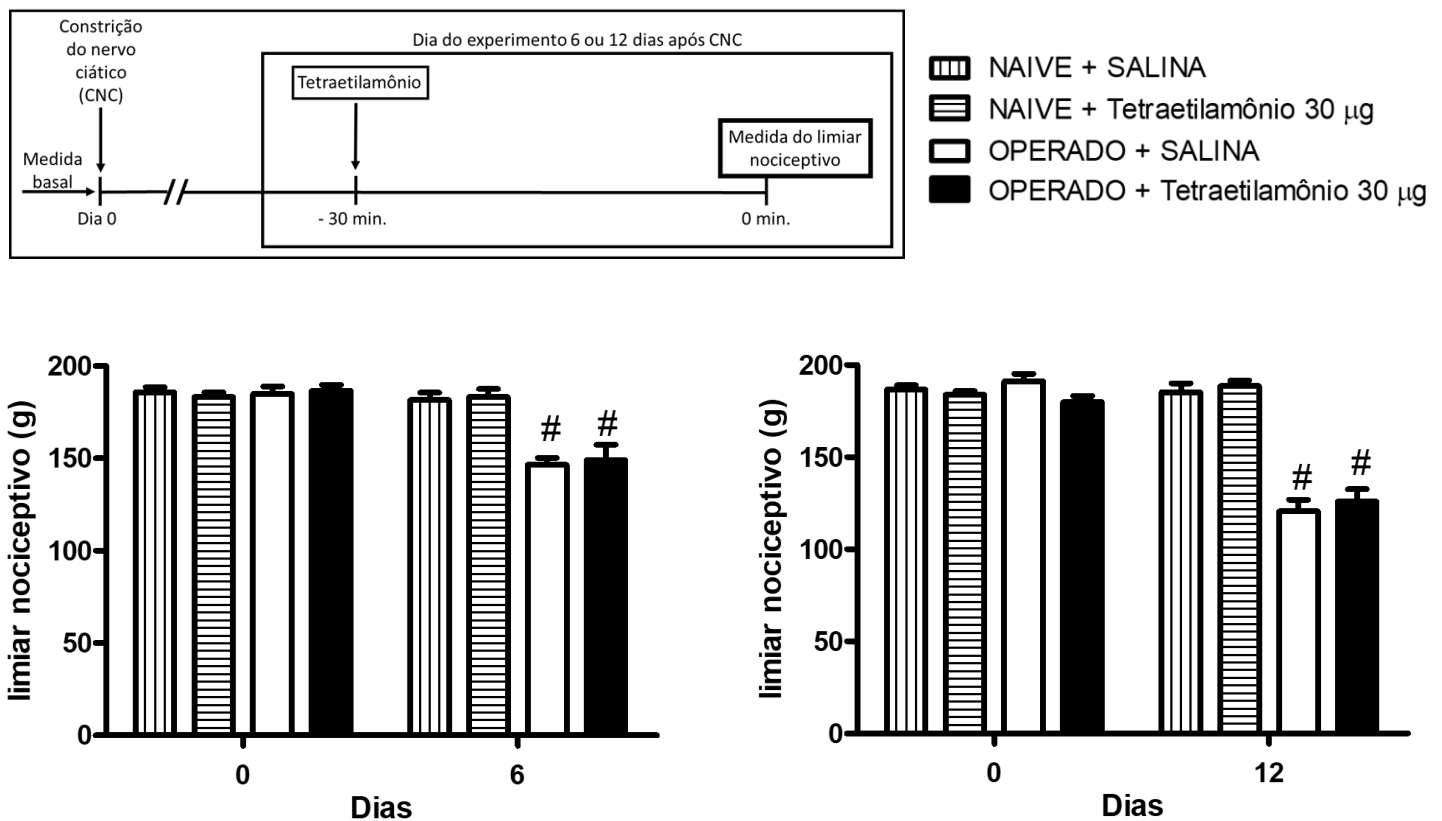


Figura 24: Efeito da administração intraplantar do bloqueador dos canais para potássio voltagem dependentes.

As barras representam a média \pm E.P.M. das medidas do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a cinco animais. # simboliza significância estatística ($P < 0.05$) comparados com os grupos NAÏVE + DMSO 10% e NAÏVE + Tetraetilamônio 30 μg . Foi utilizado *one-way* anova.

5.4.3 -Efeito dos bloqueadores dos canais para potássio sensíveis ao ATP sobre o limiar nociceptivo após constrição do nervo ciático na pata de ratos.

O efeito da aplicação de 80 µg do bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), glibenclamida, por animal, 5 minutos antes de se obter os valores no algesímetro, mostrou redução no limiar nociceptivo tanto na indução (6° dia) quanto na dor neuropática consolidada (12° dia), o que indica que K_{ATP} participa de processos analgésicos durante todo evento neuropático (Figura 25).

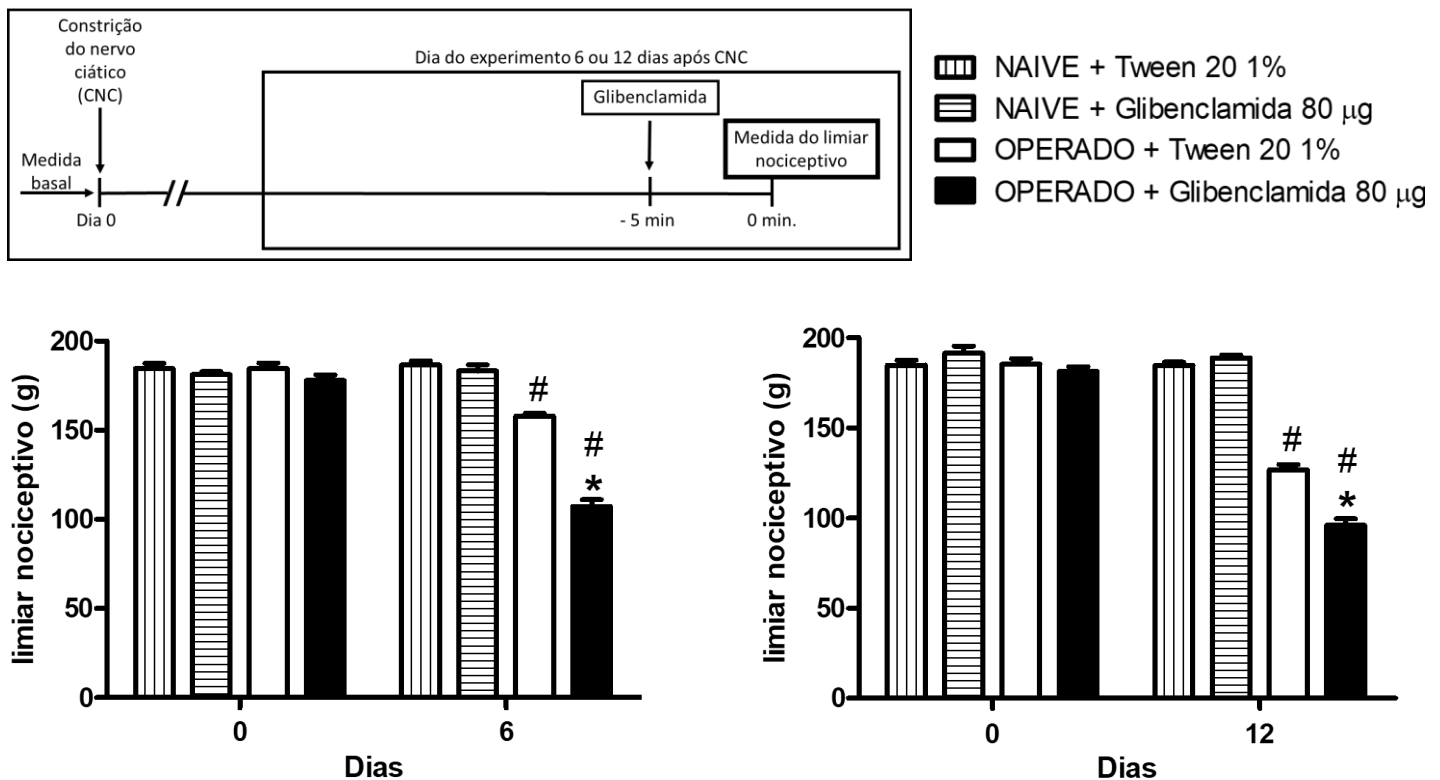


Figura 25: Efeito da administração intraplantar do bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP.

As barras representam a média \pm E.P.M. das medidas do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a cinco animais. * expressa significância estatística ($P < 0.05$) comparado com o grupo OPERADO + DMSO 10% e # simboliza significância estatística ($P < 0.05$) comparados com os grupos NAÏVE + DMSO 10% e NAÏVE + Glibenclamida 80 µg. Foi utilizado *one-way* anova.

5.5 Expressão de Akt, iNOS e do canal para potássio sensível ao ATP em pata e mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.

A expressão dos componentes da via avaliada no estudo pode revelar algumas informações sobre o mecanismo e sobre o comportamento dessa via frente aos processos adaptativos da dor neuropática e ajudar a explicá-los. Por isso testamos alguns componentes chave da via para entender um pouco do mecanismo e verificar se as alterações destes componentes estão relacionadas com os experimentos farmacológicos.

5.5.1 -Expressão de Akt em pata e mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.

A expressão de Akt foi verificada pela técnica de western blot. Por ela, podemos observar, na pata, que no primeiro dia pós CNC houve um aumento na expressão de Akt total e de sua ativação, havendo uma quantidade grande tanto da forma total quanto fosforilada. No dia 6 observamos uma queda de Akt total em relação ao dia 1 pós constrição retornando aos níveis do animal não neuropático, enquanto os níveis da forma fosforilada se mantiveram semelhantes aos do dia 1, o que aumentou bastante a relação $Akt_{fosf.}/Akt_{total}$ em relação ao 1º dia. Já no 12º dia de CNC os níveis de todas as formas de Akt testadas retornaram para os níveis semelhantes aos animais Naive e a relação entre elas voltou para abaixo de 0 revelando maior quantidade da forma não ativada em relação a forma ativada (Figura 26).

No mesencéfalo, a expressão de Akt total aumenta no 1 dia após a CNC e se mantém em níveis semelhantes nos outros dias do experimento. No entanto, Akt fosforilada (ativada), aumenta nos animais neuropáticos no 1º dia após a constrição e vai diminuindo gradativamente no 6º dia e depois no 12º dia, o que faz também com que a relação Akt fosforilada por Akt total tenha o mesmo comportamento observado em Akt ativada (Figura 27).

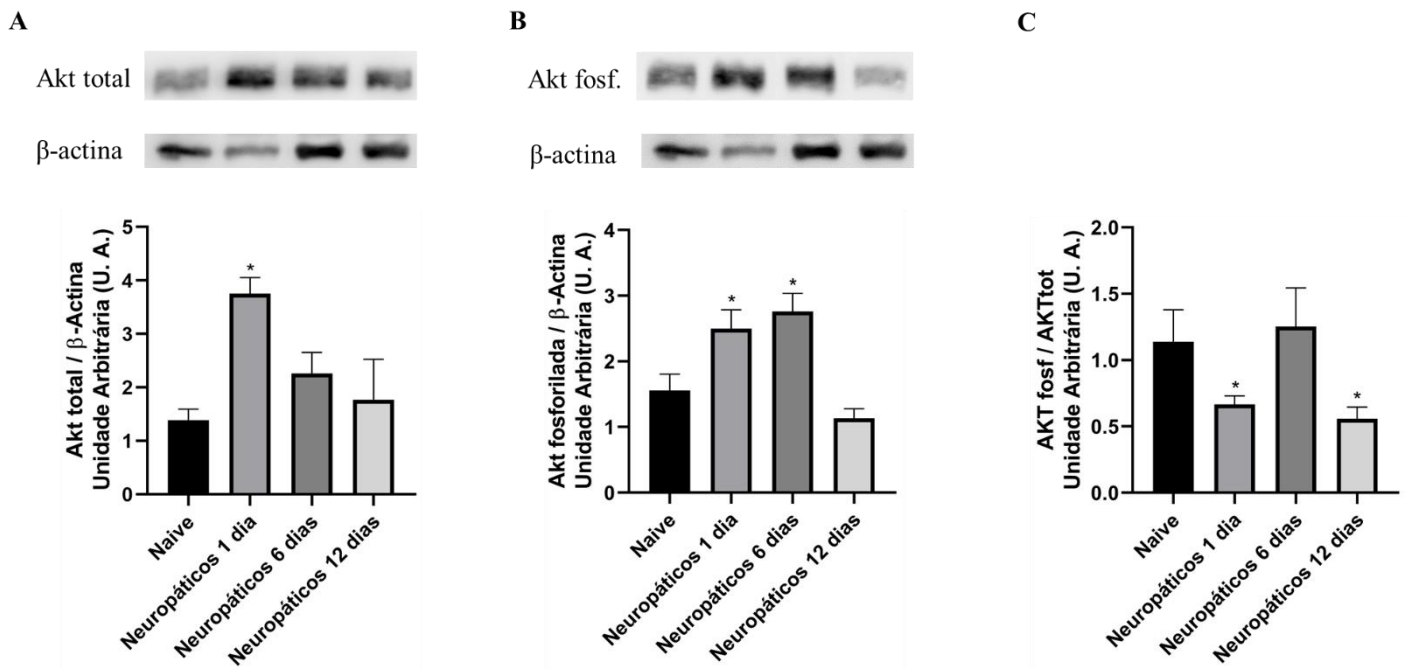


Figura 26: Expressão de Akt_{total} e Akt_{fosf.} em pata de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.

Os animais foram submetidos a CNC no dia 0 e grupos de 4 animais foram eutanasiados 1 dia, 6 dias e 12 dias após esse procedimento. Desses animais foram coletados a pata direita e essas processadas para a técnica de wester blot. Em A está representado a expressão de Akt total, em B Akt fosforilada (ativada) e em C a relação entre Akt fosforilada e Akt total. Imagens representativas das bandas estão sobre os gráficos em A e B. As barras representam a média \pm E.P.M. da expressão de Akt referente a 4 ratos por grupo. * indica diferença significativa, $P < 0,05$ em relação ao grupo Naive. Foi utilizado *one-way* anova.

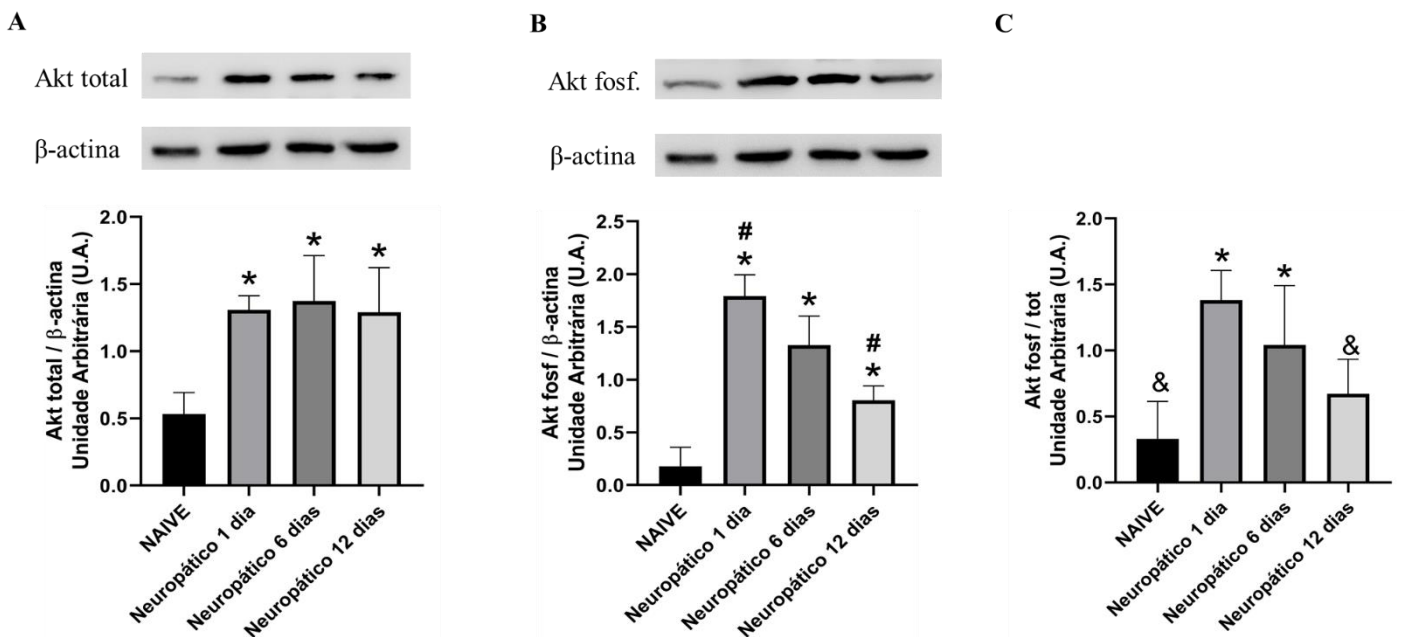


Figura 27: Expressão de Akt_{total} e Akt_{fosf.} em mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.

Os animais foram submetidos a CNC no dia 0 e grupos de 4 animais foram eutanasiados 1 dia, 6 dias e 12 dias após esse procedimento. Desses animais foram coletados o mesencéfalo e esse processado para a técnica de wester blot. Em A está representado a expressão de Akt total, em B Akt fosforilada (ativada) e em C a relação entre Akt fosforilada e Akt total. Imagens representativas das bandas estão sobre os gráficos em A e B. As barras representam a média \pm E.P.M. da expressão de Akt referente a 4 ratos por grupo. * indica diferença significativa, $P < 0,05$, em relação ao grupo Naive. & indica diferença estatística, $P < 0,05$, em relação ao grupo Neuropático 1 dia. # indica diferença significativa, $P < 0,05$, em relação ao grupo Neuropático 6 dias. Foi utilizado *one-way* anova.

5.5.2 -Expressão de iNOS em pata e mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.

Quanto a expressão de iNOS na pata, é possível observar que há um aumento durante a fase de indução desde o primeiro dia após a constrição do nervo ciático e uma manutenção deste nível ao 6º dia, já que não há diferença significativa entre esses dias de neuropatia. No 12º dia, há uma redução dos níveis de iNOS, chegando a valores não significativos em relação aos animais Naive (Figura 28).

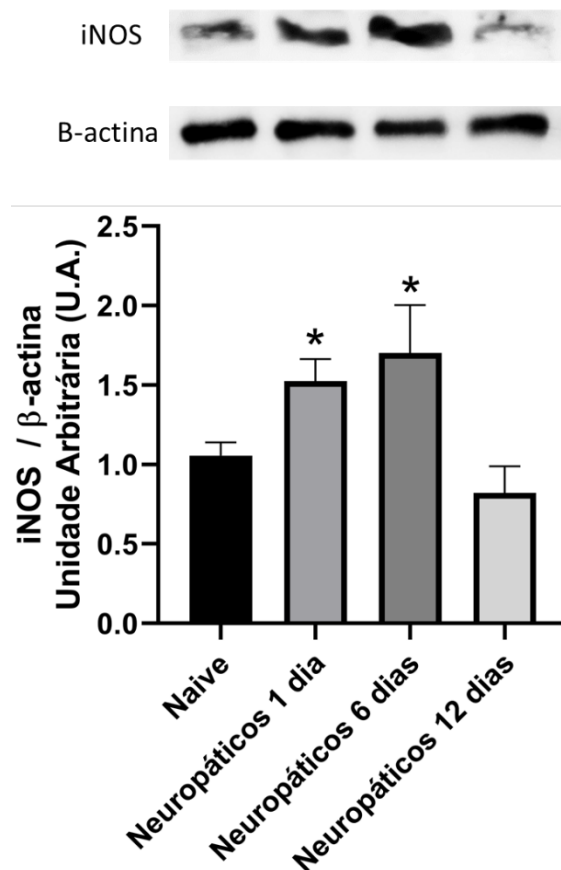


Figura 28: Expressão de iNOS na pata de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.

Os animais foram submetidos a CNC no dia 0 e grupos de 4 animais foram eutanasiados 1 dia, 6 dias e 12 dias após esse procedimento. Desses animais foram coletados a pata direita e essas processadas para a técnica de wester blot. Imagens representativas das bandas estão sobre o gráfico. As barras representam a média \pm E.P.M. da expressão de iNOS referente a 4 ratos por grupo. * indica diferença significativa, $P < 0,05$, em relação ao grupo Naive. Foi utilizado *one-way* anova.

Em relação ao mesencéfalo, iNOS apresenta aumento da expressão no 1º dia pós CNC e depois, no 6º dia, já apresenta uma queda nos níveis dessa sintase, retornando a valores basais, que se mantém no 12º dia após a constrição (Figura 29)

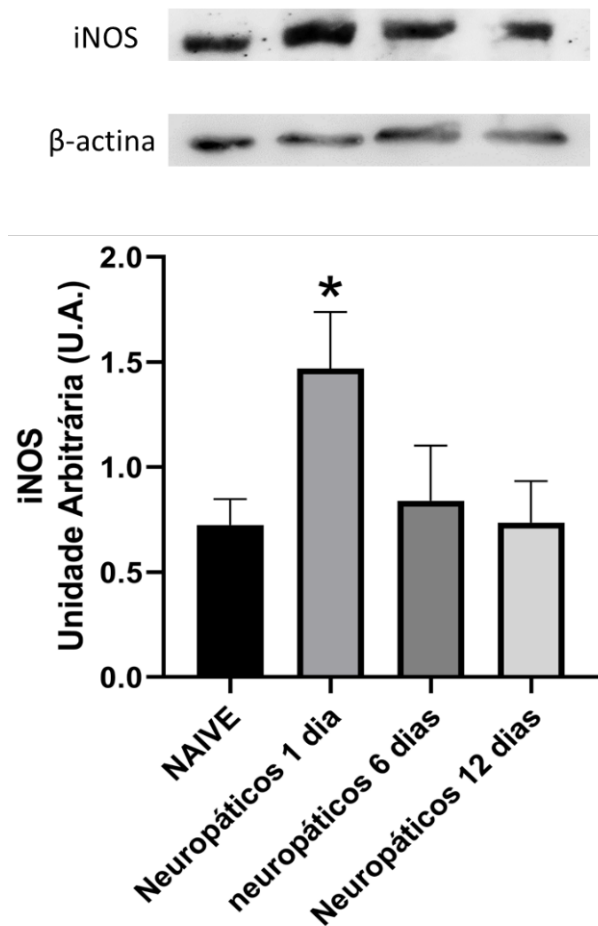


Figura 29: Expressão de iNOS em mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático. Os animais foram submetidos a CNC no dia 0 e grupos de 4 animais foram eutanasiados 1 dia, 6 dias e 12 dias após esse procedimento. Desses animais foram coletados o mesencéfalo e esses processados para a técnica de wester blot. Imagens representativas das bandas estão sobre o gráfico. As barras representam a média \pm E.P.M. da expressão de iNOS referente a 4 ratos por grupo. * indica diferença significativa, $P < 0,05$, em relação ao grupo Naive. Foi utilizado *one-way* anova.

5.5.3 -Expressão de canais para potássio sensíveis ao ATP em pata e mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.

Para verificar os níveis dos canais para potássio sensíveis ao ATP foi utilizado o anticorpo anti-Kir 6.2, que é a maior subunidade desses canais e os diferencia dos demais canais para potássio.

Na pata podemos observar que no início, há um aumento de Kir 6.2 nos animais neuropáticos 1 dia, mas os níveis voltam para os valores semelhantes aos animais Naive nos animais neuropáticos 6 dias e permanecem significativamente semelhantes nos animais neuropáticos 12 dias (Figura 30).

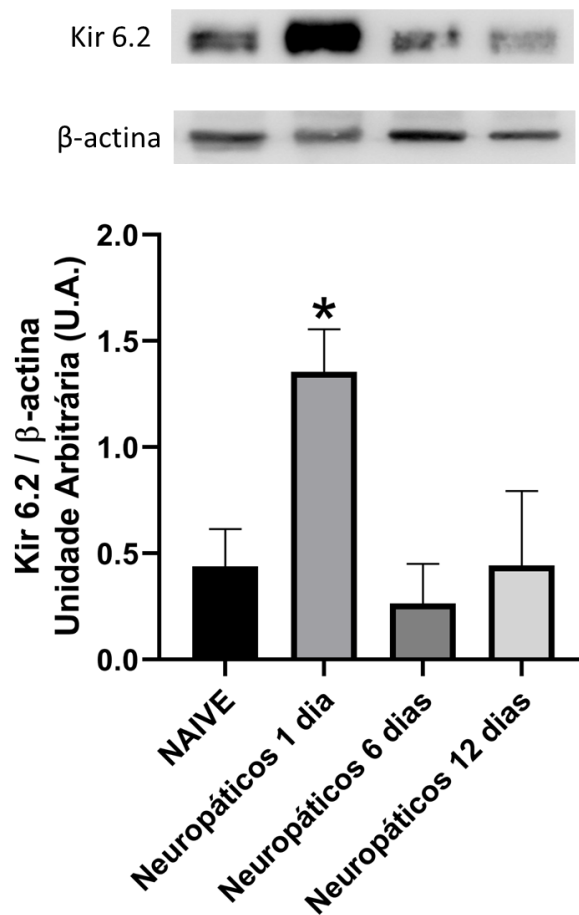


Figura 30: Expressão de Kir 6.2 em pata de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.

Os animais foram submetidos a CNC no dia 0 e grupos de 4 animais foram eutanasiados 1 dia, 6 dias e 12 dias após esse procedimento. Desses animais foram coletados a pata direita e essas processadas para a técnica de wester blot. Imagens representativas das bandas estão sobre o gráfico. As barras representam a média \pm E.P.M. da expressão de Kir 6.2 referente a 4 ratos por grupo. * indica diferença significativa, $P < 0,05$, em relação ao grupo Naive. Foi utilizado *one-way* anova.

No mesencéfalo observa-se que no dia 1 pós constrição não há variação significativa, isto é, os níveis de Kir 6.2 são semelhantes com o Naive. Já a partir do 6º dia após CNC, há um aumento significativo nos níveis dessa subunidade que se mantém em níveis semelhantes no 12º dia (Figura 31).

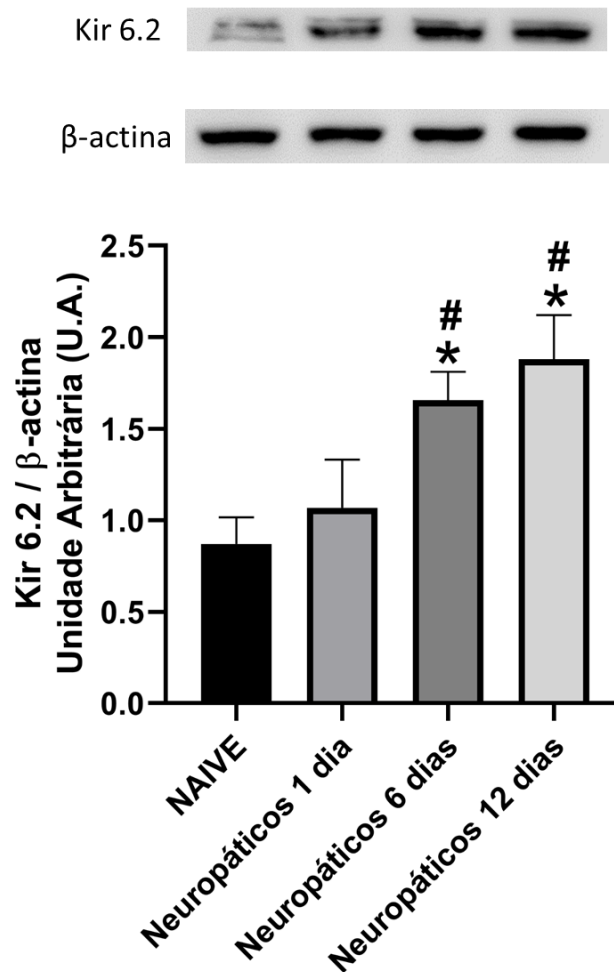


Figura 31: Expressão de Kir 6.2 em mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.

Os animais foram submetidos a CNC no dia 0 e grupos de 4 animais foram eutanasiados 1 dia, 6 dias e 12 dias após esse procedimento. Desses animais foram coletados o mesencéfalo e esses processados para a técnica de wester blot. Imagens representativas das bandas estão sobre o gráfico. As barras representam a média \pm E.P.M. da expressão de Kir 6.2 referente a 4 ratos por grupo. * indica diferença significativa, $P < 0,05$, em relação ao grupo Naive e # indica diferença significativa, $P < 0,05$, em relação ao grupo Neuropático 1 dia. Foi utilizado *one-way* anova.

5.6 Quantificar a concentração de óxido nítrico na pata e mesencéfalo pela dosagem de nitrito em ratos submetidos a constrição do nervo ciático.

A reação de Griess é uma forma indireta de dosar o NO em tecidos através da dosagem de nitrito (NO_2^-). Utilizando essa metodologia foi possível detectar níveis de NO_2^- em pata e mesencéfalo de animais saudáveis (Naive) e após a constrição do nervo ciático em três momentos diferentes 1, 6 e 12 dias após CNC).

Ao dosar o nitrito foi possível observar na pata que há um aumento nos níveis desse íon no 1º dia após a constrição do nervo em relação aos animais Naive e este nível se mantém significativamente semelhante no 6º dia. Nos animais neuropáticos 12 dias os níveis caem, retornando a valores semelhantes aos animais Naive (Figura 32)

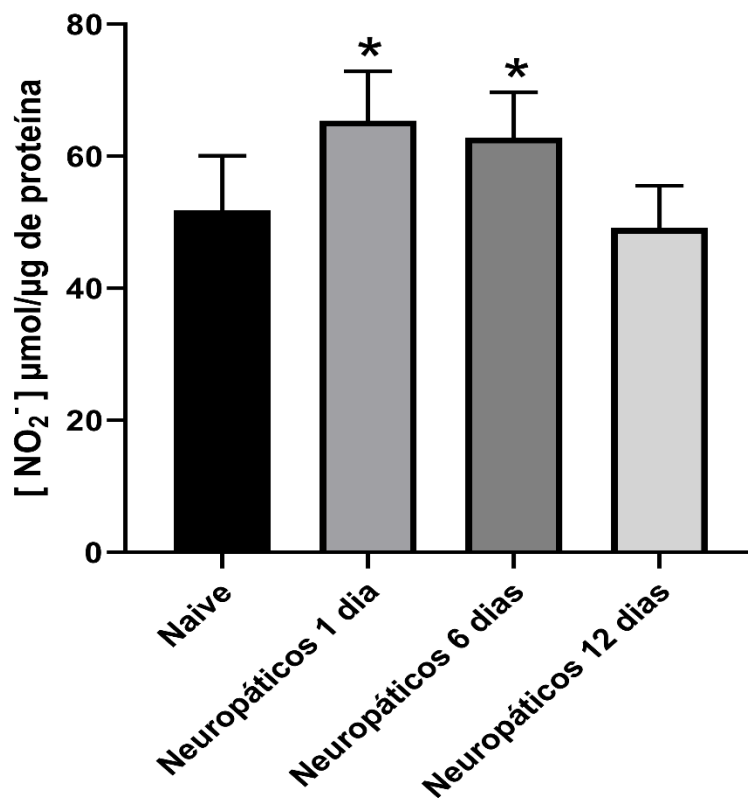


Figura 32: Concentração de nitrito (NO_2^-) na pata de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.

Os níveis de nitrito foram mensurados através da reação de Griess. Os animais foram submetidos a constrição do nervo ciático no dia 0. As amostras de superfície plantar foram coletadas 1, 6 e 12 dias após a constrição e o teste foi realizado imediatamente após a coleta dos tecidos. Cada coluna representa a média \pm EPM para 8 ratos por grupo. * indica diferença significativa em que $P < 0,05$ em comparação com o grupo Naive. Foi utilizado *one-way* anova.

O que se observa no mesencéfalo, é que há um aumento muito grande nos níveis de nitrito na fase de indução da neuropatia, no primeiro dia pós CNC já se observa esse aumento considerável e que continua aumentando no 6º dia. Já no 12º dia pós constrição, o nível de nitrito caiu novamente para níveis semelhantes aos animais não neuropáticos, representados pelo Naive (Figura 33).

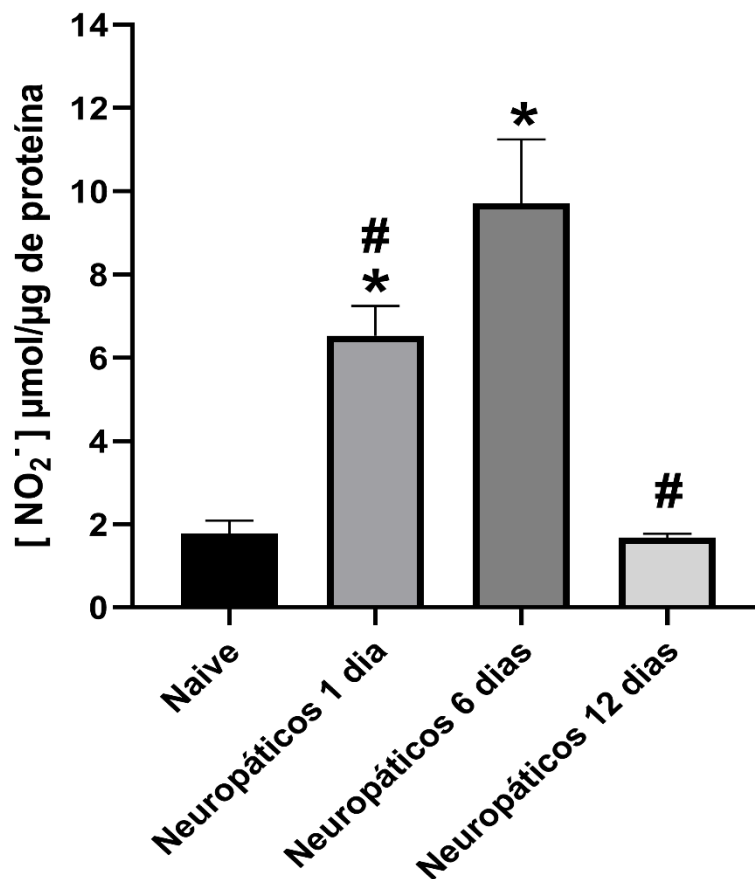


Figura 33: Concentração de nitrito (NO₂⁻) em mesencéfalo de ratos submetidos a constrição do nervo ciático.

Os níveis de nitrito foram mensurados através da reação de Griess. Os animais foram submetidos a constrição do nervo ciático no dia 0. As amostras de mesencéfalo foram coletadas 1, 6 e 12 dias após a constrição e o teste foi realizado imediatamente após a coleta dos tecidos. Cada coluna representa a média ± EPM para 8 ratos por grupo. * indica diferença significativa em que $P < 0,05$ em comparação com o grupo Naive e # indica diferença significativa, $P < 0,05$, em comparação com o grupo Neuropático 6 dias. Foi utilizado *one-way* anova.

5.7 Resumo dos resultados.

Tabela 2: Resumo do efeito da inibição dos componentes das vias.

Componente inibido	Neuropático dia 6	Neuropático dia 12
PI3Ky	↓	↓
nNOS	↓	↑
iNOS	↓	↓
GCs	↓	↓





















As seguintes formas indicam alterações no limiar nociceptivo. ■: Sem diferença significativa; ↑ : aumentou significativamente; ↓ : diminuiu significativamente. Todas as comparações são em relação ao grupo NAIVE.

Tabela 3: Resumo do efeito do bloqueio dos canais para potássio.

Canal bloqueado	Neuropático dia 6	Neuropático dia 12
SK	↓	■
BK	■	↑
KV	■	■
K _{ATP}	↓	↓

As seguintes formas indicam alterações no limiar nociceptivo. ■: Sem diferença significativa; ↑ : aumentou significativamente; ↓ : diminuiu significativamente. Todas as comparações são em relação ao grupo NAIVE. SK: canais para potássio de baixa condutância ativado por cálcio; BK: canal para potássio de alta condutância ativado por cálcio; KV: canal para potássio voltagem dependente; K_{ATP}: canal para potássio sensível ao ATP.

Tabela 4: Resumo dos resultados do western blot realizados na pata.

Componente da Via	Neuropático dia 1	Neuropático dia 6	Neuropático dia 12
Akt _{total}		 	 
Akt _{fosf.}		 	 
iNOS		 	 
K _{ATP}		 	 

























As seguintes formas indicam alterações na expressão da proteína avaliada. : Sem diferença significativa; : aumentou significativamente; : diminuiu significativamente. As formas azuis são comparações em relação ao dia 0 (grupo NAIVE). As formas vermelhas são comparações em relação ao dia experimental anterior. As formas com as duas cores indicam que o dia 0 (grupo NAIVE) e o dia experimental anterior correspondem ao mesmo momento.

Tabela 5: Resumo dos resultados de western blot realizados no mesencéfalo.

Canal bloqueado	Neuropático dia 1	Neuropático dia 6	Neuropático dia 12
Akt _{total}		 	 
Akt _{fosf.}		 	 
iNOS		 	 
K _{ATP}	 	 	 

















As seguintes formas indicam alterações na expressão da proteína avaliada. : Sem diferença significativa; : aumentou significativamente; : diminuiu significativamente. As formas azuis são comparações em relação ao dia 0 (grupo NAIVE). As formas vermelhas são comparações em relação ao dia experimental anterior. As formas com as duas cores indicam que o dia 0 e o dia experimental anterior correspondem ao mesmo momento.

Tabela 6: Resumo dos resultados da dosagem de nitrito pela reação de Griess.

Tecido	Neuropático dia 1	Neuropático dia 6	Neuropático dia 12
Pata		 	 
Mesencéfalo		 	 

As seguintes formas indicam alterações na concentração de nitrito. : Sem diferença significativa; : aumentou significativamente; : diminuiu significativamente. As formas azuis são comparações em relação ao dia 0 (grupo NAIVE). As formas vermelhas são comparações em relação ao dia experimental anterior. As formas com as duas cores indicam que o dia 0 e o dia experimental anterior correspondem ao mesmo momento.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Nas fibras aferentes primárias envolvidas na transmissão do impulso nervoso na via nervosa da dor com a ausência de um estímulo nocivo não há atividade espontânea significativa (JULIUS; BASBAUM, 2001). No entanto, quando estas são lesionadas, a atividade pode aumentar espontaneamente devido as mudanças adaptativas mal sucedidas causadas pela tentativa do organismo em solucionar as alterações causadas pela agressão que levou a lesão nervosa inicial. Nas alterações do organismo, algumas tendem a piorar a sensação dolorosa como é o caso dos impulsos ectópicos gerados pelas estruturas alteradas (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009). Entretanto, a sensação dolorosa poderia ser pior do que se sente de fato.

O organismo possui diversos sistemas endógenos de controle da dor como os sistemas opioidérgico, serotoninérgico e canabinoidérgico (MILLAN, 2002). Esses sistemas acionam receptores acoplados a proteína G_i , que por sua vez é capaz de ativar a via PI3K/Akt/NOS e causar analgesia na dor inflamatória por atuar nos canais para potássio (CUNHA et al., 2010).

Em se tratando de dor neuropática existem diferentes técnicas para induzi-la como os revistos por Kraychete et al em 2008. Bianchi em 1996 ao discutir seus resultados relata que diferentes manipulações do nervo ciático podem acarretar respostas diferentes. A escolha da técnica publicada por Benette e Xie em 1988, foi tomada devido ao modelo mimetizar bem os sinais da neuropatia, como atrofia muscular, maior sensibilidade ao frio, perda da propriocepção, preservação do membro afetado, postura e marcha anormal, alterações morfológicas no local da lesão e alodinia, como afirmado pelos criadores da técnica e por outros pesquisadores conforme revisto por Campbell em 2006.

No entanto, uma adaptação foi necessária em relação a técnica proposta por Benette e Xie. Não foi usado o fio do tipo gut cromado, como na técnica original. Devido este fio ser absorvível, provocaria um processo inflamatório muito intenso e o fio desapareceria em alguns dias. Além disso um estudo realizado por Maves et al., em 1993 indicaram que uma resposta imunomediada ao cromo tinha papel importante no desenvolvimento da neuropatia na técnica original. Assim entendemos que, a troca do fio cromado por um fio menos reativo poderia representar melhor as condições fisiopatológicas de doenças que tem como etiologia a simples compressão do nervo.

A substituição do gut cromado pelo fio resinado não impediu o desenvolvimento da dor neuropática como pode ser visto no 1º resultado deste trabalho que é muito parecido com os obtidos por Motta et al. (2011). A comparação com o grupo em que o fio ficou apenas em

contato com o nervo ciático, sem as suturas, isto é, sem compressão mostram que o fio não foi capaz, por si só, de causar neuropatia, indicando que todo sinal observado nos resultados foi devido primariamente a compressão.

Observando a dinâmica da curva que representa a indução da dor neuropática realizada nesse trabalho, a dividimos em quatro fases pós constrição do nervo ciático: sendo o dia 1 com o extremo da hipoalgesia, o dia 5 com o limiar apresentando valores basais, o dia 6 com o primeiro dia de hiperalgesia detectado após a cirurgia e o dia 12 representando a dor neuropática já instalada com os valores de limiar nociceptivo mais baixos. O comportamento da curva pode ser explicado pelo fato de o trauma mecânico no nervo periférico resultar em uma imediata interrupção da condução dos impulsos nervosos, seguida de degeneração Walleriana, causando o quadro de hipoalgesia nos primeiros dias. A partir do momento em que o neuroma vai se desenvolvendo, o limiar nociceptivo decresce gradativamente até se instalar um quadro hiperalгésico (ZIMMERMANN, 2001). Segundo WELK et al., em 1990, o neuroma só está completamente formado depois de uma semana após a lesão nervosa.

Em vários trabalhos observa-se que a dor que ascende da periferia ao tálamo é modulada em vários níveis, até mesmo ao nível periférico, frequentemente no próprio local de deflagração do impulso da dor. Tal modulação é, em parte, feita por neurotransmissores como a noradrenalina e por substâncias analгésicas como os opioides e os canabinoides (GEBHART, 2004; MELZACK; WALL, 1965; MILLAN, 2002; STAMFORD, 1995; VERA-PORTOCARRERO et al., 2006).

Vários trabalhos no nível periférico mostram que após a ativação dos receptores opioides, por exemplo pela morfina (CUNHA et al., 2010), e agonistas canabinoides (PACHECO et al., 2009), há ativação intracelular da via nitrérgica PI3K γ /Akt/NOS e NOS/NO/GCs/GMPc/K_{ATP} respectivamente.

Em adição, nosso grupo de pesquisa relatou a participação da via L-arginina/NO/GCs/GMPc e ativação de canais para potássio sensíveis ao ATP no mecanismo antinociceptivo na modulação da dor inflamatória pelos sistemas opioides (PACHECO; DUARTE, 2005; RODRIGUES; DUARTE, 2000) e canabinoides (REIS et al., 2009; ROMERO et al., 2012; ROMERO; DUARTE, 2012) e na dor neuropática (MACHADO, 2016).

O presente estudo mostra uma característica interessante da neuropatia que é o fato de suas alterações não se limitarem a um local e promover alterações distantes do foco da lesão. Ao realizarmos os testes, tanto no estudo farmacológico, quanto nos biomoleculares, verificamos o limiar nociceptivo e dosamos níveis de enzimas e compostos distantes do nervo ciático, que

seria o foco da indução da lesão neste trabalho. Inicialmente verificamos os efeitos locais da supressão farmacológica de alguns componentes chaves das vias intracelulares na pata pélvica direita e em uma segunda etapa dosamos alguns integrantes importantes dessas vias também na pata direita para verificar alterações periféricas e no mesencéfalo para analisar mudanças na porção central do sistema nervoso.

Dessa forma, inibimos o início da via, inibindo a PI3K γ , isso implicaria em uma interrupção total dela e seria um alvo farmacológico com possíveis implicações em outros mecanismos além dos analgésicos. Nossos resultados mostram que houve redução do limiar nociceptivo, o que representa uma nocicepção mais intensa e que provavelmente o animal estaria sentindo mais dor quando a PI3K γ não exerce sua atividade, indicando que essa enzima participa predominantemente do processo analgésico na modulação da dor tanto na indução quanto na neuropatia já estabelecida.

Estudos mostram que essa via está relacionada com a sensibilização central (LIU; LV; REN, 2018) e portanto faz parte da construção da dor e não do papel analgésico, o que a princípio parece um resultado contraditório em relação ao encontrado nesse trabalho. No entanto, Liu em 2018, suprimiu PI3K pela via intratecal, que é uma via central, o que levou a uma atenuação da nocicepção, evidenciando o papel hiperalgésico. Esse resultado associado com os nossos, é bastante interessante devido a corroborar o papel dual da via PI3K/Akt. A explicação para esse antagonismo é que Liu (2018) inibiu a via de forma central enquanto nosso trabalho modulou a via de forma periférica.

A PI3K induz a atividade de Akt e o estímulo da ativação da via pode alterar as quantidades de seus componentes. Periféricamente, a quantidade de Akt total aumenta no primeiro dia após a CNC, mas diminui já no 6º para os níveis dos animais não neuropáticos e assim permanece no 12º dia. É observado, que a Akt fosforilada acompanha o aumento no 1º dia, e que apesar de termos uma relação Akt fosforilada/Akt total baixa isso não reflete em pouca atividade, esse fato ocorre porque há muito da total e da forma ativada. No entanto, os níveis da forma fosforilada permanecem altos no 6º dia, o que evidencia uma taxa de ativação alta, já que há mais fosforilada do que total. No 12º dia os níveis de Akt fosforilada acompanham o movimento da Akt total e retornam para os níveis basais, o que deixa a relação entre as formas, baixa novamente, mas agora diferente do 1º dia, os níveis de Akt total e da Akt fosforilada estão baixos.

Já os níveis de Akt mensurados no mesencéfalo mostram um aumento de Akt total já no 1º dia e uma manutenção dos níveis no 6º e no 12º dia pós CNC. Já a forma ativada aumenta no 1º dia e cai progressivamente durante o 6º e o 12º dia, mas não retornam aos níveis dos animais

não neuropáticos, o que pode estar relacionado com o que observou Liu (2018) em relação a importância da via PI3K/Akt na manutenção do controle da sensibilização central e por isso se mantem em níveis acima dos níveis encontrados em animais saudáveis.

A via PI3K/Akt tem um comprovado e importante papel na resposta imune e em processos inflamatórios (GUHA; MACKMAN, 2002; HAWKINS; STEPHENS, 2015; JIN et al., 2017; VERGADI et al., 2017). O aumento de Akt inicialmente, no momento próximo de quando a lesão foi feita, pode ser devido a um processo inflamatório, já que a via PI3K/Akt/mTOR está envolvida na modulação desse processo (HAWKINS; STEPHENS, 2015; LI et al., 2018; VARSHNEY; SAINI, 2018).

A dinâmica dos níveis de Akt encontrada nesse estudo pode indicar uma mudança do organismo em relação aos locais, periferia ou sistema nervoso central, onde estão ocorrendo as adaptações que têm maior influência sobre o processo de indução e manutenção da dor neuropática. Inicialmente esse processo poderia começar como uma inflamação no local da lesão que geraria todo o processo como revisto por Costigan em 2009 e as mudanças ascenderiam pelo sistema nervoso periférico e central. Uma evidência dessa ascensão é a presença de neutrófilos e linfócitos no DRG em animais neuropáticos (HU; MCLACHLAN, 2002; MORIN et al., 2007). Morin em 2007 observou através de citometria de fluxo em ratos que passaram por contração no ciático, que no 1º e 3º dia, após a contração do nervo ciático, a densidade de polimorfonucleares não modificava significativamente no DRG ipsilateral a lesão, em relação ao DRG contralateral. Ele encontrou densidade elevada dessas células no 7º dia após a contração. Enquanto isso, nesse mesmo dia, o mesmo autor constatou que a porcentagem de polimorfonucleares no sangue era a mesma que em animais não neuropáticos, o que indica que o processo inflamatório inicial reduziu ao ponto de não ser detectável no sangue.

Por volta do 6º dia após a CNC, pode ser um momento de transição, como observamos há uma queda de Akt total, dessa forma é como se o organismo entendesse que não é necessário mais uma grande quantidade, reduzindo a ativação da via, até chegar aos níveis basais no 12º dia. Esse fato pode indicar juntamente com a celularidade relatada por Morin (2007) que o processo inflamatório além de diminuir pode estar perdendo importância na dor neuropática.

De qualquer forma, a via PI3K/Akt induz a formação de NO (STOJANOVIC et al., 2006). O NO na periferia tem participação na analgesia endógena conforme relatado por Alves (2013) na dor inflamatória, e segundo nossos resultados, isso ocorre também na dor neuropática, especificamente na periferia. Contudo, segundo Luo e Cizcova (2000), durante a neuropatia o NO pode induzir o neurônio pré-sináptico a aumentar a liberação de substância P e outros

neuropeptídeos excitatórios e assim contribuir para hiperalgesia e manter a sensibilização central.

Ao inibirmos a nNOS, ela apresentou um interessante papel dual. Durante a indução da neuropatia, ela controlava a dor já que ao ser inibida, o indivíduo apresentou hiperalgesia. No entanto ao inibirmos a nNOS na neuropatia consolidada os limiares nociceptivos aumentaram, o que revela que nesta fase a enzima está contribuindo com o processo patológico e aumentando a sensação dolorosa.

Segundo Alves et al. (2013), há controle da dor pelo NO em processos inflamatórios. No entanto, a sensibilização periférica, que é basicamente a atuação de mediadores inflamatórios de forma exacerbada sobre a via nociceptiva periférica, induz o processo de sensibilização central pela constante ativação da via. Com os processos maladaptativos, incluindo a sensibilização central, há uma facilitação para que o NO provoque a liberação dos neurotransmissores excitatórios, como foi observado por Luo; Cizcova (2000), e assim aumentaria a transmissão dos impulsos na via nociceptiva.

A óxido nítrico sintase induzível, tanto na indução quanto na neuropatia consolidada, quando inibida reduz o limiar nociceptivo. Tal fato mostra que esta enzima está relacionada com a analgesia, diferente da nNOS na fase consolidada. Apesar de serem isoformas diferentes, elas produzem o mesmo composto, o NO.

O NO pode causar analgesia ativando a GCs/GMPc/PKG/K_{ATP} (CUNHA et al., 2010; DUARTE; LORENZETTI; FERREIRA, 1990) ou por uma ação não canônica, ativando diretamente K_{ATP} através de uma S-nitrosação do canal (KAWANO et al., 2009). Por outro lado, NO pode induzir nocicepção através do aumento da atividade de COX-2, através de uma S-nitrosação de resíduos de cisteína no domínio catalítico dessa enzima, intensificando os processos de permeabilidade vascular e edema, e pela reação do NO com o íon superóxido para formar peroxinitrito (ONOO⁻), uma potente molécula oxidante capaz de provocar peroxidação lipídica e dano celular (SALVEMINI; ISCHIROPOULOS; CUZZOCREA, 2003).

A iNOS está bastante relacionada à inflamação que na fase de indução parece ter papel primordial, conforme já discutido, e ambas as enzimas têm papel analgésico (CLANCY; AMIN; ABRAMSON, 1998). Salvemini (2003) observou, em um ensaio de co-localização, que na inflamação aguda iNOS está presente no interior de macrófagos, o que sugere que essas células residentes e os monócitos infiltrantes são a origem do NO derivado dessa enzima e fortalece ainda mais a relação dela com o processo inflamatório.

Como foi observado na dosagem de iNOS em nosso estudo, na pata há um aumento no primeiro dia e esse nível se mantém no sexto e cai no décimo segundo dia, enquanto no

mesencéfalo, o nível sobe no primeiro dia e já cai para os níveis semelhantes aos animais NAIVE no sexto dia.

Salvemini (2003) observou que a origem do NO derivado da iNOS são os macrófagos residentes no tecido e os monócitos circulantes. Hu (2002) e Morin (2007) observaram a possibilidade de migração de células de defesa durante a indução da neuropatia. Dessa forma, os monócitos circulantes, poderiam migrar para pata e mesencéfalos ocasionando o aumento dessa enzima nessas regiões nos momentos próximos da lesão do nervo, quando o processo inflamatório é intenso e há aumento de células de defesa no organismo (MORIN et al., 2007; SALVEMINI; ISCHIROPOULOS; CUZZOCREA, 2003). Além disso, células da glia também podem produzir NO e essa produção primariamente é através de iNOS (ROCHA et al., 2020).

O aumento de iNOS no primeiro dia em ambos os tecidos testados e o nível mantido no 6º dia na pata pode ter relação com o que Hu (2002) e Morin (2007) observaram através de imunoenaios em que eles mostraram a migração de células de defesa, como monócitos/macrófagos, linfócitos e neutrófilos, para o DRG. Em seus experimentos, houve aumento dessas células nos sete dias pós constrição do nervo ciático, fase de indução da neuropatia. Esse momento coincide em nossos resultados com os períodos de maior quantidade de NO. Além disso, Hu (2002) observou queda na concentração de macrófagos e linfócitos em animais com 28 dias pós constrição, período em que a dor neuropática já está consolidada.

Em nossos resultados, quando a neuropatia já está consolidada, a iNOS e o NO estão em níveis menores do que na fase de indução da neuropatia. Já na fase de neuropatia consolidada, há uma redução considerável de iNOS na pata e no mesencéfalo, o que explica a redução importante de NO em ambos os tecidos. A queda de iNOS pode indicar que nesse momento a inflamação regride e o que predomina são as alterações maladaptativas. Assim a nNOS, que é constitutiva e não depende do processo inflamatório, se manteria ativa e produzindo NO, mas em pequenas quantidades e este estaria promovendo a liberação de peptídeos excitatórios (CLANCY; AMIN; ABRAMSON, 1998; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; LUO; CIZKOVA, 2000) e atuando também nos mecanismos nociceptivos já citados (LEVY; ZOCHODNE, 2004; SALVEMINI; ISCHIROPOULOS; CUZZOCREA, 2003).

Esse momento da neuropatia já consolidada, é uma fase que apesar do aumento de K_{ATP} no mesencéfalo, houve redução desse canal na pata, onde foi realizado a inibição das isoformas de NOS. Por isso, há uma redução do poder analgésico permitindo a predominância dos mecanismos hiperalgésicos como a reação do NO com o íon superóxido, o que explica a ação hiperalgésica de nNOS.

Contudo, iNOS se mantém com ação analgésica na dor neuropática consolidada. Como discutido anteriormente, iNOS é expressa em macrófagos residentes e monócitos circulantes (SALVEMINI; ISCHIROPOULOS; CUZZOCREA, 2003). Isso implica que a produção do NO derivado da iNOS seria fora do neurônio e sua ação perante o processo nociceptivo poderia ser indireta ou dependeria de uma passagem da célula produtora para o neurônio.

Então, a diferença entre a ação hiperalgésica ou analgésica do NO, poderia ser explicada pela variação do local de produção, levando a uma possível variação da concentração e o alcance de alvos farmacológicos diferentes no neurônio. Dessa forma, o NO produzido pela nNOS estaria sendo produzido dentro do neurônio, entrando em contato com alvos presentes no citosol como os íons superóxidos, que tem papel hiperalgésico. Enquanto o derivado da iNOS seria produzido por outra célula, como o macrófago (SALVEMINI; ISCHIROPOULOS; CUZZOCREA, 2003), e teria que passar da célula produtora para o neurônio, ultrapassando a membrana plasmática onde se localiza por exemplo o K_{ATP} , que pode ser um alvo do NO via s-nitrosilação (KAWANO et al., 2009), e tem um papel analgésico na dor neuropática como observamos em nossos resultados.

Para verificar uma possível alteração da concentração de NO, realizamos o ensaio de Griess, baseado na dosagem de um dos produtos da degradação desse composto. Apesar de *in vivo* esse composto resultar em dois produtos principais, os íons nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (GLADWIN et al., 2005; LUNDBERG et al., 2009), em sistemas aquosos puros, a degradação de NO gera primariamente NO_2^- (IGNARRO et al., 1993). Dessa forma, a medida dos níveis de nitrito é uma boa medida indireta dos níveis de NO.

O que observamos na dosagem de nitrito na pata foi inicialmente um aumento que corresponde com o aumento de iNOS que foi observado pela técnica de western blot, mas diferente de iNOS que reduziu no dia 6, a concentração de nitrito se manteve semelhante nesse dia, só reduzindo no dia 12 pós CNC. Aparentemente, a iNOS em níveis basais e as demais NOS foram suficientes para manter os níveis no 6º dia.

No mesencéfalo, há uma dinâmica crescente, em que os resultados mostram que há aumento da concentração de nitrito tanto no 1º dia quanto no 6º dia, mas no 12º dia pós constrição a concentração volta a níveis semelhantes ao dos animais não neuropáticos. Esse movimento nas concentrações, coincidem com iNOS dosada no mesencéfalo no 1º dia. No 6º dia enquanto iNOS volta para valores basais, o nitrito continua alto, e no 12º dia o nitrito volta para valores basais.

Não somente as concentrações de nitrito, mas todos os componentes dosados apresentaram queda de seus níveis no 12º dia pós CNC, isso mostra uma correlação entre os

mesmos e fortalece o indício de fazerem parte de uma mesma via. Teoricamente, quando mais se precisava de analgesia, a via analgésica diminuiu sua ação sobre o indivíduo, demonstrando claramente as adaptações induzidas pela dor neuropática. Em alguns estudos, foram observados a redução da expressão de receptores acoplados a proteína G_i como os receptores δ -opioide em animais neuropáticos além disso foi observado que em animais submetidos a constrição do nervo ciático há liberação contínua de opioides derivados da prodinorfina e a ação constante sobre os receptores levariam a inativação destes (HERVERA et al., 2010; STONE et al., 2004; XU et al., 2004). Assim, se os receptores não estiverem presentes ou estiverem inativados, a via PI3K/Akt/NOS/NO/GCs/GMPc não seria deflagrada e essa situação pode ser uma das explicações pela redução geral dos componentes dessa via, incluindo o NO.

Segundo Cury (2011) altas concentrações de NO estão mais relacionadas com os processos hiperalgésicos. A princípio, em nossos animais, à medida que o NO aumenta, o limiar abaixa durante a dinâmica de indução da dor neuropática. No entanto, observamos que na dor neuropática já consolidada o NO está em seus níveis mais baixos e a dor é a mais intensa. Isso pode estar relacionado, não a concentração, mas sim aos processos disponíveis tanto hiperalgésicos quanto analgésicos.

Um outro mecanismo que pode envolver a nNOS com o desenvolvimento da dor neuropática é a relação com os processos de degeneração neuronal pós lesão nervosa. Kim (2011) observou que em ratos com ligadura do nervo espinhal L5, houve aumento da imunorreatividade da nNOS no nervo ciático ipsilateral, principalmente nas células de Schwann.

Durante a degeneração Walleriana após lesão nervosa, as células de Schwann que envolvem os axônios em degeneração sofrem alterações reativas, começam a fagocitar restos de mielina e sintetizar várias moléculas biológicas (MATSUOKA; MEYER; THOENEN, 1991; MURWANI; HODGKINSON; ARMATI, 1996; SHAMASH; REICHERT; ROTSHENKER, 2002).

A ativação da nNOS durante a degeneração Walleriana pode resultar da ação de quimiocinas sobre as células de Schwann, levando à modulação da expressão de nNOS por meio de uma via de transcrição, como a de c-Jun N-terminal quinase ou p38 quinase, ou aumento da síntese de moléculas biológicas nessas células após lesão nervosa (OH et al., 2001; SCHOLZ; WOOLF, 2007). A degeneração Walleriana é um processo autodestrutivo frequentemente relacionado com a dor neuropática (SHAMASH; REICHERT; ROTSHENKER, 2002) em que o NO derivado da nNOS está contribuindo com o mecanismo da neuropatia (KIM et al., 2011).

Apesar de todo o envolvimento de nNOS com o processo de desenvolvimento e manutenção da dor neuropática, é importante ressaltar que inicialmente há um dano no nervo que gera inflamação (TRACEY; WALKER, 1995). Cunha (2010) mostrou a importância da nNOS produzindo NO e ativando GCs/GMPc/PKG/K_{ATP} para gerar analgesia. Assim, hipotetizamos que essa via e outros tipos de canais para potássio, que não necessariamente estariam envolvidos com essa via, também poderiam ser importantes na modulação da dor neuropática.

A inibição da guanilato ciclase solúvel (GC), mostra que tanto na fase de indução como na neuropatia já consolidada há redução do limiar nociceptivo e, portanto, a ativação da GC está relacionada com a analgesia. Tal fato provavelmente está associado com o mecanismo analgésico periférico mostrado por Ferreira (1991), em que a liberação de NO ativa a forma solúvel dessa enzima, que foi designada como receptor fisiológico de NO (FURUYAMA; INAGAKI; TAKAGI, 1993).

Nossos resultados mostram que durante a indução, o funcionamento da via NO/GC/GMPc parece funcionar como na dor inflamatória, assim como mostrado por Ferreira (1991) e Cunha (2010). No entanto, Cunha (2010) relata que nNOS é a responsável pela produção de NO que ativa a GC e causa analgesia. Já, nossos resultados mostram que nNOS tem papel hiperalgésico na dor neuropática já consolidada. Esse fato pode estar relacionado com a redução dos K_{ATP} na pata, onde foi feita a inibição da GC, que fazem parte e têm papel primordial na atividade analgésica. Além disso, como já foi relatado, a nNOS tem papel importante em outros mecanismos que contribuem para manutenção da dor neuropática e que acabam sobressaindo sobre o processo analgésico que está reduzido pela diminuição de K_{ATP}.

Rodrigues e Duarte (2000) mostraram que a atividade analgésica da via NOS/NO/GC/GMPc estaria associada aos canais para potássio. Além disso, estudaram os efeitos analgésicos da morfina na estimulação da dor pela injeção subcutânea de carragenina, o que seria um tratamento exógeno para a dor inflamatória. Enquanto, o presente trabalho, revela que mesmo sem a aplicação de uma substância exógena, o sistema endógeno já está em atividade diante de uma lesão, e pronto para ser estimulado para o tratamento da dor neuropática que tem se mostrado bem mais complexa de ser tratada do que os outros tipos de dor.

Existem muitos trabalhos mostrando a participação dos canais para potássio na modulação da dor de forma geral. A literatura mostra, que os canais dependentes de voltagem e os sensíveis ao ATP tem papel importante no processo analgésico (ALMEIDA et al., 2017; DE CARVALHO VELOSO et al., 2015; GALDINO et al., 2015; HAYASHI et al., 2016; HIPÓLITO et al., 2015; LI et al., 2019; ROMERO; DUARTE, 2013, 2012).

A dor neuropática pela CNC, parece ser um pouco diferente de acordo com nossos resultados, em que os canais voltagem dependentes (KV) não se mostram efetivos no controle desse tipo de dor. A modulação destes pode ser feita por mTOR, conforme observado por Obara et al. (2011) e não estaria relacionado com a via PI3K/Akt/NOS/NO/GC/GMPc.

Em condições fisiológicas, a corrente iônica gerada pelos canais para potássio voltagem dependentes (KV) dificultam a geração do potencial de ação e a despolarização da membrana celular, tal ação geralmente inibe a excitabilidade de neurônios sensitivos e promoveria analgesia (TSANTOULAS, 2015). Contudo, nossos resultados mostram que KV não teve ação em nenhum dos dias testados, o que indica que esse canal não participou da modulação. A não participação no 6º dia pode estar relacionada com o fato proposto por Linley et al., (2008), em que, a ação de mediadores inflamatórios em condições persistentes, poderiam inibir a condutância de KV. Já no 12º dia a falta de ação pode estar relacionada com o que foi observado por Ishikawa et al., (1999), que através de ensaios de imunorreatividade, relataram que há redução na expressão de KV em neurônios provenientes do DRG de animais axotomizados. Nossos resultados chamam a atenção para que a inatividade de KV pode ser mais um mecanismo importante na manutenção da dor neuropática.

Enquanto, os canais para potássio voltagem dependentes não tem variação significativa do limiar quando bloqueados, o canal para potássio de baixa condutância ativado por cálcio (SK) revelou uma redução do limiar quando bloqueados no sexto dia, sendo então, importante para o controle analgésico, no desenvolvimento da neuropatia. Já foi observado, *in vitro*, que ao se adicionar um ativador para SK em culturas de neurônios há inibição da atividade destes (BAHIA et al., 2005) e que ao se bloquear esses canais há aumento da resposta neuronal (PAGADALA et al., 2013). Desta forma, SK estaria regulando a excitabilidade neural e assim seria responsável pela resposta analgésica encontrada.

No décimo segundo dia os resultados mostram o fim da analgesia por SK, já que não houve variação significativa do limiar, revelando que possivelmente não exerce controle sobre a dor crônica e poderia estar relacionada apenas com a dor inflamatória. Esses canais são ativados por um aumento no nível de cálcio intracelular, como ocorre durante um potencial de ação. Sua ativação causa hiperpolarização da membrana, o que inibe o disparo das células e limita a frequência de disparo dos potenciais de ação repetitivos. O aumento do cálcio intracelular evocado pelo disparo do potencial de ação decai lentamente, permitindo que a ativação de SK gere uma hiperpolarização de longa duração denominada pós-hiperpolarização lenta (BOND; MAYLIE; ADELMAN, 1999).

Essa hiperpolarização lenta é uma ação protetiva contra disparos de potenciais de ação repetitivos, como os que podem ocorrer durante as neuropatias (BOETTGER et al., 2002; BOND; MAYLIE; ADELMAN, 1999). No entanto, Boettger et al., (2002) observou uma redução do transporte axonal e da expressão de SK em corpos de neurônios após uma lesão neuronal crônica, o que pode explicar a perda da modulação exercida por esse canal durante a dor neuropática consolidada.

Já o bloqueio dos canais para potássio de alta condutância ativados por cálcio (BK) não tem alteração significativa no sexto dia, mas o bloqueio deste canal no dia 12 pós cirúrgico, revelou aumento do limiar indicando participação em processos hiperalgésicos. Em situação fisiológica, BK está envolvido com o controle da geração do potencial de ação e não estaria envolvido com processos hiperalgésicos (HIRONO et al., 2015). No entanto, existe uma característica proeminente de neurônios sensoriais, incluindo os nociceptivos, que é chamada de “*burst firing*” (BF), que se trata de uma descarga intermitente de sequências de potenciais de ação rápidos, que pode influenciar as sensações normais e contribuir para parestesia e dor após uma lesão nervosa (AMIR; MICHAELIS; DEVOR, 2002; KRAHE; GABBIANI, 2004). Jin et al., (2000) mostrou através da técnica de “*cell-attached patch*” em culturas de neurônios, que ao bloquear BK com Iberiotoxina, há inibição do BF, o que indica a importância desse canal para a geração dessa atividade de disparo neuronal que está relacionado inclusive com a geração de impulsos ectópicos (AMIR; MICHAELIS; DEVOR, 2002; GARCIA-LARREA; PEYRON, 2013). É importante ressaltar que, a ativação dos canais para K^+ sensíveis ao cálcio de alta ou baixa condutância, possivelmente, não está relacionado com a via nitrérgica e sim com o aumento do influxo de cálcio em todo processo neuropático (JAGODIC et al., 2008; WEN et al., 2010; YUE et al., 2013).

Cunha et al. (2010), utilizando aplicação de morfina para ativar a via nitrérgica e Alves et al. (2013), promovendo a ativação da via de forma endógena, observaram que os canais para potássio sensíveis ao ATP têm papel importante na modulação da dor inflamatória. No presente trabalho, que avalia dor neuropática, o bloqueio dos canais para potássio sensíveis ao ATP causa redução no limiar indicando importância analgésica durante a indução da neuropatia e dela já consolidada. O mecanismo provavelmente seria o mesmo que Cunha em 2010 mostrou no seu trabalho em que a via NOS/NO/GC/GMPc induziria a abertura dos canais para potássio sensíveis ao ATP e por consequência haveria influxo de íons K^+ o que hiperpolariza o neurônio e dificulta a formação do potencial de ação.

Semelhante ao observado por Cunha et al. (2010) e por Alves et al. (2013) na dor inflamatória, os nossos resultados indicam que também na modulação da dor neuropática os

canais para potássio têm papel importante na analgesia. Além disso nossos resultados acrescentam que, dependendo do tipo de canal e da fase em que o processo neuropático se encontra, esses podem estar relacionados com processos hiperalgésicos, sendo que o K_{ATP} seria o único canal para potássio que demonstra participação analgésica nas duas fases da neuropatia.

Com os resultados deste trabalho podemos concluir que a via PI3K/Akt/NOS//NO/GCs/GMPc/ K_{ATP} possui um papel dual na modulação da dor neuropática em nossas condições. Aparentemente, a inflamação relacionada a lesão neuronal tem papel fundamental na indução da dor neuropática, mas com o desenvolvimento adaptativo diminui e perde importância durante o processo, principalmente na região periférica.

Coincidentemente, com exceção do K_{ATP} no mesencéfalo, há redução de todos os componentes da via estudada especialmente quando a dor neuropática já está consolidada. Nossa análise, permitiu mostrar que a alodinia presente na pata de animais neuropáticos sofre efeitos de modulações periféricas endógenas, mesmo não sendo o foco da lesão e estando longe do sistema nervoso central. Portanto, as alterações devidas as adaptações sofridas durante o processo neuropático afetam tanto a porção central quanto a periférica, e essas mudanças podem ser diferentes como ocorreu com o K_{ATP} que diminuiu na periferia e aumentou no SNC, evidenciando um processo sistêmico diverso e complexo, que pode envolver todo o organismo (Figura 34 - 36).

Concluimos também, que o NO está envolvido na modulação da dor neuropática tanto nos processos de indução e manutenção da dor quanto nos mecanismos analgésicos. No sexto dia, há um aumento da ativação da via e conseqüentemente maior produção de NO. Mesmo com a queda nos níveis de concentração dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) na periferia (pata), os mecanismos que sobressaíram na via PI3K/Akt/NOS//NO/GCs/GMPc/ K_{ATP} foram os analgésicos (Figura 35).

No décimo segundo dia, há uma redução da ativação da via e menor produção de NO, que somado a manutenção nos baixos níveis de concentração dos K_{ATP} na periferia (pata), há uma diferenciação de ação no NO produzido pelas isoformas nNOS e iNOS. Sendo assim, o NO produzido por nNOS tem predominância pelos mecanismos que resultam em dor, enquanto os produzidos por iNOS, tem predominância dos mecanismos analgésicos. Isso pode ocorrer devido às diferenças de locais de produção, de ação e concentração no neurônio que cada isoforma pode proporcionar no interior do neurônio (Figura 36).

E por fim, é possível que os níveis altos de canais para potássio sensíveis ao ATP no sistema nervoso central durante a dor neuropática já consolidada evidencie uma possibilidade de tratamento de forma direta, sem passar pelas dualidades da via estudada.

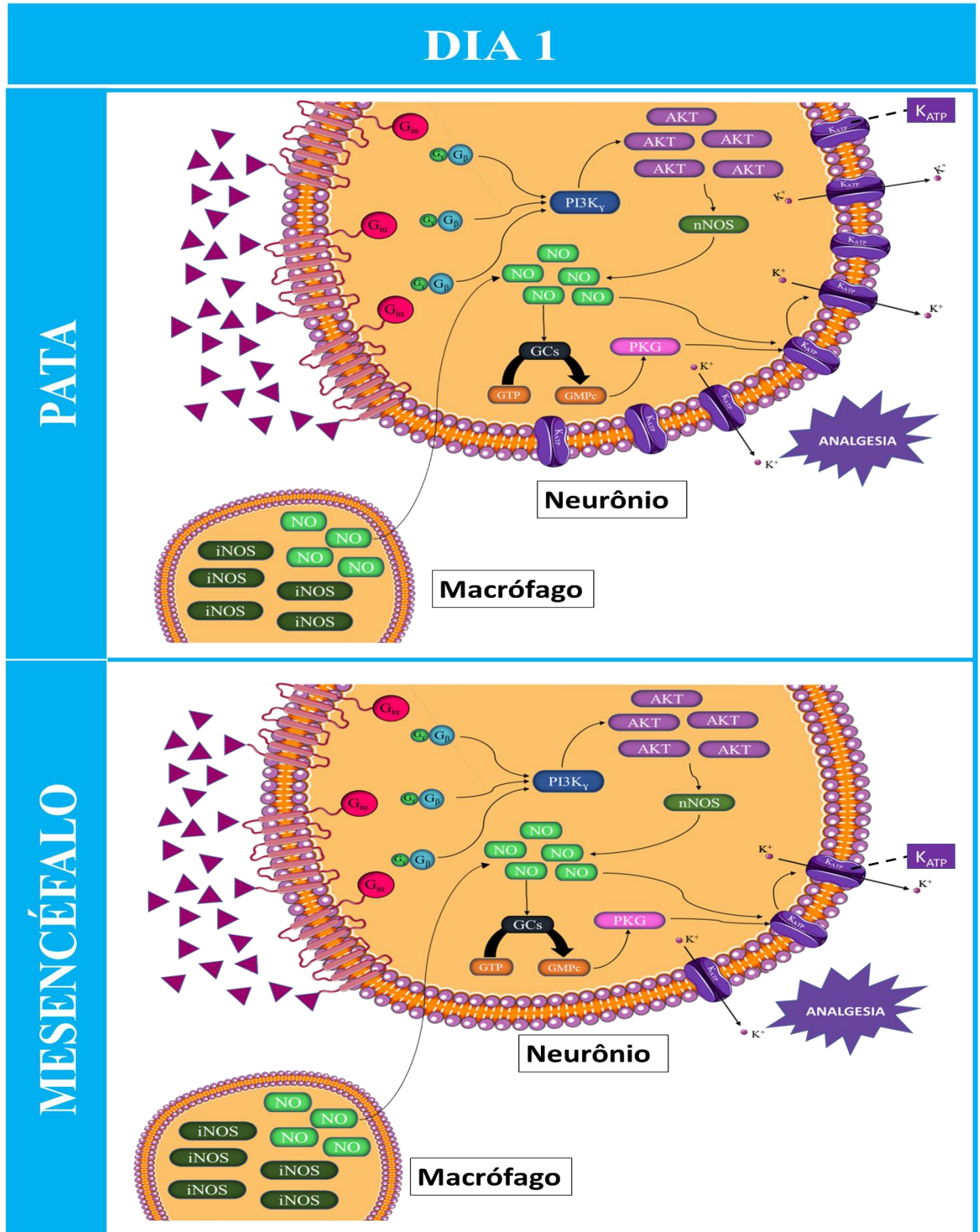
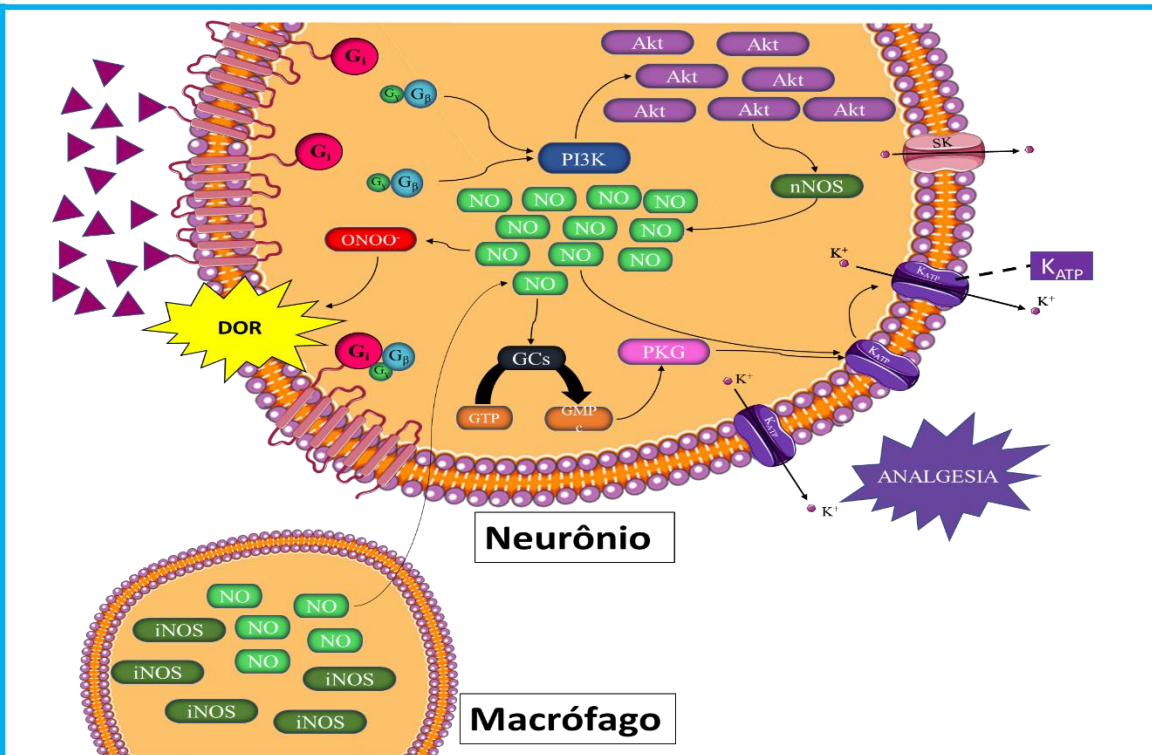


Figura 34: Representação esquemática dos supostos mecanismos envolvidos na via PI3K/Akt/NOS/NO/GC/GMPc/K_{ATP} um dia após constrição do nervo ciático.

No primeiro dia, há aumento na concentração de Akt, iNOS, K_{ATP} e de NO na pata, enquanto no mesencéfalo só não há aumento de K_{ATP} que se mantém nos níveis de animais saudáveis (grupo NAIVE). Neste momento a neuropatia está em um pico de hipoalgesia.

DIA 6

PATA



MESENCEFALO

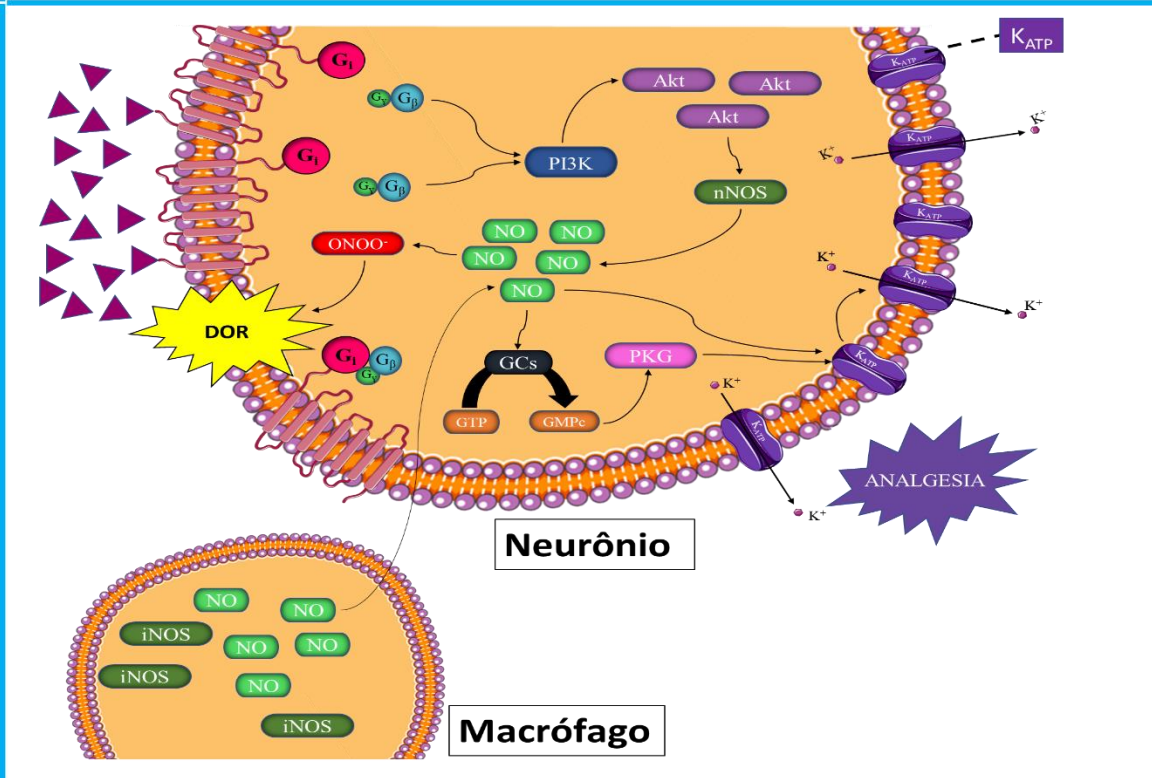


Figura 35: Representação esquemática dos supostos mecanismos envolvidos na via PI3K/Akt/NOS/NO/GC/GMPc/K_{ATP} seis dias após constrição do nervo ciático.

No sexto dia, há um aumento da ativação da via e consequentemente maior produção de NO. Mesmo com a queda nos níveis de concentração dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) na periferia (pata), os mecanismos que sobressaíram na via nitrérgica foram os analgésicos. Também está representado na figura o canal para potássio ativado por cálcio de baixa condutância (SK), que neste momento se mostrou modular a dor neuropática de forma analgésica.

DIA 12

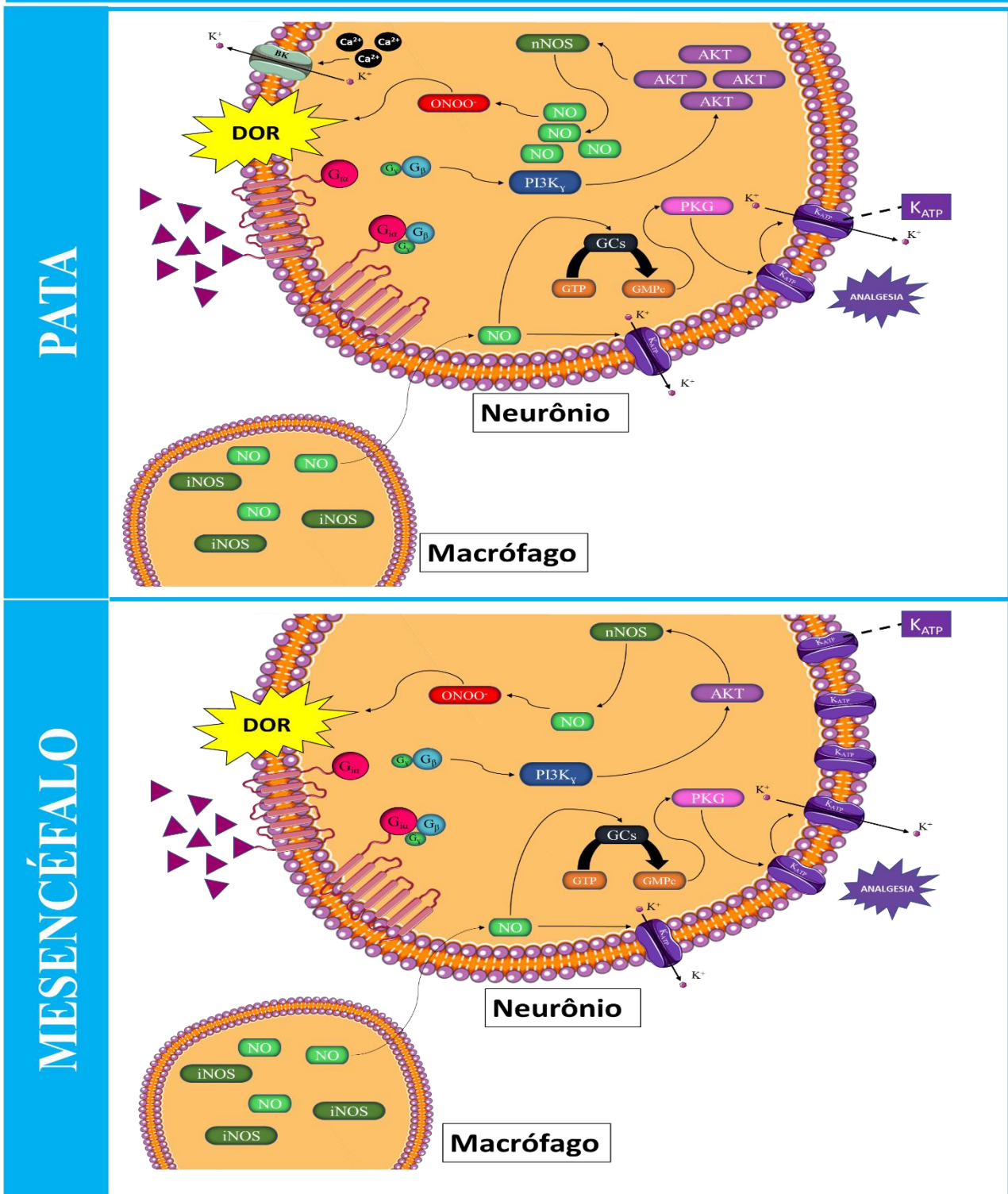


Figura 36: Representação esquemática dos supostos mecanismos envolvidos na via PI3K/Akt/NOS/NO/GC/GMPc/K_{ATP} doze dias após constrição do nervo ciático.

No décimo segundo dia, há uma redução da ativação da via e menor produção de NO. Com a manutenção nos baixos níveis de concentração dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) na periferia (pata), há uma diferenciação de ação no NO produzido pelas isoformas nNOS e iNOS. Nossos resultados mostram que o NO produzido por nNOS tem predominância pelos mecanismos que resultam em dor, enquanto os produzidos por iNOS, tem predominância dos mecanismos analgésicos. Isso pode ocorrer devido à diferenças de locais de produção, locais de ação e concentração no neurônio. Também está representado na figura o canal para potássio ativado por cálcio de alta condutância (BK), que neste momento se mostrou modular a dor neuropática de forma hiperalérgica.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. T.; GALDINO, G.; PEREZ, A. C.; SILVA, G.; ROMERO, T. R.; DUARTE, Igor Dimitri. St36 electroacupuncture activates nNOS, iNOS and ATP-sensitive potassium channels to promote orofacial antinociception in rats. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 27–33, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28456767>.
- ALP, Nicholas J.; MUSSA, Shafi; KHOO, Jeffrey; CAI, Shijie; GUZIK, Tomasz; JEFFERSON, Andrew; GOH, Nicky; ROCKETT, Kirk A.; CHANNON, Keith M. Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression. **The Journal of clinical investigation**, [S. l.], v. 112, n. 5, p. 725–35, 2003. DOI: 10.1172/JCI17786. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12952921>.
- ALVES, Daniela P.; DA MOTTA, Patrícia G.; ROMERO, Thiago R. L.; KLEIN, André; DUARTE, Igor D. G. NO/cGMP production is important for the endogenous peripheral control of hyperalgesia during inflammation. **Nitric Oxide**, [S. l.], v. 28, p. 8–13, 2013. DOI: 10.1016/j.niox.2012.09.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2012.09.001>.
- AMIR, Ron; MICHAELIS, Martin; DEVOR, Marshall. Burst discharge in primary sensory neurons: triggered by subthreshold oscillations, maintained by depolarizing afterpotentials. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 1187–98, 2002. DOI: 10.1523/jneurosci.22-03-01187.2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11826148>.
- ATROSHI, Isam; GUMMESSON, Christina; JOHNSON, Ragnar; MCCABE, Steven J.; ORNSTEIN, Ewald. Severe carpal tunnel syndrome potentially needing surgical treatment in a general population. **The Journal of hand surgery**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 639–44, 2003. DOI: 10.1016/s0363-5023(03)00148-5. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12877853>.
- BACKONJA, Misha-Miroslav. Defining neuropathic pain. **Anesthesia and analgesia**, [S. l.], v. 97, n. 3, p. 785–90, 2003. DOI: 10.1213/01.ane.0000062826.70846.8d. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12933403>.
- BAHIA, Parmvir K.; SUZUKI, Rie; BENTON, David C. H.; JOWETT, Amanda J.; CHEN, Mao Xiang; TREZISE, Derek J.; DICKENSON, Anthony H.; MOSS, Guy W. J. A functional role for small-conductance calcium-activated potassium channels in sensory pathways including nociceptive processes. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 25, n. 14, p. 3489–98, 2005. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0597-05.2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814779>.
- BARBARO, Nicholas M.; HAMMOND, Donna L.; FIELDS, Howard L. Effects of intrathecally administered methysergide and yohimbine on microstimulation-produced antinociception in the rat. **Brain Research**, [S. l.], v. 343, n. 2, p. 223–229, 1985. DOI: 10.1016/0006-8993(85)90738-3.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual Review of Neuroscience**, [S. l.], v. VOL. 7, p. 309–338, 1984. DOI: 10.1146/annurev.ne.07.030184.001521.
- BENNETT, Gary J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 87–107, 1988. DOI:

10.1016/0304-3959(88)90209-6. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6).

BENNETT, Michael. The LANSS Pain Scale: the Leeds assessment of neuropathic symptoms and signs. **Pain**, [S. l.], v. 92, n. 1–2, p. 147–57, 2001. DOI: 10.1016/s0304-3959(00)00482-6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11323136>.

BIANCHI, Mauro; SOTGIU, Maria Luisa; MANFREDI, Barbara; SACERDOTE, Paola. Peripheral mononeuropathy affects hypothalamic and splenocyte beta-endorphin levels but not immune function in the rat. **Brain research bulletin**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 269–72, 1996. DOI: 10.1016/0361-9230(96)00051-2. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8842411>.

BOETTGER, M. K. et al. Calcium-activated potassium channel SK1- and IK1-like immunoreactivity in injured human sensory neurones and its regulation by neurotrophic factors. **Brain: a journal of neurology**, [S. l.], v. 125, n. Pt 2, p. 252–63, 2002. DOI: 10.1093/brain/awf026. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11844726>.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, [S. l.], v. 2, n. 10, p. 907–16, 2001. DOI: 10.1038/ni1001-907. Disponível em: <http://www.nature.com/ni/journal/v2/n10/abs/ni1001-907.html%0Apapers3://publication/uuid/07B0E5D9-42E7-4B68-A95C-E820803D435F>.

BOND, Chris T.; MAYLIE, James; ADELMAN, John P. Small-conductance calcium-activated potassium channels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 868, p. 370–8, 1999. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb11298.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10414306>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, [S. l.], v. 72, p. 248–54, 1976. DOI: 10.1006/abio.1976.9999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.

BURGESS, P. R.; PERL, E. R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **The Journal of Physiology**, [S. l.], v. 190, n. 3, p. 541–562, 1967. DOI: 10.1113/jphysiol.1967.sp008227. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1967.sp008227>.

CAMPBELL, James N.; MEYER, Richard A. Mechanisms of neuropathic pain. **Neuron**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 77–92, 2006. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.09.021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015228>.

CARR, Daniel B.; FOX, Daniel M.; ROTHSTEIN, Mark A.; SPELLMAN, Christina M. Pain Management and Public Health: Introduction to the Special Section. **American journal of public health**, [S. l.], v. 109, n. 1, p. 17–18, 2019. DOI: 10.2105/AJPH.2018.304841. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32941764>.

CHACHLAKI, Konstantina; PREVOT, Vincent. Nitric oxide signalling in the brain and its control of bodily functions. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 177, n. 24, p. 5437–5458, 2020. DOI: 10.1111/bph.14800. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31347144>.

CHANNON, Keith M.; GUZIK, T. J. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, [S. l.], v. 53, n. 4 Pt 1, p. 515–24, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12512689>.

CHEN, Y.; MESTEK, A.; LIU, J.; HURLEY, J. A.; YU, L. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. **Molecular pharmacology**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 8–12,

1993. a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8393525>.
- CHEN, Y.; MESTEK, A.; LIU, J.; YU, L. Molecular cloning of a rat κ opioid receptor reveals sequence similarities to the μ and δ opioid receptors. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 295, n. 3, p. 625–628, 1993. b. DOI: 10.1042/bj2950625. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article/295/3/625/84995/Molecular-cloning-of-a-rat-kappa-opioid-receptor>.
- CHENG, H. T.; SUZUKI, M.; HEGARTY, D. M.; XU, Q.; WEYERBACHER, A. R.; SOUTH, S. M.; OHATA, M.; INTURRISI, C. E. Inflammatory pain-induced signaling events following a conditional deletion of the N-methyl-D-aspartate receptor in spinal cord dorsal horn. **Neuroscience**, [S. l.], v. 155, n. 3, p. 948–58, 2008. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.024. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18621103>.
- CHRISTOPH, Thomas et al. Investigation of TRPV1 loss-of-function phenotypes in transgenic shRNA expressing and knockout mice. **Molecular and cellular neurosciences**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 579–89, 2008. DOI: 10.1016/j.mcn.2007.12.006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18249134>.
- CLANCY, Robert M.; AMIN, Ashok R.; ABRAMSON, Steven B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. **Arthritis and rheumatism**, [S. l.], v. 41, n. 7, p. 1141–51, 1998. DOI: 10.1002/1529-0131(199807)41:7<1141::AID-ART2>3.0.CO;2-S. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9663469>.
- COLEMAN, John W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International immunopharmacology**, [S. l.], v. 1, n. 8, p. 1397–406, 2001. DOI: 10.1016/s1567-5769(01)00086-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11515807>.
- COSTIGAN, Michael; SCHOLZ, Joachim; WOOLF, Clifford J. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. **Annual Review of Neuroscience**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 1–32, 2009. DOI: 10.1146/annurev.neuro.051508.135531. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.051508.135531>.
- CRIADO, Ana. **Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2009. v. 44 DOI: 10.17226/12526. Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog/12526>.
- CUNHA, T. M. et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 107, n. 9, p. 4442–4447, 2010. DOI: 10.1073/pnas.0914733107.
- CURY, Yara; PICOLO, Gisele; GUTIERREZ, Vanessa Pacciari; FERREIRA, Sergio Henrique. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric oxide : biology and chemistry**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 243–54, 2011. DOI: 10.1016/j.niox.2011.06.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2011.06.004>.
- DE CARVALHO VELOSO, Clarice; RODRIGUES, Vanessa Gregório; FERREIRA, Renata Cristina Mendes; DUARTE, Lucienir Pains; KLEIN, Andre; DUARTE, Igor Dimitri; ROMERO, Thiago Roberto Lima; DE CASTRO PEREZ, Andrea. Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to NO/cGMP and ATP-sensitive K(+) channels pathway activation in mice. **European journal of pharmacology**, [S. l.], v. 755, p. 1–5, 2015. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.02.038. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.02.038>.
- DEVOR, Marshall. Centralization, central sensitization and neuropathic pain. Focus on “sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons”. **Journal of neurophysiology**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 522–3, 2006. DOI: 10.1152/jn.00365.2006. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16835360>.

DOS SANTOS, Rafael G.; OSÓRIO, Flávia L.; CRIPPA, José Alexandre S.; HALLAK, Jaime E. C. Antidepressive and anxiolytic effects of ayahuasca: A systematic literature review of animal and human studies. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 65–72, 2016. DOI: 10.1590/1516-4446-2015-1701.

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**, [S. l.], v. 186, n. 2–3, p. 289–293, 1990. DOI: 10.1016/0014-2999(90)90446-D.

DUCREUX, Denis; ATTAL, Nadine; PARKER, Fabrice; BOUHASSIRA, Didier. Mechanisms of central neuropathic pain: a combined psychophysical and fMRI study in syringomyelia. **Brain**, [S. l.], v. 129, n. 4, p. 963–976, 2006. DOI: 10.1093/brain/awl016. Disponível em: <http://academic.oup.com/brain/article/129/4/963/371173/Mechanisms-of-central-neuropathic-pain-a-combined>.

DWORKIN, Robert H. et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Archives of neurology**, [S. l.], v. 60, n. 11, p. 1524–34, 2003. DOI: 10.1001/archneur.60.11.1524. Disponível em: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneur.60.11.1524>.

ELDABE, Sam et al. Dorsal Root Ganglion (DRG) Stimulation in the Treatment of Phantom Limb Pain (PLP). **Neuromodulation: Technology at the Neural Interface**, [S. l.], v. 18, n. 7, p. 610–617, 2015. DOI: 10.1111/ner.12338. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/ner.12338>.

ESPLUGUES, Juan V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 135, n. 5, p. 1079–95, 2002. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704569. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11877313>.

EVANS, C.; KEITH, D.; MORRISON, Heather; MAGENDZO, Karin; EDWARDS, R. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. **Science**, [S. l.], v. 258, n. 5090, p. 1952–1955, 1992. DOI: 10.1126/science.1335167. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1335167>.

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**, [S. l.], v. 201, n. 1, p. 121–2, 1991. DOI: 10.1016/0014-2999(91)90333-I. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1665419>.

FREIRE, Marco Aurélio M.; GUIMARÃES, Joilson S.; LEAL, Wallace Gomes; PEREIRA, Antonio. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. **Frontiers in neuroscience**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 175–81, 2009. DOI: 10.3389/neuro.01.024.2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20011139>.

FU, Yu; HAN, Jeong; ISHOLA, Titilope; SCERBO, Michelle; ADWANIKAR, Hita; RAMSEY, Cara; NEUGEBAUER, Volker. PKA and ERK, but not PKC, in the amygdala contribute to pain-related synaptic plasticity and behavior. **Molecular pain**, [S. l.], v. 4, p. 26, 2008. DOI: 10.1186/1744-8069-4-26. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18631385>.

FUKUDA, Kazuhiko; KATO, Shigehisa; MORI, Kenjiro; NISHI, Miyuki; TAKESHIMA, Hiroshi. Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor δ - and μ -subtypes. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 327, n. 3, p. 311–314, 1993. DOI: 10.1016/0014-5793(93)81011-N. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2893%2981011-N>.

FURUYAMA, T.; INAGAKI, S.; TAKAGI, H. Localizations of alpha 1 and beta 1 subunits of soluble guanylate cyclase in the rat brain. **Brain research. Molecular brain research**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 335–44, 1993. DOI: 10.1016/0169-328x(93)90060-3. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7906852>.

- GALDINO, Giovane S.; XAVIER, Carlos H.; ALMEIDA, Renato; SILVA, Grazielle; FONTES, Marcos A.; MENEZES, Gustavo; DUARTE, Igor D.; PEREZ, Andrea C. The Nitric oxide/CGMP/KATP pathway mediates systemic and central antinociception induced by resistance exercise in rats. **The International journal of neuroscience**, [S. l.], v. 125, n. 10, p. 765–73, 2015. DOI: 10.3109/00207454.2014.970256. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271801>.
- GANTNER, Benjamin N.; LAFOND, Katy M.; BONINI, Marcelo G. Nitric oxide in cellular adaptation and disease. **Redox Biology**, [S. l.], v. 34, n. February, p. 101550, 2020. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101550. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101550>.
- GARCIA-LARREA, Luis; PEYRON, Roland. Pain matrices and neuropathic pain matrices: a review. **Pain**, [S. l.], v. 154 Suppl, n. SUPPL. 1, p. S29–S43, 2013. DOI: 10.1016/j.pain.2013.09.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2013.09.001>.
- GEBHART, G. .. Descending modulation of pain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 27, n. 8, p. 729–737, 2004. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2003.11.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763403001490>.
- GENOVA, Alessia; DIX, Olivia; SAEFAN, Asem; THAKUR, Mala; HASSAN, Abbas. Carpal Tunnel Syndrome: A Review of Literature. **Cureus**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. e7333, 2020. DOI: 10.7759/cureus.7333. Disponível em: <https://www.cureus.com/articles/29112-carpal-tunnel-syndrome-a-review-of-literature>.
- GIVALOIS, Laurent; LI, Songyun; PELLETIER, Georges. Central nitric oxide regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult male rats. **Brain research. Molecular brain research**, [S. l.], v. 102, n. 1–2, p. 1–8, 2002. DOI: 10.1016/s0169-328x(02)00218-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191488>.
- GLADWIN, Mark T. et al. The emerging biology of the nitrite anion. **Nature chemical biology**, [S. l.], v. 1, n. 6, p. 308–14, 2005. DOI: 10.1038/nchembio1105-308. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16408064>.
- GOMES, Francisco Isaac F.; CUNHA, Fernando Q.; CUNHA, Thiago M. Peripheral nitric oxide signaling directly blocks inflammatory pain. **Biochemical pharmacology**, [S. l.], v. 176, p. 113862, 2020. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.113862. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113862>.
- GOTODA, Yumiko; KAMBARA, Noriko; SAKAI, Toshiko; KISHI, Yoshihiko; KODAMA, Ken; KOYAMA, Tetsuo. The morbidity, time course and predictive factors for persistent post-thoracotomy pain. **European journal of pain (London, England)**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 89–96, 2001. DOI: 10.1053/eujp.2001.0225. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11394926>.
- GREEN, Laura C.; WAGNER, David A.; GLOGOWSKI, Joseph; SKIPPER, Paul L.; WISHNOK, John S.; TANNENBAUM, Steven R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, [S. l.], v. 126, n. 1, p. 131–8, 1982. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7181105>.
- GRIFFITH, Owen W.; STUEHR, D. J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. **Annual review of physiology**, [S. l.], v. 57, p. 707–36, 1995. DOI: 10.1146/annurev.ph.57.030195.003423. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7539994>.
- GRYGLEWSKI, Ryszard J.; WOLKOW, Pawel P.; URACZ, Wojciech; JANOWSKA, Ewa; BARTUS, Joanna B.; BALBATUN, Oleg; PATTON, Stephen; BROVKOVYCH, Viktor; MALINSKI, Tadeusz. Protective role of pulmonary nitric oxide in the acute phase of endotoxemia in rats. **Circulation research**, [S. l.], v. 82, n. 7, p. 819–27, 1998. DOI: 10.1161/01.res.82.7.819. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9562442>.

GUHA, Mausumee; MACKMAN, Nigel. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 277, n. 35, p. 32124–32, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M203298200. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M203298200>.

GUZIK, Tomasz J.; WEST, N. E.; BLACK, Edward; MCDONALD, D.; RATNATUNGA, Chandi; PILLAI, Ravi; CHANNON, Keith M. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. **Circulation research**, [S. l.], v. 86, n. 9, p. E85-90, 2000. DOI: 10.1161/01.res.86.9.e85. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807876>.

GUZIK, Tomasz J.; WEST, Nick E. J.; PILLAI, Ravi; TAGGART, David P.; CHANNON, Keith M. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 1088–94, 2002. DOI: 10.1161/01.hyp.0000018041.48432.b5. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052847>.

HAWKINS, P. T.; STEPHENS, L. R. PI3K signalling in inflammation. **Biochimica et biophysica acta**, [S. l.], v. 1851, n. 6, p. 882–97, 2015. DOI: 10.1016/j.bbali.2014.12.006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25514767>.

HAYASHI, Yoshinori et al. BK channels in microglia are required for morphine-induced hyperalgesia. **Nature communications**, [S. l.], v. 7, n. May, p. 11697, 2016. DOI: 10.1038/ncomms11697. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11697>.

HEBA, G.; KRZEMIŃSKI, T.; PORC, M.; GRZYB, J.; DEMBIŃSKA-KIEĆ, A. Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 39–52, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11321512>.

HENDRICH, Jan; VAN MINH, Alexandra Tran; HEBLICH, Fay; NIETO-ROSTRO, Manuela; WATSCHINGER, Katrin; STRIESSNIG, Jörg; WRATTEN, Jack; DAVIES, Anthony; DOLPHIN, Annette C. Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 105, n. 9, p. 3628–33, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0708930105. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/105/9/3628.short>.

HERVERA, Arnau; NEGRETE, Roger; LEÁNEZ, Sergi; MARTÍN-CAMPOS, Jesús; POL, Olga. The role of nitric oxide in the local antiallodynic and antihyperalgesic effects and expression of delta-opioid and cannabinoid-2 receptors during neuropathic pain in mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, [S. l.], v. 334, n. 3, p. 887–96, 2010. DOI: 10.1124/jpet.110.167585. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498253>.

HIPÓLITO, Lucia; FAKIRA, Amanda K.; CABAÑERO, David; BLANDÓN, Rebecca; CARLTON, Susan M.; MORÓN, Jose A.; MELYAN, Zara. In vivo activation of the SK channel in the spinal cord reduces the NMDA receptor antagonist dose needed to produce antinociception in an inflammatory pain model. **Pain**, [S. l.], v. 156, n. 5, p. 849–858, 2015. DOI: 10.1097/j.pain.000000000000124. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25734988>.

HIRONO, Moritoshi; OGAWA, Yasuhiro; MISONO, Kaori; ZOLLINGER, Daniel R.; TRIMMER, James S.; RASBAND, Matthew N.; MISONOU, Hiroaki. BK Channels Localize to the Paranodal Junction and Regulate Action Potentials in Myelinated Axons of Cerebellar Purkinje Cells. **The**

- Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 35, n. 18, p. 7082–94, 2015. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3778-14.2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25948259>.
- HOFFMANN, Tal; SAUER, Susanne K.; HORCH, Raymund E.; REEH, Peter W. Sensory transduction in peripheral nerve axons elicits ectopic action potentials. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 28, n. 24, p. 6281–4, 2008. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1627-08.2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550771>.
- HOSOBUCHI, Y.; ADAMS, J.; LINCHITZ, R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. **Science**, [S. l.], v. 197, n. 4299, p. 183–186, 1977. DOI: 10.1126/science.301658. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.301658>.
- HU, P.; MCLACHLAN, E. M. Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. **Neuroscience**, [S. l.], v. 112, n. 1, p. 23–38, 2002. DOI: 10.1016/s0306-4522(02)00065-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044469>.
- IGNARRO, L. J.; FUKUTO, J. M.; GRISCAVAGE, J. M.; ROGERS, N. E.; BYRNS, R. E. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 90, n. 17, p. 8103–7, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.17.8103. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7690141>.
- IGNARRO, Louis J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, [S. l.], v. 53, n. 4 Pt 1, p. 503–14, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12512688>.
- ISCHIROPOULOS, Harry; AL-MEHDI, A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS letters**, [S. l.], v. 364, n. 3, p. 279–82, 1995. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00307-u. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7758583>.
- ISHIKAWA, Kuniko; TANAKA, Masaki; BLACK, Joel A.; WAXMAN, Stephen G. Changes in expression of voltage-gated potassium channels in dorsal root ganglion neurons following axotomy. **Muscle & nerve**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 502–7, 1999. DOI: 10.1002/(sici)1097-4598(199904)22:4<502::aid-mus12>3.0.co;2-k. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10204786>.
- IWATA, Hideaki; TAKASUSUKI, Toshifumi; YAMAGUCHI, Shigeki; HORI, Yuuichi. NMDA receptor 2B subunit-mediated synaptic transmission in the superficial dorsal horn of peripheral nerve-injured neuropathic mice. **Brain research**, [S. l.], v. 1135, n. 1, p. 92–101, 2007. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.12.014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17198690>.
- JAGODIC, Miljen M.; PATHIRATHNA, Sriyani; JOKSOVIC, Pavle M.; LEE, Wooyong; NELSON, Michael T.; NAIK, Ajit K.; SU, Peihan; JEVTOVIC-TODOROVIC, Vesna; TODOROVIC, Slobodan M. Upregulation of the T-type calcium current in small rat sensory neurons after chronic constrictive injury of the sciatic nerve. **Journal of neurophysiology**, [S. l.], v. 99, n. 6, p. 3151–6, 2008. DOI: 10.1152/jn.01031.2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417624>.
- JENSEN, Troels Staehelin; GOTTRUP, Hanne; SINDRUP, Soren Hein; BACH, Flemming Winther. The clinical picture of neuropathic pain. **European journal of pharmacology**, [S. l.], v. 429, n. 1–3, p. 1–11, 2001. DOI: 10.1016/s0014-2999(01)01302-4. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698022>.

Jl, Ru-Rong; KOHNO, Tatsuro; MOORE, Kimberly A.; WOOLF, Clifford J. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? **Trends in neurosciences**, [S. l.], v. 26, n. 12, p. 696–705, 2003. DOI: 10.1016/j.tins.2003.09.017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14624855>.

JIANG, Bao-Chun; LIU, Tong; GAO, Yong-Jing. Chemokines in chronic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. **Pharmacology & therapeutics**, [S. l.], v. 212, p. 107581, 2020. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107581. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107581>.

JIN, Wen; SUGAYA, A.; TSUDA, Tadashi; OHGUCHI, Hiromi; SUGAYA, Eiichi. Relationship between large conductance calcium-activated potassium channel and bursting activity. **Brain research**, [S. l.], v. 860, n. 1–2, p. 21–8, 2000. DOI: 10.1016/s0006-8993(00)01943-0. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727620>.

JIN, Yuepeng et al. Involvement of the PI3K/Akt/NF-κB Signaling Pathway in the Attenuation of Severe Acute Pancreatitis-Associated Acute Lung Injury by Sedum sarmentosum Bunge Extract. **BioMed research international**, [S. l.], v. 2017, p. 9698410, 2017. DOI: 10.1155/2017/9698410. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29359164>.

JULIUS, David; BASBAUM, Allan I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, [S. l.], v. 413, n. 6852, p. 203–210, 2001. DOI: 10.1038/35093019. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781420004557/chapters/10.1201/b14255-2>.

KANDASAMY, Ram; PRICE, Theodore J. The Pharmacology of Nociceptor Priming. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l: s.n.]. v. 227p. 15–37. DOI: 10.1007/978-3-662-46450-2_2. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-46450-2_2.

KANO, T.; SHIMIZU-SASAMATA, M.; HUANG, P. L.; MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H. Effects of nitric oxide synthase gene knockout on neurotransmitter release in vivo. **Neuroscience**, [S. l.], v. 86, n. 3, p. 695–9, 1998. DOI: 10.1016/s0306-4522(98)00179-1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9692709>.

KAWANO, Takashi et al. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. **Molecular pain**, [S. l.], v. 5, p. 12, 2009. DOI: 10.1186/1744-8069-5-12. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19284878>.

KIEFFER, B. L.; BEFORT, K.; GAVERIAUX-RUFF, C.; HIRTH, C. G. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 89, n. 24, p. 12048–12052, 1992. DOI: 10.1073/pnas.89.24.12048. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.89.24.12048>.

KIM, K. H.; KIM, J. I.; HAN, J. A.; CHOE, M. A.; AHN, J. H. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in the periphery promotes pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. **Neuroscience**, [S. l.], v. 190, p. 367–78, 2011. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.05.064. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.064>.

KNOWLES, R. G.; PALACIOS, M.; PALMER, R. M. J.; 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 of the United States of America**, [S. l.], v. 86, n. 13, p. 5159–62, 1989. DOI: 10.1073/pnas.86.13.5159. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2567995>.

KOIKE, Haruki; IJIMA, Masahiro; SUGIURA, Makoto; MORI, Keiko; HATTORI, Naoki; ITO, Hiroki; HIRAYAMA, Masaaki; SOBUE, Gen. Alcoholic neuropathy is clinicopathologically distinct from thiamine-deficiency neuropathy. **Annals of neurology**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 19–29, 2003. DOI:

10.1002/ana.10550. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.10550>.

KOPF, Andreas; PATEL, Nilesh B. Guide to Pain Management in Low-Resource Settings. **IASP Press**, [S. l.], n. January 2010, p. 1–384, 2010. Disponível em: [papers2://publication/uuid/C6AF8061-CDFC-4664-92EE-549338C9A317](https://publication/uuid/C6AF8061-CDFC-4664-92EE-549338C9A317).

KOSEK, Eva; COHEN, Milton; BARON, Ralf; GEBHART, Gerald F.; MICO, Juan-Antonio; RICE, Andrew S. C.; RIEF, Winfried; SLUKA, A. Kathleen. Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? **PAIN**, [S. l.], v. 157, n. 7, p. 1382–1386, 2016. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000507. Disponível em: <http://journals.lww.com/00006396-201607000-00003>.

KOUROSH-ARAMI, Masoumeh; HOSSEINI, Nasrin; MOHSENZADEGAN, Monireh; KOMAKI, Alireza; JOGHATAEI, Mohammad Taghi. Neurophysiologic implications of neuronal nitric oxide synthase. **Reviews in the neurosciences**, [S. l.], v. 31, n. 6, p. 617–636, 2020. DOI: 10.1515/revneuro-2019-0111. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32739909>.

KRAHE, Rüdiger; GABBIANI, Fabrizio. Burst firing in sensory systems. **Nature reviews. Neuroscience**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 13–23, 2004. DOI: 10.1038/nrn1296. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661065>.

KRAYCHETE, Durval Campos; GOZZANI, Judymara Lauzi; KRAYCHETE, Angiolina Campos. Dor neuropática: aspectos neuroquímicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, [S. l.], v. 58, n. 5, p. 492–505, 2008. DOI: 10.1590/S0034-70942008000500008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-70942008000500008&lng=pt&nrm=iso&tIng=pt.

KUFFLER, Damien P. Injury-Induced Effectors of Neuropathic Pain. **Molecular neurobiology**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 51–66, 2020. DOI: 10.1007/s12035-019-01756-w. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31701439>.

LALA, P. K. Significance of nitric oxide in carcinogenesis, tumor progression and cancer therapy. **Cancer metastasis reviews**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–6, 1998. DOI: 10.1023/a:1005963400984. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9544419>.

LEVY, Dan; ZOCHODNE, Douglas W. NO Pain: Potential Roles of Nitric Oxide in Neuropathic Pain. **Pain Practice**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 11–18, 2004. DOI: 10.1111/j.1533-2500.2004.04002.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1533-2500.2004.04002.x>.

LI, Bin; XI, Panpan; WANG, Zhenglei; HAN, Xiangan; XU, Yuanyuan; ZHANG, Yuanshu; MIAO, Jinfeng. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway participates in Streptococcus uberis-induced inflammation in mammary epithelial cells in concert with the classical TLRs/NF-κB pathway. **Veterinary microbiology**, [S. l.], v. 227, p. 103–111, 2018. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.10.031. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30473339>.

LI, Chun Ying; SONG, Yan Hua; HIGUERA, Emiliano S.; LUO, Z. David. Spinal dorsal horn calcium channel $\alpha 2\delta$ -1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 24, n. 39, p. 8494–8499, 2004. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2982-04.2004.

LI, S.; ZHU, J.; CHEN, C.; CHEN, Y. W.; DERIEL, J. K.; ASHBY, B.; LIU-CHEN, L. Y. Molecular cloning and expression of a rat κ opioid receptor. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 295, n. 3, p. 629–633, 1993. DOI: 10.1042/bj2950629. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article/295/3/629/85030/Molecular-cloning-and-expression-of-a-rat-k-opioid>.

LI, Yongfeng et al. Cannabinoids-induced peripheral analgesia depends on activation of BK channels. **Brain research**, [S. l.], v. 1711, p. 23–28, 2019. DOI: 10.1016/j.brainres.2019.01.007.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.01.007>.

LIMA, Deolinda. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. **Progress in Neurobiology**, [S. l.], v. 66, n. 2, p. 81–108, 2002. DOI: 10.1016/S0301-0082(01)00025-9. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008201000259>.

LIN, Binbin; WANG, Yuting; ZHANG, Piao; YUAN, Yanyan; ZHANG, Ying; CHEN, Gang. Gut microbiota regulates neuropathic pain: potential mechanisms and therapeutic strategy. **The journal of headache and pain**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 103, 2020. DOI: 10.1186/s10194-020-01170-x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32807072>.

LINLEY, John E.; ROSE, Kirstin; PATIL, Mayur; ROBERTSON, Brian; AKOPIAN, Armen N.; GAMPER, Nikita. Inhibition of M current in sensory neurons by exogenous proteases: a signaling pathway mediating inflammatory nociception. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 28, n. 44, p. 11240–9, 2008. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2297-08.2008. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18971466>.

LIU, Wei; LV, Yanling; REN, Facheng. PI3K/Akt Pathway is Required for Spinal Central Sensitization in Neuropathic Pain. **Cellular and molecular neurobiology**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 747–755, 2018. DOI: 10.1007/s10571-017-0541-x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28849293>.

LIU, Xianzeng; ZHOU, Jun Li; CHUNG, K.; CHUNG, Jin Mo. Ion channels associated with the ectopic discharges generated after segmental spinal nerve injury in the rat. **Brain research**, [S. l.], v. 900, n. 1, p. 119–27, 2001. DOI: 10.1016/S0006-8993(01)02274-0. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325354>.

LUGNIER, C.; KERAUIS, T.; ECKLY-MICHEL, A. Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 639–52, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639014>.

LUNDBERG, Jon O. et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. **Nature chemical biology**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. 865–9, 2009. DOI: 10.1038/nchembio.260. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915529>.

LUO, Z. D.; CIZKOVA, D. The role of nitric oxide in nociception. **Current review of pain**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 459–66, 2000. DOI: 10.1007/s11916-000-0070-y. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060592?dopt=Abstract>.

MACHADO, Daniel Portela Dias. **Participação dos sistemas endógenos opioide e canabinoide na modulação da dor neuropática por constrição do nervo ciático**. 2016. Universidade Federal de Minas Gerais, [S. l.], 2016.

MACIVER, K.; LLOYD, D. M.; KELLY, S.; ROBERTS, N.; NURMIKKO, T. Phantom limb pain, cortical reorganization and the therapeutic effect of mental imagery. **Brain**, [S. l.], v. 131, n. 8, p. 2181–2191, 2008. DOI: 10.1093/brain/awn124. Disponível em: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awn124>.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual review of immunology**, [S. l.], v. 15, p. 323–50, 1997. DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143691>.

MACRAE, W. A. Chronic pain after surgery. **British journal of anaesthesia**, [S. l.], v. 87, n. 1, p. 88–98, 2001. DOI: 10.1093/bja/87.1.88. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007091217363468>.

- MARCHETTINI, P.; LACERENZA, M.; MAURI, E.; MARANGONI, C. Painful peripheral neuropathies. **Current neuropharmacology**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 175–81, 2006. DOI: 10.2174/157015906778019536. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18615140>.
- MARCINKIEWICZ, Janusz. Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. **Immunopharmacology**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 35–41, 1997. DOI: 10.1016/s0162-3109(96)00168-3. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285242>.
- MATSUNO, Ryozi; ARAMAKI, Yukihiko; ARIMA, Hidetoshi; ADACHI, Yoshiyuki; OHNO, Naohito; YADOMAE, Toshiro; TSUCHIYA, Seishi. Contribution of CR3 to nitric oxide production from macrophages stimulated with high-dose of LPS. **Biochemical and biophysical research communications**, [S. l.], v. 244, n. 1, p. 115–9, 1998. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8231. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9514898>.
- MATSUOKA, I.; MEYER, M.; THOENEN, H. Cell-type-specific regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in non-neuronal cells: comparison of Schwann cells with other cell types. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 3165–77, 1991. DOI: 10.1523/jneurosci.11-10-03165.1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1658245>.
- MAVES, Timothy J.; PECHMAN, Patty S.; GEBHART, G. F.; MELLER, Stephen T. Possible chemical contribution from chromic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 57–69, 1993. DOI: 10.1016/0304-3959(93)90100-4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8378104>.
- MCALLISTER, Sean D.; GLASS, Michelle. CB1 and CB2 receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, [S. l.], v. 66, n. 2–3, p. 161–171, 2002. DOI: 10.1054/plef.2001.0344. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952327801903448>.
- MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain Mechanisms: A New Theory. **Science**, [S. l.], v. 150, n. 3699, p. 971–978, 1965. DOI: 10.1126/science.150.3699.971. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.150.3699.971>.
- MENG, F.; XIE, G. X.; THOMPSON, Robert C.; MANSOUR, Alfred; GOLDSTEIN, A.; WATSON, Stanley J.; AKIL, Huda. Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 90, n. 21, p. 9954–9958, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.21.9954. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/089662739390120G>.
- MERSKEY, H. Some features of the history of the idea of pain. **Pain**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 3–8, 1980. DOI: 10.1016/0304-3959(80)90024-X. Disponível em: <http://journals.lww.com/00006396-198008000-00002>.
- MICHEL, Thomas; FERON, Olivier. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? **The Journal of clinical investigation**, [S. l.], v. 100, n. 9, p. 2146–52, 1997. DOI: 10.1172/JCI119750. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9410890>.
- MILLAN, Mark J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 1–164, 1999. DOI: 10.1016/S0301-0082(98)00048-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008298000483>.
- MILLAN, Mark J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, [S. l.], v. 66, n. 6, p. 355–474, 2002. DOI: 10.1016/S0301-0082(02)00009-6. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008202000096>.
- MILLER, Richard J. Peptides as neurotransmitters: Focus on the enkephalins and endorphins. **Pharmacology & Therapeutics**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 73–108, 1981. DOI: 10.1016/0163-

- 7258(81)90076-0. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0163725881900760>.
- MIYABE, Takako; MILETIC, Gordana; MILETIC, Vjekoslav. Loose ligation of the sciatic nerve in rats elicits transient up-regulation of Homer1a gene expression in the spinal dorsal horn. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 398, n. 3, p. 296–299, 2006. DOI: 10.1016/j.neulet.2006.01.011.
- MIYAMOTO, Takashi; DUBIN, Adrienne E.; PETRUS, Matt J.; PATAPOUTIAN, Ardem. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. **PloS one**, [S. l.], v. 4, n. 10, p. e7596, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0007596. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893614>.
- MOILANEN, Eeva; VAPAATALO, Heikki. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Annals of medicine**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 359–67, 1995. DOI: 10.3109/07853899509002589. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7546626>.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 109–42, 1991. DOI: 10.4103/2045-9912.273953. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31898600>.
- MORIN, N.; OWOLABI, S. A.; HARTY, M. W.; PAPA, E. F.; TRACY, T. F.; SHAW, S. K.; KIM, M.; SAAB, C. Y. Neutrophils invade lumbar dorsal root ganglia after chronic constriction injury of the sciatic nerve. **Journal of neuroimmunology**, [S. l.], v. 184, n. 1–2, p. 164–71, 2007. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2006.12.009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17275921>.
- MORO, María A.; DARLEY-USMAR, Victor M.; GOODWIN, David A.; READ, Nicholas G.; ZAMORA-PINO, Rubén; FEELISCH, Martin; RADOMSKI, Marek W.; MONCADA, Salvador. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 91, n. 14, p. 6702–6, 1994. DOI: 10.1073/pnas.91.14.6702. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7517561>.
- MOTTA, Patrícia G.; PEREZ, Andrea C.; ALVES, Daniela P.; DUARTE, Igor D. G. Peripheral control of inflammatory but not neuropathic pain by endogenous cholinergic system. **Pharmacology**, [S. l.], v. 88, n. 1–2, p. 18–25, 2011. DOI: 10.1159/000328409. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21720188>.
- MURNION, Bridin P. Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment. **Australian prescriber**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 60–63, 2018. DOI: 10.18773/austprescr.2018.022. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29921999>.
- MURWANI, Retno; HODGKINSON, Suzanne; ARMATI, Patricia. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 mRNA expression in neonatal Lewis rat Schwann cells and a neonatal rat Schwann cell line following interferon gamma stimulation. **Journal of neuroimmunology**, [S. l.], v. 71, n. 1–2, p. 65–71, 1996. DOI: 10.1016/s0165-5728(96)00131-2. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8982104>.
- NEUMANN, S.; DOUBELL, T. P.; LESLIE, T.; WOOLF, C. J. Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. **Nature**, [S. l.], v. 384, n. 6607, p. 360–4, 1996. DOI: 10.1038/384360a0. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8934522>.
- OBATA, Koichi; YAMANAKA, Hiroki; FUKUOKA, Tetsuo; YI, Dai; TOKUNAGA, Atsushi; HASHIMOTO, Norio; YOSHIKAWA, Hideki; NOGUCHI, Koichi. Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression

- following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. **Pain**, [S. l.], v. 101, n. 1–2, p. 65–77, 2003. DOI: 10.1016/s0304-3959(02)00296-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507701>.
- OH, Seog Bae; TRAN, Phuong B.; GILLARD, Samantha E.; HURLEY, Robert W.; HAMMOND, Donna L.; MILLER, Richard J. Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 21, n. 14, p. 5027–35, 2001. DOI: 10.1523/jneurosci.21-14-05027.2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438578>.
- PACE, Maria Caterina et al. Nociceptor plasticity: A closer look. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 233, n. 4, p. 2824–2838, 2018. DOI: 10.1002/jcp.25993. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.25993>.
- PACHECO, Daniela da Fonseca; KLEIN, André; PEREZ, Andréa Castro; PACHECO, Cinthia Mara da Fonseca; DE FRANCISCHI, Janetti Nogueira; REIS, Gláucia Maria Lopes; DUARTE, Igor Dimitri Gama. Central antinociception induced by mu-opioid receptor agonist morphine, but not delta- or kappa-, is mediated by cannabinoid CB1 receptor. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 158, n. 1, p. 225–31, 2009. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00310.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19594755>.
- PACHECO, Daniela F.; DUARTE, Igor D. G. Delta-opioid receptor agonist SNC80 induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K⁺ channels. **European journal of pharmacology**, [S. l.], v. 512, n. 1, p. 23–8, 2005. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.02.018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814086>.
- PAGADALA, Promila et al. Loss of NR1 subunit of NMDARs in primary sensory neurons leads to hyperexcitability and pain hypersensitivity: involvement of Ca(2+)-activated small conductance potassium channels. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 33, n. 33, p. 13425–30, 2013. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0454-13.2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23946399>.
- PARADISE, William A.; VESPER, Benjamin J.; GOEL, Ajay; WALTONEN, Joshua D.; ALTMAN, Kenneth W.; HAINES, G. Kenneth; RADOSEVICH, James A. Nitric oxide: perspectives and emerging studies of a well known cytotoxin. **International journal of molecular sciences**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 2715–45, 2010. DOI: 10.3390/ijms11072715. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20717533>.
- PARRATT, J. R. Nitric oxide. A key mediator in sepsis and endotoxaemia? **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, [S. l.], v. 48, n. 4, p. 493–506, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9444603>.
- PEDERSEN, Louise Henriette; SCHEEL-KRÜGER, Jørgen; BLACKBURN-MUNRO, Gordon. Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. **Pain**, [S. l.], v. 127, n. 1–2, p. 17–26, 2007. DOI: 10.1016/j.pain.2006.06.036. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16965855>.
- PERTTUNEN, K.; TASMUTH, T.; KALSO, E. Chronic pain after thoracic surgery: a follow-up study. **Acta anaesthesiologica Scandinavica**, [S. l.], v. 43, n. 5, p. 563–7, 1999. DOI: 10.1034/j.1399-6576.1999.430513.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10342006>.
- PEYRON, Christelle; LUPPI, Pierre-Hervé; KITAHAMA, Kunio; FORT, Patrice; HERMANN, Dirk M.; JOUVET, Michel. Origin of the dopaminergic innervation of the rat dorsal raphe nucleus. **NeuroReport**, [S. l.], v. 6, n. 18, p. 2527–2531, 1995. DOI: 10.1097/00001756-199512150-

00019. Disponível em: <http://journals.lww.com/00001756-199512150-00019>.
- PINHO-RIBEIRO, Felipe A.; CHIU, Isaac M. Nociceptor nerves set the stage for skin immunity. **Cell Research**, [S. l.], v. 29, n. 11, p. 877–878, 2019. DOI: 10.1038/s41422-019-0240-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41422-019-0240-x>.
- POOBALAN, A. S.; BRUCE, J.; KING, P. M.; CHAMBERS, W. A.; KRUKOWSKI, Z. H.; SMITH, W. C. S. Chronic pain and quality of life following open inguinal hernia repair. **The British journal of surgery**, [S. l.], v. 88, n. 8, p. 1122–6, 2001. DOI: 10.1046/j.0007-1323.2001.01828.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11488800>.
- PROFYRIS, Christos; CHEEMA, Surindar S.; ZANG, DaWei; AZARI, Michael F.; BOYLE, Kristy; PETRATOS, Steven. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. **Neurobiology of disease**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 415–36, 2004. DOI: 10.1016/j.nbd.2003.11.015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15056450>.
- QUASTHOFF, Stefan; HARTUNG, Hans Peter. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **Journal of neurology**, [S. l.], v. 249, n. 1, p. 9–17, 2002. DOI: 10.1007/pl00007853. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11954874>.
- RAJA, Srinivasa N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, [S. l.], v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 2020. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001939. Disponível em: <https://journals.lww.com/10.1097/j.pain.0000000000001939>. Acesso em: 1 maio. 2021.
- RALSTON, S. H. The Michael Mason Prize Essay 1997. Nitric oxide and bone: what a gas! **British journal of rheumatology**, [S. l.], v. 36, n. 8, p. 831–8, 1997. DOI: 10.1093/rheumatology/36.8.831. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9291850>.
- RAMOS, Luiz Antônio; CRISTINA, Carla; CAVALHEIRO, Schmitt; GOMES, Tadeu; QUÍMICA, Instituto De; CARLOS, De São; PAULO, Universidade De São; SP, São Carlos. Determination of nitrite in water using a flower extract. **Química Nova**, [S. l.], v. 29, n. August 2014, p. 1114–1120, 2006.
- RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, [S. l.], v. 111, n. 4, p. 409–19, 1957. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13471093>.
- RASMUSSEN, Peter Vestergaard; SINDRUP, Søren Hein; JENSEN, Troels Staehelin; BACH, Flemming Winther. Symptoms and signs in patients with suspected neuropathic pain. **Pain**, [S. l.], v. 110, n. 1–2, p. 461–9, 2004. DOI: 10.1016/j.pain.2004.04.034. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15275799>.
- REIS, Fábio José; ROCHA, Noeli Pereira. Efeito analgésico de longa duração da dipirona sobre a hiperalgesia persistente induzida pela constrição do nervo ciático em ratos: Participação do óxido nítrico. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 42, n. 4, p. 513–522, 2006. DOI: 10.1590/s1516-93322006000400006.
- REIS, Gláucia Maria Lopes; PACHECO, Daniela; PEREZ, Andréa Castro; KLEIN, André; RAMOS, Marina Abadia; DUARTE, Igor Dimitri Gama. Opioid receptor and NO/cGMP pathway as a mechanism of peripheral antinociceptive action of the cannabinoid receptor agonist anandamide. **Life sciences**, [S. l.], v. 85, n. 9–10, p. 351–6, 2009. DOI: 10.1016/j.lfs.2009.06.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2009.06.012>.
- RHUDY, Jamie L.; MEAGHER, Mary W. Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. **Pain**, [S. l.], v. 84, n. 1, p. 65–75, 2000. DOI: 10.1016/S0304-3959(99)00183-9. Disponível em: <http://journals.lww.com/00006396-200001010-00009>.

- RIVERA, Luis; GALLAR, Juana; POZO, Miguel Angel; BELMONTE, Carlos. Responses of nerve fibres of the rat saphenous nerve neuroma to mechanical and chemical stimulation: an in vitro study. **The Journal of physiology**, [S. l.], v. 527 Pt 2, n. 2, p. 305–13, 2000. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00305.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10970431>.
- ROCHA, P. A.; FERREIRA, A. F. B.; DA SILVA, J. T.; ALVES, A. S.; MARTINS, D. O.; BRITTO, L. R. G.; CHACUR, M. Effects of selective inhibition of nNOS and iNOS on neuropathic pain in rats. **Molecular and cellular neurosciences**, [S. l.], v. 105, n. April, p. 103497, 2020. DOI: 10.1016/j.mcn.2020.103497. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103497>.
- RODRIGUES, A. R. A.; DUARTE, I. D. G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 129, n. 1, p. 110–114, 2000. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703038.
- ROMERO, Thiago R. L.; DUARTE, Igor D. G. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by ketamine. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 419–24, 2013. DOI: 10.1111/vaa.12024. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23490455>.
- ROMERO, Thiago R. L.; GALDINO, Giovane S.; SILVA, Grazielle C.; RESENDE, Lívia C.; PEREZ, Andréa C.; CORTES, Steyner F.; DUARTE, Igor D. G. Involvement of the L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in peripheral antinociception induced by N-palmitoyl-ethanolamine in rats. **Journal of neuroscience research**, [S. l.], v. 90, n. 7, p. 1474–9, 2012. DOI: 10.1002/jnr.22797. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22411529>.
- ROMERO, Thiago R. L.; GALDINO, Giovane S.; SILVA, Grazielle C.; RESENDE, Lívia C.; PEREZ, Andréa C.; CÔRTEZ, Steyner F.; DUARTE, Igor D. G. **Ketamine activates the l-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway to induce peripheral antinociception in rats** *Anesthesia and Analgesia*, 2011. DOI: 10.1213/ANE.0b013e3182285dda.
- ROMERO, Thiago R. L.; RESENDE, Lívia C.; DUARTE, Igor D. G. The neuronal NO synthase participation in the peripheral antinociception mechanism induced by several analgesic drugs. **Nitric Oxide**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 431–435, 2011. DOI: 10.1016/j.niox.2011.08.002.
- ROMERO, Thiago Roberto Lima; DUARTE, Igor Dimitri Gama. N-palmitoyl-ethanolamine (PEA) induces peripheral antinociceptive effect by ATP-sensitive K⁺-channel activation. **Journal of pharmacological sciences**, [S. l.], v. 118, n. 2, p. 156–60, 2012. DOI: 10.1254/jphs.11150fp. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22343363>.
- ROSENBERGER, Daniela C.; BLECHSCHMIDT, Vivian; TIMMERMAN, Hans; WOLFF, André; TREEDE, Rolf-Detlef. Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, [S. l.], v. 127, n. 4, p. 589–624, 2020. DOI: 10.1007/s00702-020-02145-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02145-7>.
- SAHA, Biplab K.; BURNS, Stacey L. The Story of Nitric Oxide, Sepsis and Methylene Blue: A Comprehensive Pathophysiologic Review. **The American journal of the medical sciences**, [S. l.], v. 360, n. 4, p. 329–337, 2020. DOI: 10.1016/j.amjms.2020.06.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2020.06.007>.
- SALVEMINI, Daniela; ISCHIROPOULOS, Harry; CUZZOCREA, Salvatore. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [S. l.], v. 225, n. 5, p. 291–303, 2003. DOI: 10.1385/1-59259-374-7:291. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12769497>.
- SANDKÜHLER, Jürgen. The organization and function of endogenous antinociceptive systems. **Progress in Neurobiology**, [S. l.], v. 50, 1996. DOI: 10.1016/0301-0082(96)00031-7.
- SANDNER, Peter; ZIMMER, Daniel P.; MILNE, G. Todd; FOLLMANN, Markus; HOBBS, Adrian;

- STASCH, Johannes-Peter. Soluble Guanylate Cyclase Stimulators and Activators. **Handbook of experimental pharmacology**, [S. l.], 2019. DOI: 10.1007/164_2018_197. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30689085>.
- SCHIFITTO, G.; MCDERMOTT, M. P.; MCARTHUR, J. C.; MARDER, K.; SACKTOR, N.; EPSTEIN, L.; KIEBURTZ, K. Incidence of and risk factors for HIV-associated distal sensory polyneuropathy. **Neurology**, [S. l.], v. 58, n. 12, p. 1764–1768, 2002. DOI: 10.1212/WNL.58.12.1764. Disponível em: <http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.58.12.1764>.
- SCHMADER, Kenneth E. Epidemiology and Impact on Quality of Life of Postherpetic Neuralgia and Painful Diabetic Neuropathy. **The Clinical Journal of Pain**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 350–354, 2002. DOI: 10.1097/00002508-200211000-00002. Disponível em: <http://journals.lww.com/00002508-200211000-00002>.
- SCHMIDT, H. H.; POLLOCK, J. S.; NAKANE, M.; FÖRSTERMANN, U.; MURAD, F. Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. **Cell calcium**, [S. l.], v. 13, n. 6–7, p. 427–34, 1992. DOI: 10.1016/0143-4160(92)90055-w. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1380405>.
- SCHOLZ, Joachim; WOOLF, Clifford J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nature neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 1361–8, 2007. DOI: 10.1038/nn1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965656>.
- SERRA, Jordi; BOSTOCK, Hugh; SOLÀ, Romà; ALEU, Jordi; GARCÍA, Elizabeth; COKIC, Barbara; NAVARRO, Xavier; QUILES, Cristina. Microneurographic identification of spontaneous activity in C-nociceptors in neuropathic pain states in humans and rats. **Pain**, [S. l.], v. 153, n. 1, p. 42–55, 2012. DOI: 10.1016/j.pain.2011.08.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2011.08.015>.
- SHAMASH, Shlomit; REICHERT, Fanny; ROTSHENKER, Shlomo. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 22, n. 8, p. 3052–60, 2002. DOI: 20026249. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943808>.
- SHEETS, Patrick L.; HEERS, Cara; STOEHR, Thomas; CUMMINS, Theodore R. Differential block of sensory neuronal voltage-gated sodium channels by lacosamide [(2R)-2-(acetylamino)-N-benzyl-3-methoxypropanamide], lidocaine, and carbamazepine. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, [S. l.], v. 326, n. 1, p. 89–99, 2008. DOI: 10.1124/jpet.107.133413. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18378801>.
- SLOMIANY, B. L.; SLOMIANY, A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase during oral mucosal ulcer healing. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 159–69, 2002. DOI: 10.1097/00124743-200208000-00004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12120893>.
- SLOMIANY, B. L.; SLOMIANY, A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma impedes Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide interference with salivary mucin synthesis through phosphatidylinositol 3-kinase/erk pathway. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 3–15, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12674215>.
- SLUKA, Kathleen A. **Mechanism and management of pain for the physical therapist**. Second ed. Iowa City, Iowa: IASP Press, 2016. Disponível em: <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>.
- STAMFORD, J. A. Descending control of pain. **British Journal of Anaesthesia**, [S. l.], v. 75, n. 2,

- p. 217–227, 1995. DOI: 10.1093/bja/75.2.217. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007091217441419>.
- STOJANOVIC, Aleksandra; MARJANOVIC, Jasna A.; BROVKOVYCH, Viktor M.; PENG, Xiaoding; HAY, Nissim; SKIDGEL, Randal A.; DU, Xiaoping. A phosphoinositide 3-kinase-AKT-nitric oxide-cGMP signaling pathway in stimulating platelet secretion and aggregation. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 281, n. 24, p. 16333–9, 2006. DOI: 10.1074/jbc.M512378200. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M512378200>.
- STONE, Laura S.; VULCHANOVA, Lucy; RIEDL, Maureen S.; WILLIAMS, Frank G.; WILCOX, George L.; ELDE, Robert. Effects of peripheral nerve injury on delta opioid receptor (DOR) immunoreactivity in the rat spinal cord. **Neuroscience letters**, [S. l.], v. 361, n. 1–3, p. 208–11, 2004. DOI: 10.1016/j.neulet.2003.12.067. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15135930>.
- TAKASUSUKI, T.; FUJIWARA, T.; YAMAGUCHI, S.; FUKUSHIMA, T.; AKAGAWA, K.; HORI, Y. Enhancement of synaptic transmission and nociceptive behaviour in HPC-1/syntaxin 1A knockout mice following peripheral nerve injury. **The European journal of neuroscience**, [S. l.], v. 26, n. 8, p. 2179–87, 2007. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2007.05830.x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17953616>.
- TAO, Yuan-Xiang et al. Impaired NMDA receptor-mediated postsynaptic function and blunted NMDA receptor-dependent persistent pain in mice lacking postsynaptic density-93 protein. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 23, n. 17, p. 6703–12, 2003. DOI: 10.1523/jneurosci.23-17-06703.2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12890763>.
- TOLPPANEN, Heli; PONIKOWSKI, Piotr. sGC Stimulators and Activators. **International Cardiovascular Forum Journal**, [S. l.], v. 18, p. 2–6, 2019. DOI: 10.17987/icfj.v18i0.609. Disponível em: <http://icfjournal.org/index.php/icfj/article/view/609>.
- TORIYABE, Masaki; OMOTE, Keiichi; KAWAMATA, Tomoyuki; NAMIKI, Akiyoshi. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. **Anesthesiology**, [S. l.], v. 101, n. 4, p. 983–90, 2004. DOI: 10.1097/00000542-200410000-00025. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15448533>.
- TRACEY, D. J.; WALKER, J. S. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, [S. l.], v. 44, n. 10, p. 407–11, 1995. DOI: 10.1007/BF01757696. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8564515>.
- TSANTOULAS, Christoforos. Emerging potassium channel targets for the treatment of pain. **Current opinion in supportive and palliative care**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 147–54, 2015. DOI: 10.1097/SPC.0000000000000131. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25872119>.
- ULTENIUS, Camilla; LINDEROTH, Bengt; MEYERSON, Björn A.; WALLIN, Johan. Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat. **Neuroscience letters**, [S. l.], v. 399, n. 1–2, p. 85–90, 2006. DOI: 10.1016/j.neulet.2006.01.018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469445>.
- VARSHNEY, Pallavi; SAINI, Neeru. PI3K/AKT/mTOR activation and autophagy inhibition plays a key role in increased cholesterol during IL-17A mediated inflammatory response in psoriasis. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease**, [S. l.], v. 1864, n. 5 Pt A, p. 1795–1803, 2018. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.02.003. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.02.003>.

VERA-PORTOCARRERO, L. P.; ZHANG, E. T.; OSSIPOV, M. H.; XIE, J. Y.; KING, T.; LAI, J.; PORRECA, F. Descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains nerve injury-induced central sensitization. **Neuroscience**, [S. l.], v. 140, n. 4, p. 1311–20, 2006. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.03.016. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16650614>.

VERGADI, Eleni; IERONYMAKI, Eleftheria; LYRONI, Konstantina; VAPORIDI, Katerina; TSATSANIS, Christos. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], v. 198, n. 3, p. 1006–1014, 2017. DOI: 10.4049/jimmunol.1601515. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28115590>.

VISWANATH, Omar et al. Central Neuropathic Mechanisms in Pain Signaling Pathways: Current Evidence and Recommendations. **Advances in therapy**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 1946–1959, 2020. DOI: 10.1007/s12325-020-01334-w. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s12325-020-01334-w>.

WALL, Patrick D. On the relation of injury to pain the John J. Bonica Lecture. **Pain**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 253–264, 1979. DOI: 10.1016/0304-3959(79)90047-2. Disponível em: <http://journals.lww.com/00006396-197906000-00002>.

WALLACE, M. S.; WALLACE, Anne M.; LEE, Judy; DOBKE, Marek K. Pain after breast surgery: a survey of 282 women. **Pain**, [S. l.], v. 66, n. 2–3, p. 195–205, 1996. DOI: 10.1016/0304-3959(96)03064-3. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8880841>.

WATKINS, Linda R.; MILLIGAN, Erin D.; MAIER, Steven F. Spinal cord glia: new players in pain. **Pain**, [S. l.], v. 93, n. 3, p. 201–205, 2001. DOI: 10.1016/S0304-3959(01)00359-1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514078>.

WELK, E.; LEAH, J. D.; ZIMMERMANN, M. Characteristics of A- and C-fibers ending in a sensory nerve neuroma in the rat. **Journal of Neurophysiology**, [S. l.], v. 63, n. 4, p. 759–766, 1990. DOI: 10.1152/jn.1990.63.4.759.

WEN, Xian-Jie; XU, Shi-Yuan; CHEN, Zhi-Xin; YANG, Cheng-Xiang; LIANG, Hua; LI, Heng. The roles of T-type calcium channel in the development of neuropathic pain following chronic compression of rat dorsal root ganglia. **Pharmacology**, [S. l.], v. 85, n. 5, p. 295–300, 2010. DOI: 10.1159/000276981. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20453553>.

WEST, N. E. J.; QIAN, H.; GUZIK, T. J.; BLACK, E.; CAI, S.; GEORGE, S. E.; CHANNON, K. M. Nitric oxide synthase (nNOS) gene transfer modifies venous bypass graft remodeling: effects on vascular smooth muscle cell differentiation and superoxide production. **Circulation**, [S. l.], v. 104, n. 13, p. 1526–32, 2001. DOI: 10.1161/hc3801.095693. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11571247>.

WOOLF, Clifford J. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. **Annals of Internal Medicine**, [S. l.], v. 140, n. 6, p. 441–451, 2004. a. DOI: 10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00010.

WOOLF, Clifford J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. **Life sciences**, [S. l.], v. 74, n. 21, p. 2605–10, 2004. b. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.01.003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15041442>.

WOOLF, Clifford J.; MANNION, Richard J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **The Lancet**, [S. l.], v. 353, n. 9168, p. 1959–1964, 1999. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)01307-0. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2008-1039061>.

- WU, G.; RINGKAMP, M.; HARTKE, T. V.; MURINSON, B. B.; CAMPBELL, J. N.; GRIFFIN, J. W.; MEYER, R. A. Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. RC140, 2001. DOI: 10.1523/jneurosci.21-08-j0002.2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306646>.
- XIE, Q.; NATHAN, C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. **Journal of leukocyte biology**, [S. l.], v. 56, n. 5, p. 576–82, 1994. DOI: 10.1002/jlb.56.5.576. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7525816>.
- XU, Mei et al. Neuropathic pain activates the endogenous kappa opioid system in mouse spinal cord and induces opioid receptor tolerance. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [S. l.], v. 24, n. 19, p. 4576–84, 2004. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5552-03.2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15140929>.
- YANG, Zhi-Lu; ZHAO, Qiang; HE, Qianjun. Nitric oxide. **Medical gas research**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 170, 2019. DOI: 10.4103/2045-9912.273953. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31898600>.
- YASUDA, K.; RAYNOR, K.; KONG, H.; BREDER, C. D.; TAKEDA, J.; REISINE, T.; BELL, G. I. Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 90, n. 14, p. 6736–40, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.14.6736. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8393575%5Cnhttp://www.pnas.org/content/90/14/6736.full.pdf.
- YETIK-ANACAK, Gunay; CATRAVAS, John D. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. **Vascular pharmacology**, [S. l.], v. 45, n. 5, p. 268–76, 2006. DOI: 10.1016/j.vph.2006.08.002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17052961>.
- YUE, Jing; LIU, Lieju; LIU, Zhiguo; SHU, Bin; ZHANG, Yi. Upregulation of T-type Ca²⁺ channels in primary sensory neurons in spinal nerve injury. **Spine**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 463–70, 2013. DOI: 10.1097/BRS.0b013e318272fbf8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22972512>.
- ZIMMERMANN, Manfred. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 109–110, 1983. DOI: 10.1016/0304-3959(83)90201-4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6877845>.
- ZIMMERMANN, Manfred. Pathobiology of neuropathic pain. **European journal of pharmacology**, [S. l.], v. 429, n. 1–3, p. 23–37, 2001. DOI: 10.1016/s0014-2999(01)01303-6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698024>.

Anexos

8. ANEXO I

04/12/2014

Mensagem de Impressão do Outlook.com

----- Mensagem encaminhada -----

De: CEUA <ceua@prpq.ufmg.br>

Data: 2 de dezembro de 2014 16:01

Assunto: Certificado CEUA

Para: thiromero@gmail.com
UFMG
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 173 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Possível participação de sistemas analgésicos no evento de modulação endógena da dor neuropática periférica.”, que tem como responsável thiago roberto lima romero, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 02/12/2014. Este certificado expira-se em 02/12/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 173 / 2014, related to the Project entitled “The possible participation of the analgesic systems in the peripheral neuropathic pain modulation”, under the supervision of thiago roberto lima romero, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 02/12/2014. This certificates expires in 02/12/2019.

Cleuza Maria de Faria Rezende
 Coordenador(a) da CEUA/UFMG
 Belo Horizonte, 02/12/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br