

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e
Farmacologia

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DOS ÁCIDOS EPOXIEICOSATRIENOICOS
(EET_s) NO MODELO DE NOCICEPÇÃO PERIFÉRICA EM CAMUNDONGOS.**

Flávia Cristina de Sousa Fonseca

Belo Horizonte

2021

Flávia Cristina de Sousa Fonseca

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DOS ÁCIDOS EPOXIEICOSATRIENOICOS
(EETs) NO MODELO DE NOCICEPÇÃO PERIFÉRICA EM CAMUNDONGOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, com área de concentração em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte

Belo Horizonte

2021

043 Fonseca, Flávia Cristina de Sousa.

Atividade antinociceptiva dos ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) no modelo de nociceção periférica em camundongos [manuscrito] / Flávia Cristina de Sousa Fonseca. - 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte.

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

1. Farmacologia. 2. Antinociceção. 3. Opióides. 4. Canabinóides. I. Duarte, Igor Dimitri Gama. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA TESE N° 351 DE FLÁVIA CRISTINA DE SOUSA FONSECA

"Atividade Antinociceptiva dos Ácidos Epoxieicosatrienoicos (EETs) No Modelo de Nocicepção Periférica Em Camundongos"

FLÁVIA CRISTINA DE SOUSA FONSECA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **09 de dezembro de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho, Faculdade de Farmácia/UFMG

Profa. Dra. Luciene Bruno Vieira, ICB/UFMG

Profa. Dra. Morgana Duarte da Silva, CFS/UFSC

Profa. Dra. Luciana Souza Guzzo Costa, Faculdade de Farmácia/UFJF

Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 09 de dezembro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Luciene Bruno Vieira, Professora do Magistério Superior**, em 15/12/2021, às 08:21, 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 **Igor Dimitri Gama Duarte, Membro de comissão**, em 15/12/2021, às 14:23, 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 **Marcio de Matos Coelho, Chefe de departamento**, em 15/12/2021, às 16:53, 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 **Luciana Souza Guzzo Costa, Usuário Externo**, em



20/12/2021, às 11:34, 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 **Morgana Duarte da Silva, Usuário Externo**, em 03/01/2022, às 14:15, 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 **1101401** e o código CRC **15633D59**.

*Aos meus pais e aos meus T(h)jagos,
pelo apoio e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar, proteger e me permitir vivenciar essa experiência única.

Ao meu orientador, Prof. Igor Dimitri Gama Duarte, essencial na minha formação, pela confiança em mim depositada, pela acessibilidade e excelente orientação. Agradeço pela acolhida no laboratório, pelo apoio constante e ensinamentos prestados, revelando uma especial humildade, delicadeza e atenção no trato. Obrigada por embarcar comigo nas minhas ideias e me incentivar sempre.

Ao Prof. Thiago Roberto Lima Romero pela receptividade e agradável convivência.

À Profa. Andrea de Castro Perez pelas conversas, parceria e disponibilidade em ajudar sempre.

À Prof. Cleida Aparecida de Oliveira e a todos do Laboratório de Biologia da Reprodução pela agradável convivência e, em especial à Hipacia Werneck Gomes, pela parceria, dedicação, carinho e zelo para auxiliar nos experimentos.

À Profa. Miriam Teresa Paz Lopes e a toda a equipe do Laboratório de Substâncias Antitumorais (LSAT) pela disponibilidade em guardar as minhas substâncias no freezer -80°C e pelo agradável convívio.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia e Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pelos ensinamentos e comprometimento.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Dor e Analgesia (LDA): Amanda Gonzaga, Bárbara Queiroz, Caio Lopes, Cristina Oliveira, Daniel Portela, Danielle Diniz, Douglas Almeida, Laís Quintão, Loyara Rocha, Mariana Prata, Marla Calazans, Raquel Rodrigues, Renata Ferreira, Sandro Dias, Thaís Noronha, Thamyris Santos, Vanessa Kaiser, Wallace Barra e Willian Valadares. Não pude conviver por muito tempo com todas as pessoas, mas o importante é que todos contribuíram de alguma forma para esse trabalho e para a minha formação, e eu só tenho a agradecer a cada um de vocês pelo companheirismo, boa convivência, aprendizado e momentos de descontração. Vocês foram fundamentais!

Ao meu tutor nos Estados Unidos, Prof. Bruce D. Hammock, por me receber tão bem em seu laboratório na Universidade da Califórnia-Davis (UC Davis), com tanto profissionalismo, cuidado e atenção.

A todos os colegas, professores, pesquisadores e funcionários do *Hammock Lab* (UC Davis) pela boa convivência e ajuda dentro e fora do laboratório, em especial à Dra. Karen Wagner, Hoàng Pham, Carlos Trindade, Julie Learn, Daniel Lybrand e Gregory Zebouni.

Aos colegas da pós-graduação, em especial à Flávia Araújo, por caminharmos juntas desde a graduação e pelo apoio nos momentos de desespero. Você é um presente de Ouro Preto para a vida!

Aos meus amados pais, Paulo e Magna, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Amo vocês!

Ao meu irmão Tiago, pelo entusiasmo contagiante e pelo exemplo de competência, determinação e perseverança.

Ao amado Thiago, meu grande amigo e companheiro, pela paciência, amor e apoio.

A todos os familiares e amigos pela torcida e carinho.

À técnica Adriane Pereira pela disposição em ajudar sempre e tornar nossos dias mais leves e divertidos.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia pelos esclarecimentos e atenção.

A toda a equipe do CEBIO-ICB/UFMG, especialmente o Elmo, pela disposição em ajudar sempre.

Aos bioteristas, Wellington e Rinaldo, por todo o cuidado com os animais de experimentação, fundamental para o sucesso do nosso trabalho.

Aos animais de experimentação por doarem suas vidas pelo nosso trabalho e em prol da ciência.

Aos órgãos de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, fica expressa aqui a minha gratidão.

"Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente" (Roger Von Oech)

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) são derivados do ácido araquidônico via enzimas epoxigenases do citocromo P450 e atuam como moléculas sinalizadoras endógenas em múltiplos sistemas biológicos. Os principais papéis dos EETs incluem a modulação da pressão arterial e das cascatas inflamatórias, embora haja uma série de outras funções fisiopatológicas associadas a essas substâncias, incluindo seus efeitos controversos na dor. **OBJETIVO:** Verificar o efeito antinociceptivo periférico dos EETs e os mecanismos envolvidos nesse evento, bem como sua participação no controle endógeno periférico da dor. **MÉTODOS:** O teste de retirada de pata submetida à compressão foi utilizado e a hiperalgesia foi induzida por: (i) injeção intraplantar de prostaglandina E₂ (PGE₂), para avaliação do efeito da administração dos EETs exógenos; e (ii) pela injeção intraplantar de carragenina (CG) ou pela constrição do nervo ciático (CCI), para avaliação dos EETs endógenos. Os EETs (5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET) e as drogas dos sistemas analgésicos avaliados foram administrados por via intraplantar em camundongos machos (n = 5-8). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni. **RESULTADOS:** Os EETs apresentaram efeito antinociceptivo periférico de maneira dose-dependente. Esse efeito, com exceção do 8,9-EET, foi revertido pela Naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opioides, e pela Nor-binaltorfimina, um antagonista seletivo do receptor κ-opioide, mas não pelo CTOP e Naltrindole, antagonistas seletivos dos receptores μ e δ-opioide, respectivamente. Ademais, um inibidor da enzima que degrada opioides endógenos, a Bestatina, potencializou o efeito antinociceptivo de baixas doses dos EETs e, através da técnica de imunofluorescência, sugeriu-se o envolvimento da dinorfina. A antinocicepção periférica induzida pelos EETs foi antagonizada pelo AM251, um antagonista seletivo do receptor CB₁, mas não pelo AM630, um antagonista seletivo do receptor CB₂. Além disso, um inibidor da recaptção de anandamida (AEA; VDM11), bem como um inibidor da enzima responsável pela hidrólise de AEA (MAFP) potencializaram o efeito antinociceptivo de baixas doses dos EETs. Por outro lado, um inibidor da enzima responsável pela hidrólise de 2-araquidonilglicerol (JZL184) não potencializou esse efeito. Adicionalmente, o LNOArg, um inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), bem como os inibidores seletivos das NOS induzível (LNIL) e endotelial (LNIO), mas não a neuronal (LNPA) reverteram a antinocicepção dos EETs. Além disso, um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel (ODQ) reduziu esse efeito e um inibidor seletivo da fosfodiesterase específica do GMPc (Zaprinast) potencializou o efeito antinociceptivo de baixas doses dos EETs, sugerindo

que o GMPc está envolvido nesse processo. A antinocicepção desencadeada pelos EETS não parece estar relacionada a abertura de canais para potássio, nem de cloreto, conforme avaliado pelos bloqueadores seletivos para os diferentes canais: glibenclamida, tetraetilamônio, dequalínio, paxilina e ácido niflúmico. Com relação ao envolvimento dos EETs endógenos no controle periférico da dor, observou-se que um antagonista não seletivo dos receptores dos EETs (14,15-EEZE) e um inibidor das enzimas epoxigenases do citocromo P450 (MS-PPOH) foram responsáveis pela potencialização da hiperalgesia induzida pela CG e pela CCI. Além disso, um inibidor da enzima epóxido hidrolase solúvel (EHs; TPPU) bem como animais *knockout* para essa enzima (EHs KO), reduziram a hiperalgesia nos modelos de dor inflamatória (CG) e neuropática (CCI). Além do comportamento nociceptivo pelo método de compressão da pata, foi realizada a análise da marcha, usando o *CatWalk*, nos camundongos C57BL/6 submetidos a CCI. Observou-se que os animais operados (WT e EHs KO) apresentaram menor área de impressão da pata, redução na intensidade média de contato da pata e da fase de apoio, e aumento na fase de balanço se comparado aos seus pares *sham*. Os animais operados EHs KO e WT apresentaram diferenças significativas entre si nas fases de apoio e de balanço. A partir da técnica de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS), observou-se um aumento nos níveis dos EETs nos coxins plantares dos camundongos apenas na dor inflamatória, no grupo tratado com TPPU em relação ao grupo tratado com veículo. **CONCLUSÃO:** Em conjunto, nossos resultados fornecem evidências de que os EETs apresentam efeito antinociceptivo periférico, cujo mecanismo de ação envolve a participação dos sistemas opioide e canabinoide, e a ativação da via NO/GMPc para o 5,6-, 11,12- e 14,15-EET; enquanto para o 8,9-EET, apenas os dois últimos mecanismos parecem estar envolvidos. Ademais, nossos achados sugerem uma modulação da dor inflamatória e neuropática pelos EETs endógenos como um mecanismo de controle da transmissão dos impulsos nociceptivos na periferia, sendo que na dor neuropática, pode haver a participação de mais AGEPs nessa modulação periférica da dor.

Palavras-chave: ácidos epoxieicosatrienoicos, antinocicepção, opioides, canabinoides, óxido nítrico, modulação endógena, nocicepção.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) are cytochrome P450-epoxygenase-derived metabolites of arachidonic acid that act as endogenous signaling molecules in multiple biological systems. The major roles of EETs include modulation of blood pressure and inflammatory cascades, although there are several other physiological functions associated with these substances, including their controversial effects on pain. **OBJECTIVES:** To verify the peripheral antinociceptive effect of EETs and the mechanisms involved in this event, as well as their participation in peripheral endogenous pain control. **METHODS:** The mechanical paw pressure test was used, and hyperalgesia was induced by: (i) intraplantar injection of prostaglandin E₂ (PGE₂) to evaluate the effect of the administration of exogenous EETs; and (ii) intraplantar injection of carrageenan (CG) or ciatic constriction injury (CCI) to assess endogenous EETs. The EETs (5,6-, 8,9-, 11,12- and 14,15-EET) and the drugs of the analgesic systems evaluated were given intraplantarly in male mice (n = 5-8). Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Bonferroni post-test. **RESULTS:** EETs showed a dose-dependent peripheral antinociceptive effect. This effect, except for 8,9-EET, was reversed by Naloxone, a non-selective opioid receptor antagonist, and by Nor-binaltorphimine, a selective κ -opioid receptor antagonist, but not by CTOP and Naltrindole, selective antagonists of μ and δ opioid receptors, respectively. Furthermore, an inhibitor of the enzyme that degrades endogenous opioids, Bestatin, potentiated the antinociceptive effect of low doses of EETs and, through the immunofluorescence technique, the involvement of dynorphin was suggested. The peripheral antinociception induced by EETs was antagonized by AM251, a selective CB₁ receptor antagonist, but not by AM630, a selective CB₂ receptor antagonist. Besides, an inhibitor of the anandamide (AEA) cellular reuptake (VDM11), as well as an inhibitor of the enzyme responsible for AEA hydrolysis (MAFP), potentiated the peripheral antinociceptive effect of a low dose of EETs. However, an inhibitor of the enzyme responsible for 2-arachidonoylglycerol hydrolysis (JZL184) did not potentiate this effect. Additionally, LNOArg, a non-selective inhibitor of the enzymes nitric oxide synthase (NOS), as well as selective inhibitors of inducible (LNIL) and endothelial (LNIO), but not neuronal (LNPA) NOS, reversed EETs antinociception. Furthermore, an inhibitor of the soluble guanylate cyclase enzyme (ODQ) reduced this effect and a selective inhibitor of GMPc-specific phosphodiesterase (Zaprinast) potentiated the antinociceptive effects of low doses of EETs, suggesting that GMPc is involved in this process. Antinociception triggered by EETS does not seem to be related to opening potassium or chloride channels, as

assessed by selective blockers for the different channels: glibenclamide, tetraethylammonium, dequalinium, paxillin and niflumic acid. Regarding the involvement of endogenous EETs in peripheral pain control, it was observed that a non-selective EETs receptor antagonist (14,15-EEZE) and an inhibitor of cytochrome P450 epoxygenase enzymes (MS-PPOH) were responsible for the potentiation of nociception induced by CG or CCI. Furthermore, an inhibitor of the soluble epoxide hydrolase enzyme (TPPU) as well as knockout animals for this enzyme (EHs KO) reduced nociception in inflammatory (CG) and neuropathic (CCI) pain models. In addition to the nociceptive behavior by the mechanical paw pressure test, gait analysis was performed using the CatWalk in C57BL/6 mice submitted to CCI. It was observed that operated animals (WT and EHs KO) had smaller paw print area, reduced mean intensity of paw contact and single stance, and increase in swing time compared to their sham counterparts. The operated animals EHs KO and WT showed significant differences between them in the single stance and swing time. Using the liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technique, we observed an increase in EETs levels in the mice foot pads only in inflammatory pain, in the group treated with TPPU compared to the group treated with vehicle. **CONCLUSIONS:** Our results provide evidence that EETs have a peripheral antinociceptive effect, whose mechanism of action involves the opioid and cannabinoid systems, and the activation of the NO/GMPc pathway for 5,6-, 11,12- and 14,15-EET; while for 8,9-EET, only the last two mechanisms seem to be involved. Furthermore, our findings suggest a modulation of inflammatory and neuropathic pain by endogenous EETs as a control mechanism for the transmission of nociceptive impulses in the periphery, and in neuropathic pain, more AGEPs may participate in this peripheral pain modulation.

Keywords: epoxyeicosatrienoic acids, antinociception, opioids, cannabinoids, nitric oxide, endogenous modulation, nociception.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos tipos de dor.....	25
Figura 2. Representação esquemática das vias ascendente e descendente da dor.	27
Figura 3. Representação esquemática da modulação da transmissão aferente nociceptiva.	28
Figura 4. Via do citocromo P450 (CYP) na cascata do ácido araquidônico, originando duas classes de substâncias: os ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) e os ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs).	31
Figura 5. Estruturas químicas dos EETs sintetizados a partir do ácido araquidônico via CYP epoxigenases.	32
Figura 6. Esquema representativo da ação das substâncias que atuam na via opioidérgica.	41
Figura 7. Esquema representativo da ação das substâncias que atuam na via canabinoidérgica.	42
Figura 8. Esquema representativo da ação das substâncias que atuam na via nitrérgica.	43
Figura 9. Esquema representativo da ação das substâncias que atuam nos canais para potássio.....	44
Figura 10. Esquema representativo da ação do bloqueador dos canais para cloreto ativados por cálcio (CaCCs).....	44
Figura 11. Esquema representativo da ação das substâncias que atuam na formação dos EETs endógenos.	45
Figura 12. Construção do nervo ciático (CCI).....	46
Figura 13. Analgesímetros das marcas (A) Ugo Basile (B) e IITC Life Science.	48
Figura 14. Representação do equipamento <i>CatWalk</i> (A) e do caminho percorrido pelo animal nesse aparelho (B).....	49
Figura 15. Equipamentos utilizados para a quantificação de oxilipinas.	52
Figura 16. Protocolo experimental para a avaliação temporal do efeito dos EETs...	53
Figura 17. Protocolo experimental para a avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na antinocicepção periférica induzida pelos EETs.	54
Figura 18. Protocolo experimental para avaliação do efeito do inibidor da síntese e antagonista farmacológico dos EETs frente a (A) dor inflamatória e a (B) dor neuropática.	55

Figura 19. Protocolo experimental para avaliação do inibidor da degradação dos EETs frente a (A) dor inflamatória e a (B) dor neuropática.	55
Figura 20. Curva temporal do efeito antinociceptivo da administração intraplantar de diferentes doses de 5,6-EET sobre a nocicepção induzida por prostaglandina E ₂	59
Figura 21. Exclusão de efeito antinociceptivo sistêmico do 5,6-EET.....	59
Figura 22. Curva temporal do efeito antinociceptivo da administração intraplantar de diferentes doses de 8,9-EET sobre a nocicepção induzida por prostaglandina E ₂	60
Figura 23. Exclusão de efeito antinociceptivo sistêmico do 8,9-EET.....	60
Figura 24. Curva temporal do efeito antinociceptivo da administração intraplantar de diferentes doses de 11,12-EET sobre a nocicepção induzida por prostaglandina E ₂	61
Figura 25. Exclusão de efeito antinociceptivo sistêmico do 11,12-EET.....	61
Figura 26. Curva temporal do efeito antinociceptivo da administração intraplantar de diferentes doses de 14,15-EET sobre a nocicepção induzida por prostaglandina E ₂	62
Figura 27. Exclusão de efeito antinociceptivo sistêmico do 14,15-EET.....	62
Figura 28. Antagonismo pelo 14,15-EEZE do efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	64
Figura 29. Efeito do 14,15-EEZE sozinho ou seu veículo sobre o limiar nociceptivo na ausência e presença de prostaglandina E ₂	65
Figura 30. Efeito da naloxona sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.	66
Figura 31. Antagonismo pela nor-binaltorfimina do efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET.....	67
Figura 32. Efeito do CTOP sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET.	68
Figura 33. Efeito do naltrindole sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET.	69
Figura 34. Potencialização induzida pela bestatina sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET.....	70
Figura 35. Efeito das drogas do sistema opioide sozinhas ou seus veículos sobre o limiar nociceptivo na ausência e presença de prostaglandina E ₂	71
Figura 36. Imunofluorescência para dinorfina na pata de camundongos.	73

Figura 37. Antagonismo pelo AM251 do efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	75
Figura 38. Efeito do AM630 sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	76
Figura 39. Potencialização induzida pelo VDM11 sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	77
Figura 40. Potencialização induzida pelo MAFP sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	78
Figura 41. Efeito do JZL184 sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	79
Figura 42. Efeito das drogas do sistema canabinoide sozinhas ou seus veículos sobre o limiar nociceptivo na ausência e presença de prostaglandina E ₂	80
Figura 43. Antagonismo pelo L-NOArg do efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	82
Figura 44. Antagonismo pelo LNIL do efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	83
Figura 45. Antagonismo pelo LNIO do efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	84
Figura 46. Efeito do LNPA sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	85
Figura 47. Efeito do ODQ sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	86
Figura 48. Potencialização induzida pelo zaprinast sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	87
Figura 49. Efeito das drogas do sistema nitrérgico sozinhas ou seus veículos sobre o limiar nociceptivo na ausência e presença de prostaglandina E ₂	88
Figura 50. Efeito da glibenclamida sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	90
Figura 51. Efeito do tetraetilamônio sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	91
Figura 52. Efeito do dequalínio sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	92
Figura 53. Efeito da paxilina sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	93

Figura 54. Efeito das drogas dos canais para potássio sozinhas ou seus veículos sobre o limiar nociceptivo na ausência e presença de prostaglandina E ₂	94
Figura 55. Efeito do ácido niflúmico sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET.....	95
Figura 56. Efeito do ácido niflúmico sozinho ou seu veículo sobre o limiar nociceptivo na ausência e presença de prostaglandina E ₂	96
Figura 57. Curva temporal do efeito nociceptivo induzido por diferentes doses de carragenina.	99
Figura 58. Curva temporal do efeito do 14,15-EEZE sobre a nocicepção induzida por carragenina.	100
Figura 59. Efeito do 14,15-EEZE sobre a nocicepção induzida por carragenina e por prostaglandina E ₂	101
Figura 60. Efeito do MS-PPOH sobre a nocicepção induzida por carragenina.	102
Figura 61. Efeito do TPPU sobre a nocicepção induzida por carragenina em camundongos Swiss.	103
Figura 62. Efeito da deleção da enzima EHs (EHs KO) sobre a nocicepção induzida por carragenina em camundongos C57BL/6.....	104
Figura 63. Avaliação temporal do desenvolvimento da dor neuropática na pata de camundongos após constrição do nervo ciático.....	108
Figura 64. Efeito do 14,15-EEZE sobre a dor neuropática.	109
Figura 65. Efeito do MS-PPOH sobre a dor neuropática.....	110
Figura 66. Efeito do TPPU sobre a dor neuropática em camundongos Swiss.	111
Figura 67. Efeito da deleção da enzima EHs (EHs KO) sobre a dor neuropática em camundongos C57BL/6.....	112
Figura 68. Área de impressão da pata por análise da marcha pelo <i>CatWalk</i> em camundongos C57BL/6 submetidos à dor neuropática.....	113
Figura 69. Parâmetros associados à análise da marcha pelo <i>CatWalk</i> em camundongos C57BL/6 submetidos à dor neuropática.....	114
Figura 70. Níveis de EETs medidos no coxim plantar de camundongos Swiss em modelos de dor inflamatória e neuropática (CCI).....	116
Figura 71. Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva periférica dos EETs.	135
Figura 72. Representação esquemática da possível modulação endógena periférica da dor.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11,12-EET – ácido 11,12-epoxieicosatrienoico

14,15-EET - ácido 14,15-epoxieicosatrienoico

2-AG - 2-araquidonilglicerol

5,6-EET - ácido 5,6-epoxieicosatrienoico

8,9-EET – ácido 8,9-epoxieicosatrienoico

AA - ácido araquidônico

AEA - anandamida

AGEPs = ácidos graxos epoxigenados

AGPIs = ácidos graxos poli-insaturados

AN -ácido niflúmico

ANOVA - análise de variância

Best - bestatina

BHT = hidroxitolueno butilado (do inglês *butylated hydroxy toluene*)

BSA = albumina do soro bovino (do inglês *bovine serum albumin*)

CaCCs - canais para cloreto ativados por cálcio (do inglês *calcium-activated chloride channels*)

CB₁ – receptor canabinoide tipo 1

CB₂ - receptor canabinoide tipo 2

CCI - constrição do nervo ciático (do inglês *chronic constriction injury*)

CEBIO - Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CG - carragenina

COX – ciclooxigenase

CYP - citocromo P450

DHA = ácido docosahexaenoico

DHET = ácido dihidroxieicosatrienoico

DMSO - dimetilsulfóxido

DQ - dequalínio

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

EDHF - fator hiperpolarizante derivado do endotélio (do inglês *endothelium-derived hyperpolarizing factor*)

EET - ácido epoxieicosatrienoico

EHS - enzima epóxido hidrolase solúvel

EPA = ácido eicosapentaenoico

EPM - erro padrão da média

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

GCs - enzima guanilato ciclase solúvel

Glib - glibenclamida

GMP - monofosfato de guanosina.

GMPc = monofosfato cíclico de guanosina

GPCRs - receptores acoplados à proteína G (do inglês *G-protein-coupled receptors*)

GTP - guanosina trifosfato

HETE = ácido hidroxieicosatetraenoico

IACUC - Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais (do inglês *Institutional Animal Care and Use Committee*)

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

IEHS = inibidor da enzima EHS

KO – supressão genética (do inglês *knockout*)

LC/MS-MS - cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas

LOX - lipoxigenase

LPS – lipopolissacarídeo

MAGL - monoacilglicerol lipase

NO - óxido nítrico

Nor-BNI - nor-binaltorfimina

NOS - óxido nítrico sintase

NOS_e - óxido nítrico sintase endotelial

NOS_i - óxido nítrico sintase induzível

NOS_n - óxido nítrico sintase neuronal

Ns – não significativo

NTD - naltrindole

NX - naloxona

O₂ - oxigênio

PAG - substância cinzenta periaquedutal

Pax - paxilina

PBS = salina tampão fosfato (do inglês *phosphate buffer saline*)

PDE - fosfodiesterase

PGE₂ - prostaglandina E₂

PK - proteína quinase A

PLA₂ = fosfolipase A₂

SNC - sistema nervoso central

SPE - extração em fase sólida (do inglês *solid phase extraction*)

TEA - tetraetilamônio

TPP = trifenilfosfina (do inglês *triphenylphosphine*)

TRPA - receptor de potencial transitório anquirina

TRPV - receptor de potencial transitório vaniloide

WT – selvagem (do inglês *wild-type*)

Zap - zaprinast

Δ – delta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Dor e analgesia.....	24
1.1.1 Considerações gerais sobre o estudo da dor.....	24
1.1.2 Via ascendente da dor	26
1.1.3 Vias de modulação da dor.....	28
1.2 Ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs).....	29
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Animais.....	40
4.2 Drogas	40
4.2.1 Agentes hiperalgésicos	40
4.2.2 Substâncias sob teste	40
4.2.3 Substâncias para avaliar a via opioidérgica	41
4.2.4 Substâncias para avaliar a via canabinoidérgica	41
4.2.5 Substâncias para avaliar a via nitrérgica.....	42
4.2.6 Substâncias para avaliar os canais para potássio	43
4.2.7 Substâncias para avaliar os canais para cloreto	44
4.2.8 Substâncias para avaliar o efeito dos EETs endógenos	44
4.3 Administração das drogas	45
4.4 Modelo de Indução de Dor Neuropática: Constrição do Nervo Ciático (CCI) ..	45
4.5 Teste algésimétrico: mensuração do limiar nociceptivo mecânico na pata de camundongos	47
4.6 Análise da marcha pelo <i>CatWalk</i>	48
4.7 Análise da expressão de dinorfina através da técnica de imunofluorescência	50
4.8 Detecção e mensuração dos níveis endógenos de EETs através da técnica de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC/MS-MS).....	51
4.9 Procedimento experimental	53

4.9.1 Efeito dos EETs exógenos sobre a nocicepção periférica induzida pela prostaglandina E ₂ e os mecanismos envolvidos nesse evento	53
4.9.2 Efeito dos EETs endógenos no controle periférico da dor inflamatória e da dor neuropática	54
4.10 Análise estatística dos resultados	56
5. RESULTADOS.....	58
5.1 Efeito dos EETs frente a nocicepção induzida por prostaglandina E ₂ na pata de camundongos	58
5.1.1 Antagonismo do efeito dos EETs	63
5.2 Envolvimento do sistema opioide na antinocicepção induzida pelos EETs	63
5.2.1 Avaliação da expressão de dinorfina através da técnica de imunofluorescência	72
5.3 Envolvimento do sistema canabinoide na antinocicepção induzida pelos EETs	74
5.4 Envolvimento do sistema nitrérgico na antinocicepção induzida pelos EETs	81
5.5 Envolvimento dos canais para potássio na antinocicepção induzida pelos EETs	89
5.6 Envolvimento dos canais para cloreto na antinocicepção induzida pelos EETs	89
5.7 Envolvimento dos EETs no controle endógeno periférico da dor	97
5.7.1 Inflamatória	97
5.7.2 Neuropática	105
5.8 Detecção e mensuração dos níveis de EETs através da técnica de LC-MS/MS	115
6. DISCUSSÃO	118
7. CONCLUSÃO	135
REFERÊNCIAS.....	138
ANEXO	150

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor e analgesia

1.1.1 Considerações gerais sobre o estudo da dor

A dor é considerada parte integrante da vida e desempenha um importante papel protetor nos indivíduos. A sensação de dor nos alerta sobre lesões reais ou iminentes e desencadeia respostas protetoras apropriadas. No entanto, tal finalidade protetora é evidentemente perdida em casos de cronicidade, tornando-se patológica e debilitante (Anastas et al., 2019; Julius & Basbaum, 2001).

O entendimento sobre o conceito e mecanismos da dor sofreram inúmeras modificações e interpretações ao longo da história. Devido à complexidade do estudo da dor, em 1973, John J. Bonica fundou a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), que atualmente definiu dor como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (Raja et al., 2020).

Dessa forma, a dor é considerada uma experiência complexa que envolve muito mais do que apenas uma reação a um estímulo nocivo, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo cérebro (Julius & Basbaum, 2001). Sendo assim, as experiências biológicas, psicológicas, sociais e de vida também influenciam a experiência da dor de um indivíduo (Raja et al., 2020).

Uma vez que a mensuração do componente emocional da dor na experimentação animal não é uma tarefa simples, convencionou-se utilizar os termos nocicepção e antinocicepção, que se referem somente ao componente sensorial da dor. O termo nocicepção é definido, conforme descrição taxonômica da IASP, como um processo neural de codificação de estímulos nocivos (Merskey & Bogduk, 1994). Enquanto o termo antinocicepção é descrito como uma redução na capacidade de percepção do estímulo doloroso (Klaumann et al., 2008; Woolf, 2004). Dessa forma, os termos nocicepção e antinocicepção são mais adequados na experimentação animal, pois excluem o componente emocional da dor.

De acordo com Woolf (2010), a dor pode ser amplamente classificada, conforme sua natureza, em três tipos: (i) nociceptiva; (ii) inflamatória; e (iii) patológica, que engloba as dores neuropática e disfuncional, conforme apresentado

na Figura 1. A dor nociceptiva ocorre mediante a ativação direta dos nociceptores por estímulos nocivos de natureza térmica, química ou mecânica, e desempenha uma função protetora, essencial para detectar e minimizar o contato com estímulos prejudiciais ou nocivos. A dor inflamatória está associada à uma lesão tecidual e à infiltração de células do sistema imunológico, com consequente liberação de mediadores inflamatórios que ativam ou sensibilizam os nociceptores. A dor patológica é um estado de doença resultante de uma lesão neuronal (dor neuropática) ou está vinculada com o funcionamento e/ou reatividade anormal do sistema nervoso (dor disfuncional) (Scholz & Woolf, 2002; Woolf, 2004).

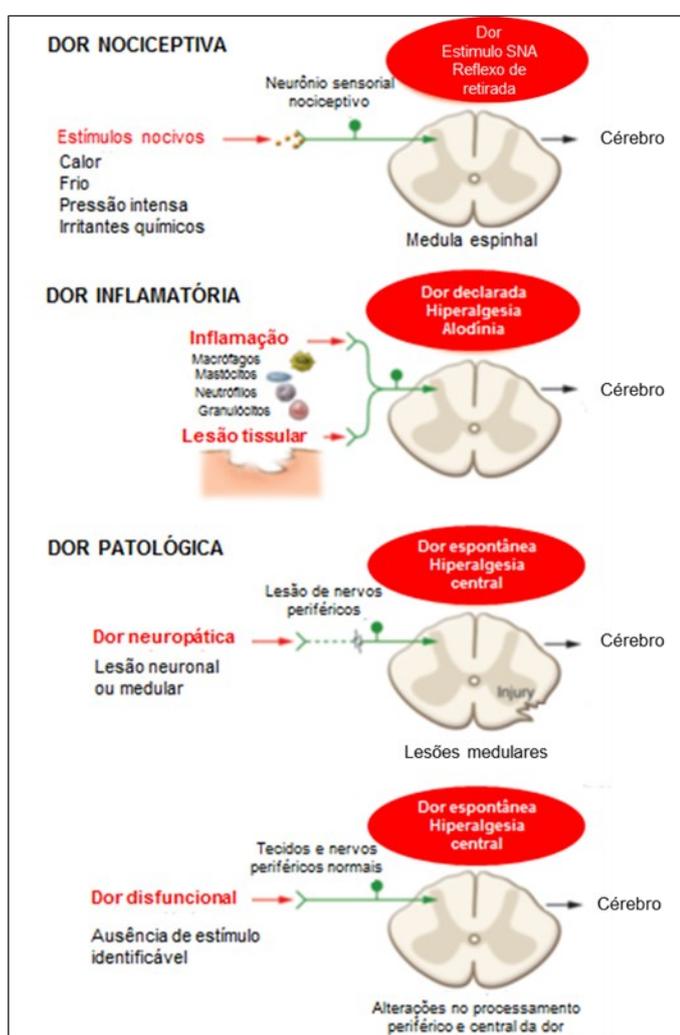


Figura 1. Classificação dos tipos de dor (modificada de Woolf, 2010).

Segundo a IASP, a dor era classificada em apenas dois tipos: (i) nociceptiva, definida como a dor que resulta de danos reais ou potenciais ao tecido não neural

devido à ativação de nociceptores; e (ii) neuropática, que é definida como uma dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial. Essa visão dicotômica da dor, no entanto, não contempla pacientes que sentem dor sem que ocorra ativação óbvia de nociceptores, nem lesão comprovada ou doença do sistema nervoso somatossensorial, como pacientes com fibromialgia ou lombalgia inespecífica. Sendo assim, um terceiro termo foi necessário para classificar a dor nesses pacientes (Kosek et al., 2016; Trouvin & Perrot, 2019). O novo termo proposto pela IASP em 2017 foi dor nociplástica, que é definida como a dor que surge da nocicepção alterada, apesar de não haver evidência clara de dano tecidual real ou potencial causando a ativação de nociceptores periféricos, ou evidência de doença ou lesão do sistema somatossensorial que causa a dor (Trouvin & Perrot, 2019).

1.1.2 Via ascendente da dor

Nociceptores são receptores sensoriais de alto limiar do sistema nervoso periférico somatossensorial que são capazes de transduzir e codificar estímulos nocivos, iniciando o processo de nocicepção (Sherrington, 1906; Merskey & Bogduk, 1994). O que distingue o nociceptor de outros receptores sensoriais é o seu alto limiar de ativação, de tal forma que, somente estímulos muito intensos (potencialmente lesivos) possam ser detectados pelos mesmos (Millan, 1999).

As fibras nervosas periféricas são classificadas conforme diâmetro, velocidade de condução e mielinização. As fibras A são fibras mielinizadas e, portanto, apresentam maior velocidade de condução, enquanto as fibras C são condutoras mais lentas por serem amielinizadas. Considera-se que as terminações nervosas livres das fibras A δ e C constituem a região sensorial dos principais nociceptores, enquanto as fibras A α e A β são motoras e sensoriais não nociceptivas, respectivamente (Julius & Basbaum, 2001; Millan, 1999).

De forma simplificada, a transmissão ascendente da dor (Figura 2 – vermelho) consiste na transmissão de um impulso nervoso, frente a um estímulo potencialmente lesivo, da periferia para o córtex cerebral. Nesse processo, uma vez que ocorre a transdução, que é a conversão de um estímulo nocivo em atividade

elétrica nos nociceptores periféricos, o impulso nervoso é projetado da periferia até o corno dorsal da medula espinhal por meio de neurônios denominados de primeira ordem. Esses neurônios realizam sinapses com neurônios de segunda ordem, os quais ascendem o trato espinotalâmico contralateralmente, se projetando até o tálamo, onde realizam sinapses com neurônios de terceira ordem, que, por fim, se projetam para o córtex somatossensorial, onde ocorre o complexo fenômeno da percepção da dor (Klaumann et al., 2008; Woolf, 2004).

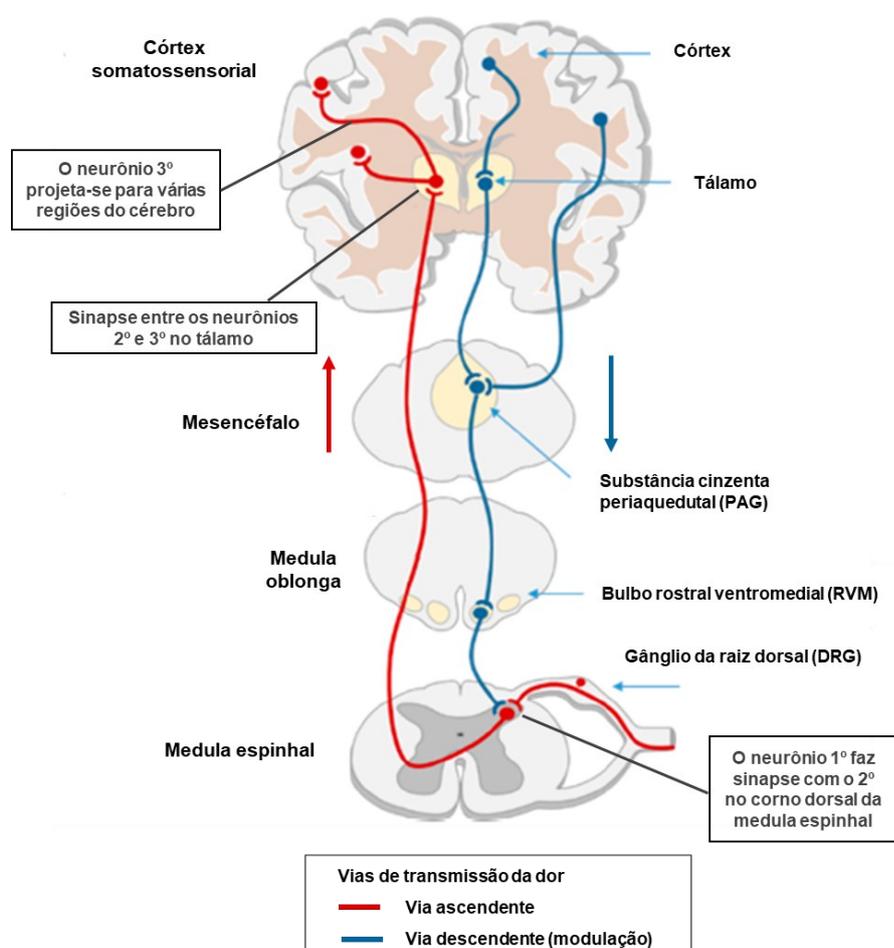


Figura 2. Representação esquemática das vias ascendente e descendente da dor. A transmissão da nociceção a partir do estímulo do tecido periférico para o sistema nervoso central ocorre através do trato espinotalâmico ascendente até o tálamo e depois para o córtex somatossensorial (vermelho). Os tratos inibitórios descendentes (azul) do cérebro e de outras regiões, modulam a nociceção (modificada de Cioffi, 2018).

A transmissão ascendente da dor pode sofrer influências modulatórias em vários pontos da via descrita, propiciando um aumento ou redução da transmissão dolorosa o que culmina com, respectivamente, uma maior ou menor sensação de

dor. Esse processo de modulação da dor inclui o sistema segmentar medular (teoria do portão da dor) e a via descendente da dor, que serão melhor explicados no tópico a seguir (Figura 2 – azul).

1.1.3 Vias de modulação da dor

Em 1965, Melzack e Wall formularam a “teoria do portão da dor” (Figura 3), a qual relatava a influência da estimulação cutânea tátil no alívio da dor. De acordo com essa teoria, no corno dorsal da medula espinhal, existe um sistema específico para a modulação da dor que controla a passagem dos impulsos nervosos oriundos das fibras nociceptivas periféricas para o sistema nervoso central, comportando-se, portanto, como um portão da dor (Melzack & Wall, 1965).

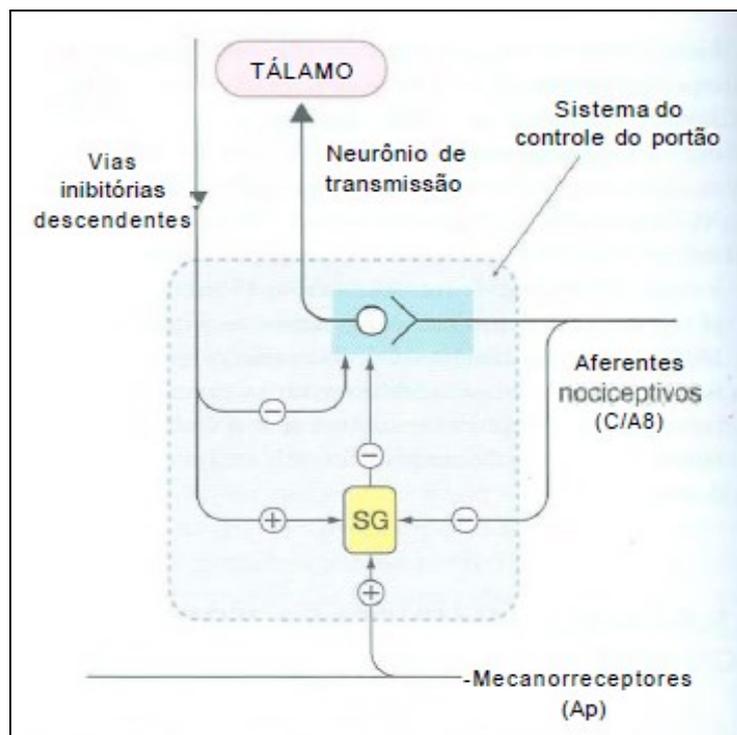


Figura 3. Representação esquemática da modulação da transmissão aferente nociceptiva. Mecanorreceptores / fibras A β (teoria do portão da dor) e os neurônios descendentes, quando estimulados, ativam interneurônios inibitórios na substância gelatinosa (SG) do corno dorsal da medula espinhal. Por outro lado, os mesmos interneurônios inibitórios são inibidos pelos aferentes nociceptivos (fibras C e A δ) (Rang et al., 2004).

A modulação da dor ocorre devido à estimulação de fibras táteis (A β) que ativam interneurônios inibitórios presentes na substância gelatinosa do corno dorsal

da medula espinhal, os quais, por sua vez, diminuem a transmissão nociceptiva. Por outro lado, a estimulação das fibras nociceptivas (A δ e C) inibe os interneurônios inibitórios, facilitando a chegada da informação nociceptiva nos neurônios secundários. Dessa forma, o balanço entre a atividade das fibras periféricas nociceptivas e táteis no corno dorsal da medula espinhal define o grau de supressão dos sinais dolorosos aferentes e, portanto, a percepção dolorosa a ser evocada (Millan, 1999; 2002).

Além do controle espinhal, evidenciado pela teoria do portão da dor, a via ascendente também é modulada pelo sistema nervoso central (SNC) que é capaz de inibir ou facilitar as informações nociceptivas que chegam ao cérebro (Millan, 2002). A primeira evidência de regulação supraespinhal foi apresentada em 1969 por Reynolds, que demonstrou que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (PAG) era capaz de induzir processos analgésicos em ratos, na ausência de anestésicos, sem o comprometimento da responsividade motora geral (Reynolds, 1969). Posteriormente, outras estruturas supraespinhais que participam das vias descendentes modulatórias foram identificadas, dentre elas podemos citar o hipotálamo, o núcleo rostral ventromedial e o locus coeruleus (Millan, 2002). A partir das evidências experimentais demonstrando a modulação da percepção dolorosa, diversos neurotransmissores passaram a ser pesquisados contribuindo para uma melhor compreensão dos múltiplos sistemas endógenos envolvidos no controle da dor (Ossipov, 2012; Sandkühler, 1996). Diversos mediadores químicos partícipes da via descendente já foram descritos, como por exemplo, opioides endógenos (Watkins & Mayer, 1982), endocanabinoides (Lichtman et al., 1996), óxido nítrico (Millan, 2002), noradrenalina (Millan, 2002), serotonina (Millan, 1995) e dopamina (Wood, 2008). Além do controle medular e supramedular, mecanismos periféricos também estão envolvidos na modulação da dor, e esse controle será objeto de estudo nesse trabalho.

1.2 Ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs)

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) abrangem as famílias de ácidos graxos ômega-3 [ácido araquidônico (AA)] e ômega-6 [ácido eicosapentaenoico

(EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA)], e podem ser metabolizados via ciclooxigenase (COX), lipoxigenase (LOX) e citocromo P450 (CYP) dando origem a produtos biologicamente ativos, também conhecidos como oxilipinas (Du et al., 2020).

A metabolização via CYP dos AGPIs, origina os ácidos graxos epoxigenados (AGEPs), que por sua vez são majoritariamente degradados pela enzima epóxido hidrolase solúvel (EHs) (Wagner et al., 2014a). O crescente relato das mais diversas atividades biológicas descritas para os AGEPs, representou uma mudança na compreensão que se tinha de que lipídeos eram considerados meramente componentes estruturais ou de reserva energética. Atualmente tem-se conhecimento de que os AGEPs desempenham papéis biológicos importantes, como na modulação da transmissão de sinal (Chalon et al., 2001; Wassall et al., 2004). No entanto, diferentemente dos neurotransmissores, os lipídeos não são armazenados em vesículas ou liberados delas, mas sim sintetizados *de novo* ou liberados de bicamadas de membrana mediante estimulação (Wagner et al., 2011b; Wang & Ueda, 2009).

O ácido araquidônico (AA) é originado a partir da membrana fosfolipídica e desempenha um papel crucial na sinalização celular. Após estimulação celular, o AA é liberado mediante a ação de várias enzimas, incluindo a fosfolipase A2 (PLA2), e o AA intracelular livre é rapidamente metabolizado por uma série de enzimas em um processo denominado coletivamente de cascata do AA (Zeldin, 2001). Existem três principais vias dessa cascata: a via da COX, da LOX e a CYP (Meirer et al., 2014). A via da COX dá origem às prostaglandinas, tromboxanas e prostaciclina (Smith et al., 1996), enquanto a via da LOX origina leucotrienas, ácidos hidroieicosatetraenoicos (HETEs) e lipoxinas (Brash, 1999). Tanto a via da COX quanto a da LOX têm sido extensivamente estudadas e os seus produtos apresentaram um papel importante em vários processos biológicos tais como a inflamação, proliferação celular e sinalização intracelular. Além disso, uma variedade de drogas aprovadas para o uso terapêutico tem como alvo essas duas vias. Em contrapartida, o conhecimento da via CYP é bastante limitado e ainda não foi explorado terapêuticamente (Zhang et al., 2014).

A via CYP (Figura 4), primeiro descrita em 1980, é responsável pela conversão do AA em duas classes de substâncias: os ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos (HETEs) e os EETs. As CYP hidroxilases catalisam a hidroxilação do AA gerando os ácidos 19-HETE e 20-HETE (Kroetz & Xu, 2005). No outro ramo da via CYP, as CYP epoxigenases catalisam a epoxidação das duplas ligações do AA para gerar EETs, que incluem quatro regioisômeros (Figura 5; 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET), de acordo com qual das quatro duplas ligações do AA a epoxidação ocorra (Zeldin, 2001).

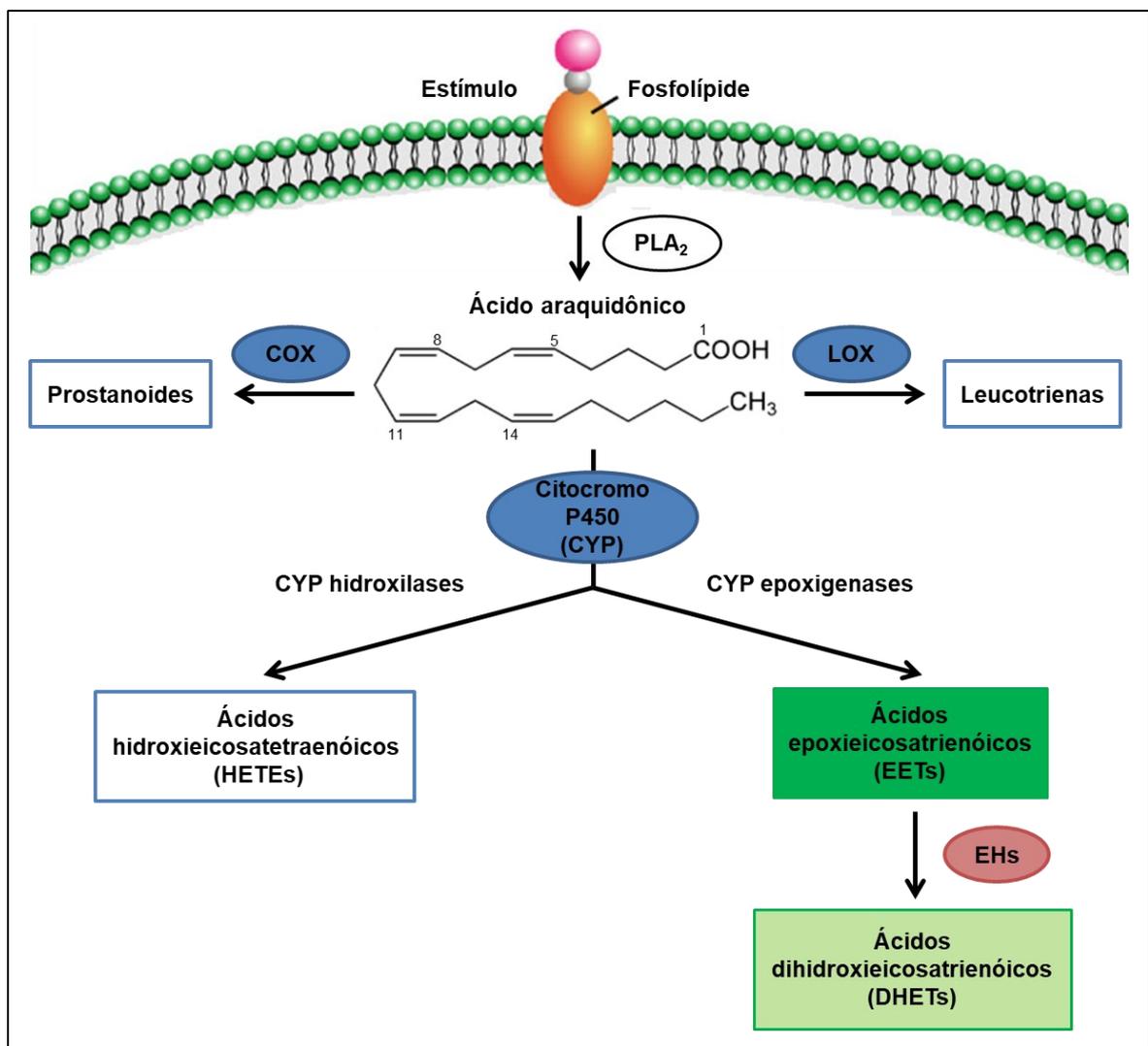


Figura 4. Via do citocromo P450 (CYP) na cascata do ácido araquidônico, originando duas classes de substâncias: os ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos (HETEs) e os ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs). COX = ciclooxigenase, LOX = lipoxigenase e EHs = enzima epóxido hidrolase solúvel (modificada de Panigrahy et al., 2010).

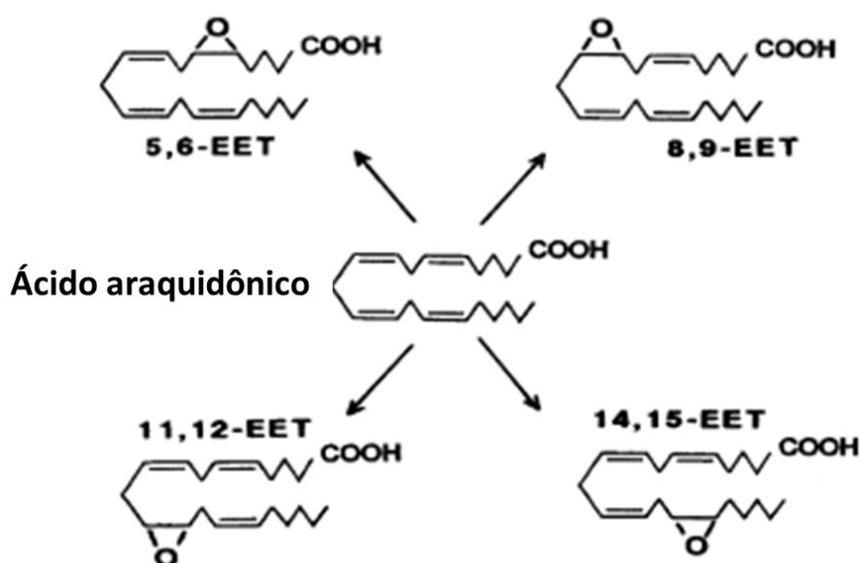


Figura 5. Estruturas químicas dos EETs sintetizados a partir do ácido araquidônico via CYP epoxigenases (modificada de Spector et al., 2004).

As epoxigenases responsáveis pela síntese dos EETs são pertencentes às famílias CYP2C e 2J (Imaoka et al., 2005; Wang et al., 2021). Essas enzimas podem ser encontradas em hepatócitos, cardiomiócitos, células endoteliais, células musculares lisas, células epiteliais, células ganglionares autônomas e células nervosas (Enayetallah et al., 2004). Muitas das atividades biológicas apresentadas pelos EETs são regioespecíficas, dessa forma a literatura sugere que diferentes isoformas dessas enzimas estejam presentes em diferentes tecidos ou órgãos, contribuindo para o entendimento dos papéis biológicos dos EETs nos diferentes tecidos (Node et al., 1999; Capdevila et al., 2000).

Os EETs são rapidamente metabolizados no organismo por uma diversidade de vias, sendo a mais importante a via da EHs (Newman et al., 2005). Essa enzima é responsável pela conversão dos EETs em ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHETs), que se acredita serem inativos ou menos ativos que os seus precursores. A EHs é composta por dois domínios: o domínio N-terminal exibe uma atividade de fosfatase que hidrolisa os fosfatos lipídicos, enquanto o domínio C-terminal exibe uma atividade de epóxido hidrolase que converte epóxidos em seus dióis correspondentes (Morisseau & Hammock, 2013). Inibidores farmacológicos da enzima EHs (IEHs) vêm sendo extensivamente estudados para benefícios sobre o

sistema cardiovascular, tendo como primeira indicação o tratamento da hipertensão (Imig & Hammock, 2009; Imig & Morisseau, 2020).

Existem várias abordagens para investigar as atividades biológicas dos EETs *in vitro* e *in vivo*. Estas abordagens incluem: (I) experimento com EETs sintéticos, utilizando agonistas e antagonistas; (II) inibição farmacológica das CYP epoxigenases; (III) inibição da EHs usando IEHs com diversas características estruturais; e (IV) animais *knockout* para a EHs. A partir do uso desses instrumentos ficou evidente que os EETs são moléculas de sinalização importantes para mediar e regular uma série de eventos, tais como a inflamação (Das Mahapatra et al., 2020; Wang et al., 2019), câncer (Guo et al., 2018), angiogênese (Rand et al., 2019) e doenças cardiovasculares (Imig, 2012; Zhang et al., 2014).

Apesar de um progresso considerável sobre relatos dos efeitos dos EETs e sobre a sua metabolização, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais essas substâncias produzem os seus efeitos biológicos. Até o presente momento, não existem receptores de EETs identificados. No entanto, estudos mostraram que os diferentes EETs se ligam com alta afinidade em locais específicos da membrana, sugerindo, portanto, a existência de diferentes isoformas de receptores de membrana, ligados a cascatas bioquímicas específicas, para os diferentes regioisômeros de EET, o que explicaria a variedade de ações dependendo do EET e do tipo específico de célula. Além disso, foi observado que os EETs têm a capacidade de regular a expressão de genes, logo um mecanismo intracelular também deve existir (Gauthier et al., 2004; Spector et al., 2004).

Dentre as várias ações biológicas dos EETs, no campo da dor a literatura apresenta efeitos controversos. Alguns estudos demonstram que os EETs são analgésicos, como no trabalho de Inceoglu *et al.* (2006) no qual observou-se uma redução da hiperalgesia térmica induzida por LPS. Terashvili *et al.* (2008), por sua vez, observaram que o 14,15-EET, mas não os demais EETs, produziu antinocicepção quando injetado na substância cinzenta periaquedutal, propondo um efeito analgésico central dos EETs. Por outro lado, Brenneis et al. (2011) mostraram que o 8,9-EET possui um efeito nociceptivo em um modelo inflamatório induzido por zymosan. Ademais, foi mostrado que o 5,6-EET causa uma hipersensibilidade mecânica à nível central (Sisignano et al., 2012).

Diante do exposto, esse estudo propõe verificar o efeito periférico dos EETs na nocicepção e seu controle, avaliando o efeito da administração exógena, bem como o efeito endógeno dessas substâncias, além do estudo dos diversos sistemas envolvidos na modulação da dor para os EETs que apresentaram efeito antinociceptivo.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A dor é um processo multifatorial relacionado a diversas condições patológicas, o que torna o seu tratamento uma questão complexa (Apkarian et al., 2005; Brodal, 2017; Freitas et al., 2009; Garland, 2013). A prevalência dos casos de dor está aumentando exponencialmente em todo o mundo, contribuindo para a piora na qualidade de vida da população (Mills et al., 2019). A dor é considerada uma questão de saúde pública, gerando um impacto monetário expressivo e levando a investimentos bilionários em serviços de saúde a nível mundial (Romanelli, 2017; Turk, 2002). Ademais, os analgésicos disponíveis hoje são ineficazes em proporcionar o alívio da dor em algumas condições, além de serem responsáveis pela ocorrência de efeitos adversos graves, como por exemplo os observados com o uso de opioides. Nesse cenário, o controle da dor é considerado uma prioridade terapêutica e o desmembramento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse processo é de suma importância.

Considerando dados já descritos na literatura sobre os efeitos dos EETs em diversas áreas, considera-se relevante uma abordagem do seu efeito na gênese e controle periférico da dor, buscando uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da dor. Dessa forma, pode-se oferecer subsídios para futuras pesquisas acerca de novas ferramentas para o controle da dor, especialmente nos tipos de dor refratárias aos tratamentos convencionais.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito periférico dos ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) sobre a nocicepção e os mecanismos envolvidos nesse evento, bem como sua participação no controle endógeno periférico da dor.

3.2 Objetivos específicos

- I. Verificar o efeito da administração intraplantar de 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET sobre o limiar nociceptivo, através de curvas dose-resposta;
- II. Estudar a participação dos sistemas opioidérgico, canabinoidérgico, nitrérgico e dos canais para potássio e cloreto envolvidos na modulação da dor para os EETs que apresentaram efeito antinociceptivo;
- III. Verificar o efeito dos EETs endógenos na modulação periférica da dor inflamatória e neuropática.
- IV. Avaliação dos níveis teciduais de EETs frente aos estímulos inflamatório e neuropático.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 30 e 40 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Cebio-ICB/UFMG). Esses animais foram alojados em caixas plásticas com forragem, tendo livre acesso à ração e água. Permaneceram em ambiente com temperatura controlada (23 a 25°C), em regime claro-escuro de 12 horas (07:00 - 19:00h). Os procedimentos utilizando modelo animal foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, com protocolo de nº 75/2017 (Anexo I).

Também foram utilizados camundongos C57BL/6 machos selvagens (WT) e *knockout* (KO) para a enzima EHs, que foram obtidos do *The Jackson Laboratory* (EUA), durante o meu estágio nos EUA. Esses camundongos foram acomodados de maneira similar aos Swiss. Todos os procedimentos utilizando os camundongos C57BL/6 foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais (IACUC, do inglês *Institutional Animal Care and Use Committee*) da Universidade da Califórnia – Davis, com protocolos de nº 21014 e 21509.

4.2 Drogas

Os diluentes e solventes de cada droga estão indicados nos respectivos gráficos.

4.2.1 Agentes hiperalgésicos

- Carragenina λ tipo IV (Sigma, EUA)
- Prostaglandina E₂ (Sigma, EUA)

4.2.2 Substâncias sob teste

- 5,6 - ácido epoxieicosatrienoico (5,6 - EET) (Cayman Chemical, EUA)
- 8,9 - ácido epoxieicosatrienoico (8,9 - EET) (Cayman Chemical, EUA)
- 11,12 - ácido epoxieicosatrienoico (11,12 - EET) (Cayman Chemical, EUA)
- 14,15 - ácido epoxieicosatrienoico (14,15 - EET) (Cayman Chemical, EUA)

4.2.3 Substâncias para avaliar a via opioidérgica

- Naloxona (Sigma, EUA): antagonista não seletivo dos receptores opioides.
- CTOP (Sigma, EUA): antagonista seletivo do receptor μ (mu) opioide.
- Naltrindole (Sigma, EUA): antagonista seletivo do receptor δ (delta) opioide.
- Nor-binaltorfimina (Sigma, EUA): antagonista seletivo do receptor κ (kappa) opioide.
- Bestatina (Alfa Aesar, EUA): inibidor da aminopeptidase, enzima que degrada peptídeos opioides endógenos.

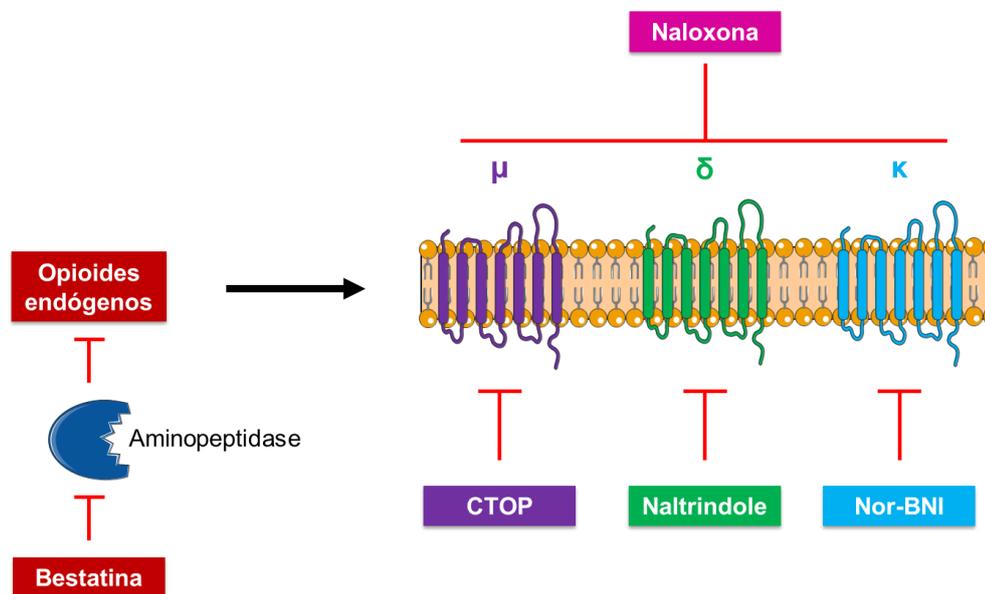


Figura 6. Esquema representativo da ação das substâncias que atuam na via opioidérgica. μ , receptor opioide do tipo μ . δ , receptor opioide do tipo δ . κ , receptor opioide do tipo κ . Nor-BNI, nor-binaltorfimina.

4.2.4 Substâncias para avaliar a via canabinoidérgica

- AM251 (Sigma, EUA): antagonista seletivo do receptor CB₁ canabinoide.
- AM630 (Sigma, EUA): antagonista seletivo do receptor CB₂ canabinoide.
- MAFP (Tocris, EUA): inibidor da enzima amida hidrolase de ácidos graxos (*FAAH*, do inglês *fatty acid amide hydrolase*).
- VDM11 (Tocris, EUA): inibidor do transportador membranar de anandamida.
- JZL184 (Tocris, EUA): inibidor da enzima monoacilglicerol lipase (*MAGL*).

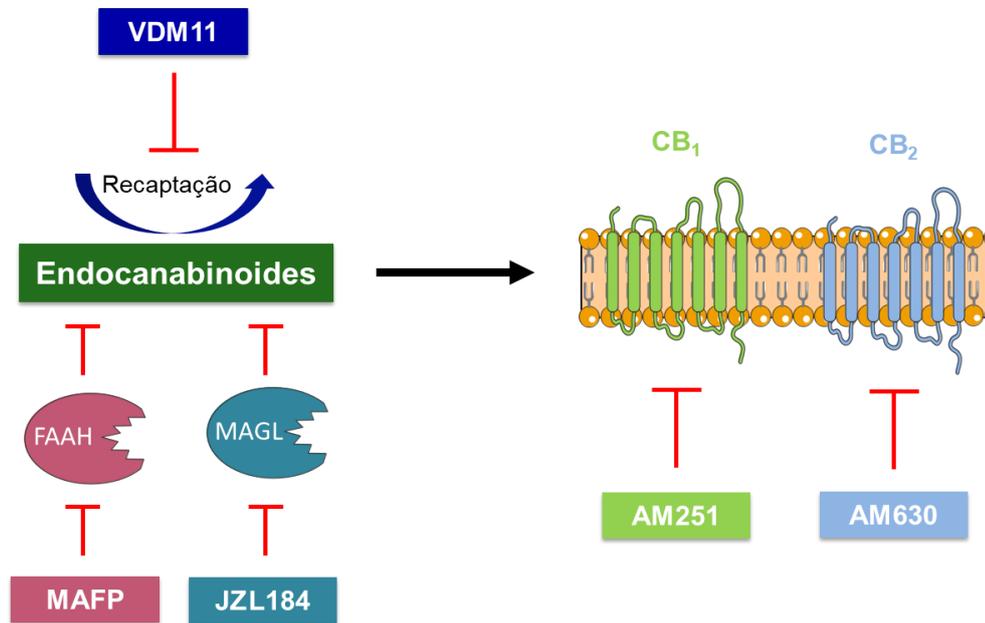


Figura 7. Esquema representativo da ação das substâncias que atuam na via canabinoide. CB₁ - receptor canabinoide do tipo 1. CB₂ - receptor canabinoide do tipo 2. FAAH, fatty acid amide hydrolase. MAGL, monoacilglicerol lipase.

4.2.5 Substâncias para avaliar a via nitrérgica

- L-NOArg (RBI, EUA): inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintases.
- L-NIL (Tocris, EUA): inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzível.
- L-NIO (Tocris, EUA): inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase endotelial.
- L-NPA (Tocris, EUA): inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal.
- ODQ (Tocris, EUA): inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel.
- Zaprinast (Cayman Chemical, EUA): inibidor seletivo da enzima fosfodiesterase específica do GMPc (PDE5 e PDE6).

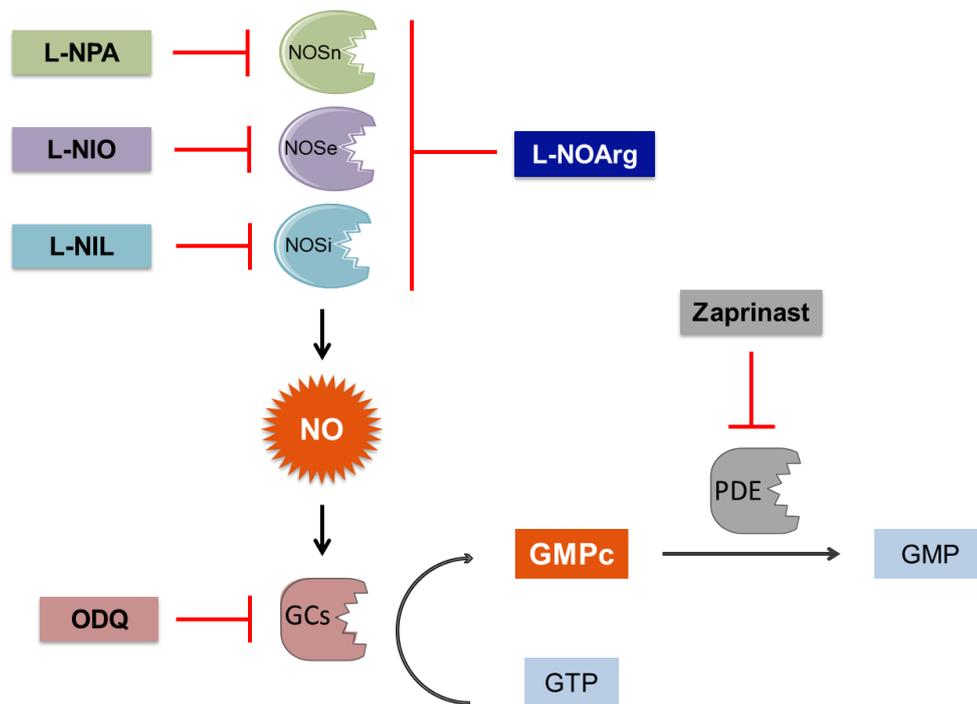


Figura 8. Esquema representativo da ação das substâncias que atuam na via nitrérgica. NOSn, NOSe, NOSi, óxido nítrico sintase neuronal, endotelial e induzível, respectivamente. GCs, guanilato ciclase solúvel. GTP, guanosina trifosfato. GMPc, monofosfato cíclico de guanosina. GMP, monofosfato de guanosina. PDE, fosfodiesterase.

4.2.6 Substâncias para avaliar os canais para potássio

- Glibenclamida (Sigma, EUA): bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP.
- Tetraetilamônio (Sigma, EUA): bloqueador dos canais para potássio dependentes de voltagem.
- Dequalínio (Sigma, EUA): bloqueador seletivo dos canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância.
- Paxilina (Sigma, EUA): bloqueador seletivo dos canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância.

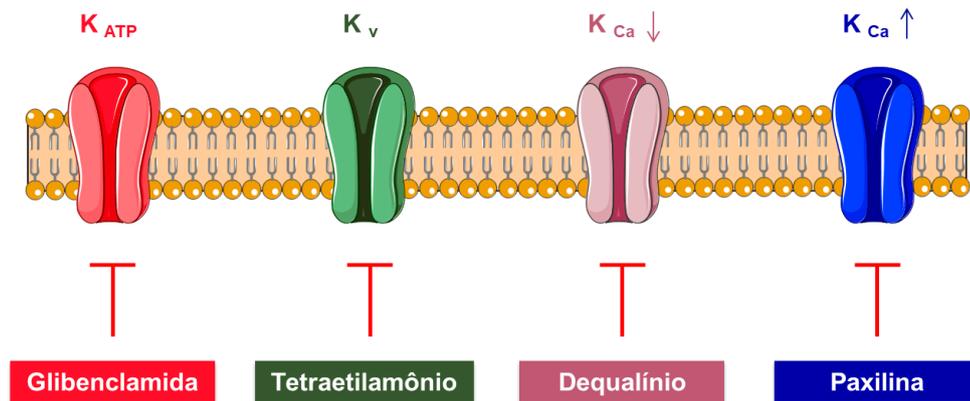


Figura 9. Esquema representativo da ação das substâncias que atuam nos canais para potássio. K_{ATP} , K_v , $K_{Ca\downarrow}$, $K_{Ca\uparrow}$, canais para potássio sensíveis ao ATP, dependentes de voltagem, ativados por cálcio de baixa condutância e ativados por cálcio de alta condutância, respectivamente.

4.2.7 Substâncias para avaliar os canais para cloreto

- Ácido niflúmico (Sigma, EUA): bloqueador dos canais para cloreto ativados por cálcio.

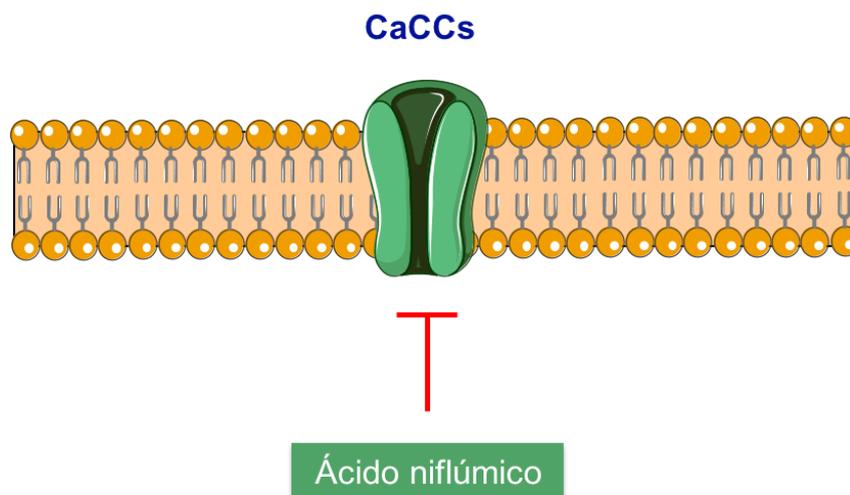


Figura 10. Esquema representativo da ação do bloqueador dos canais para cloreto ativados por cálcio (CaCCs).

4.2.8 Substâncias para avaliar o efeito dos EETs endógenos

- 14,15-EE-5(Z)-E (Cayman Chemicals, EUA): antagonista não seletivo dos receptores dos EETs.

- MS-PPOH (Cayman Chemicals, EUA): inibidor específico das enzimas epoxigenases do citocromo P450.
- TPPU (Cayman Chemicals, EUA): inibidor da enzima epóxido hidrolase solúvel (EHs).

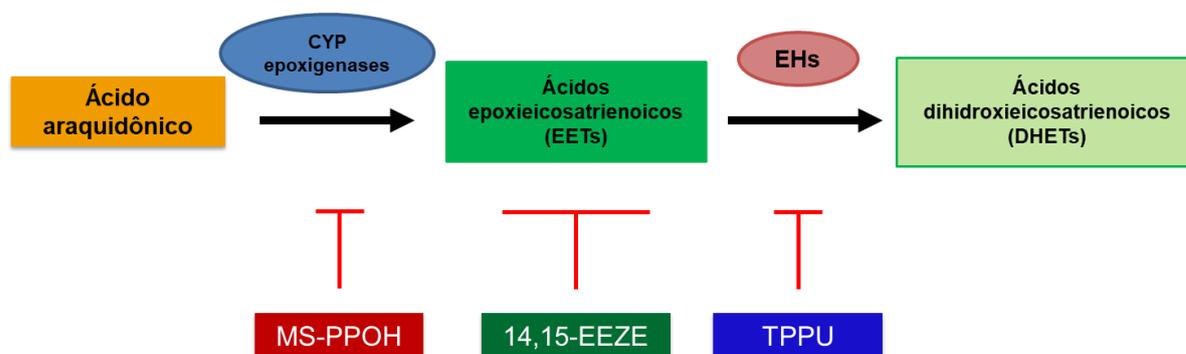


Figura 11. Esquema representativo da ação das substâncias que atuam na formação dos EETs endógenos. CYP, citocromo P450. EHs, enzima epóxido hidrolase solúvel.

4.3 Administração das drogas

Todas as drogas foram administradas por via subcutânea na superfície plantar (via intraplantar) da pata posterior de camundongos, em um volume de 20 μ L por pata. A pata posterior direita foi utilizada em todos os experimentos, exceto para o teste de exclusão de um possível efeito sistêmico, em que foram utilizadas ambas as patas posteriores.

4.4 Modelo de Indução de Dor Neuropática: Constrição do Nervo Ciático (CCI)

A técnica cirúrgica que foi empregada para estudar a dor neuropática é a constrição do nervo ciático (CCI, do inglês *chronic constriction injury*), adaptada de Bennett & Xie (1988) para camundongos. Nesse procedimento, os camundongos foram previamente anestesiados com cloridrato de ketamina 10% (Dopalen, Vetbrands, Brasil) na dose de 100 mg/Kg e cloridrato de xilazina 2% (Dopaser, Calier, Brasil) na dose de 5 mg/Kg, injetados por via intraperitoneal em um volume final de 100 μ L de solução. Imediatamente após estarem anestesiados, foi realizada uma tricotomia, por epilação manual, da região lateral da coxa direita. O animal foi, então, posicionado em decúbito lateral, de forma que toda a região dorsolateral do

quadril direito e a região lateral da coxa ficaram expostas. Após a assepsia da pele com álcool, foi realizada uma incisão longitudinal na pele, paralelamente ao fêmur, sobre os músculos bíceps femoral e vasto lateral. Em seguida, divulsionou-se os músculos dessa região com a finalidade de localizar e expor o nervo ciático. Duas ligaduras frouxas, com fio de seda 4.0, foram colocadas ao redor do nervo, separadas uma da outra por aproximadamente dois milímetros (Figura 12). A seguir, a ferida cirúrgica foi suturada com fio de nylon agulhado 5.0. Logo após o processo cirúrgico, os animais receberam uma injeção intramuscular de pentabiótico veterinário (Zoetis, Brasil) na dose de 400.000 UI/Kg, a fim de se minimizar qualquer eventual infecção. Os animais foram monitorados atentamente durante e após o procedimento cirúrgico até o momento da recuperação anestésica.

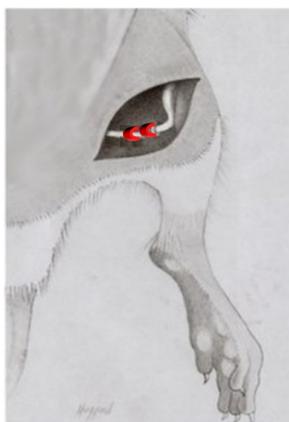


Figura 12. Constrição do nervo ciático (CCI). Ilustração do nervo ciático com o local (em vermelho) onde foi realizada a ligadura frouxa do mesmo com fio de seda 4.0 (adaptada de Vasudeva et al., 2014).

Nota-se que esse procedimento foi igual para os camundongos Swiss e C57BL/6, com exceção do procedimento da anestesia. Os camundongos C57BL/6 foram submetidos à anestesia inalatória em uma câmara de indução com 1-5% de isoflurano em oxigênio (O₂) e, em seguida, mantidos com 1-3% de isoflurano em O₂ por meio de uma máscara facial personalizada até o término da cirurgia.

Os grupos experimentais foram divididos em “operado” e “sham”. Os animais do grupo “operado” foram submetidos a todo o procedimento cirúrgico explicado acima, enquanto os animais do grupo “sham”, ou falso-operado, foram submetidos a todos os procedimentos experimentais realizados no grupo “operado”, exceto a

ligadura do fio de seda ao redor do nervo ciático, ou seja, não houve a constrição do nervo ciático nesse grupo, tendo esse servido como controle.

4.5 Teste algesimétrico: mensuração do limiar nociceptivo mecânico na pata de camundongos

O método de retirada da pata submetida à compressão, descrito originalmente por Randall & Selitto (1957) para ratos e, posteriormente, adaptado para camundongos por Kawabata et al. (1992), foi utilizado para a mensuração do limiar nociceptivo mecânico em camundongos.

Para esse teste foram utilizados analgesímetros das marcas Ugo Basile (Figura 13A) e IITC Life Science (Figura 13B). O aparelho da marca Ugo Basile foi utilizado nos experimentos com camundongos Swiss, enquanto o da IITC foi utilizado com camundongos C57BL/6 devido à disponibilidade dos aparelhos nos diferentes laboratórios em que foram realizados os experimentos. Para o teste algesimétrico, faz-se a contenção do animal em posição horizontal sobre a bancada com uma das mãos do experimentador, enquanto a superfície plantar da pata a ser estudada é exposta e posicionada sob a 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, por meio da qual é aplicada uma pressão na superfície plantar da pata do animal. Para o aparelho da Ugo Basile, a intensidade da pressão exercida sobre a pata aumenta mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador. Diferentemente, no instrumento da marca IITC Life Science, o experimentador deve aplicar a pressão na pata do animal fechando o aparelho com a mão, em um movimento de pinça. Deve-se ter atenção e treinamento adequado para aumentar a força de maneira gradual. Ao observar uma resposta nociceptiva do animal, padronizada como o reflexo de retirada da pata, o experimentador desaciona o pedal e verifica, na escala numérica do aparelho, o peso suportado pelo animal (em gramas), definida então, como o limiar nociceptivo. O valor de 160 g foi usado como valor de corte para reduzir a possibilidade de causar uma lesão na pata dos camundongos.

É importante salientar que o animal passa por uma ambientalização ao aparelho nos dois dias que antecedem o teste. Esse processo consiste em submeter a pata do animal ao aparelho até que ele não apresente uma reação de fuga à condição experimental a que foi exposto. Dessa forma, no dia do teste o animal apresentará o movimento de retirada da pata devido a uma resposta nociceptiva e não como fuga à condição imposta.

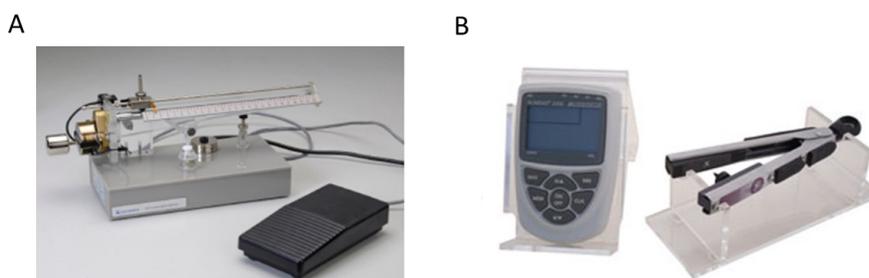


Figura 13. Analgesímetros das marcas (A) Ugo Basile (B) e IITC Life Science.

4.6 Análise da marcha pelo *CatWalk*

A marcha dos camundongos C57BL/6 submetidos à cirurgia de constrição do nervo ciático foi avaliada utilizando o equipamento e o programa *CatWalk* XT 10.0 (Noldus; Figura 14). Esse equipamento é constituído por uma plataforma elevada de vidro fechada, iluminada com luzes vermelha e verde, respectivamente, no teto e chão da passarela de vidro. À medida que o animal caminha ao longo da plataforma, as suas pegadas são registradas a partir da luz refletida internamente no vidro e capturadas por uma câmera posicionada abaixo da plataforma de vidro. O *software* do programa *CatWalk* é capaz de fornecer inúmeros parâmetros relacionados à marcha com base nesses registros, sendo avaliados os seguintes parâmetros: a área plantar, a intensidade média de contato da pata com a superfície, a duração da fase de apoio (tempo gasto com a pata apoiada na plataforma) e duração da fase de balanço (tempo gasto sem a pata apoiada).

Para a avaliação motora, o camundongo foi colocado em uma das extremidades da plataforma e caminhou espontaneamente até atingir a outra extremidade, sendo considerado finalizado o teste após três corridas completas (atravessando a passarela de um lado para o outro) e o resultado foi representado pela média dos valores dos parâmetros das três corridas. Essa análise foi realizada

em três momentos: (i) antes da cirurgia de constrição do nervo ciático, (ii) 12 dias após a cirurgia, porém antes de qualquer tratamento, e (iii) após o tratamento. Ressalta-se que o animal passa por uma ambientalização ao aparelho nos dois dias que antecedem o teste e no dia do teste antes da primeira medida. Esse processo consiste em colocar o animal na plataforma durante 15 minutos com o aparelho ligado para que ele se habitue ao aparelho e sua iluminação. Dessa forma, durante o teste o animal caminhará espontaneamente de uma extremidade à outra da plataforma de vidro.

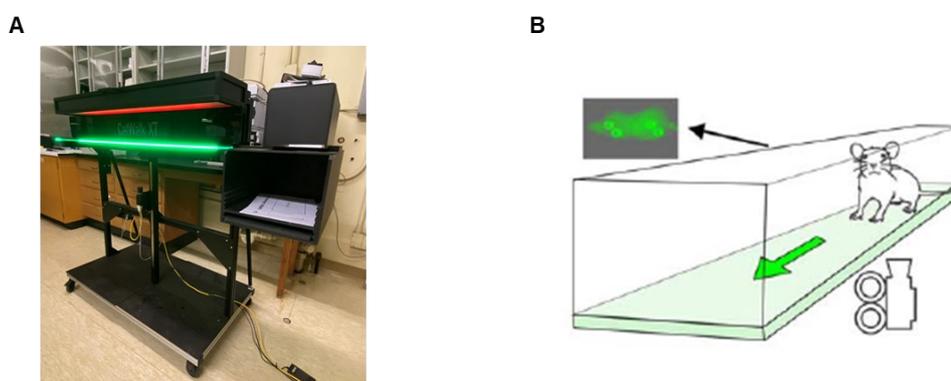


Figura 14. Representação do equipamento *CatWalk* (A) e do caminho percorrido pelo animal nesse aparelho (B). Esse equipamento é constituído por uma plataforma elevada de vidro iluminada com luzes vermelha e verde, que compõem o caminho pelo qual o animal percorre. As pegadas são registradas pela câmera posicionada abaixo da plataforma (adaptada de Deus et al., 2017).

Os ajustes do programa *CatWalk* foram da seguinte forma: 28,0 cm de distância entre a plataforma e a câmera; 15,0 dB de ganho de câmera, 17,5 e 16,5 V das luzes vermelha e verde, respectivamente; e cerca de 0,20 de intensidade de luz verde, sendo que esse parâmetro é variável e pode ser reajustado no momento das análises após as corridas. Além disso, foi estabelecido um critério de duração da corrida entre 1 e 6 segundos, e a uma variação de velocidade máxima permitida de 60%. Os dados são calculados como a mudança percentual do parâmetro avaliado resultante da razão entre a pata direita e a pata esquerda (PD/PE), no qual o valor antes da CCI é definido como 100%. Observe que a PD é a pata operada, ipsilateral, e PE é a pata esquerda, contralateral.

4.7 Análise da expressão de dinorfina através da técnica de imunofluorescência

O padrão de expressão da dinorfina na pata posterior dos camundongos foi realizado por ensaios de imunofluorescência. Para tal, foram coletados o tecido dos coxins plantares das patas posteriores direitas dos camundongos submetidos a hiperalgesia induzida pela prostaglandina E₂, seguido do posterior tratamento com os EETs ou seus veículos.

Após a administração de sobre dose de anestésico (solução de ketamina 300 mg/Kg e xilazina 15 mg/Kg), os animais foram submetidos à perfusão cardíaca com solução de ringer bicarbonato, seguido por perfusão com formalina neutra tamponada a 10% (fixador). Após fixação, os coxins plantares foram coletados, lavados com salina tampão fosfato (PBS) para remoção do fixador, desidratado em série crescente de etanol, diafanizado em xilol e incluído em parafina (Histotec® Pastilles – Merck, Alemanha). Após inclusão dos tecidos, foram obtidos cortes de 5 µm de espessura, utilizando micrótomo (Leica Biosystems, EUA), e os cortes foram colocados em lâminas histológicas previamente silanizadas.

No processo da imunofluorescência, os tecidos foram desparafinizados em xilol, hidratados em série crescente de etanol, e lavados com água destilada e solução de PBS. Em seguida, os tecidos foram submetidos à recuperação antigênica, pelo aquecimento dos cortes em forno micro-ondas, em solução de tampão citrato 0,1M pH 6,0. Após resfriamento dos cortes em temperatura ambiente, os mesmos foram lavados em PBS e permeabilizados com solução de tampão (PBS) contendo triton X-100 0,5% (v/v) e lavados novamente com PBS. Os tecidos foram incubados com solução mix de bloqueio, contendo soro normal de cabra 5% e BSA 1% por 90 min para bloqueio de ligações inespecíficas, antes de serem expostos ao anticorpo primário. Foi utilizado o anticorpo primário policlonal de coelho anti-Dinorfina A (Abcam, ab82509) diluído 1:500 em PBS 1%, *overnight* a 4°C. Para os controles negativos, os cortes foram incubados em PBS em substituição aos anticorpos primários. Os cortes foram lavados com PBS e incubados, por 90 min, com anticorpo secundário cabra anti-coelho Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A-11008), com emissão de fluorescência verde, diluído 1:100 em BSA 1%. Seguiu-se lavagem com PBS e foi

realizada a marcação nuclear com uso de 4,6-diamidino-2-phenylindole staining (DAPI), seguida de nova lavagem com PBS e montagem das lâminas para análise.

As secções histológicas foram analisadas utilizando-se microscópio Zeiss ApoTome com lasers e filtros específicos para detecção da fluorescência para FITC (verde) ou DAPI (azul).

4.8 Detecção e mensuração dos níveis endógenos de EETs através da técnica de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC/MS-MS)

A extração e quantificação de oxilipinas, dentre elas os EETs, na pata posterior dos camundongos foi realizada como descrito por Yang et al. (2009; 2019). Para tal, foram coletados o tecido dos coxins plantares das patas posteriores de camundongos submetidos aos modelos de dor inflamatória e neuropática, e tratados com os inibidores da síntese e degradação dos EETs ou seus veículos.

A primeira etapa do preparo das amostras para a extração consistiu em pesar os coxins plantares e adicionar as seguintes soluções: 10 µL de antioxidante (0,02% de trifetilfosfina (TEP), hidroxitolueno butilado (BHT) e 0,1% de EDTA), 20 µL de solução de padrões internos incluindo 9 oxilipinas marcadas com isótopos (d_4 PGF $_{1\alpha}$, d_4 PGE $_2$, d_4 TXB $_2$, d_4 LTB $_4$, d_6 20 HETE, $d_{11}14,15$ DiHETrE, d_8 9 HODE, d_8 5 HETE e $d_{11}11,12$ EpETrE), 400 µL de metanol gelado com 0,1% de ácido acético e 0,1% de BHT. Após agitação no vórtex por 1 minuto, as amostras foram armazenadas a -80°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se duas esferas de metal em cada tubo de amostra e procedeu-se com a homogeneização automática a 30 Hz durante 20 minutos, armazenando novamente as amostras a -80°C *overnight* até a extração em fase sólida (SPE).

Para a extração em fase sólida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 4°C e 10.000 rpm e o sobrenadante foi coletado. Em seguida lavou-se o sedimento com 100 µL de metanol gelado com 0,1% de ácido acético e 0,1% de BHT, agitou-se no vórtex por 1 minuto e centrifugou novamente. O sobrenadante foi coletado e combinado com o anterior, sendo então diluídos em 1,5 mL de água mili-Q.

A segunda etapa do preparo das amostras para a extração consistiu no preparo da coluna SPE (Oasis HLB, 3cc, 60mg) (Figura 15A). Inicialmente lavou-se

as colunas com 1 coluna (3 mL) de acetato de etila seguido por 2 colunas (6 mL) de metanol. Em seguida, equilibrou-se as colunas com 6 mL de solução de lavagem (5% metanol, 0,1% ácido acético em água) e o fluxo foi interrompido quando o líquido estava a 0,5 cm acima da fase sólida, tendo-se atenção para não deixar as colunas secarem.

Na última etapa que consistiu na extração das amostras, as mesmas foram adicionadas às colunas SPE equilibradas e deixadas em repouso por 5 minutos com as válvulas fechadas. Após esse tempo, completou-se as colunas com solução de lavagem, abriu-se as válvulas e procedeu-se com a lavagem da coluna com mais 6 mL de solução de lavagem. Em seguida, secou-se as colunas com alto vácuo durante 20 minutos e limpou-se as pontas do aparato contendo as colunas SPE. Prosseguiu-se para a eluição utilizando 0,5 mL de etanol seguido de 1,5 mL de acetato de etila, empregando baixo vácuo para obter até as últimas gotas em tubos de eppendorf contendo 10 μ L de solução de armadilha (30% de glicerol). Os eppendorfs foram então colocados em um concentrador à vácuo durante cerca de 2 horas e, após completamente secos, foram reconstituídos em 50 μ L de solução de padrão interno (CUDA 200 nM), filtrados utilizando um ultrafiltro de 0,2 μ m e finalmente transferidos para vials para posterior leitura no sistema de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC/MS-MS).

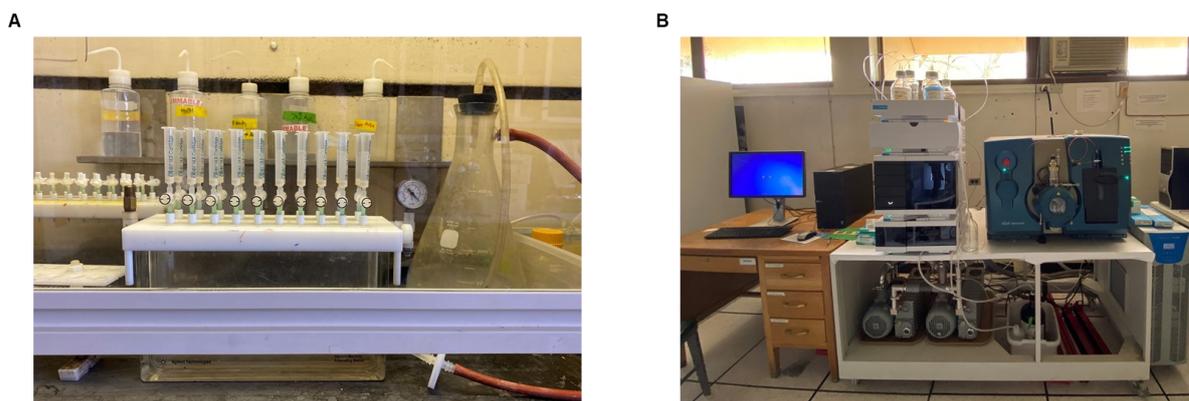


Figura 15. Equipamentos utilizados para a quantificação de oxilipinas. (A) Aparato contendo as colunas de extração em fase sólida (SPE) para a extração de oxilipinas de tecidos e **(B)** Aparelhagem para realização da cromatografia, espectrometria de massas e análise por *software*.

Após a extração, as amostras foram analisadas usando o sistema LC/MS-MS (Milford, EUA) acoplado para o sistema AB Sciex 6.500 QTrap (EUA) (Figura 15B). O equipamento nos fornece a quantidade de oxilipinas na concentração de nanomolar (nM) e o *software* utilizado para análise foi o *Analyst* 1.6.3 que permite encontrar a concentração de cada oxilipina de acordo com a curva padrão e os picos de cada amostra. A quantidade de oxilipinas foi expressa em picomoles por grama de peso do tecido. A dosagem de EETs foi realizada na *University of California – Davis* (UC Davis), em Davis, Califórnia, Estados Unidos.

4.9 Procedimento experimental

O procedimento experimental foi realizado conforme diagrama localizado na parte superior de cada um dos gráficos apresentados na seção de resultados. O tempo de injeção das drogas, bem como suas doses, foram baseados em experimentos preliminares e dados da literatura.

4.9.1 Efeito dos EETs exógenos sobre a nocicepção periférica induzida pela prostaglandina E₂ e os mecanismos envolvidos nesse evento

Para o conjunto de experimentos referente à essa seção foi utilizada a prostaglandina E₂ (PGE₂) como agente hiperalgésico, em camundongos Swiss, e foi realizada a mensuração do limiar nociceptivo mecânico utilizando o método de retirada da pata submetida à compressão.

Nos experimentos de observação do efeito dos EETs frente a hiperalgisia induzida pela PGE₂ ao longo do tempo, ou seja, nos experimentos de curvas temporais, foi utilizado o limiar nociceptivo medido em tempos pré-definidos (Figura 16).

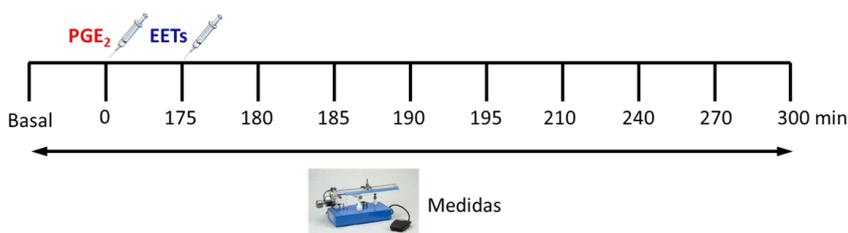


Figura 16. Protocolo experimental para a avaliação temporal do efeito dos EETs.

Enquanto nos experimentos de avaliação dos sistemas envolvidos na antinocicepção induzida pelos EETs, utilizou-se o Δ do limiar nociceptivo, que diz respeito à diferença do limiar nociceptivo obtido no início do experimento antes de qualquer injeção (valor basal), em relação ao limiar medido após 180 min (tempo em que se observa o efeito máximo da PGE₂) (Figura 17). Os limiares foram sempre medidos três vezes, sendo o resultado expresso como a média dessas medidas.

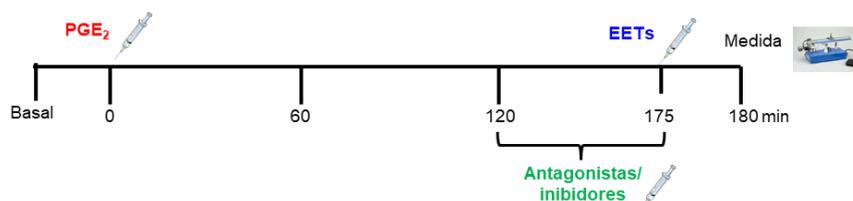


Figura 17. Protocolo experimental para a avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na antinocicepção periférica induzida pelos EETs.

Para a exclusão de um possível efeito sistêmico, a PGE₂ foi administrada, no tempo 0 min, na pata posterior direita (PD) e esquerda (PE) dos animais, ao passo que os EETs, em suas doses máximas, foram administrados após 175 min apenas na PD e seu veículo na PE. Medições do limiar nociceptivo de ambas as patas foram feitas, antes e após 180 min da injeção da PGE₂ e em seguida foi calculada a diferença entre as médias destas medições (Δ do limiar nociceptivo).

Adicionalmente, coletou-se os coxins plantares dos camundongos submetidos a hiperalgesia com a PGE₂ e tratados com cada EET separadamente ou seus veículos, para posterior avaliação da expressão de dinorfina por meio da técnica de imunofluorescência.

4.9.2 Efeito dos EETs endógenos no controle periférico da dor inflamatória e da dor neuropática

Para o conjunto de experimentos referente à essa seção foram utilizados camundongos das linhagens Swiss e C57BL/6, submetidos ao modelo de dor inflamatória induzido pela injeção intraplantar de carragenina (CG), e o modelo de dor neuropática induzido pela cirurgia de constrição do nervo ciático (CCI).

Para avaliar a participação dos EETs endógenos no controle periférico dos tipos de dor mencionados acima, utilizou-se inibidores da síntese (MS-PPOH) e degradação (TPPU) dessas substâncias, bem como seus antagonistas farmacológicos (14,15-EEZE). Sendo que nos experimentos utilizando os inibidores da síntese dos EETs e seu antagonista farmacológico, utilizou-se a dose intermediária de CG (100 µg/pata) e um dia intermediário ao estabelecimento da neuropatia (6º dia após a cirurgia). Sendo assim, a escolha de um efeito hiperalgésico de menor intensidade e, portanto, passível de ser potencializado, possibilitou a observação de um aumento da resposta nociceptiva (Figura 18).

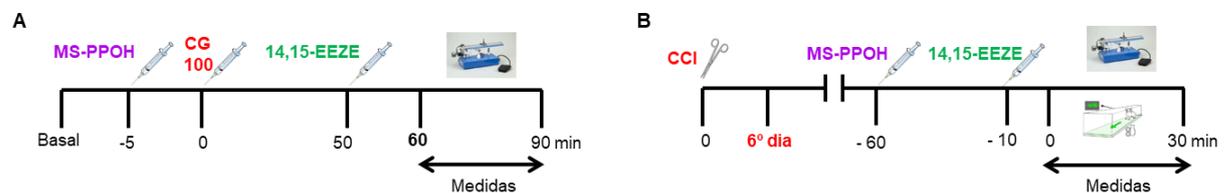


Figura 18. Protocolo experimental para avaliação do efeito do inibidor da síntese e antagonista farmacológico dos EETs frente a (A) dor inflamatória e a (B) dor neuropática.

Por outro lado, nos experimentos utilizando o inibidor da degradação dos EETs, utilizou-se uma dose máxima de CG (200 µg/pata) e o dia no qual a dor neuropática já estava estabelecida (12º dia após a cirurgia). Dessa forma, com o efeito hiperalgésico máximo, foi possível observar uma redução da resposta nociceptiva (Figura 19).

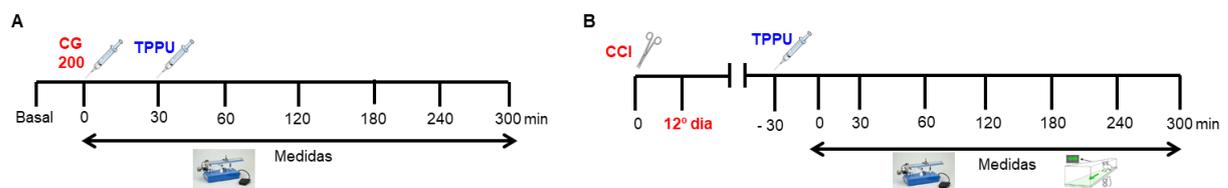


Figura 19. Protocolo experimental para avaliação do inibidor da degradação dos EETs frente a (A) dor inflamatória e a (B) dor neuropática.

Foi realizada a mensuração do limiar nociceptivo mecânico utilizando o método de retirada da pata submetida à compressão em ambas as linhagens de camundongos sendo obtido o limiar nociceptivo dos animais em tempos pré-definidos. Os limiares foram sempre medidos três vezes, sendo o resultado expresso como a média dessas medidas.

Além disso, realizou-se a análise da marcha dos camundongos C57BL/6, WT e *knockout* para a enzima EHs, submetidos à dor neuropática utilizando o *CatWalk*. Essa análise foi realizada antes da cirurgia de constrição do nervo ciático, 12 dias após a cirurgia, porém antes de qualquer tratamento, e após o tratamento. O resultado foi representado pela média dos valores dos parâmetros avaliados após três corridas completas (atravessando a passarela de um lado para o outro).

Adicionalmente, coletou-se os coxins plantares dos camundongos Swiss submetidos aos modelos de dor inflamatória e neuropática e tratados com os inibidores da síntese ou degradação dos EETs para posterior avaliação dos níveis teciduais dos EETs endógenos por meio da técnica de LC-MS/MS.

4.10 Análise estatística dos resultados

Para o cálculo estatístico do n amostral utilizou-se os seguintes parâmetros: desvio padrão (σ) = 12,688; poder de teste de 80% (Z_{β} = 0,84); nível de significância alfa = 0,05 (Z_{α} = 1,64); e erro absoluto (E) = 25 g; sendo obtido o valor de 4 animais por grupo (Sampaio, 2015).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais e controle. O programa GraphPad Prism 8.0.2 foi utilizado para a confecção dos gráficos e para a realização da análise estatística.

Os resultados obtidos foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) das medidas e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni, para comparação entre os grupos. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Efeito dos EETs frente a nocicepção induzida por prostaglandina E₂ na pata de camundongos

A fim de avaliar o possível efeito antinociceptivo periférico induzido pelos diferentes EETs, utilizou-se curvas dose-resposta, ao longo do tempo, frente a administração de prostaglandina E₂ (PGE₂). A administração intraplantar de 5,6-, 8,9- e 11,12-EET (32, 64 e 128 ng) ou 14,15-EET (128, 256 e 512 ng), cinco minutos antes da terceira hora após a injeção de PGE₂ (pico de ação dessa substância), produziu uma resposta antinociceptiva dependente da dose. Todos os EETs avaliados apresentaram um perfil semelhante de resposta, embora o 14,15-EET, apesar de possuir a mesma eficácia, ser menos potente que os demais. Os EETs apresentaram pico de ação 5 minutos após a sua administração e esse efeito foi diminuindo, concomitante a uma redução no efeito nociceptivo da PGE₂, até cerca de 100 min após a sua administração (270 min após a injeção de PGE₂). A dose máxima de cada EET reverteu completamente a hiperalgesia induzida pela PGE₂, porém essas mesmas doses não alteraram significativamente o limiar nociceptivo basal sem a presença do estímulo nociceptivo (PGE₂) (Figuras 20,22,24 e 26).

Para excluir possíveis efeitos sistêmicos, PGE₂ foi administrada no tempo zero em ambas as patas posteriores e cada EET, em sua dose máxima, foi injetado apenas na pata posterior direita 5 minutos antes da terceira hora após a administração de PGE₂. As medidas do limiar nociceptivo de ambas as patas posteriores foram feitas imediatamente antes e 3h após a injeção intraplantar de PGE₂, em seguida, a diferença entre as médias das medidas foi calculada (Δ do limiar nociceptivo). 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET, em suas doses máximas, induziram efeito restrito à pata tratada, não alterando a hiperalgesia induzida por PGE₂ na pata contralateral, indicando que essas doses de EET são eficazes apenas localmente (Figuras 21, 23, 25 e 27).

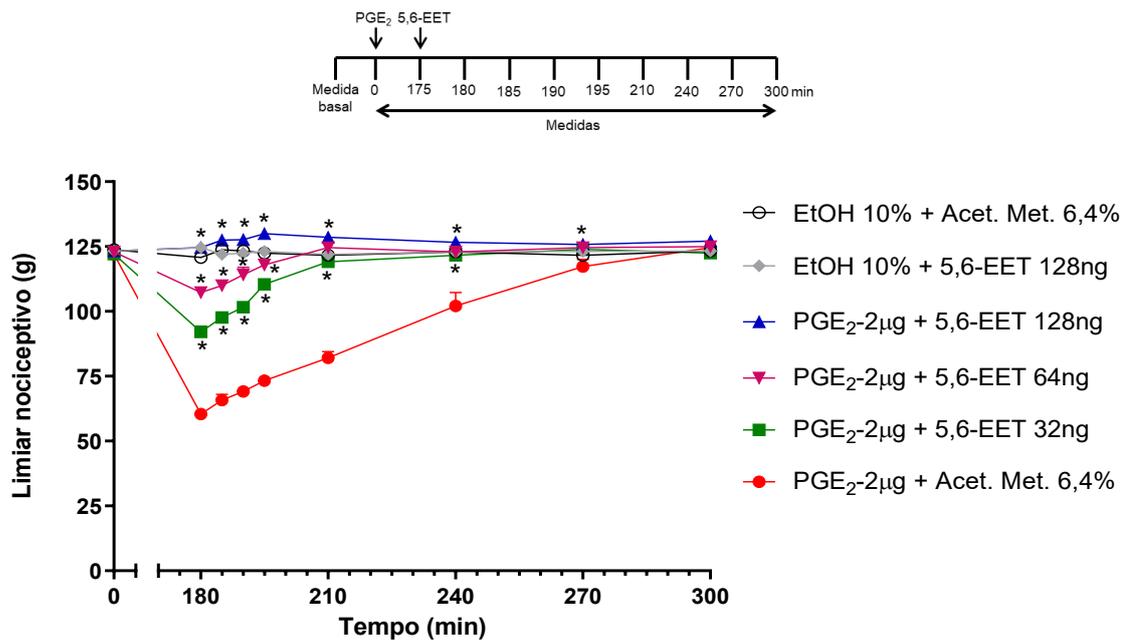


Figura 20. Curva temporal do efeito antinociceptivo da administração intraplantar de diferentes doses de 5,6-EET sobre a nociceção induzida por prostaglandina E₂. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata) e 5,6-EET (32, 64 e 128 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 175 min, respectivamente. As medições foram realizadas nos tempos indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + acetato de metila 6,4% em salina. Acet. Met. = acetato de metila. EtOH = etanol. F (5, 18) = 253,2.

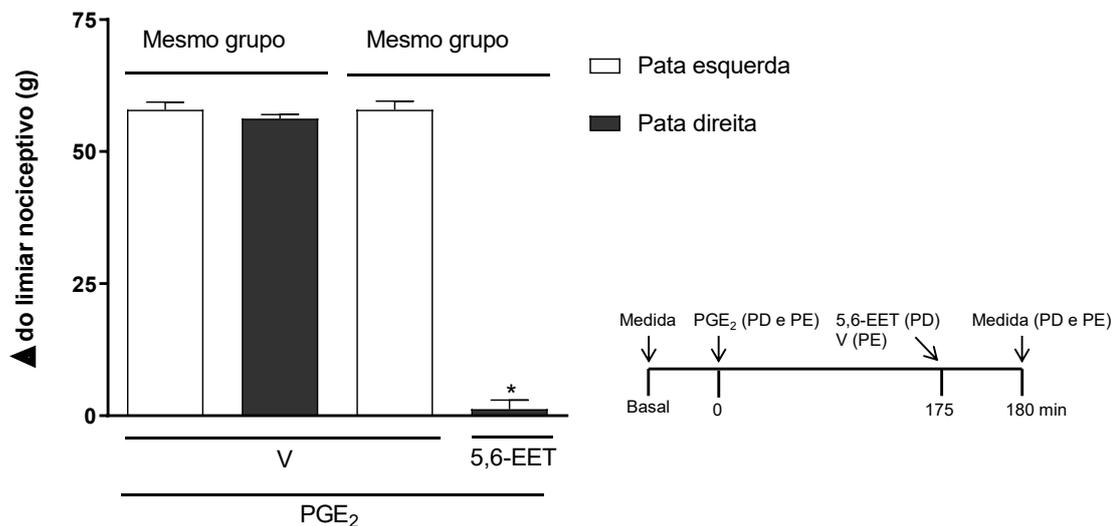


Figura 21. Exclusão de efeito antinociceptivo sistêmico do 5,6-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg) foi injetada, no tempo 0 min, nas patas posteriores direita e esquerda e o 5,6-EET (128 ng/pata) foi injetado, no tempo 175 min, apenas na pata posterior direita. As medições foram feitas, em ambas as patas, no tempo 180 min (diagrama ao lado do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V. V (veículo = acetato de metila 6,4% em salina). F (3, 12) = 383,9.

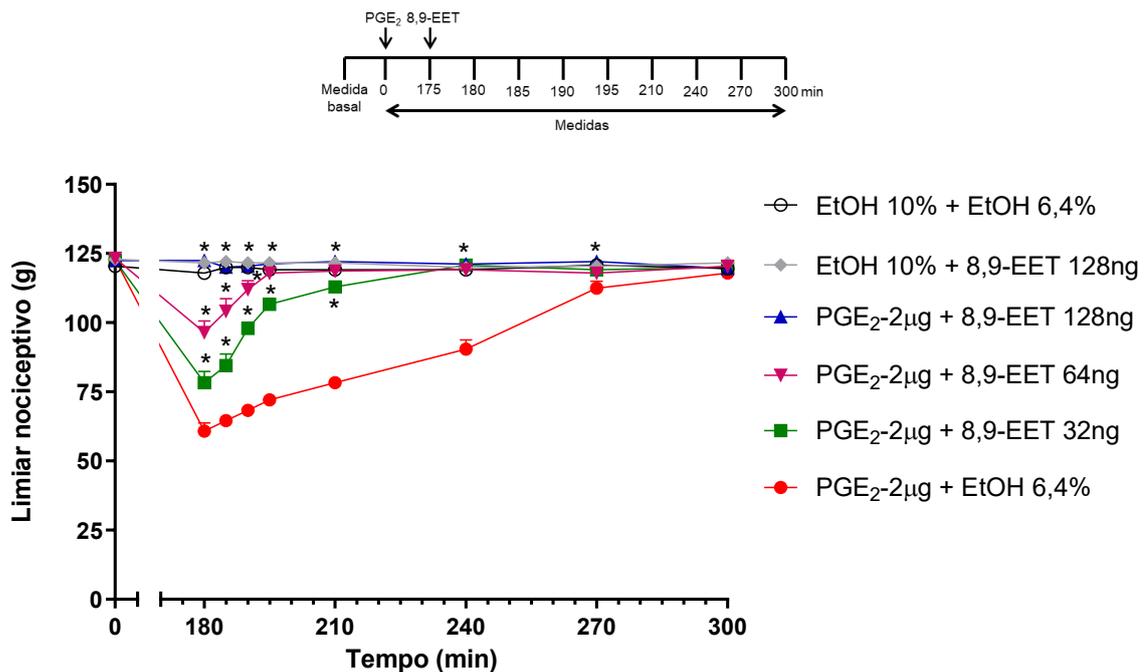


Figura 22. Curva temporal do efeito antinociceptivo da administração intraplantar de diferentes doses de 8,9-EET sobre a nocicepção induzida por prostaglandina E₂. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg/pata) e 8,9-EET (32, 64 e 128 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 175 min, respectivamente. As medições foram realizadas nos tempos indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + etanol 6,4% em salina. EtOH = etanol. F (5, 18) = 117,6.

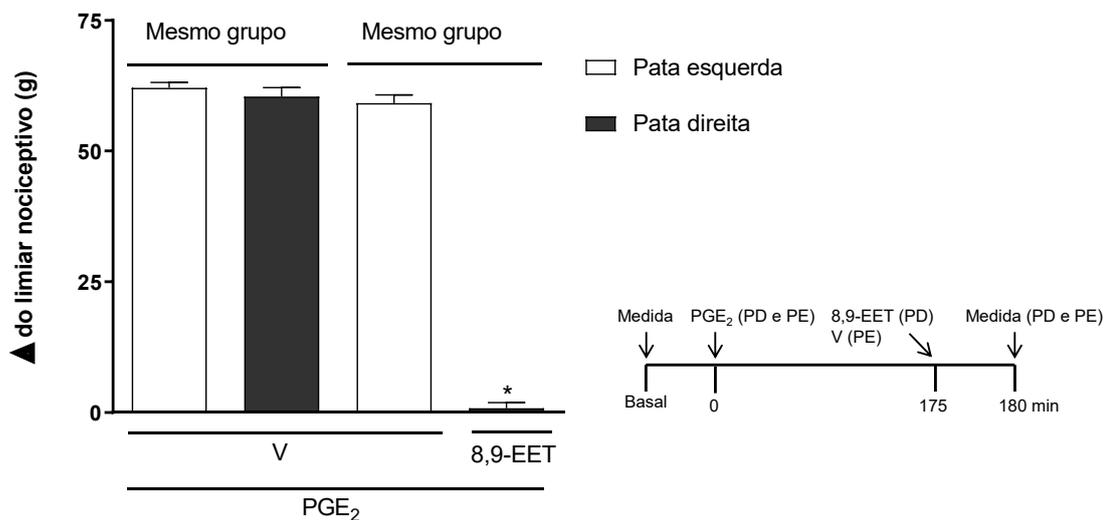


Figura 23. Exclusão de efeito antinociceptivo sistêmico do 8,9-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg) foi injetada, no tempo 0 min, nas patas posteriores direita e esquerda e o 8,9-EET (128 ng/pata) foi injetado, no tempo 175 min, apenas na pata posterior direita. As medições foram feitas, em ambas as patas, no tempo 180 min (diagrama ao lado do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V. V (veículo = etanol 6,4% em salina). F (3, 12) = 462,4.

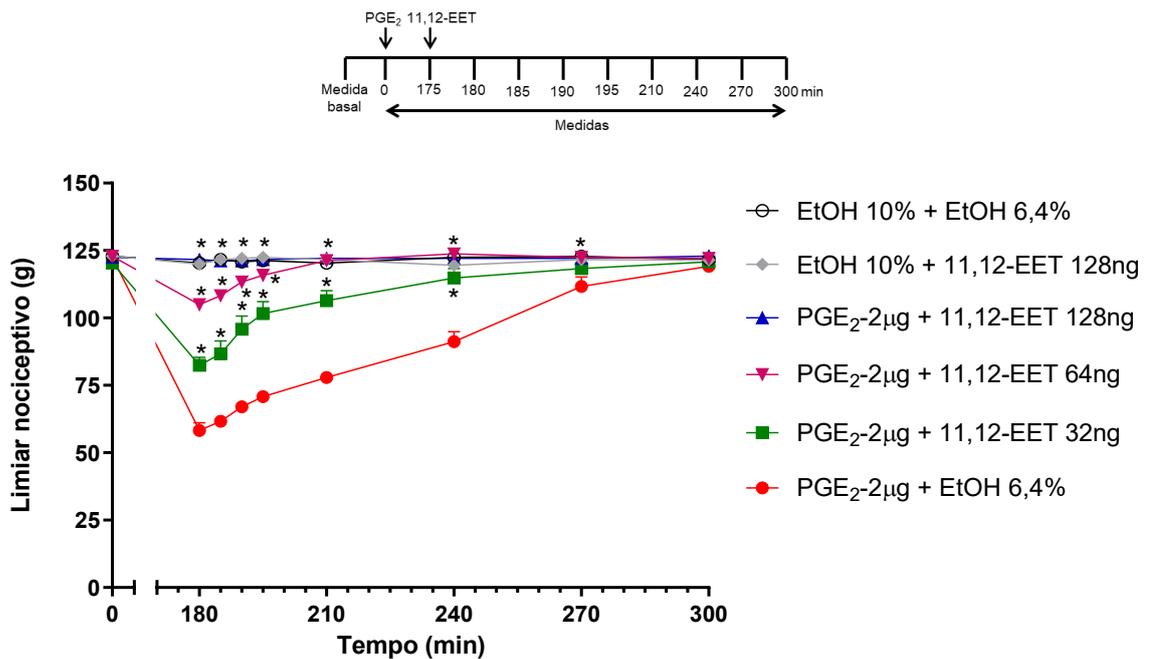


Figura 24. Curva temporal do efeito antinociceptivo da administração intraplantar de diferentes doses de 11,12-EET sobre a nocicepção induzida por prostaglandina E₂. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg/pata) e 11,12-EET (32, 64 e 128 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 175 min, respectivamente. As medições foram realizadas nos tempos indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + etanol 6,4% em salina. EtOH = etanol. F (5, 18) = 113,2.

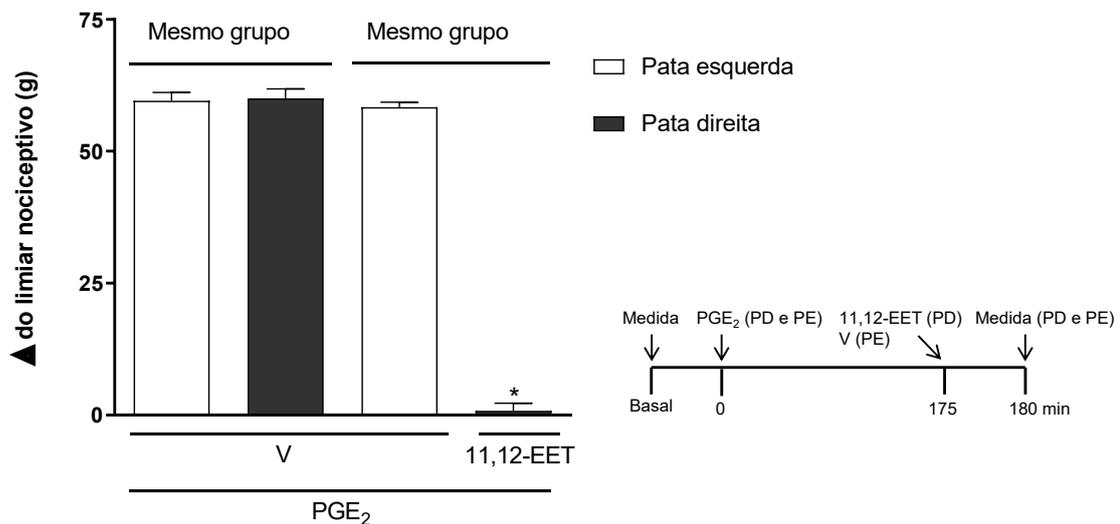


Figura 25. Exclusão de efeito antinociceptivo sistêmico do 11,12-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg) foi injetada, no tempo 0 min, nas patas posteriores direita e esquerda e o 11,12-EET (128 ng/pata) foi injetado, no tempo 175 min, apenas na pata posterior direita. As medições foram feitas, em ambas as patas, no tempo 180 min (diagrama ao lado do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V. V (veículo = etanol 6,4% em salina). F (3, 12) = 395,7.

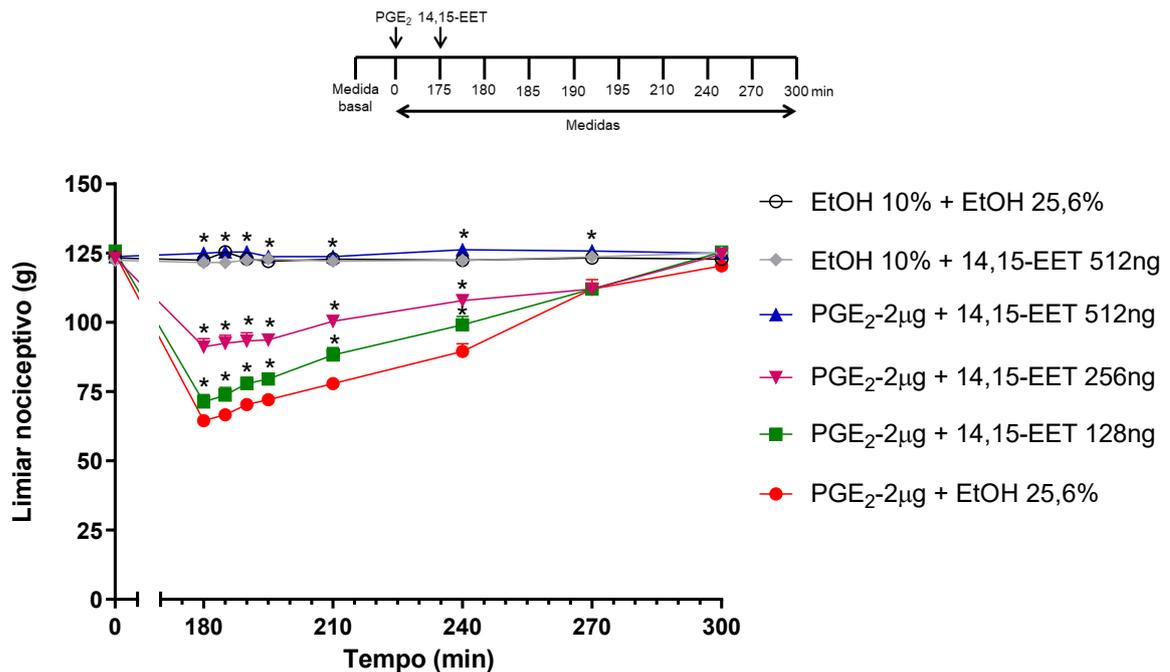


Figura 26. Curva temporal do efeito antinociceptivo da administração intraplantar de diferentes doses de 14,15-EET sobre a nociceção induzida por prostaglandina E₂. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg/pata) e 14,15-EET (128, 256 e 512 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 175 min, respectivamente. As medições foram realizadas nos tempos indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + etanol 25,6% em salina. EtOH = etanol. F (5, 18) = 178,4.

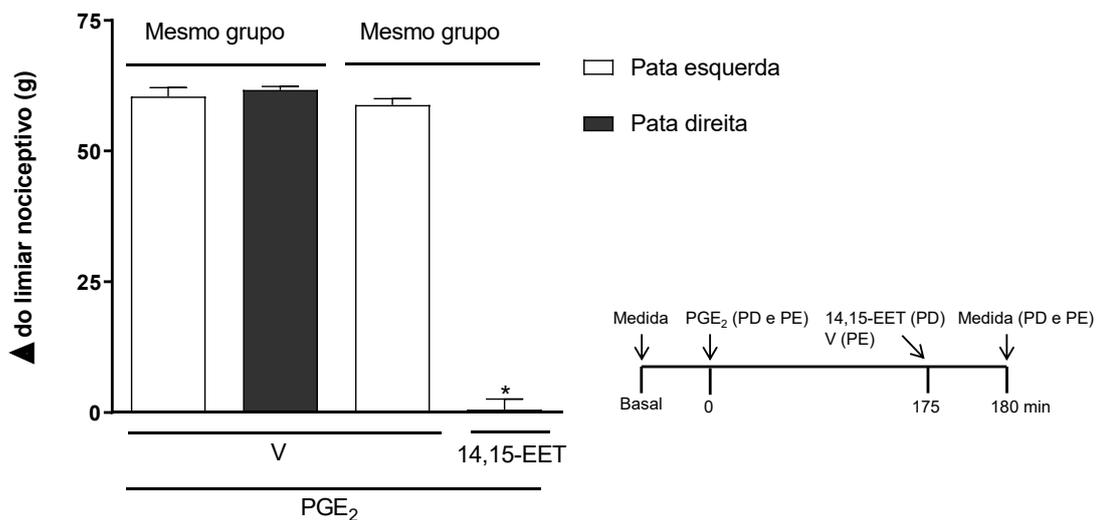


Figura 27. Exclusão de efeito antinociceptivo sistêmico do 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg) foi injetada, no tempo 0 min, nas patas posteriores direita e esquerda e o 14,15-EET (512 ng/pata) foi injetado, no tempo 175 min, apenas na pata posterior direita. As medições foram feitas, em ambas as patas, no tempo 180 min (diagrama ao lado do gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V. V (veículo = etanol 25,6% em salina). F (3, 12) = 392,3.

5.1.1 Antagonismo do efeito dos EETs

A administração intraplantar do antagonista dos EETs, o 14,15-EEZE (32, 64, 128, 256 e 512 ng/pata), reverteu de maneira dose-dependente a antinocicepção periférica induzida pelo 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (Figura 28). Salienta-se que a maior dose do antagonista, quando administrada sozinha nesse mesmo protocolo, não alterou a resposta frente à PGE₂ nem ao veículo (Figura 29).

5.2 Envolvimento do sistema opioide na antinocicepção induzida pelos EETs

A administração intraplantar de naloxona (NX; 12,5; 25; 50 e 100 µg/pata), um antagonista não seletivo dos receptores opioides, reverteu de maneira dose-dependente a antinocicepção periférica do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET (Figura 30A, C e D). No entanto, a antinocicepção induzida pelo 8,9-EET não foi alterada (Figura 30B). O antagonista seletivo do receptor κ-opioide, nor-binaltorfimina (50, 100 e 200 µg/pata), também inibiu de maneira dose-dependente a resposta antinociceptiva periférica do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET (Figura 31). Por outro lado, os antagonistas dos receptores µ (CTOP; 20 µg/pata) e δ opioide (naltrindole; 60 µg/pata) não alteraram a antinocicepção dos três EETs (Figuras 32 e 33, respectivamente). Salienta-se que a maior dose de todos os antagonistas utilizados, quando administrada sozinha, não alterou a resposta frente à PGE₂ nem ao veículo (Figura 35).

A administração da bestatina (100, 200 e 400 µg/pata), um inibidor da enzima envolvida na degradação de peptídeos opioides endógenos (aminopeptidase), previamente aos EETs, foi capaz de potencializar o efeito antinociceptivo de baixas doses do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET, tornando-os equiparáveis ao efeito dos EETs em suas doses máximas (Figura 34). Ressalta-se que foi utilizada uma baixa dose de bestatina, de tal forma que, quando administrada isoladamente, ela não produziu antinocicepção significativa frente à hiperalgisia da PGE₂ (Figura 35E).

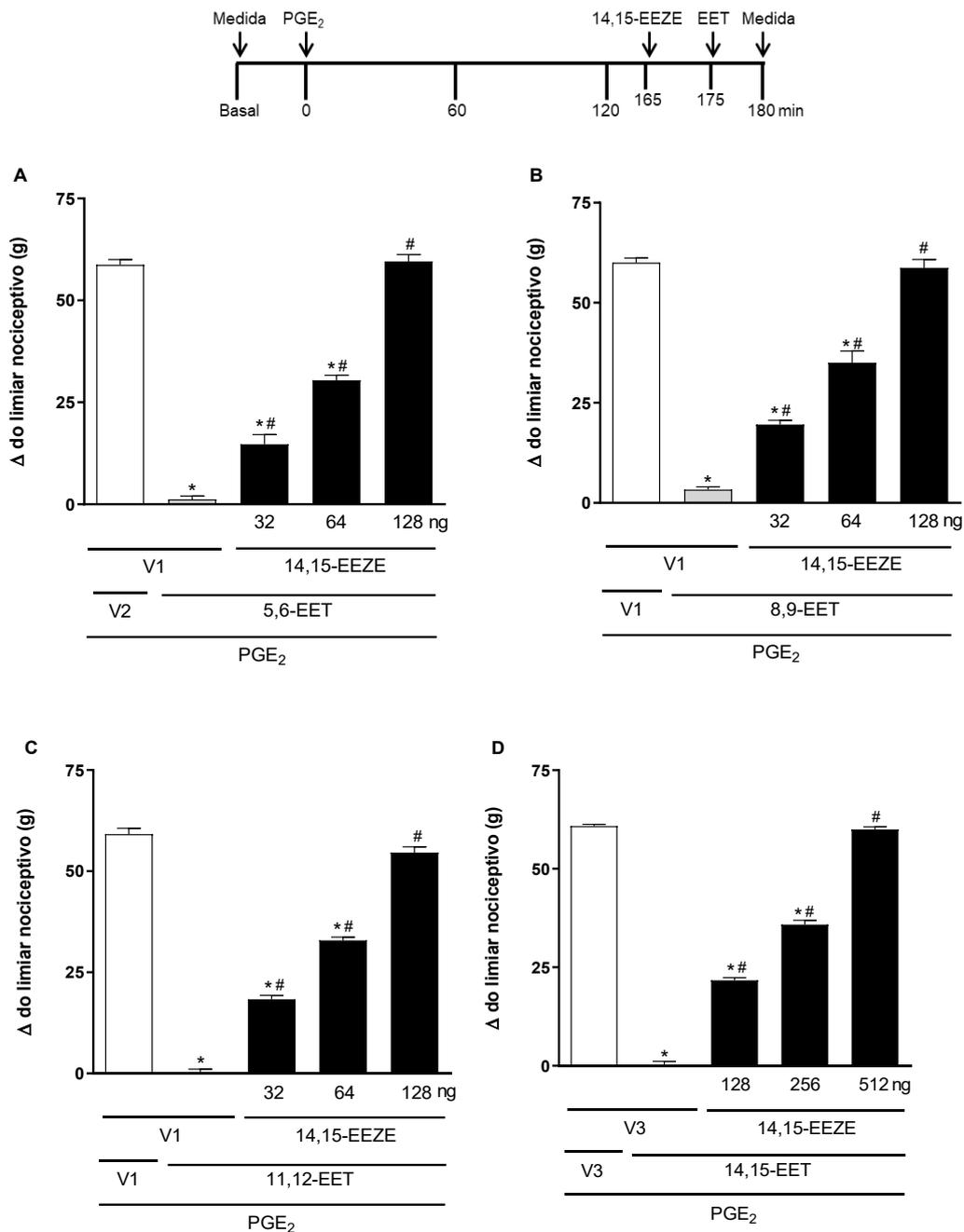


Figura 28. Antagonismo pelo 14,15-EEZE do efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg/pata), 14,14-EEZE (32, 64, 128, 256 e 512 ng/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 165 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). #p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). V1 (veículo 1) = etanol 6,4%; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 25,6%. (A) F (4, 15) = 275,7; (B) F (4, 15) = 189,1; (C) F (4, 15) = 455,3 e (D) F (4, 15) = 997,4.

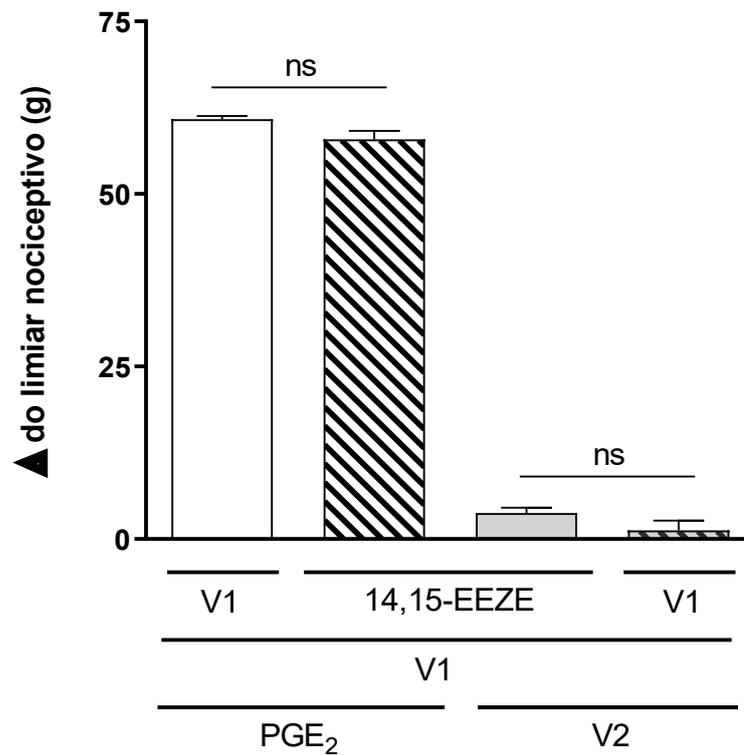


Figura 29. Efeito do 14,15-EEZE sozinho ou seu veículo sobre o limiar nociceptivo na ausência e presença de prostaglandina E₂. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μ g/pata) e 14,15-EEZE (512 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita e as medições foram feitas no tempo 180 min. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. ns = não significativo. V1 (veículo 1) = etanol 25,6%; V2 (veículo 2) = etanol 10%. F (3, 12) = 965,5.

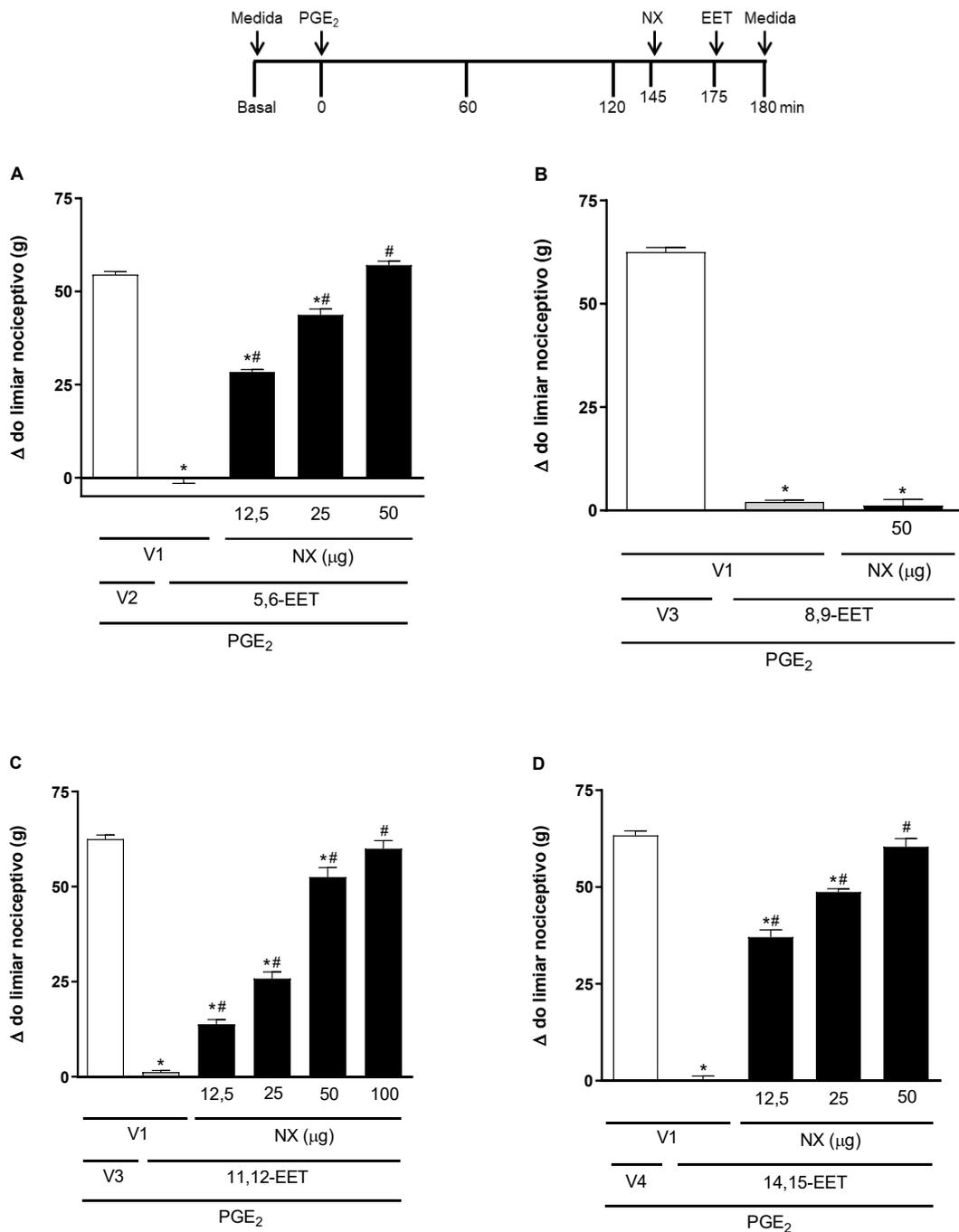


Figura 30. Efeito da naloxona sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E2 (PGE₂; 2 μg/pata), naloxona (NX; 12,5, 25, 50 e 100 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 145 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 (V2, V3 ou V4). #p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (4, 15) = 486,7; (B) F (2, 9) = 1101; (C) F (5, 18) = 239,4 e (D) F (4, 15) = 291,3.

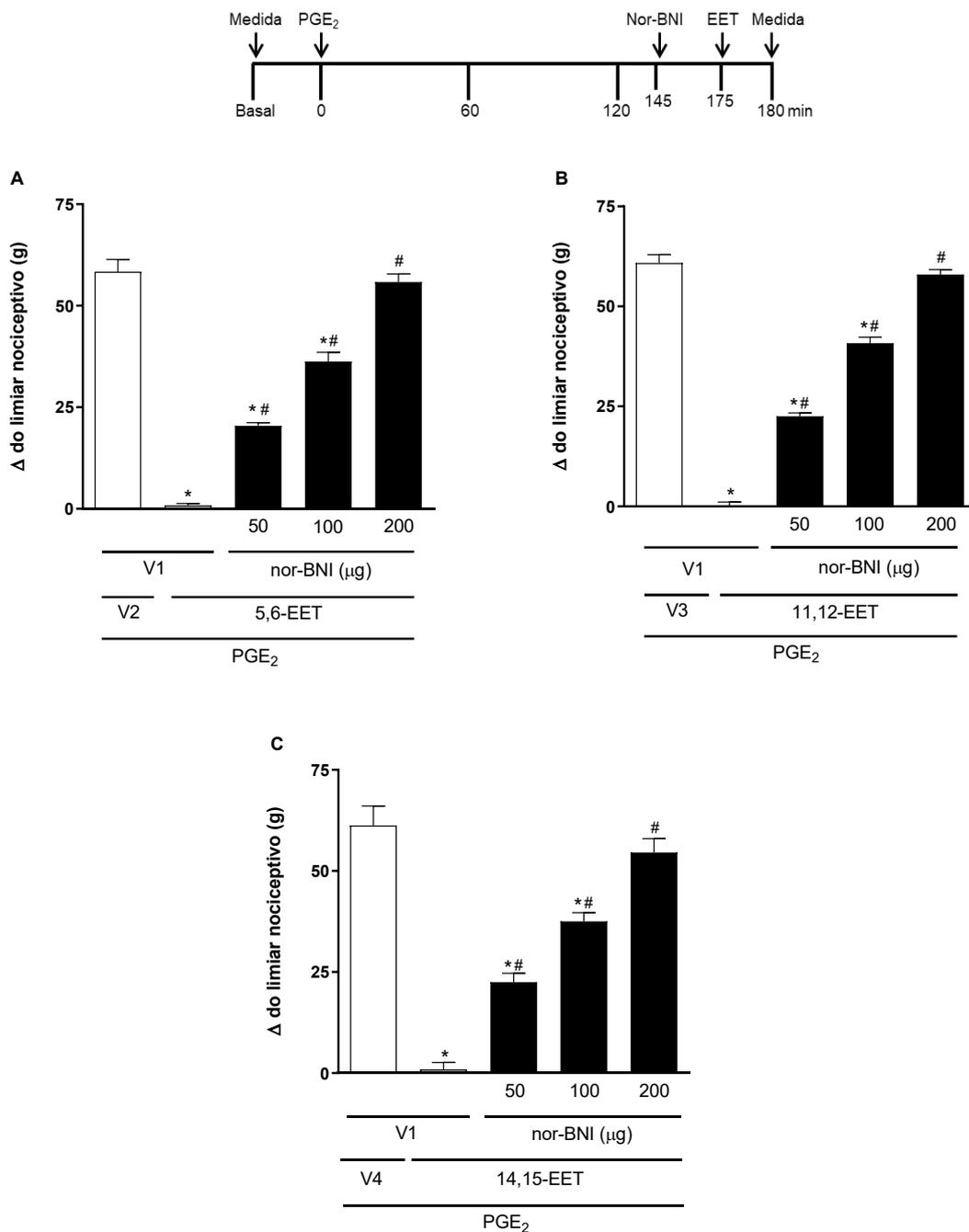


Figura 31. Antagonismo pela nor-binaltorfimina do efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata), nor-binaltorfimina (nor-BNI; 50, 100 e 200 μg/pata) e 5,6-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B e C) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 145 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). #p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (5,6-, 11,12- ou 14,15-EET). V1 (veículo 1) = DMSO 10%; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (4, 15) = 152,8; (B) F (4, 15) = 331,4 e (C) F (4, 15) = 255,1.

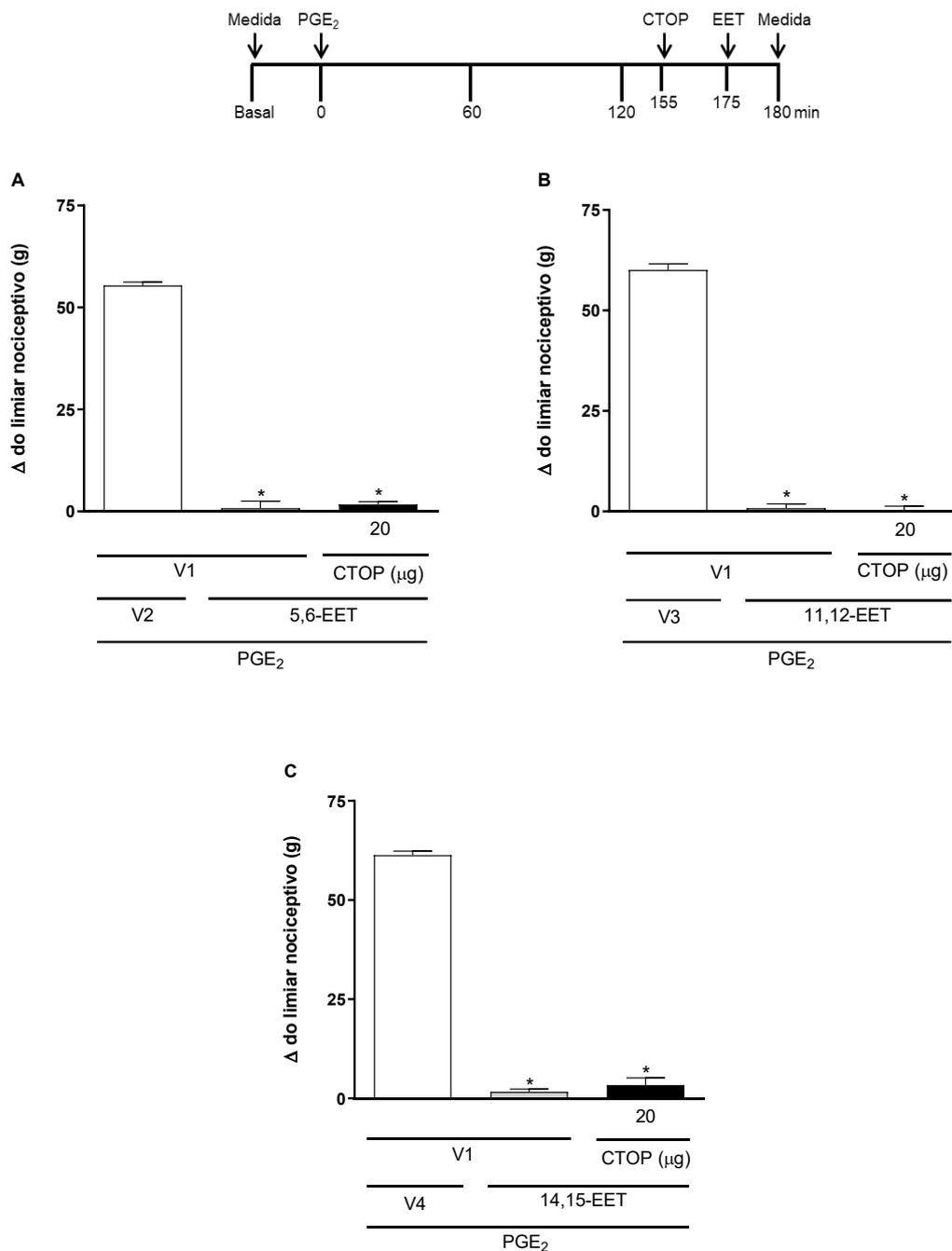


Figura 32. Efeito do CTOP sobre a antinocicepção periférica do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata), CTOP (20 μg/pata) e 5,6-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B e C) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 155 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos PGE₂ + V1 + (5,6-, 11,12- ou 14,15-EET) e PGE₂ + CTOP + (5,6-, 11,12- ou 14,15-EET). *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 700,5; (B) F (2, 9) = 799,2 e (C) F (2, 9) = 715,3.

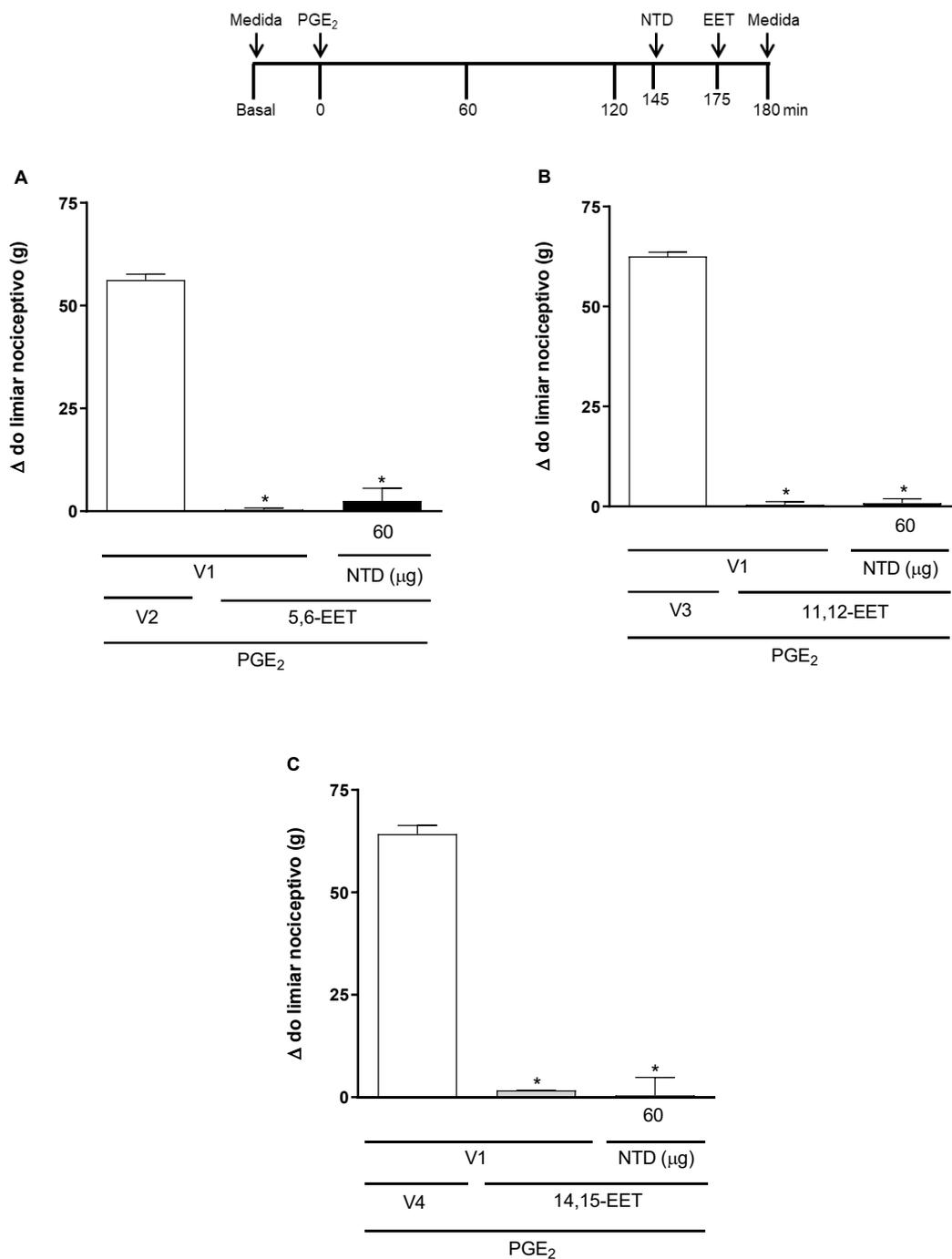


Figura 33. Efeito do naltrindole sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata), naltrindole (NTD; 60 μg/pata) e 5,6-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B e C) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 145 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos PGE₂ + V1 + (5,6-, 11,12- ou 14,15-EET) e PGE₂ + NTD + (5,6-, 11,12- ou 14,15-EET). *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 257,2; (B) F (2, 9) = 1302 e (C) F (2, 9) = 667,5.

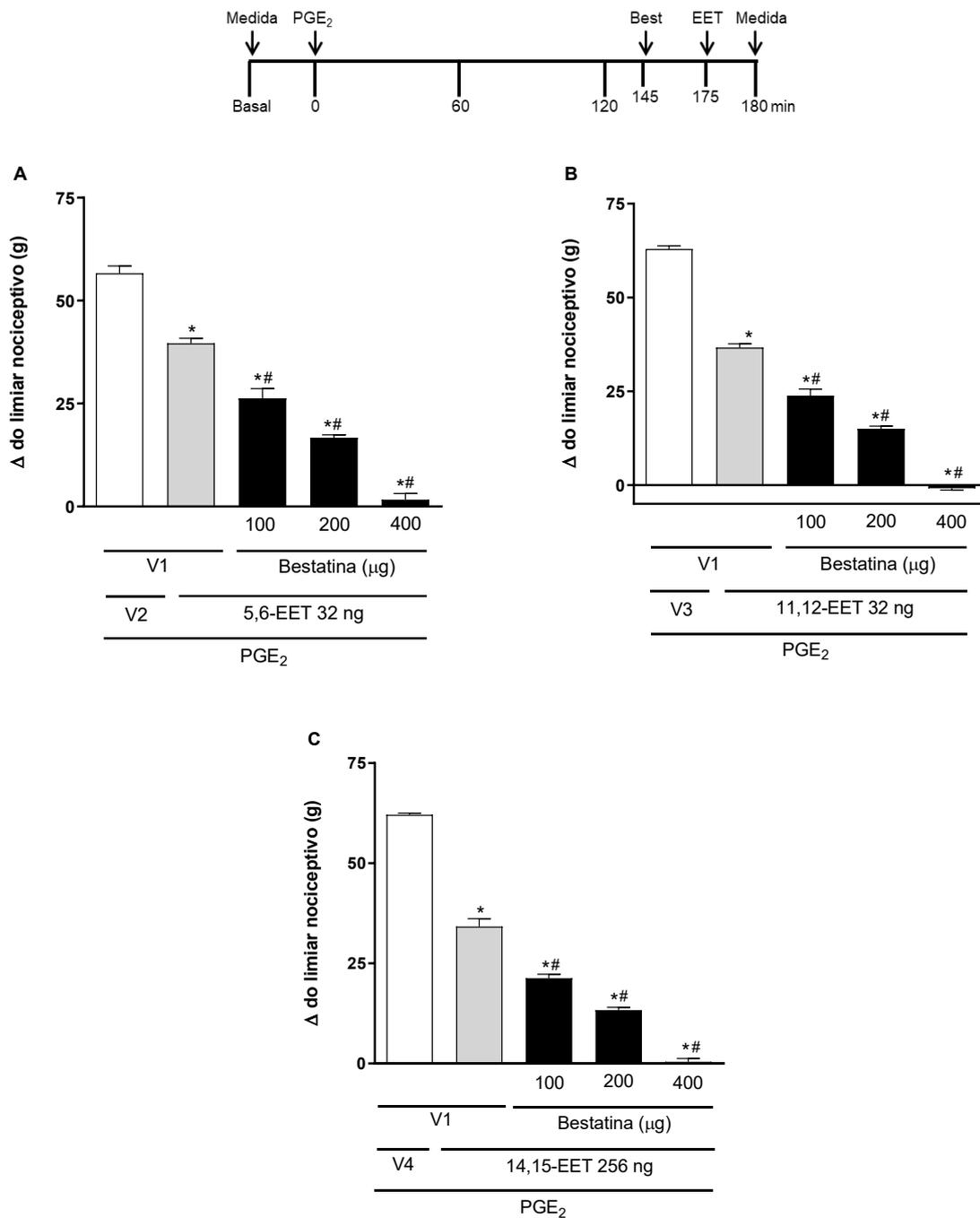


Figura 34. Potencialização induzida pela bestatina sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg), bestatina (Best; 100, 200 e 400 µg) e 5,6-, 11,12- e 14,15-EET (32, 32 e 256 ng, respectivamente nos painéis A, B e C) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 165 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). #p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (5,6-, 11,12- ou 14,15-EET). V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (4, 15) = 167,5; (B) F (4, 15) = 513,9 e (C) F (4, 15) = 435,5.

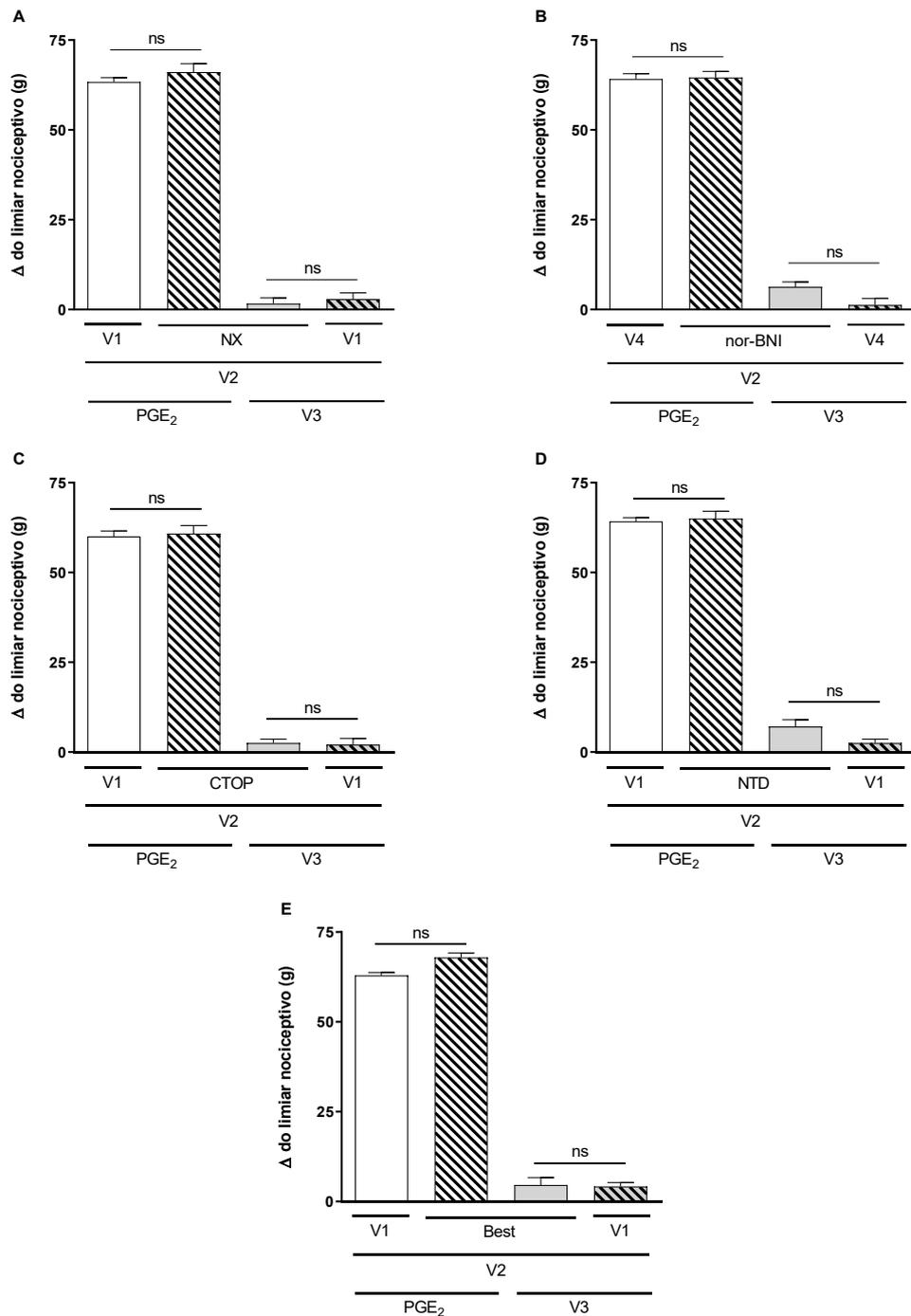


Figura 35. Efeito das drogas do sistema opioide sozinhas ou seus veículos sobre o limiar nociceptivo na ausência e presença de prostaglandina E_2 . Prostaglandina E_2 (PGE_2 ; 2 μ g/pata), naloxona (NX; 100 μ g/pata), nor-binaltorfimina (nor-BNI; 200 μ g/pata), CTOP (20 μ g/pata), naltrindole (NTD; 60 μ g/pata) e bestatina (Best; 400 μ g/pata), respectivamente nos painéis A, B, C, D e E, foram administrados na pata posterior direita e as medições foram feitas no tempo 180 min. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). $n = 4$ camundongos/grupo. ns = não significativo. V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = etanol 25,6%; V3 (veículo 3) = etanol 10%; V4 (veículo 4) = DMSO 25%. (A) $F(3, 12) = 422,1$; (B) $F(3, 12) = 468,8$; (C) $F(3, 12) = 397,4$; (D) $F(3, 12) = 475,5$ e (E) $F(3, 12) = 650,8$.

5.2.1 Avaliação da expressão de dinorfina através da técnica de imunofluorescência

Para avaliar a expressão do peptídeo opioide dinorfina nas patas posteriores dos camundongos, foram realizadas análises qualitativas dos ensaios de imunofluorescência em animais controle (PGE₂ + veículo) e tratados com os diferentes EETs.

As análises de imunohistoquímica e imunofluorescência mostraram a presença de dinorfina nas células epiteliais que compõe a epiderme e nas glândulas da derme, em todos os grupos do estudo. Observou-se também uma imunopositividade para dinorfina em algumas células com características de células inflamatórias no tecido conjuntivo que compõe a derme, sendo notado qualitativamente um aumento dessas células imunopositivas nos animais que receberam a injeção de PGE₂ acrescido do tratamento com 5,6-, 11,12-, e 14,15-EET. Além disso, também foi observada positividade para dinorfina em estruturas similares às fibras nervosas, que encontram-se agrupadas na derme, com maior frequência dessa imunomarcacão nos camundongos que receberam PGE₂ acrescido do tratamento com 11,12-EET (Figura 36).

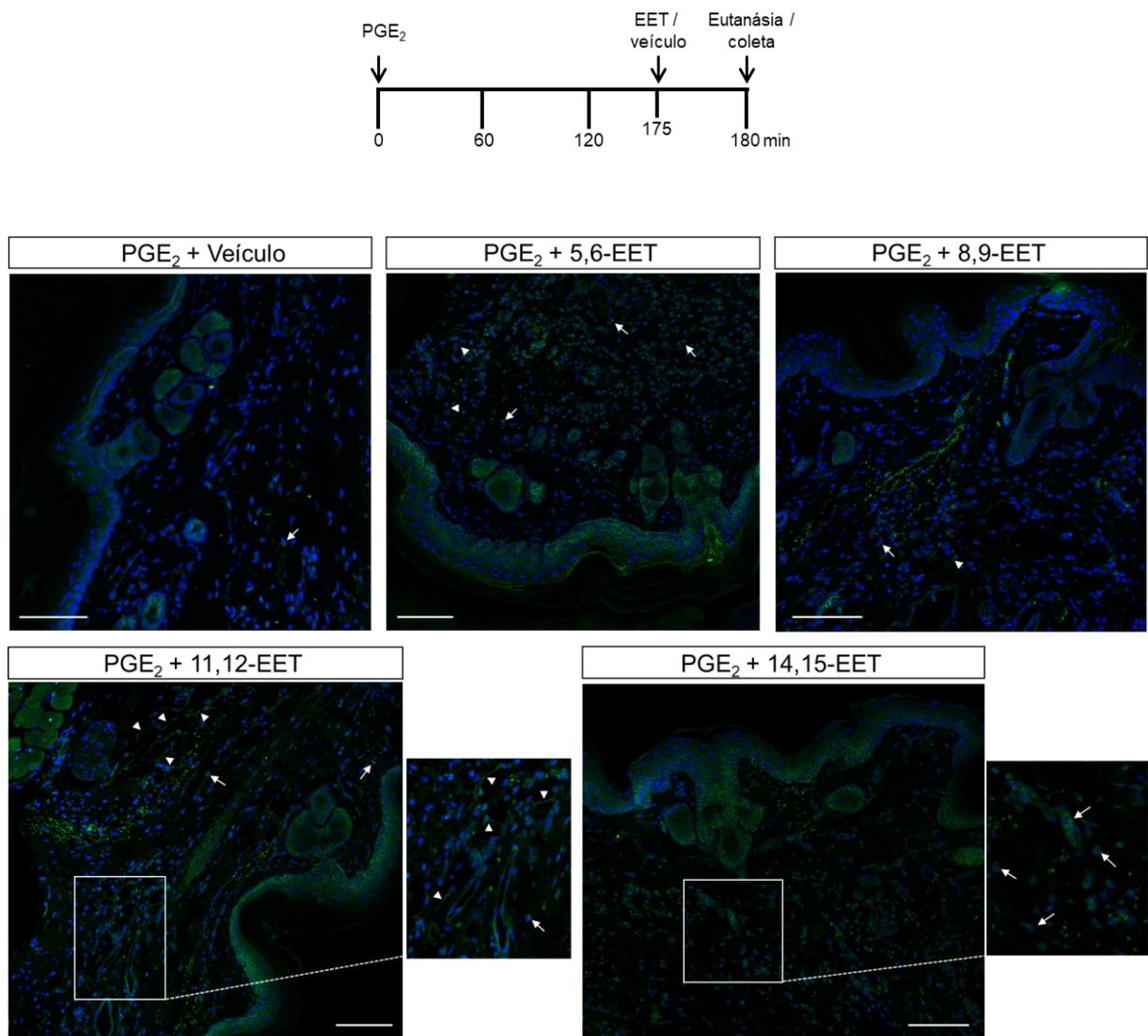


Figura 36. Imunofluorescência para dinorfina na pata de camundongos. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente), ou seus veículos, foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0 e 175 min, respectivamente. Os animais foram eutanasiados no tempo 180 min para coleta dos coxins plantares (diagrama sobre o gráfico). Imunopositividade para dinorfina foi observada nas células epiteliais e nas glândulas, em todos os grupos analisados. Algumas células inflamatórias positivas para dinorfina também foram observadas na derme (seta). Cabeça de seta: estruturas similares às fibras nervosas, que encontram-se positivas para dinorfina. Inserts mostram detalhes das células imunopositivas. Barra de escala = 100 µm.

5.3 Envolvimento do sistema canabinoide na antinocicepção induzida pelos EETs

A administração intraplantar de um antagonista seletivo dos receptores canabinoides tipo 1 (AM251; 20, 40 e 80 µg/pata), reverteu de forma dependente da dose a antinocicepção periférica induzida pelo 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (Figura 37). Por outro lado, o AM630 (100 µg/pata), antagonista seletivo dos receptores canabinoides tipo 2, foi incapaz de reverter o efeito antinociceptivo periférico dos mesmos EETs (Figura 38). Salienta-se que a maior dose dos antagonistas, quando administrada sozinha, não alterou a resposta frente à PGE₂ nem ao veículo (Figura 42).

Foram utilizadas também drogas capazes de aumentar a disponibilidade dos endocannabinoides: VDM11 (2,5 µg/pata), um inibidor do transportador membranar de anandamida (AEA); MAFP (0,5 µg/pata), inibidor da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), enzima envolvida na hidrólise de AEA; e JZL184 (4 µg/pata), inibidor da monoacilglicerol lipase (MAGL), enzima envolvida na hidrólise do 2-araquidonilglicerol (2-AG). A administração de VDM11 (Figura 39) e de MAFP (Figura 40) potencializou o efeito antinociceptivo de baixas doses dos EETs. Por outro lado, o JZL184 (Figura 41) não potencializou esse efeito. Todas essas drogas foram utilizadas em doses que, quando administradas sozinhas, não produziram antinocicepção significativa frente à hiperalgesia da PGE₂ (Figura 42).

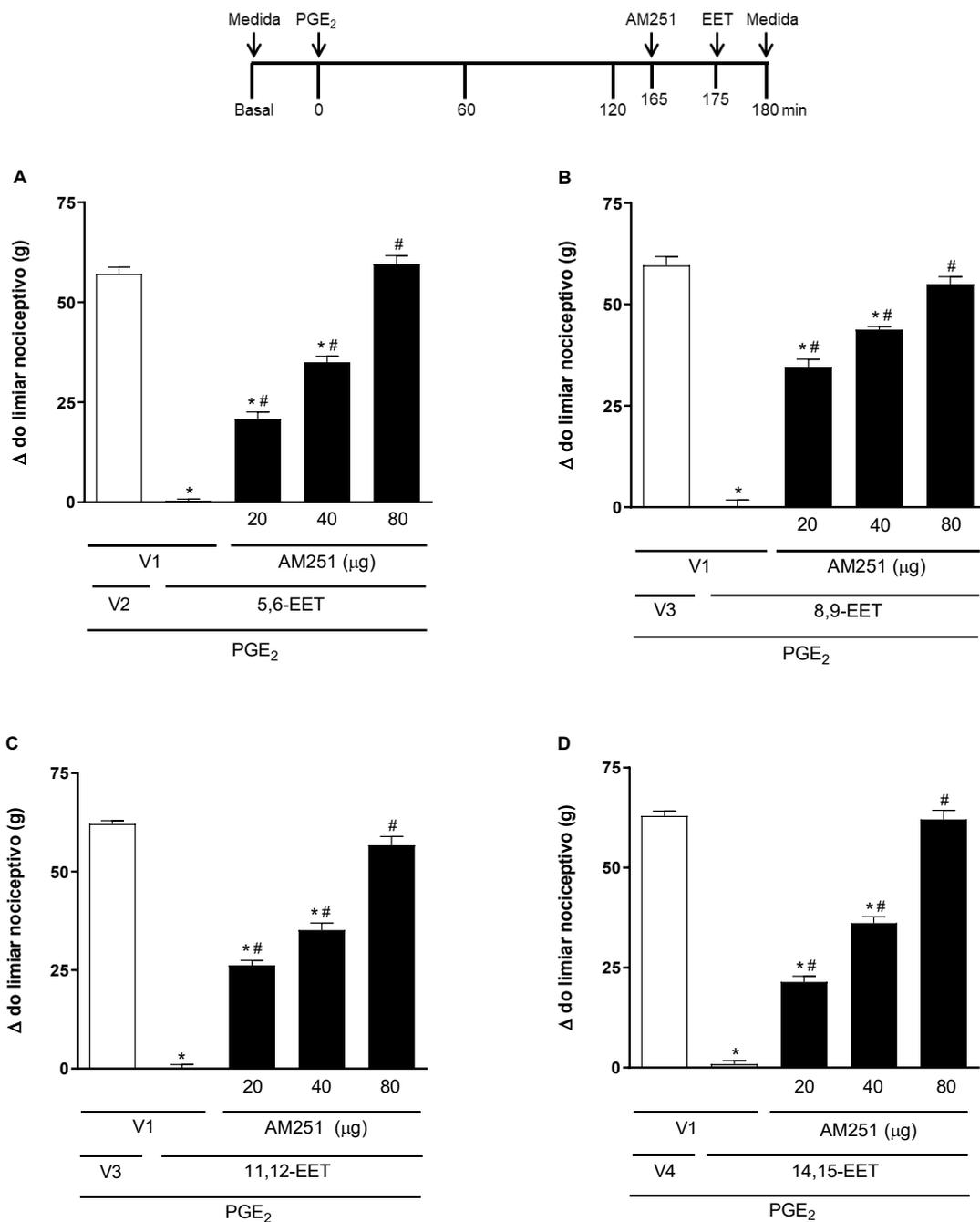


Figura 37. Antagonismo pelo AM251 do efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata), AM251 (20, 40 e 80 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 165 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). #p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). V1 (veículo 1) = DMSO 10%; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (4, 15) = 244,4; (B) F (4, 15) = 181,6; (C) F (4, 15) = 269,8 e (D) F (4, 15) = 296,9.

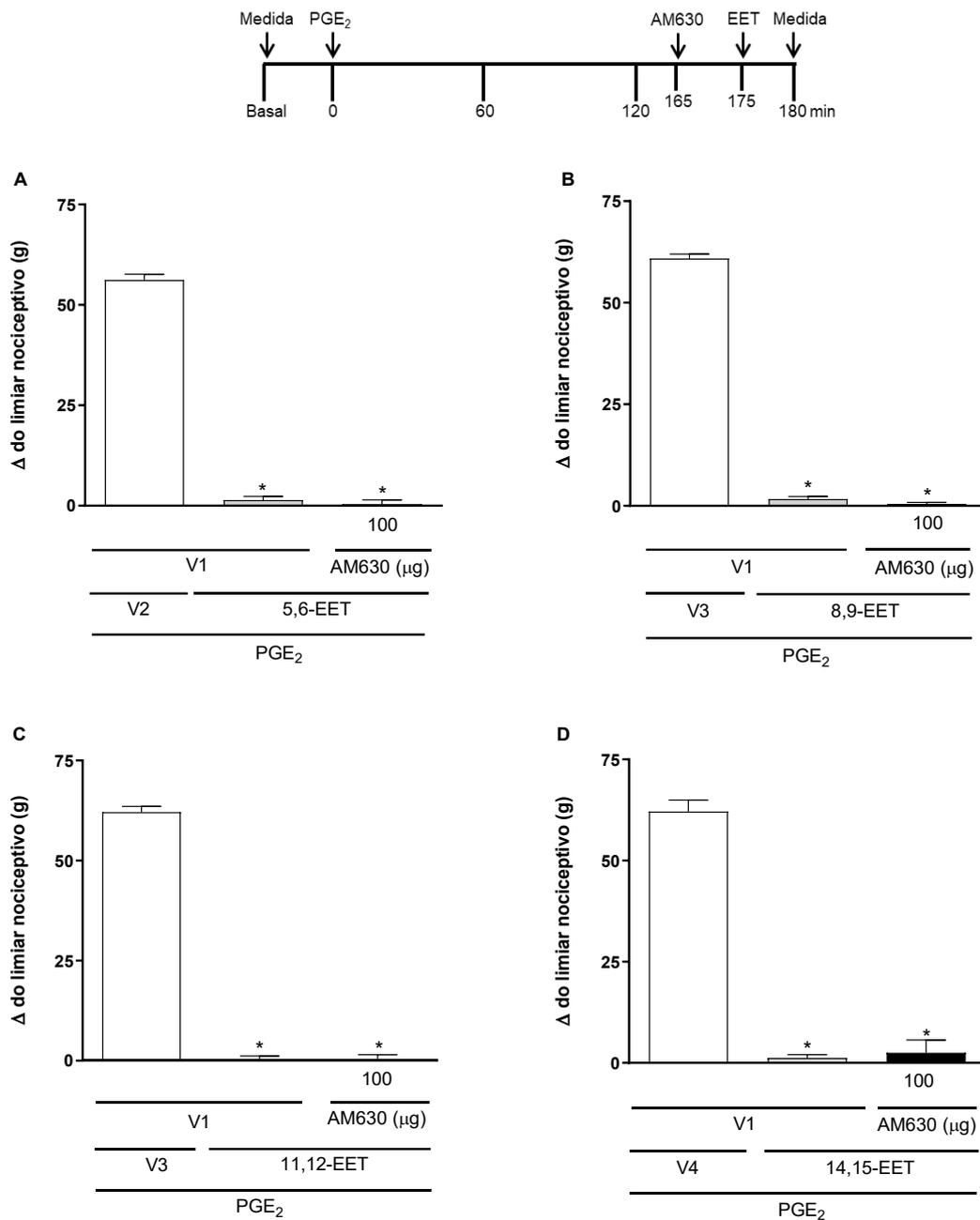


Figura 38. Efeito do AM630 sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E2 (PGE₂; 2 μg/pata), AM630 (100 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 165 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET) e PGE₂ + AM630 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). V1 (veículo 1) = DMSO 10%; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 760,5; (B) F (2, 9) = 1993; (C) F (2, 9) = 1022 e (D) F (2, 9) = 777,4.

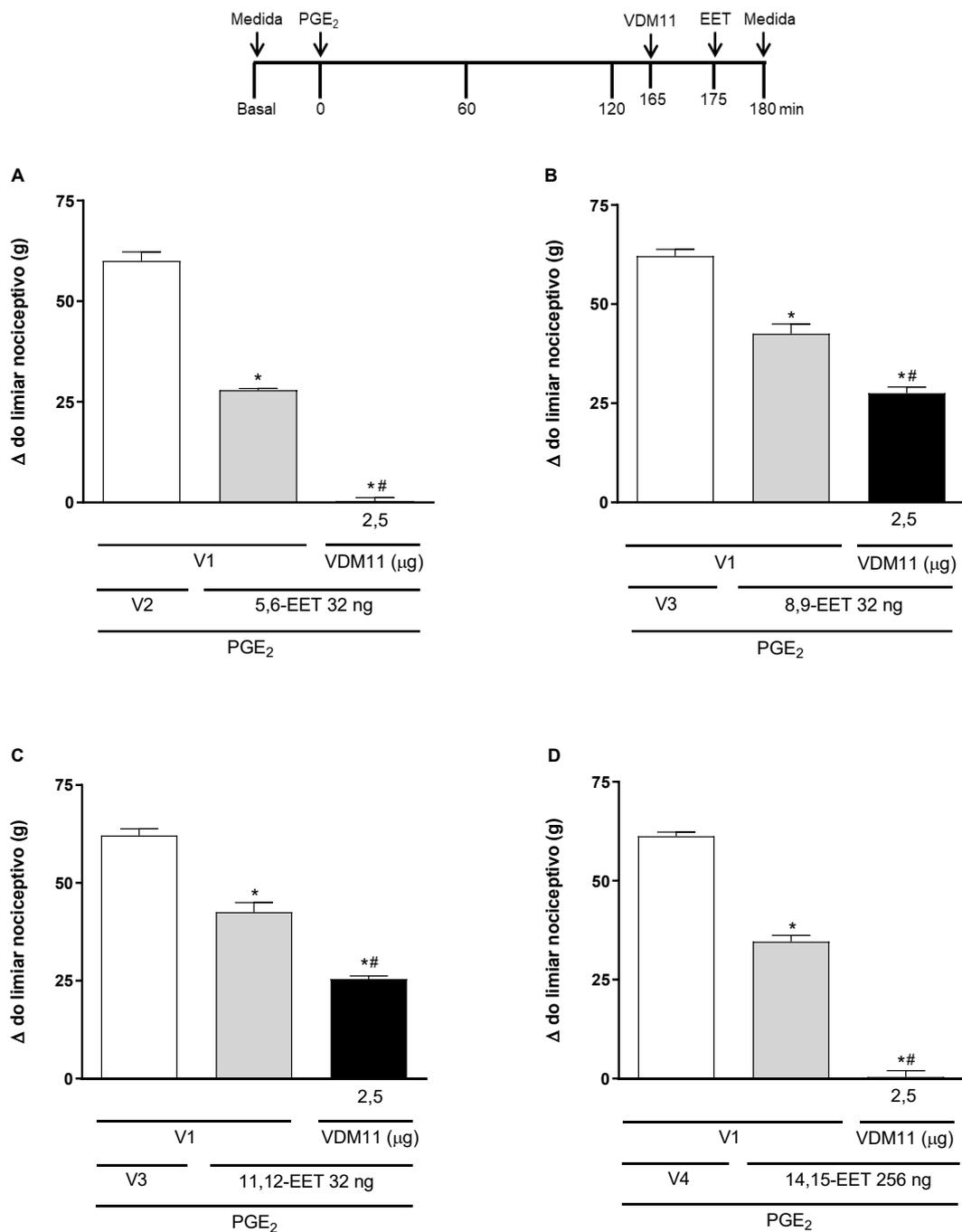


Figura 39. Potencialização induzida pelo VDM11 sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg), VDM11 (2,5 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (32, 32, 32 e 256 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 165 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). #p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). V1 (veículo 1) = DMSO 1%; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 447,9; (B) F (2, 9) = 76,84; (C) F (2, 9) = 102,8 e (D) F (2, 9) = 455,2.

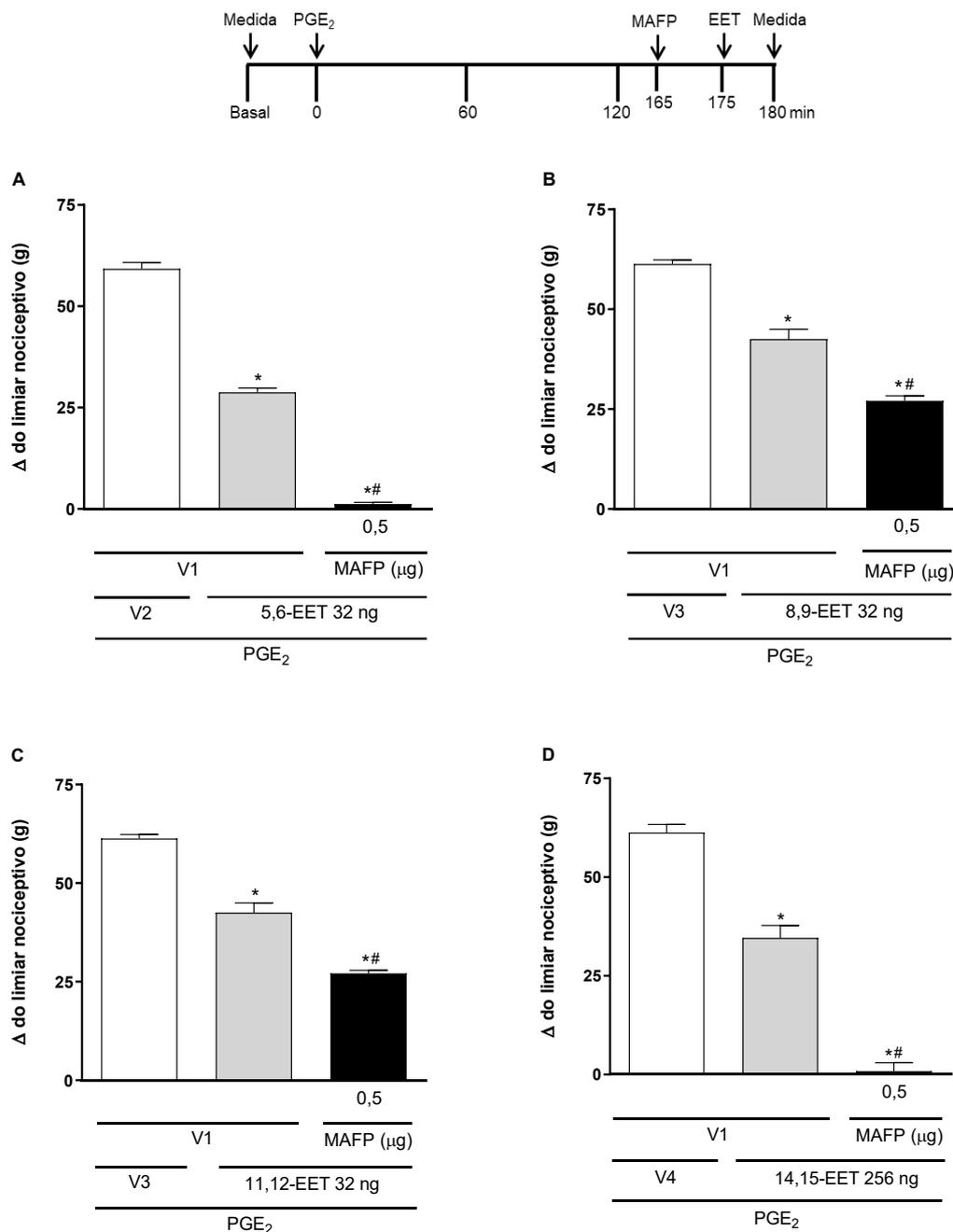


Figura 40. Potencialização induzida pelo MAFP sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata), MAFP (0,5 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (32, 32, 32 e 256 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 165 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 (V2, V3 ou V4). #p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). V1 (veículo 1) = acetato de metila 1%; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 692,9; (B) F (2, 9) = 99,64; (C) F (2, 9) = 111,0 e (D) F (2, 9) = 581,5.

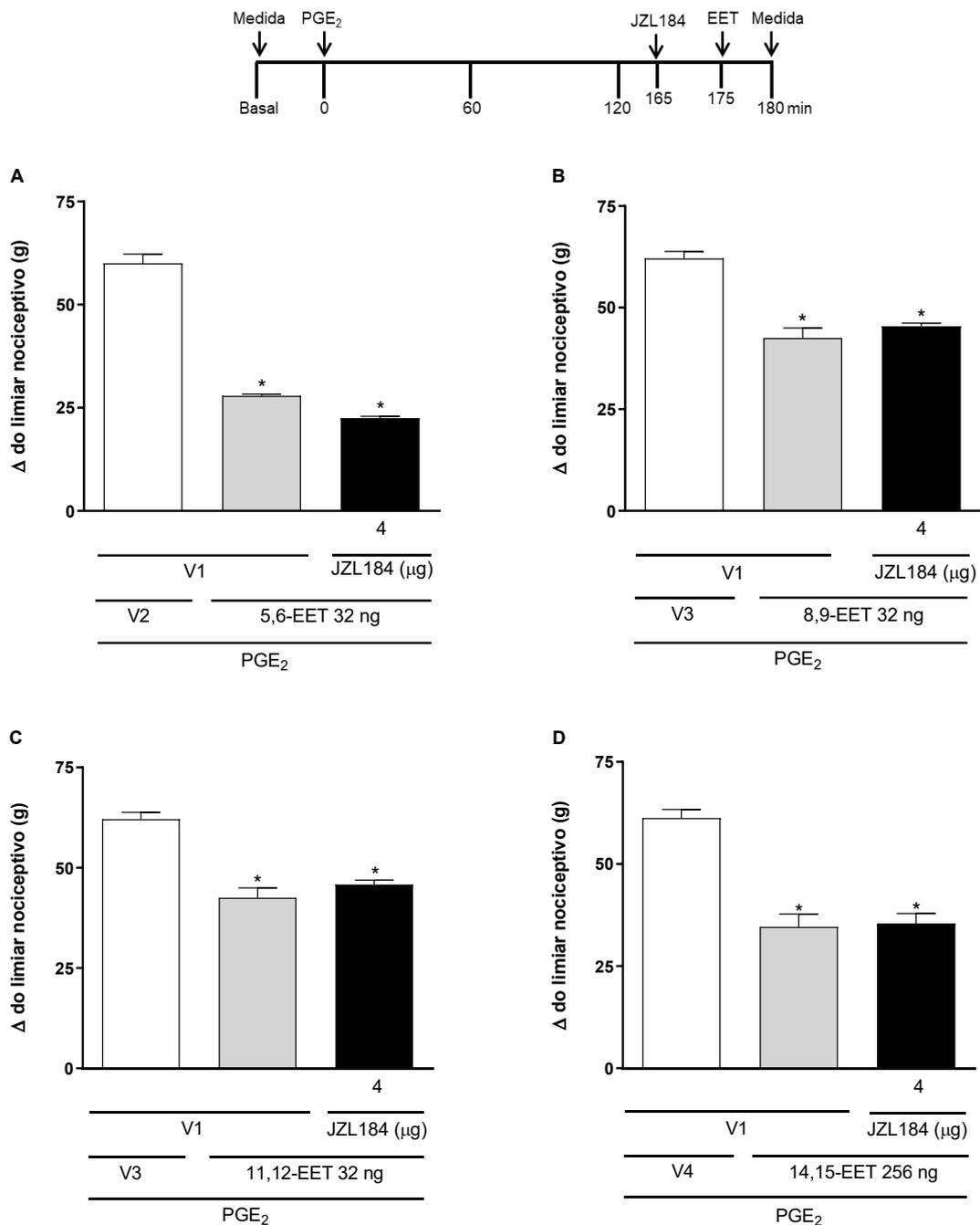


Figura 41. Efeito do JZL184 sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg/pata), JZL184 (4 µg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (32, 32, 32 e 256 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 165 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET) e PGE₂ + JZL184 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). V1 (veículo 1) = DMSO 1%; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 222,2; (B) F (2, 9) = 34,15; (C) F (2, 9) = 31,89 e (D) F (2, 9) = 133,4.

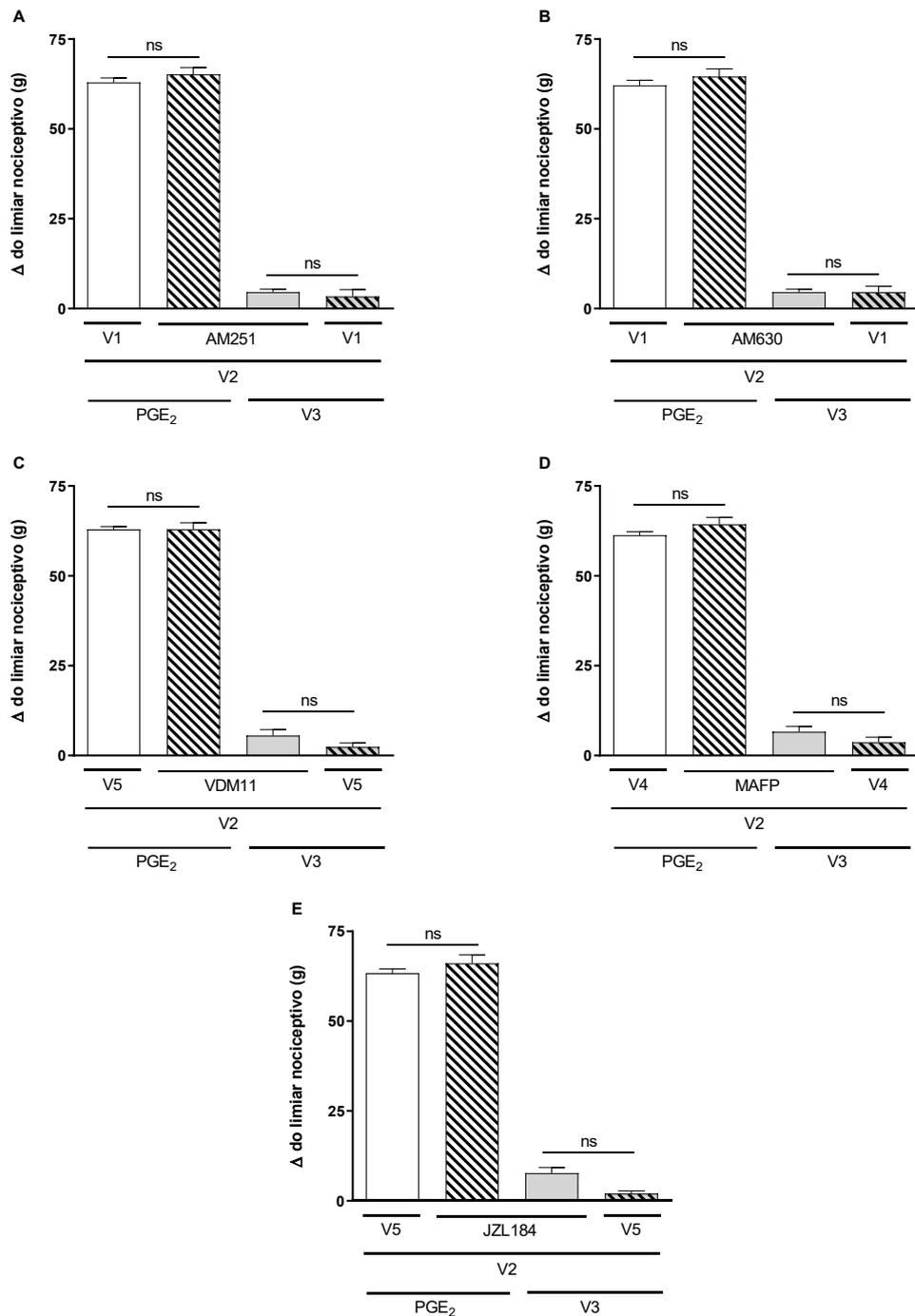


Figura 42. Efeito das drogas do sistema canabinoide sozinhas ou seus veículos sobre o limiar nociceptivo na ausência e presença de prostaglandina E₂. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μ g/pata), AM251 (80 μ g/pata), AM630 (100 μ g/pata), VDM11 (2,5 μ g/pata), MAFP (0,5 μ g/pata) e JZL184 (4 μ g/pata), respectivamente nos painéis A, B, C, D e E, foram administrados na pata posterior direita e as medições foram feitas no tempo 180 min. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. ns = não significativo. V1 (veículo 1) = DMSO 10%; V2 (veículo 2) = etanol 25,6%; V3 (veículo 3) = etanol 10%; V4 (veículo 4) = acetato de metila 1%; V5 (veículo 5) = DMSO 1%. (A) F (3, 12) = 512,5; (B) F (3, 12) = 486,3; (C) F (3, 12) = 616,3; (D) F (3, 12) = 497,6 (e (E) F (3, 12) = 476,4.

5.4 Envolvimento do sistema nitrérgico na antinociceção induzida pelos EETs

O efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET foi antagonizado pelo L-NOArg (12, 18, e 24 µg/pata), um inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (Figura 43). Os inibidores seletivos da NOS induzível (NOSi) (LNIL; 24 µg/pata) e endotelial (NOSe) (LNIO; 24 µg/pata) reduziram parcialmente o efeito antinociceptivo dos EETs (Figuras 44 e 45, respectivamente). Por outro lado, o inibidor seletivo da NOS neuronal (NOSn) (LNPA; 24 µg/pata) não alterou a antinociceção periférica induzida pelos EETs (Figura 46). Todos esses inibidores, quando administrados sozinhos, não alteraram a resposta frente à PGE₂ nem ao veículo (Figura 49).

O inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCs), ODQ (50, 100 e 200 µg/pata), reverteu o efeito antinociceptivo periférico dos EETs de uma maneira dependente da dose (Figura 47). Além disso, um inibidor seletivo da fosfodiesterase (PDE) específica do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), Zaprinast (50 µg/pata), intensificou o efeito antinociceptivo periférico de baixas doses dos EETs, efeito esse semelhante a antinociceção induzida pelas doses máximas dessas substâncias (Figura 48). ODQ e zaprinast, nas doses utilizadas, não apresentaram efeito quando injetados isoladamente em patas normais ou hiperalgésicas (Figura 49).

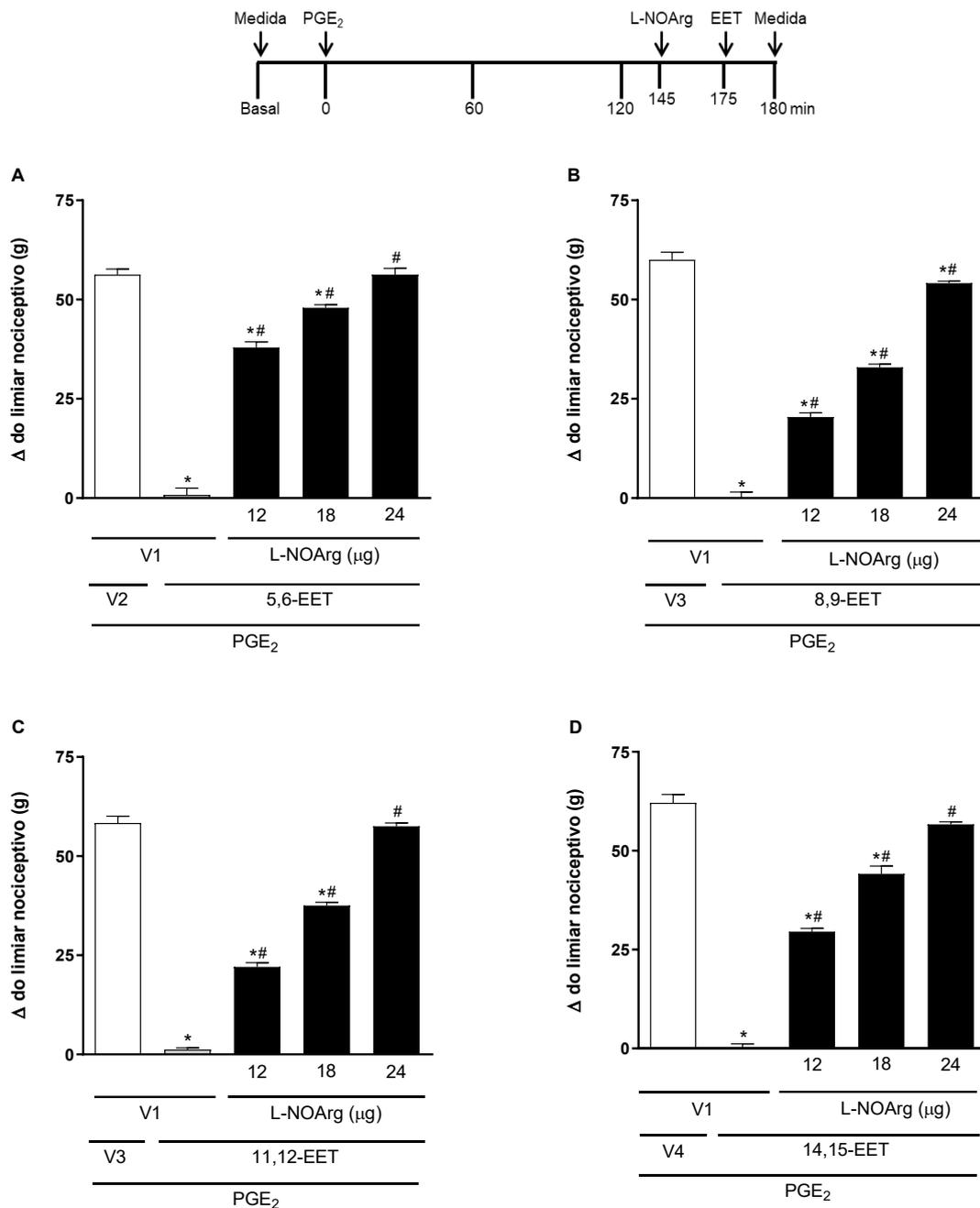


Figura 43. Antagonismo pelo L-NOArg do efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg/pata), L-NOArg (12, 18 e 24 µg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 145 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). #p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (4, 15) = 262,1; (B) F (4, 15) = 380,3; (C) F (4, 15) = 542,3 e (D) F (4, 15) = 288,9

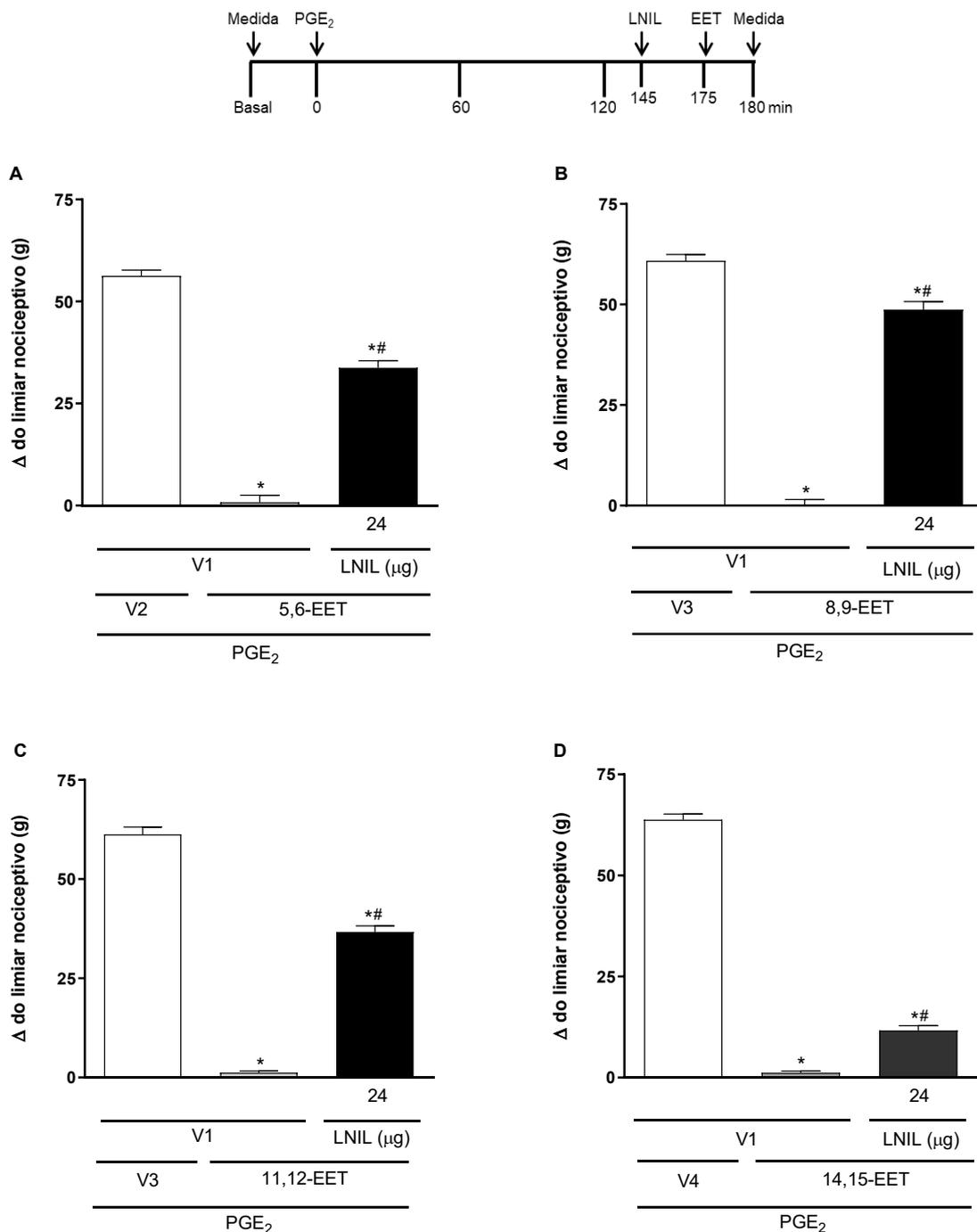


Figura 44. Antagonismo pelo LNIL do efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E2 (PGE₂; 2 μg/pata), LNIL (24 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 145 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 (V2, V3 ou V4). #p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 291,1; (B) F (2, 9) = 356,5; (C) F (2, 9) = 460,9 e (D) F (2, 9) = 937,3.

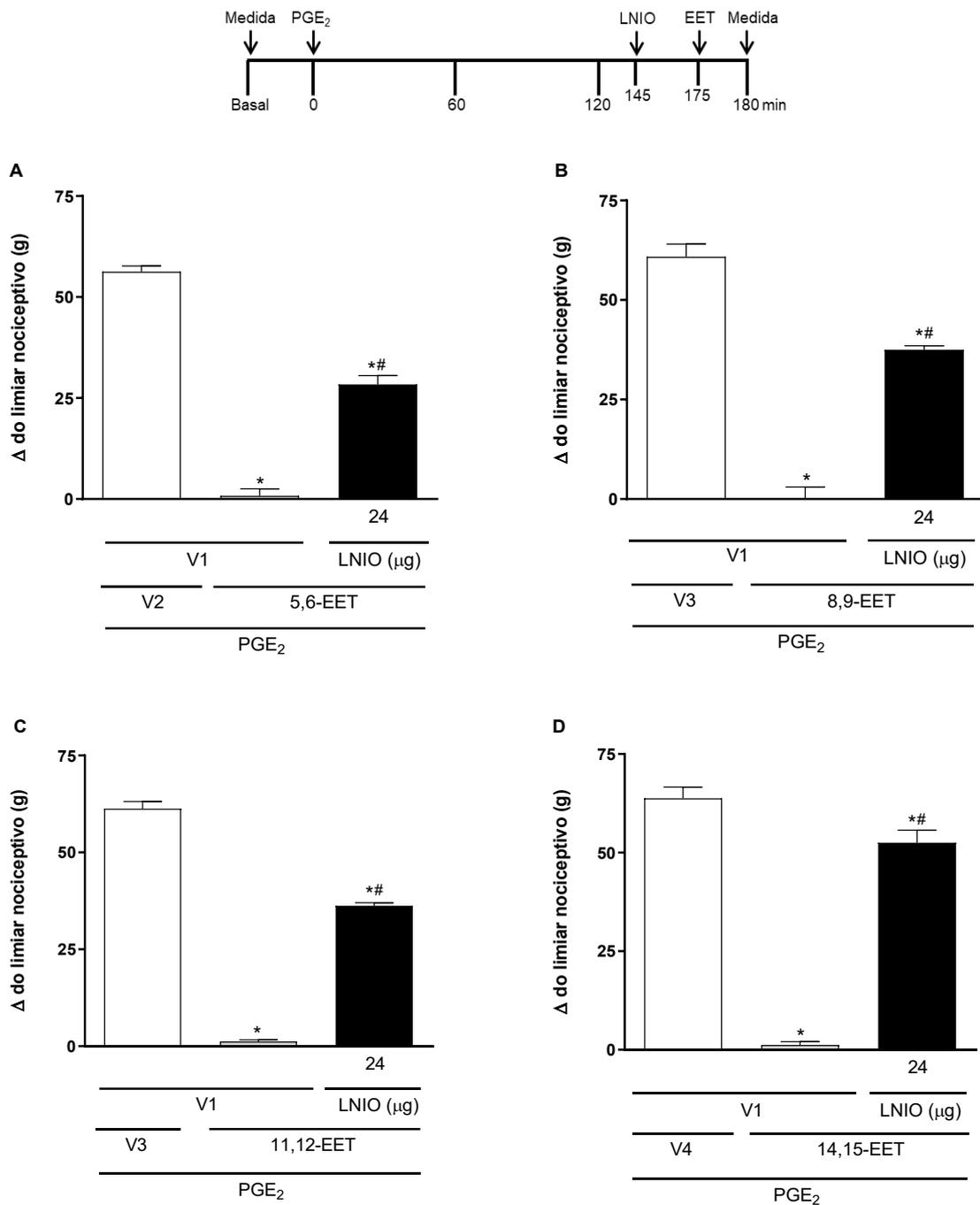


Figura 45. Antagonismo pelo LNIO do efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata), LNIO (24 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 145 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). #p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 237,5; (B) F (2, 9) = 555,4; (C) F (2, 9) = 649,8 e (D) F (2, 9) = 699,1.

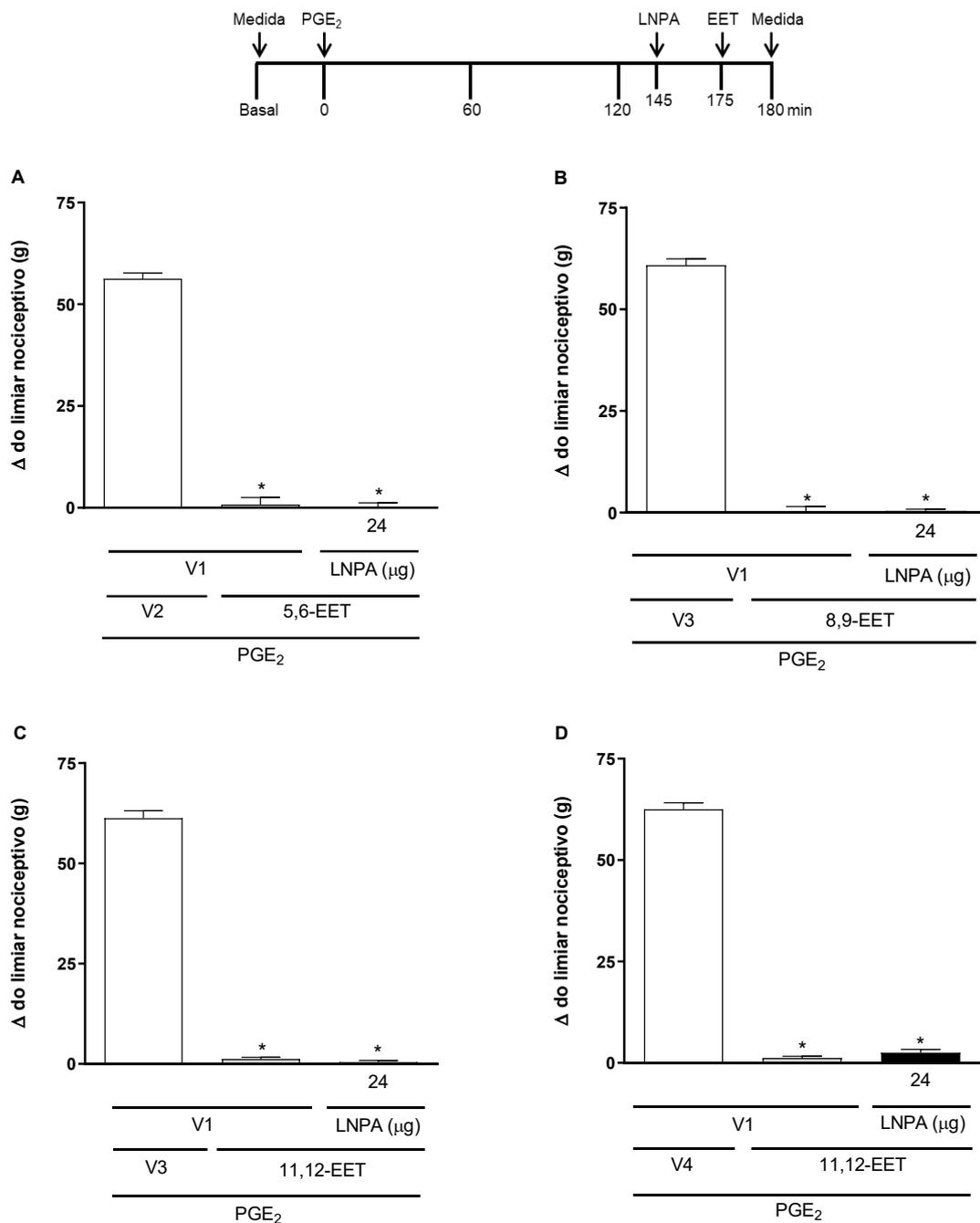


Figura 46. Efeito do LNPA sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata), LNPA (24 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 145 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET) e PGE₂ + LNPA + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 477,3; (B) F (2, 9) = 733,2; (C) F (2, 9) = 971,9 e (D) F (2, 9) = 1070.

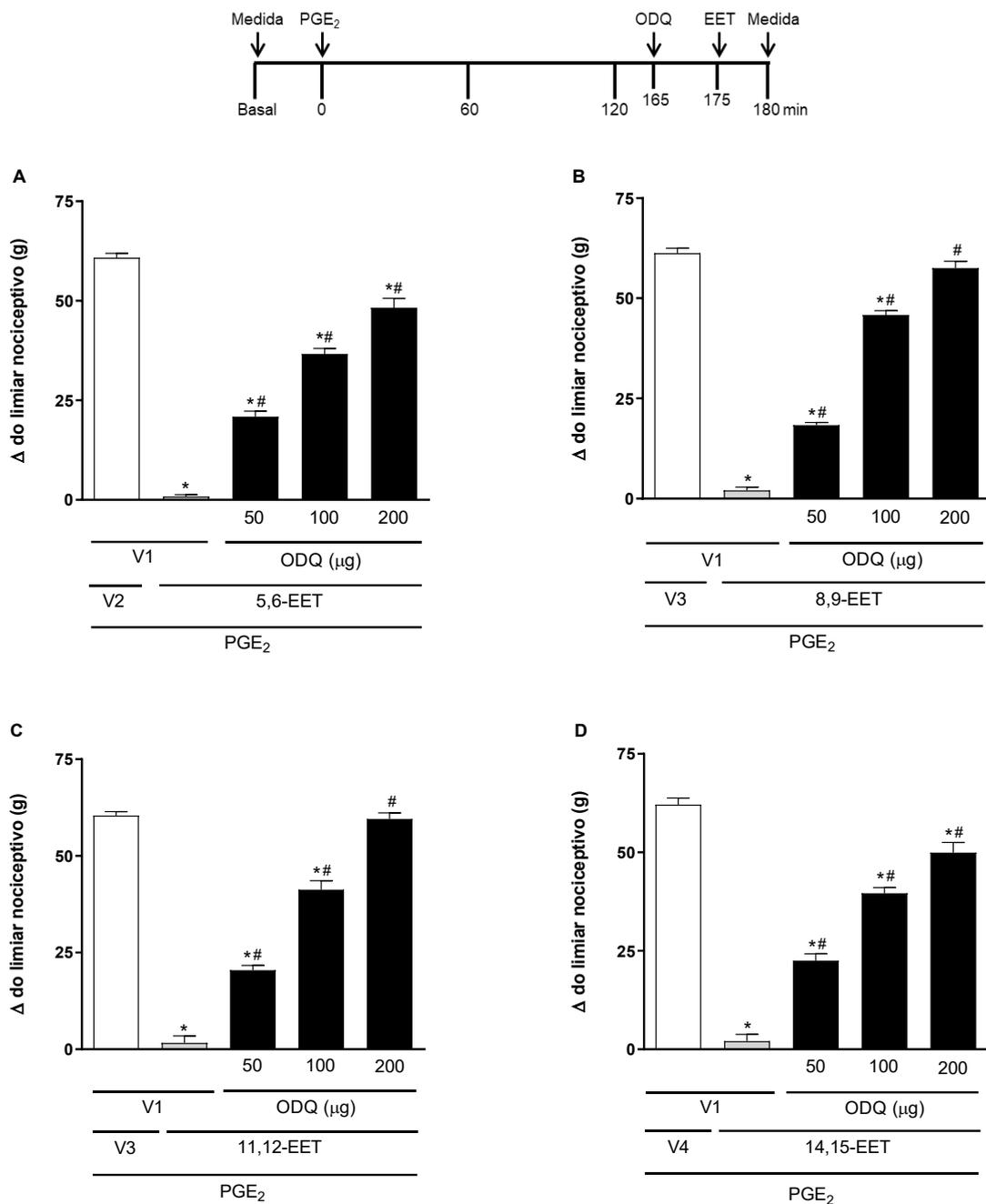


Figura 47. Efeito do ODQ sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata), ODQ (50, 100 e 200 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 165 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). #p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). V1 (veículo 1) = DMSO 10%; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (4, 15) = 252,6; (B) F (4, 15) = 490,8; (C) F (4, 15) = 236,2 e (D) F (4, 15) = 156,3.

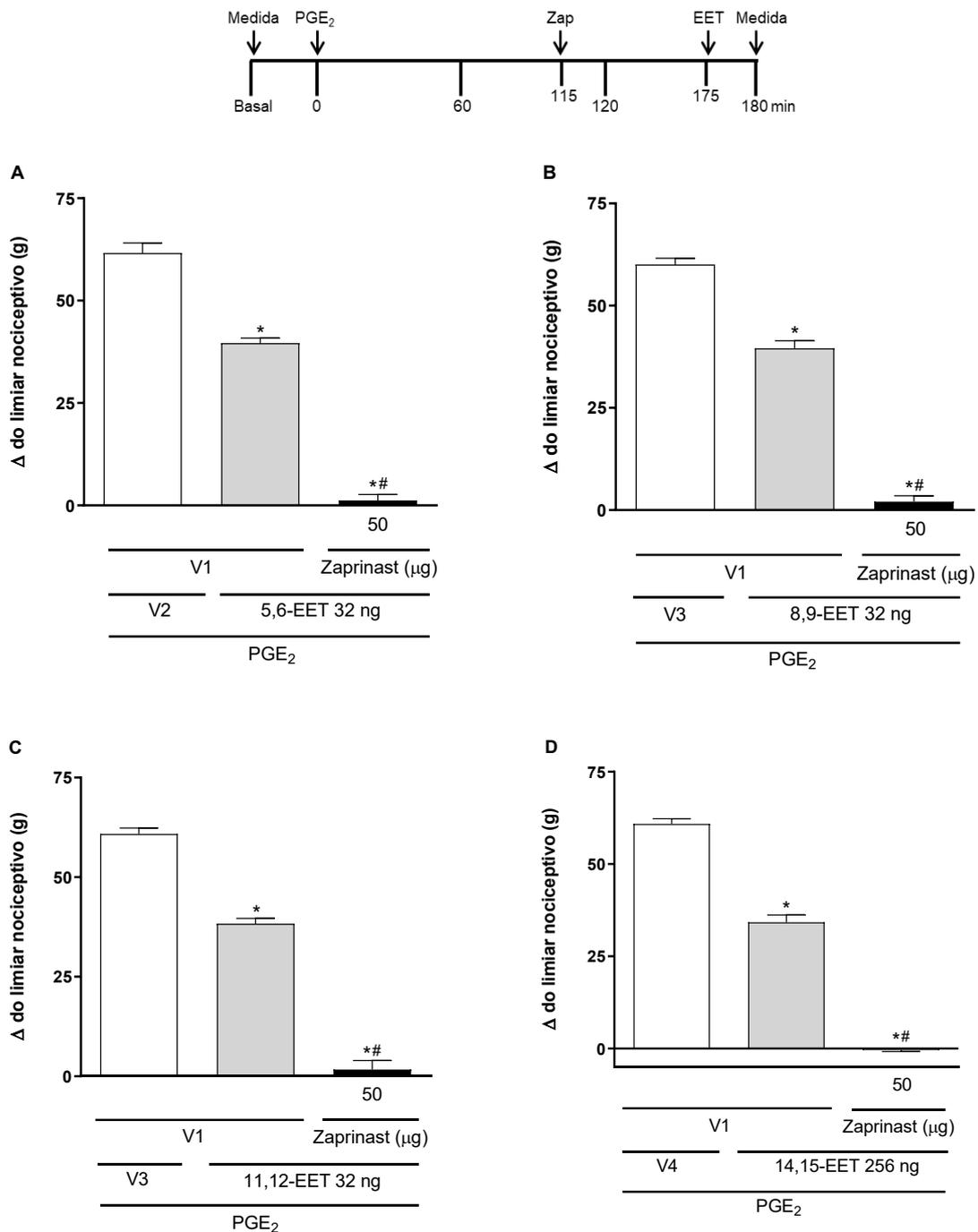


Figura 48. Potencialização induzida pelo zaprinast sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg/pata), zaprinast (Zap; 50 µg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (32, 32, 32 e 256 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 115 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). #p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). V1 (veículo 1) = DMSO 10%; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 291,1; (B) F (2, 9) = 332,4; (C) F (2, 9) = 294,4 e (D) F (2, 9) = 454,4.

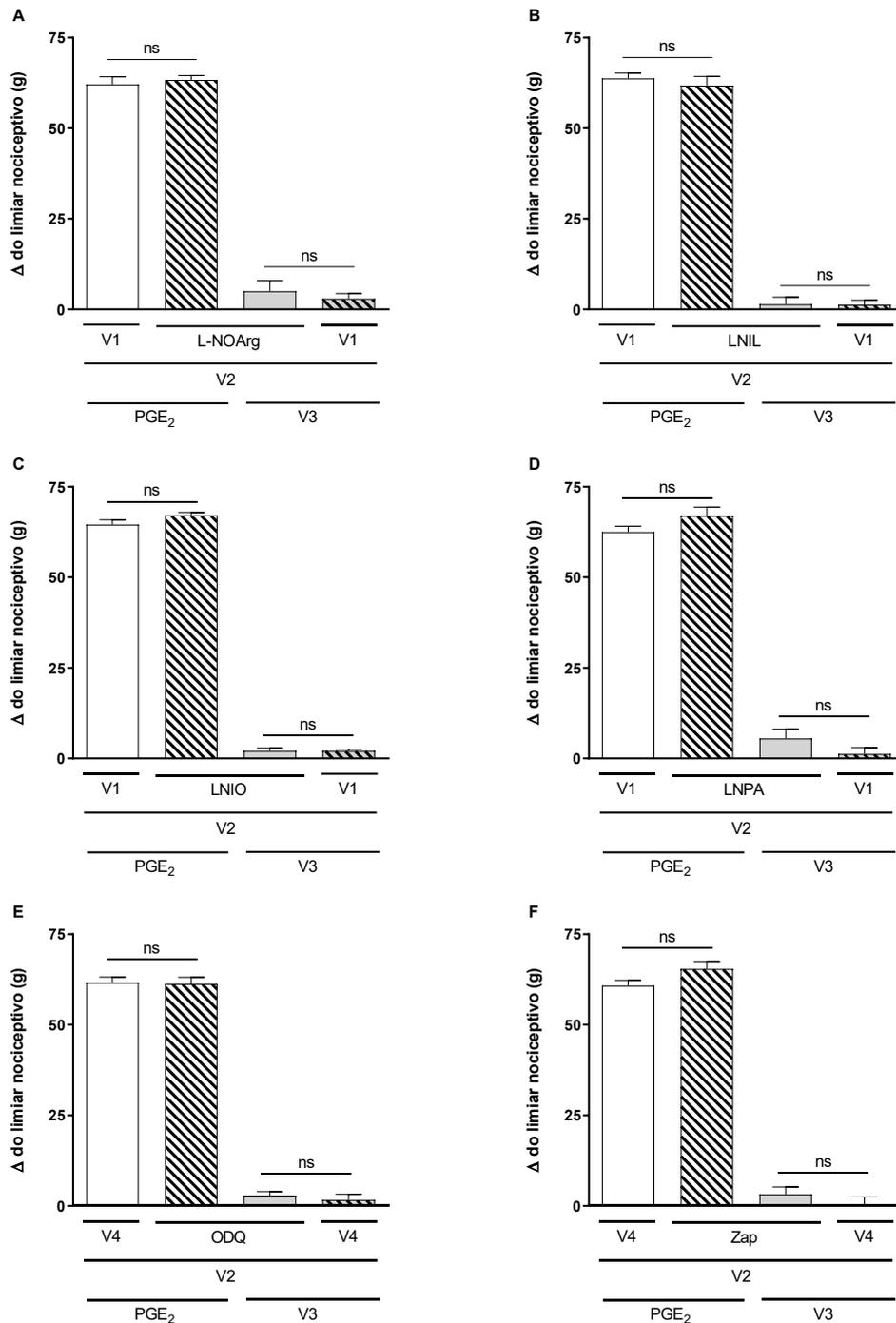


Figura 49. Efeito das drogas do sistema nitrérgico sozinhas ou seus veículos sobre o limiar nociceptivo na ausência e presença de prostaglandina E_2 . Prostaglandina E_2 (PGE_2 ; 2 μ g/pata), L-NOArg (24 μ g/pata), LNIL (24 μ g/pata), LNIO (24 μ g/pata), LNPA (24 μ g/pata), ODQ (200 μ g/pata) e Zaprinast (Zap; 50 μ g/pata), respectivamente nos painéis A, B, C, D, E e F, foram administrados na pata posterior direita e as medições foram feitas no tempo 180 min. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). $n = 4$ camundongos/grupo. ns = não significativo. V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = etanol 25,6%; V3 (veículo 3) = etanol 10%; V4 (veículo 4) = DMSO 10%. (A) $F(3, 12) = 284,4$; (B) $F(3, 12) = 357,4$; (C) $F(3, 12) = 1768$; (D) $F(3, 12) = 277,9$; (E) $F(3, 12) = 511,2$ e (F) $F(3, 12) = 343,4$.

5.5 Envolvimento dos canais para potássio na antinocicepção induzida pelos EETs

Bloqueadores seletivos para os diferentes canais para potássio foram utilizados: (I) glibenclamida (Glib; 80 µg/pata), bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP; (II) tetraetilamônio (TEA; 30 µg/pata), bloqueador dos canais para potássio dependentes de voltagem; (III) dequalínio (DQ; 50 µg/pata), bloqueador dos canais para potássio ativados por cálcio de baixa condutância; e (IV) paxilina (Pax; 20 µg/pata), bloqueador dos canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância. Glib (Figura 50), TEA (Figura 51), DQ (Figura 52) e Pax (Figura 53) não foram capazes de alterar a antinocicepção periférica induzida pelo 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Todos os bloqueadores, quando administrados sozinhos, não causaram alteração no limiar nociceptivo dos animais (Figura 54).

5.6 Envolvimento dos canais para cloreto na antinocicepção induzida pelos EETs

O ácido niflúmico (AN; 32 µg/pata), um bloqueador seletivo dos canais para cloreto ativados por cálcio, foi incapaz de reverter o efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (Figura 55). O AN, quando administrado sozinho, também não alterou a resposta frente à PGE₂ nem ao veículo (Figura 56).

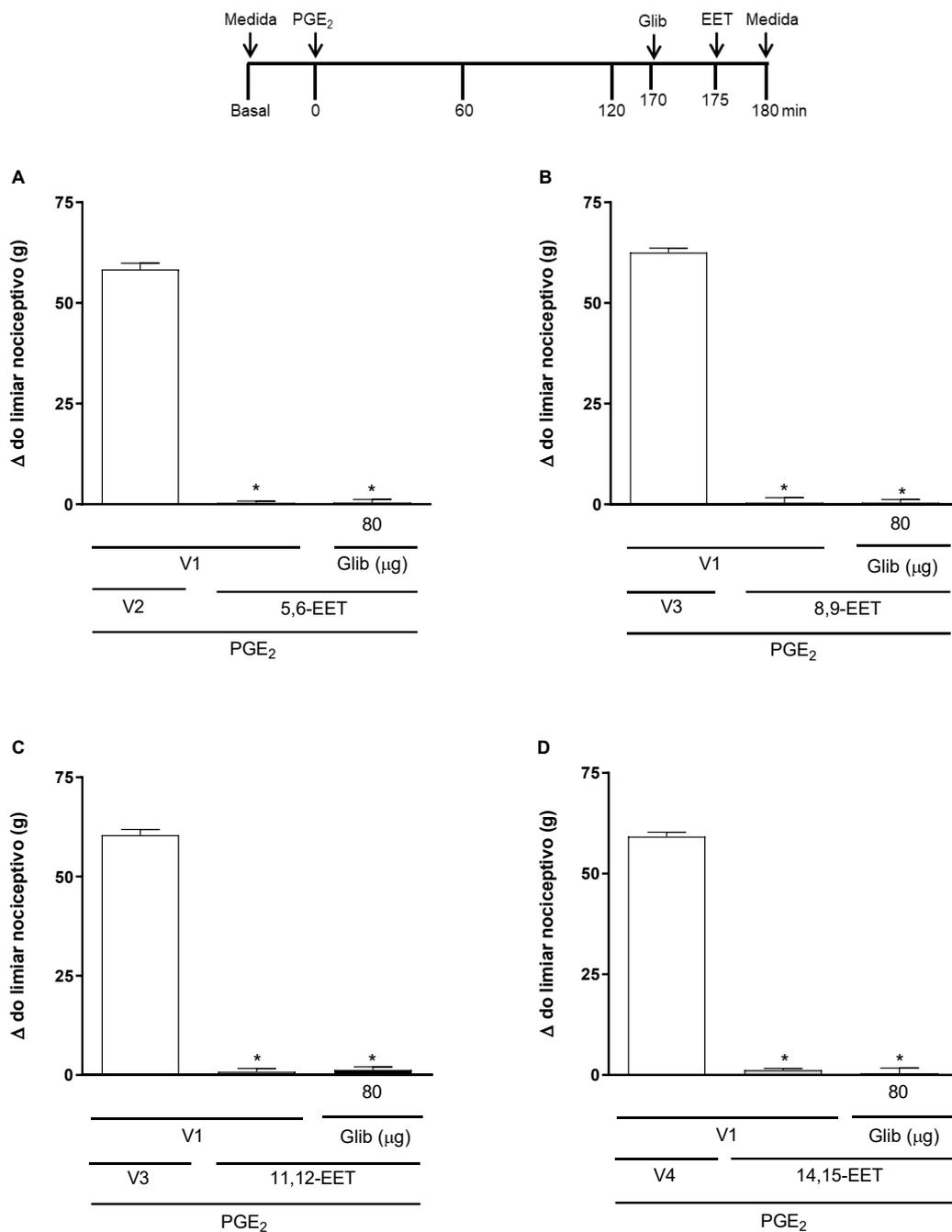


Figura 50. Efeito da glibenclamida sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata), glibenclamida (Glib; 80 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 170 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET) e PGE₂ + Glib + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). V1 (veículo 1) = tween 20 1%; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 1075; (B) F (2, 9) = 1164; (C) F (2, 9) = 1040 e (D) F (2, 9) = 1159.

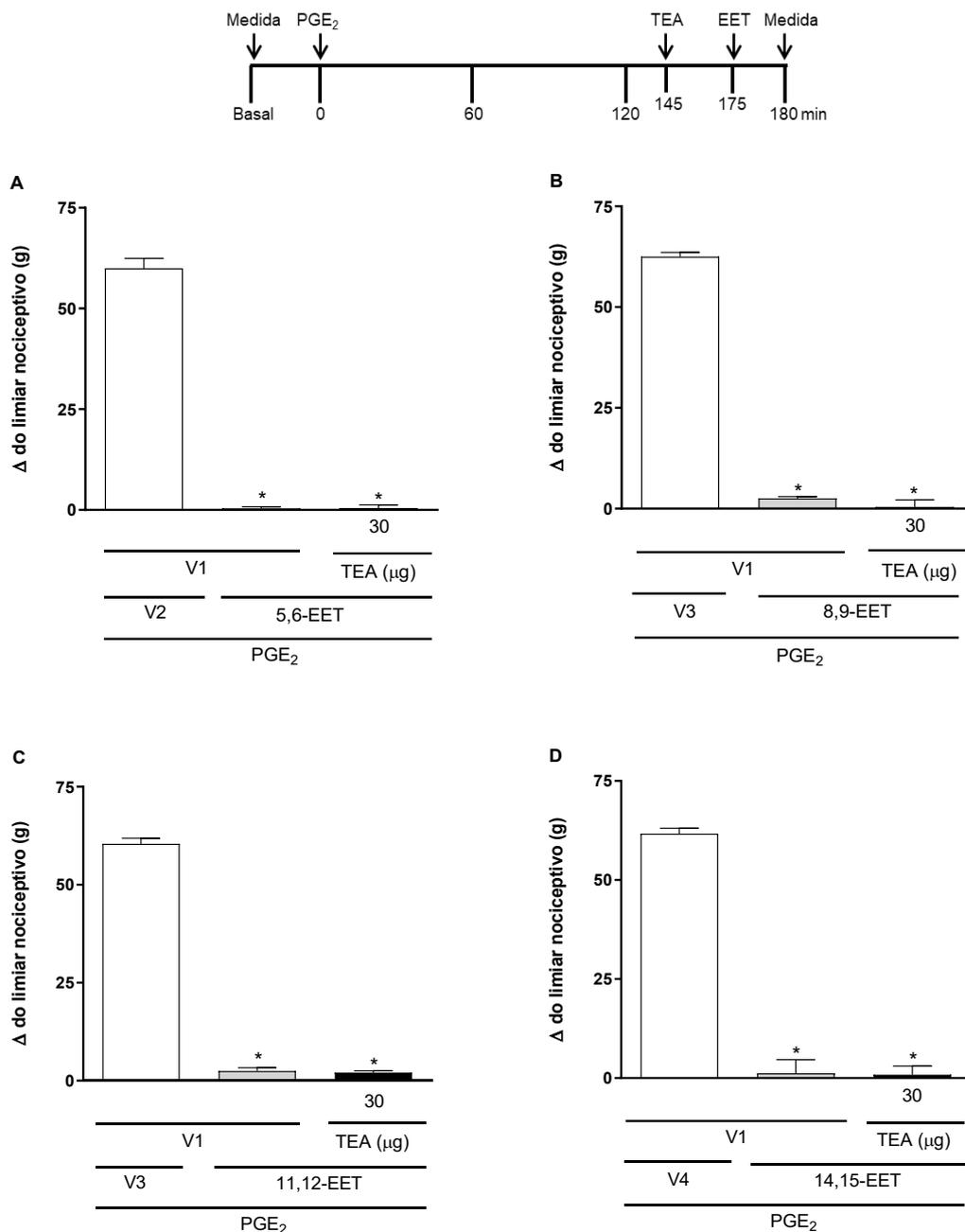


Figura 51. Efeito do tetraetilamônio sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata), tetraetilamônio (TEA; 30 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 170 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET) e PGE₂ + TEA + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 517,2; (B) F (2, 9) = 850,0; (C) F (2, 9) = 1148 e (D) F (2, 9) = 799,5.

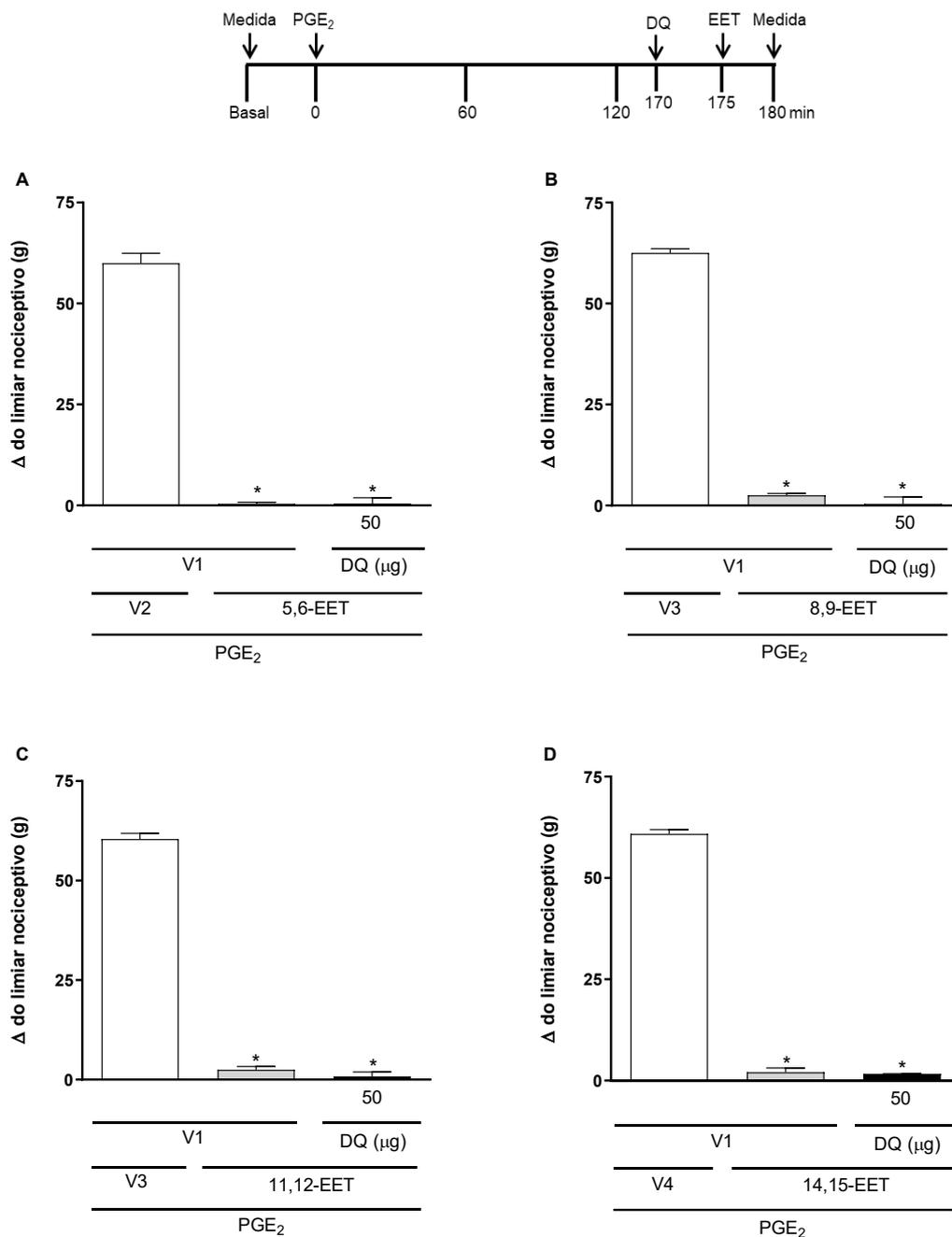


Figura 52. Efeito do dequalínio sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata), dequalínio (DQ; 50 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 170 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET) e PGE₂ + DQ + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 427,2; (B) F (2, 9) = 853,5; (C) F (2, 9) = 877,2 e (D) F (2, 9) = 1537.

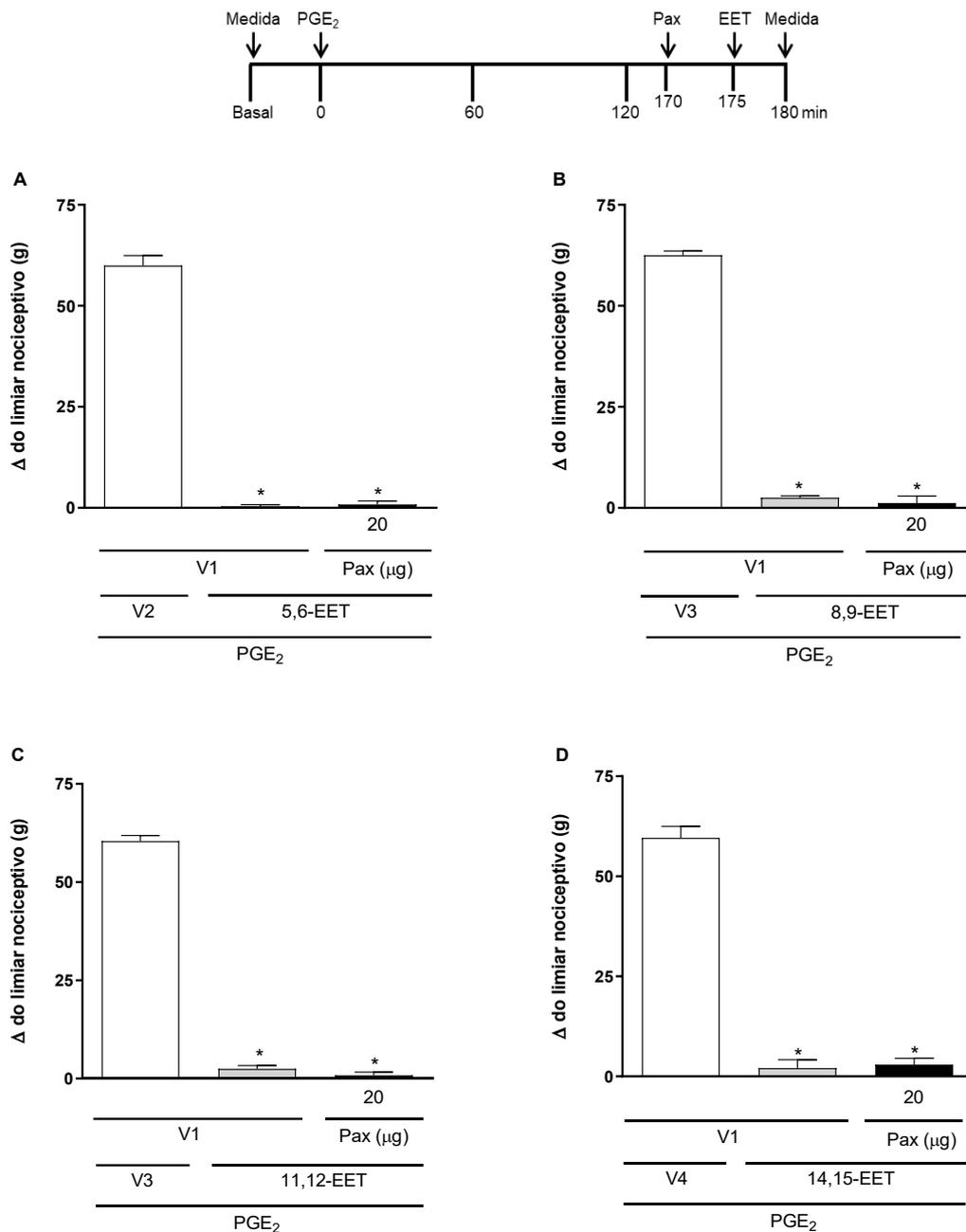


Figura 53. Efeito da paxilina sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata), paxilina (Pax; 20 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 170 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET) e PGE₂ + Pax + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). *p<0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 509,1; (B) F (2, 9) = 840,1; (C) F (2, 9) = 1007 e (D) F (2, 9) = 866,8.

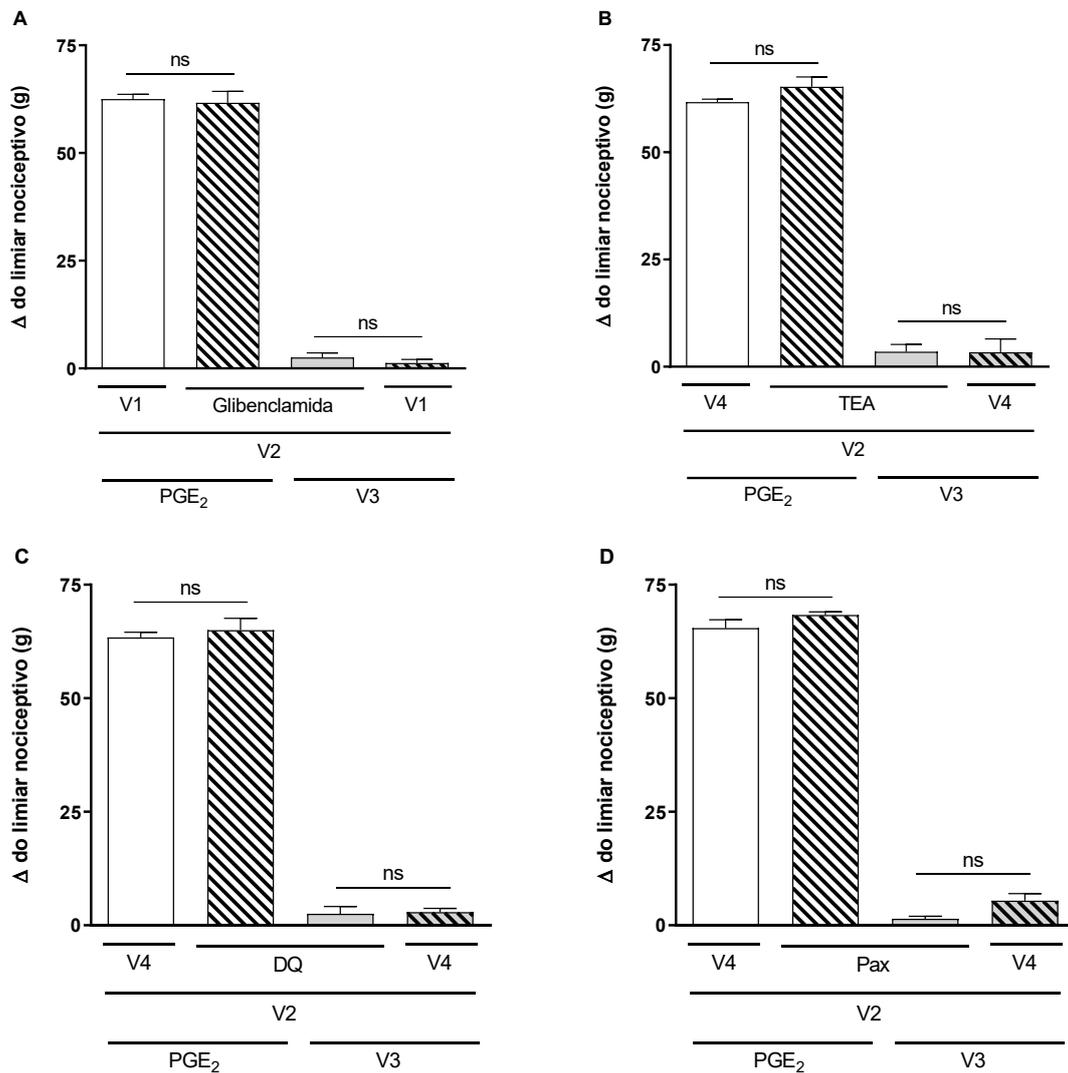


Figura 54. Efeito das drogas dos canais para potássio sozinhas ou seus veículos sobre o limiar nociceptivo na ausência e presença de prostaglandina E₂. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg/pata), glibenclamida (Glib; 80 µg/pata), tetraetilamônio (TEA; 30 µg/pata), dequalínio (DQ; 50 µg/pata) e paxilina (Pax; 20 µg/pata), respectivamente nos painéis A, B, C e D, foram administrados na pata posterior direita e as medições foram feitas no tempo 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. ns= não significativo. V1 (veículo 1) = tween 20 1%; V2 (veículo 2) = etanol 25,6%; V3 (veículo 3) = etanol 10%; V4 (veículo 4) = salina. (A) F (3, 12) = 485,3; (B) F (3, 12) = 262,5; (C) F (3, 12) = 433,5 e (D) F (3, 12) = 814,4.

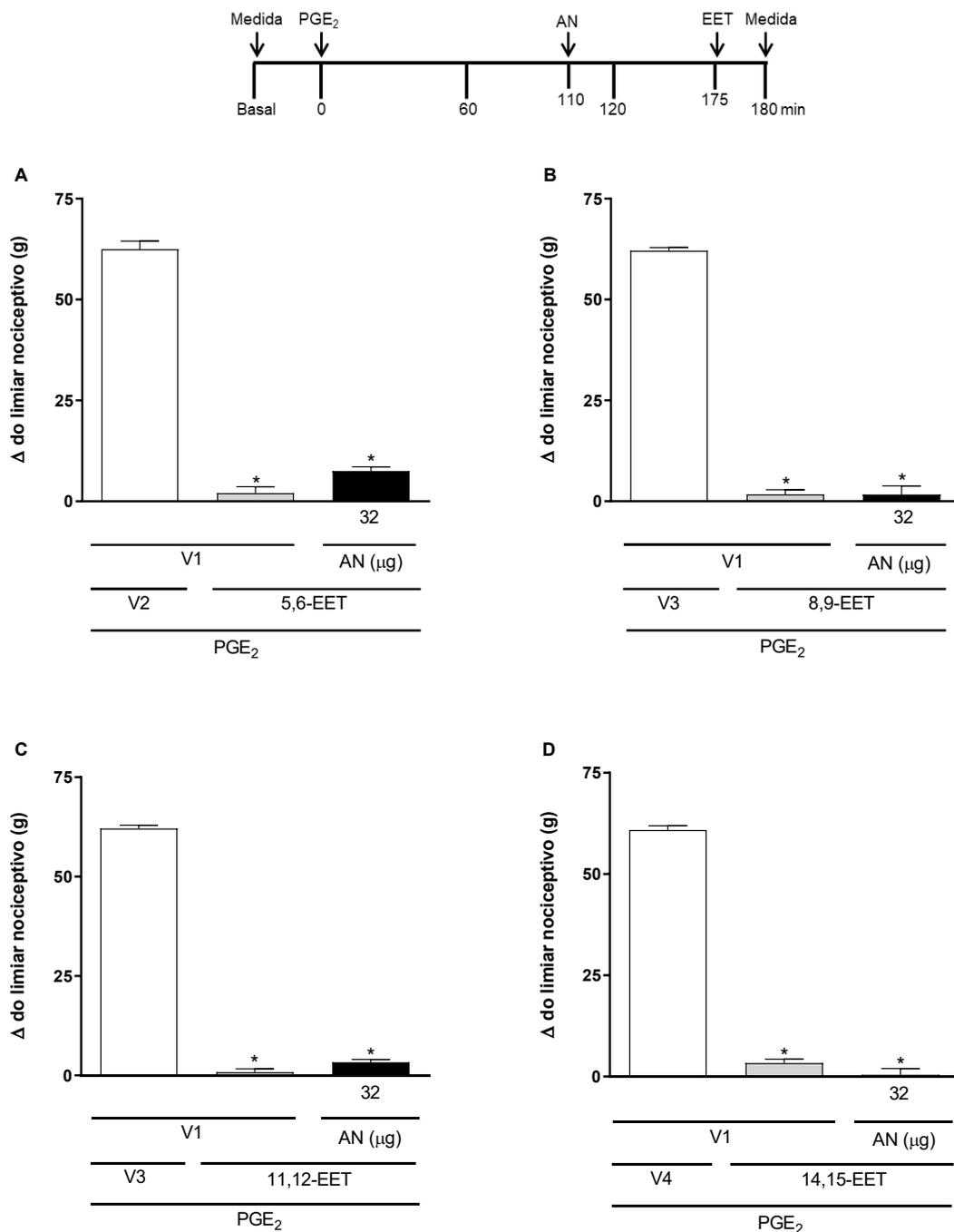


Figura 55. Efeito do ácido niflúmico sobre a antinociceção periférica do 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 μg/pata), ácido niflúmico (AN; 32 μg/pata) e 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET (128, 128, 128 e 512 ng/pata, respectivamente nos painéis A, B, C e D) foram administrados, na pata posterior direita, nos tempos 0, 110 e 175 min, respectivamente. Todas as medições foram feitas no tempo 180 min (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n = 4 camundongos/grupo. Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos PGE₂ + V1 + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET) e PGE₂ + AN + (5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET). *p < 0,05 comparado com o grupo PGE₂ + V1 + (V2, V3 ou V4). V1 (veículo 1) = acetona 3,2%; V2 (veículo 2) = acetato de metila 6,4%; V3 (veículo 3) = etanol 6,4%; V4 (veículo 4) = etanol 25,6%. (A) F (2, 9) = 441,8; (B) F (2, 9) = 555,6; (C) F (2, 9) = 2008 e (D) F (2, 9) = 762,2.

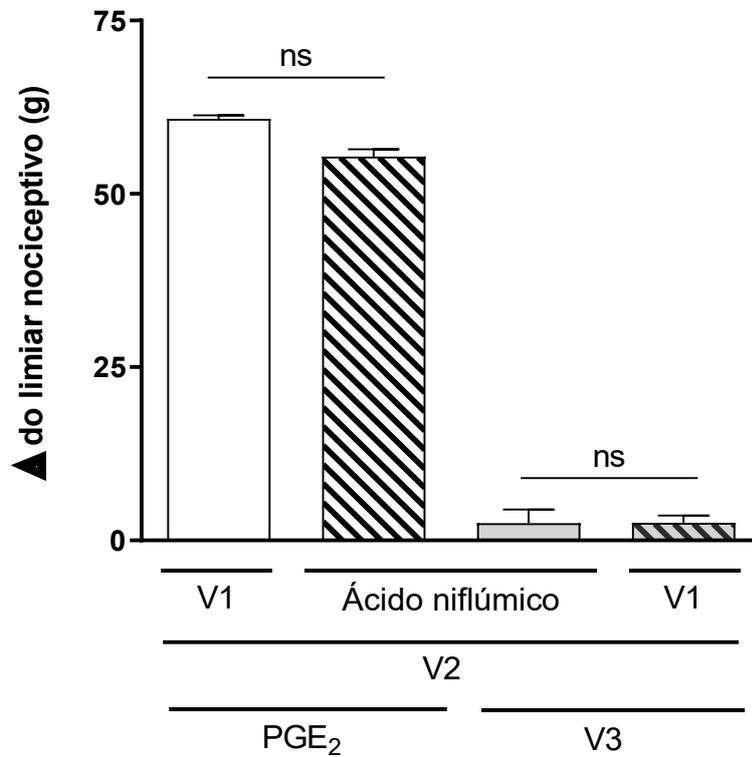


Figura 56. Efeito do ácido niflúmico sozinho ou seu veículo sobre o limiar nociceptivo na ausência e presença de prostaglandina E₂. Prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg/pata) e ácido niflúmico (AN; 32 µg/pata) foram administrados na pata posterior direita e as medições foram feitas no tempo 180 min. Cada coluna representa a média ± E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. ns = não significativo. V1 (veículo 1) = acetona 3,2%; V2 (veículo 2) = etanol 25,6%; V3 (veículo 3) = etanol 10%. F (3, 12) = 638,4.

5.7 Envolvimento dos EETs no controle endógeno periférico da dor

5.7.1 Inflamatória

Inicialmente mostrou-se a dinâmica de indução da dor inflamatória utilizando a CG, em diferentes doses, como agente hiperalgésico (Figura 57). Como pode ser observado, a CG induziu uma resposta nociceptiva dependente da dose, com pico de ação 3 horas após a sua administração. Sendo assim, para os experimentos de potencialização de hiperalgisia foi utilizada a dose de 100 µg e para a obtenção de antinocicepção a dose escolhida foi a de 200 µg.

Para avaliar o envolvimento dos EETs no controle endógeno periférico da dor, utilizamos um antagonista não seletivo dos receptores dos EETs, o 14,15-EEZE. Na Figura 58 observa-se o efeito da injeção intraplantar do 14,15-EEZE (128 ng/pata), em diferentes tempos, a saber: 10 minutos antes dos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas da administração de CG (100 µg/pata). O antagonista induziu uma redução do limiar nociceptivo, ou seja, potencializou a hiperalgisia induzida pela primeira hora de CG. Esse efeito foi observado 10 minutos após a injeção do antagonista e prolongou-se por 15 minutos (Figura 59A). Nos outros tempos em que o 14,15-EEZE foi administrado na pata dos animais, não se observou nenhuma alteração de limiar. Além disso, quando administrado sozinho, o 14,15-EEZE não alterou o limiar nociceptivo basal sem a presença do estímulo nociceptivo (CG). Desta forma, 60 minutos após a injeção de CG foi o tempo escolhido para os experimentos subsequentes. O 14,15-EEZE (128 ng/pata) também foi administrado 50 minutos após a injeção intraplantar de PGE₂. No entanto, diferentemente da potencialização da hiperalgisia induzida pela CG, nessas condições, esse antagonista não foi capaz de alterar o efeito hiperalgésico da PGE₂ (Figura 59B).

Outra ferramenta farmacológica utilizada para investigar o envolvimento dos EETs no controle endógeno periférico da dor foi um inibidor das enzimas epoxigenases do citocromo P450, portanto, um inibidor da síntese de AGEPs, incluindo os EETs. A administração intraplantar de MS-PPOH (10 µg/pata) 55 minutos após a administração de CG (100 µg/pata) induziu uma redução do limiar nociceptivo, ou seja, potencializou a hiperalgisia induzida pela CG. Esse efeito foi observado 5 minutos após a injeção desse inibidor e prolongou-se por 15 minutos. O

MS-PPOH quando administrado sem a presença do estímulo nociceptivo (CG) não foi capaz de alterar o limiar nociceptivo basal (Figura 60).

Outra estratégia utilizada avaliar o envolvimento dos EETs no controle endógeno periférico da dor foi o TPPU, um inibidor da enzima EHs (IEHs), portanto, um inibidor da degradação dos AGEPs, incluindo os EETs. Adicionalmente também foi utilizada uma abordagem não farmacológica com camundongos *knockout* para a enzima EHs (EHs KO). Observou-se que a administração intraplantar de TPPU (0,4 µg/pata) 30 minutos após a administração de CG (200 µg/pata), nos camundongos Swiss, induziu um aumento do limiar nociceptivo, ou seja, reduziu a hiperalgesia induzida pela dose máxima de CG. Esse efeito foi observado 30 minutos após a injeção desse inibidor e prolongou-se até 180 minutos. Salienta-se que o TPPU quando administrado sem a presença do estímulo nociceptivo (CG) não foi capaz de alterar o limiar nociceptivo basal (Figura 61). Utilizando a estratégia de deleção da enzima EHs, os camundongos C57BL/6 KO apresentaram uma hiperalgesia reduzida se comparado com os animais controle (WT). Esse efeito é equiparado ao obtido com a injeção de TPPU nos camundongos Swiss, no entanto, se estendeu por 360 min (Figura 62).

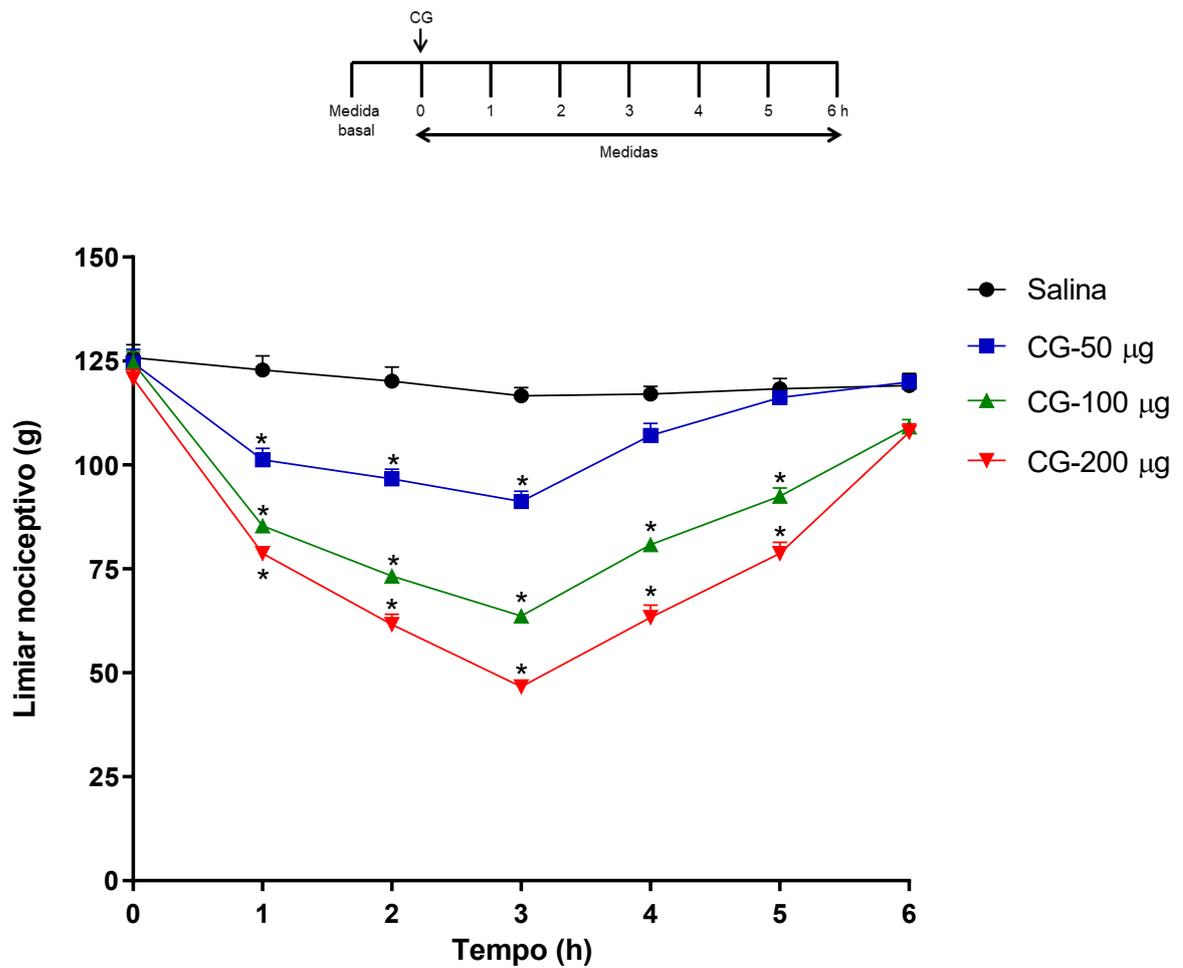


Figura 57. Curva temporal do efeito nociceptivo induzido por diferentes doses de carragenina. Carragenina (CG; 50, 100 e 200 µg/pata) foi administrada na pata posterior direita na 0 h. As medições foram realizadas nos tempos indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo salina. F (3, 12) = 105,2.

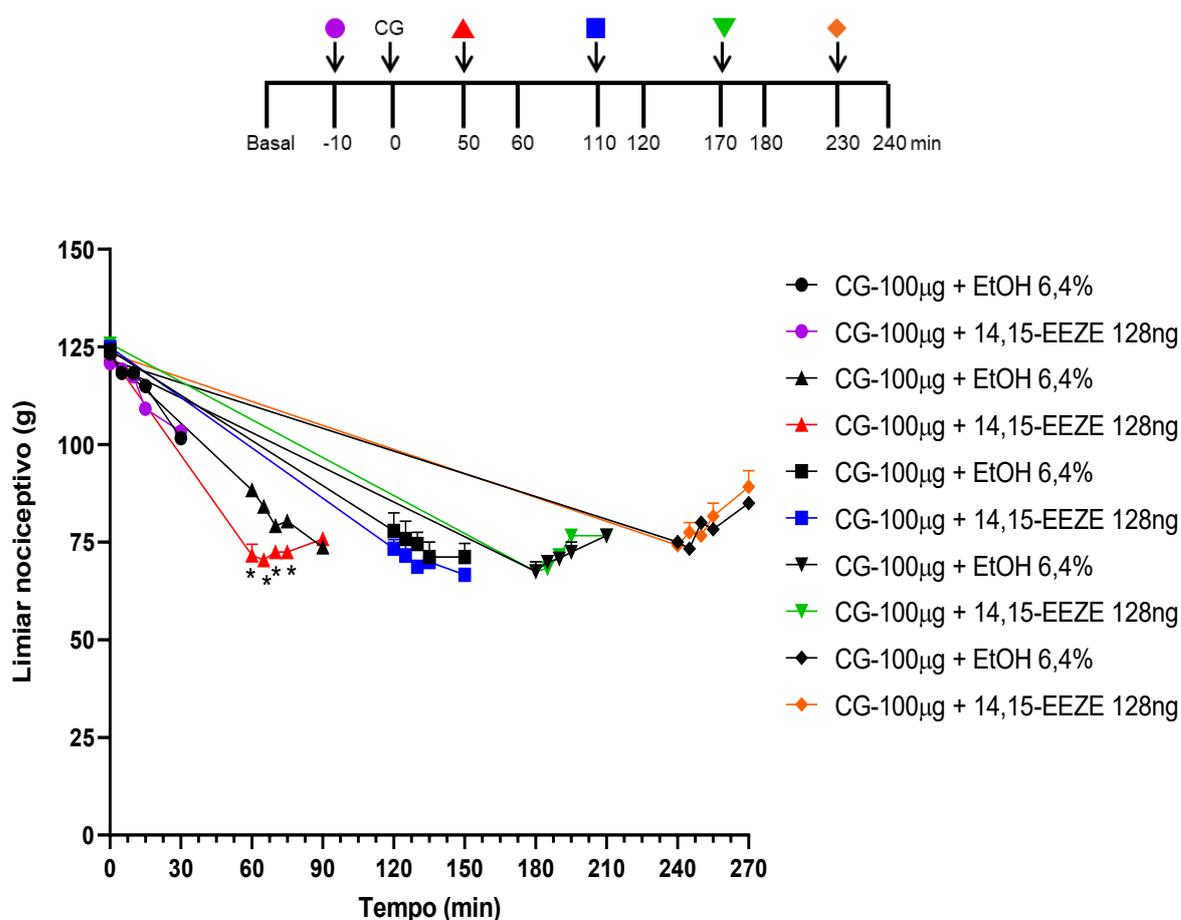


Figura 58. Curva temporal do efeito do 14,15-EEZE sobre a nociceção induzida por carragenina. Carragenina (CG; 100 μ g/pata) e 14,15-EEZE (128 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). $n=4$ camundongos/grupo. * $p<0,05$ comparado ao respectivo grupo CG + EtOH 6,4% em salina. EtOH = etanol.

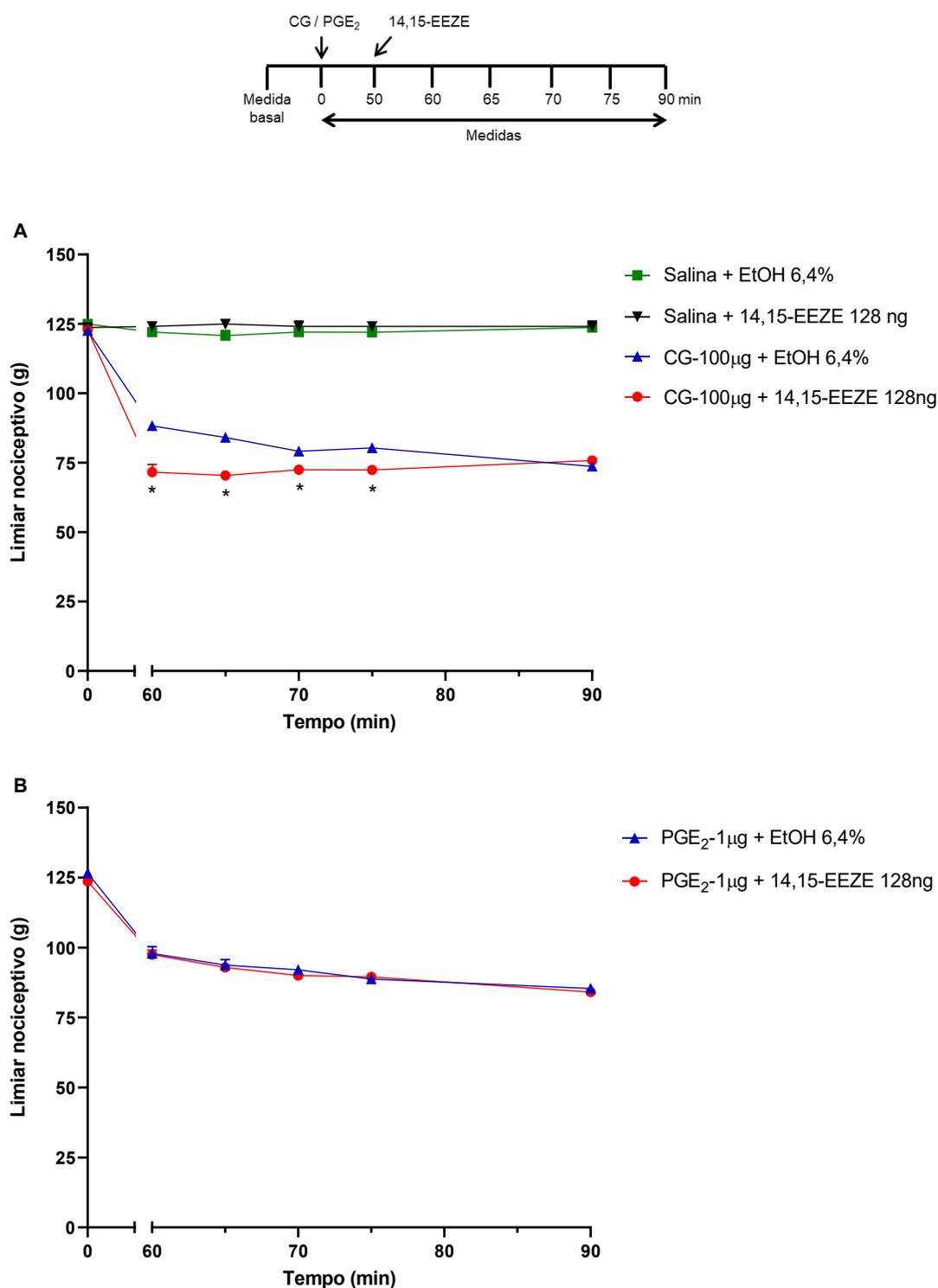


Figura 59. Efeito do 14,15-EEZE sobre a nociceção induzida por carragenina e por prostaglandina E₂. (A) Carragenina (CG; 100 µg/pata), (B) prostaglandina E₂ (PGE₂; 2 µg/pata) e 14,15-EEZE (128 ng/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0, 0 e 50 min, respectivamente. As medições foram realizadas nos tempos indicados no diagrama sobre os gráficos. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo CG + EtOH 6,4% em salina. EtOH = etanol. (A) F (3, 12) = 759,1 e (B) F (1, 6) = 0,5846.

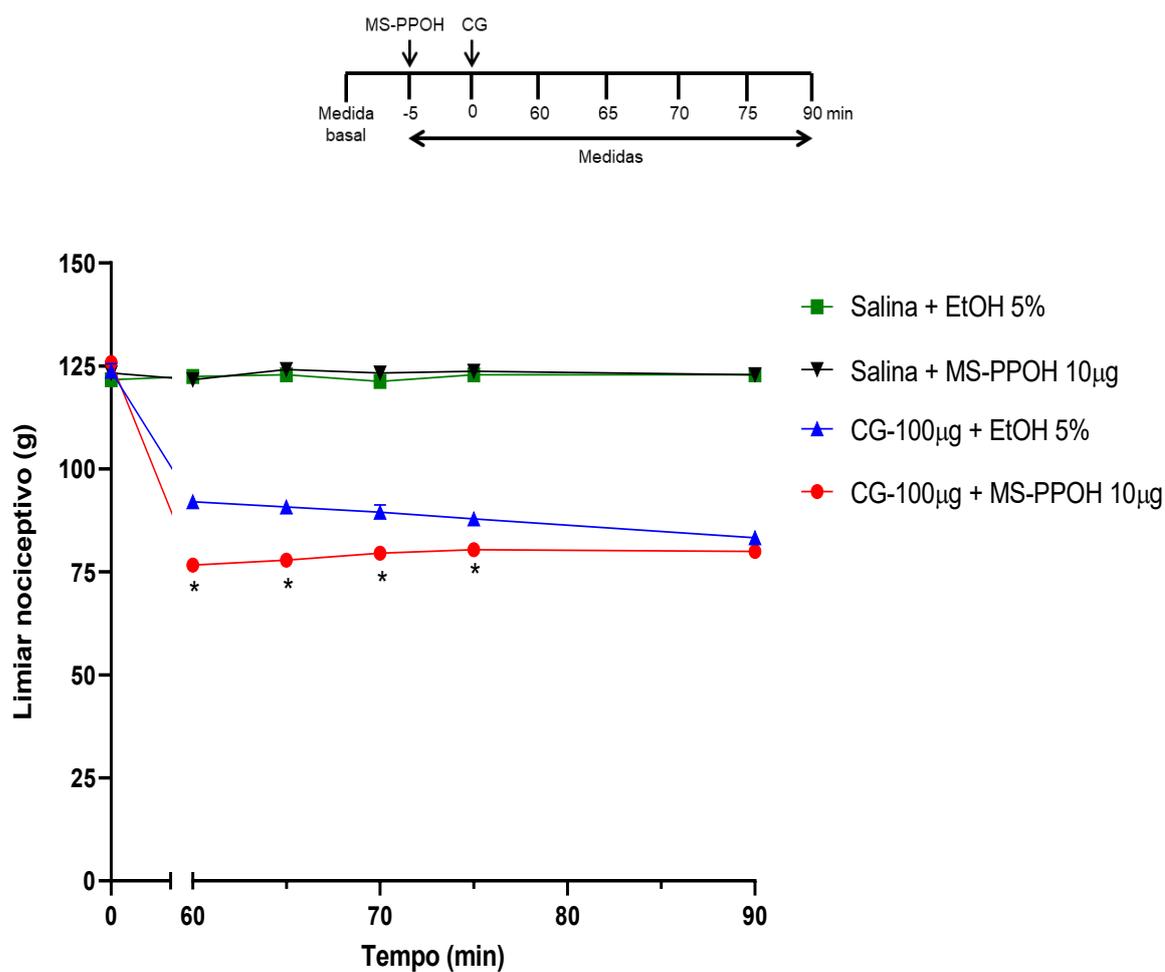


Figura 60. Efeito do MS-PPOH sobre a nociceção induzida por carragenina. Carragenina (CG; 100 µg/pata) e MS-PPOH (10 µg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e -5 min, respectivamente. As medições foram realizadas nos tempos indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo CG + EtOH 5% em salina. EtOH = etanol. F (3, 12) = 588,1.

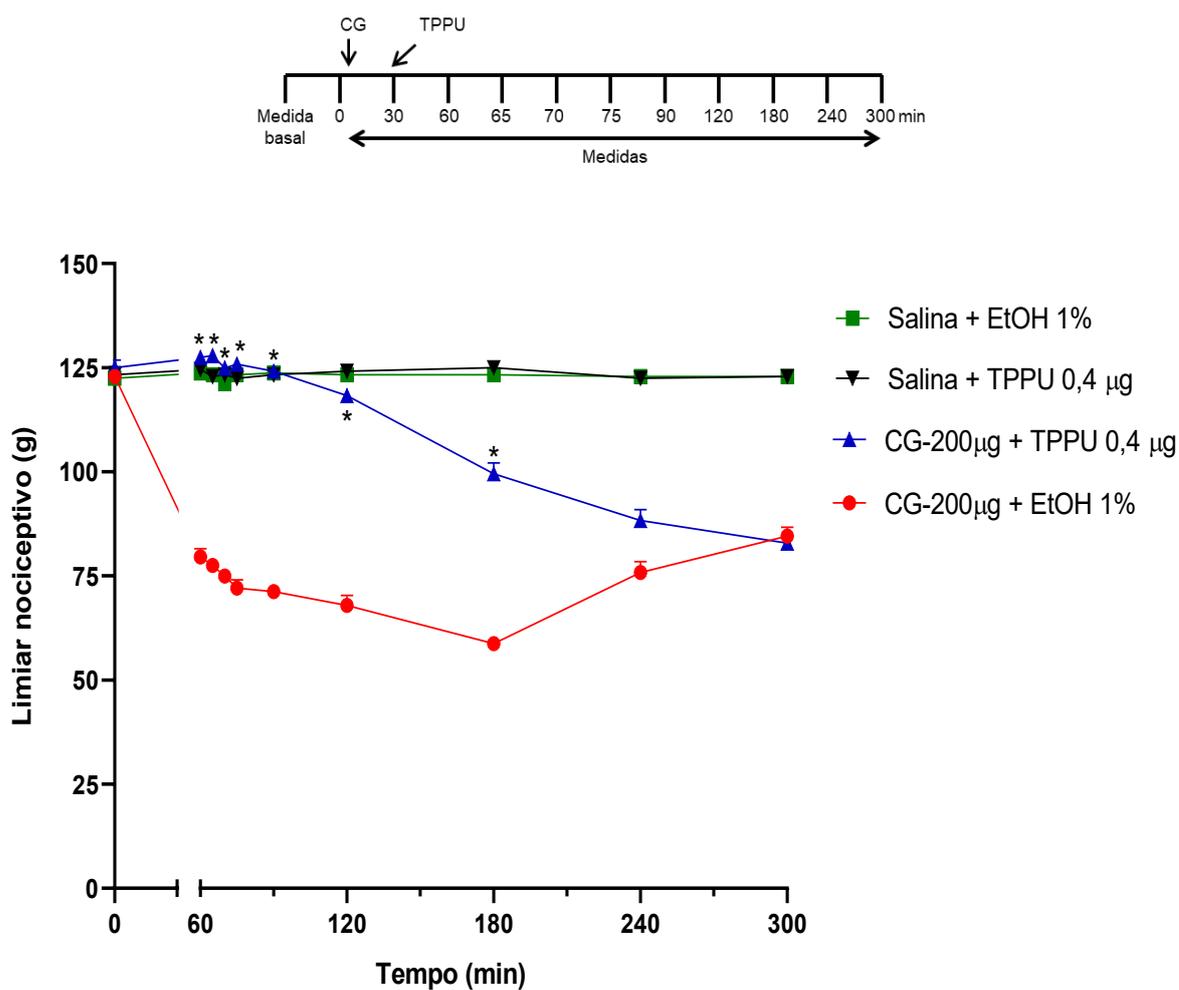


Figura 61. Efeito do TPPU sobre a nociceção induzida por carragenina em camundongos Swiss. Carragenina (CG; 200 µg/pata) e TPPU (0,4 µg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 30 min, respectivamente. As medições foram realizadas nos tempos indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo CG + EtOH 1% em salina. EtOH = etanol. F (3, 12) = 1299.

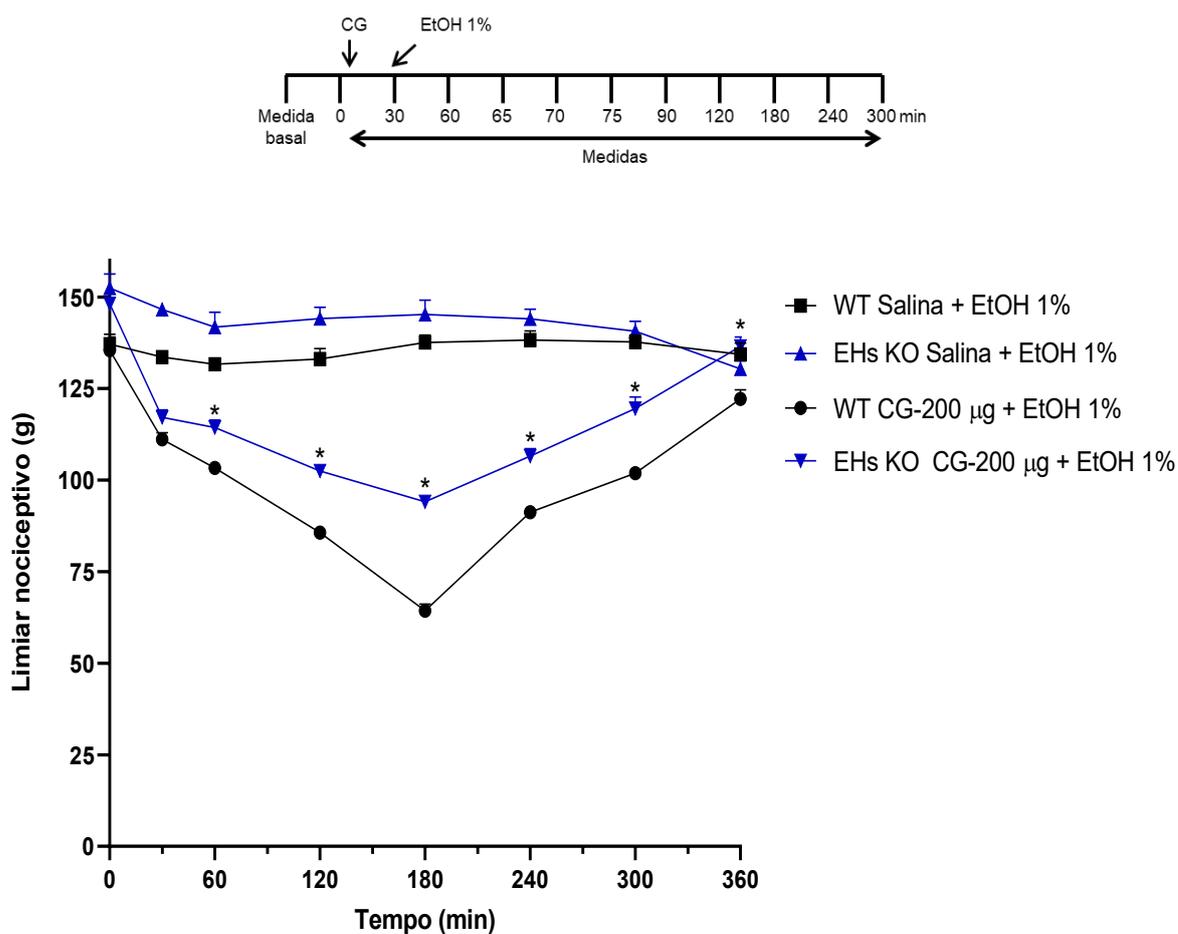


Figura 62. Efeito da deleção da enzima EHs (EHs KO) sobre a nociceção induzida por carragenina em camundongos C57BL/6. Carragenina (CG; 200 µg/pata) e etanol 1% (veículo do TPPU) foram administrados na pata posterior direita de camundongos WT e EHs KO nos tempos 0 e 30 min, respectivamente. As medições foram realizadas nos tempos indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). n= 4-8 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo WT CG + EtOH 1% em salina. EtOH = etanol, EHs = enzima epóxido hidrolase solúvel.

5.7.2 Neuropática

Inicialmente mostrou-se a dinâmica de indução da dor neuropática, após a constrição do nervo ciático, realizando-se medidas dos limiares nociceptivos na pata posterior direita dos animais durante 15 dias consecutivos. Os animais foram divididos nos grupos: *naive*, que são os animais que não foram submetidos a nenhum tipo de procedimento cirúrgico; *sham*, que são os animais que foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico que os animais operados, porém não foram realizadas as ligaduras de constrição ao redor do nervo; e o grupo operado, que são os animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico com ligadura do fio ao redor do nervo. Observou-se que, no 1º dia após a constrição, os animais operados apresentaram um efeito hipoalgésico que durou até o 3º dia. A partir do 4º dia houve uma diminuição crescente do limiar nociceptivo, com a estabilização da resposta hiperalgésica no 10º dia. O grupo *sham* não apresentou nenhuma diferença no limiar nociceptivo em relação ao grupo *naive* (Figura 63). A partir dessa curva, determinou-se que todos os experimentos em que se desejava observar uma potencialização do efeito nociceptivo foram realizados 6 dias após a cirurgia de constrição do nervo ciático e, para observação de um efeito antinociceptivo, os experimentos foram realizados no 12º dia após o procedimento cirúrgico.

Utilizando um antagonista não seletivo dos receptores dos EETs, o 14,15-EEZE (128 ng/pata), observou-se que a administração intraplantar desse antagonista reduziu o limiar nociceptivo no 6º dia após a cirurgia de constrição do nervo ciático, evidenciando, portanto, uma potencialização da nocicepção durante o desenvolvimento da dor neuropática induzida pela cirurgia. Esse efeito foi observado 10 minutos após a injeção do antagonista e prolongou-se por 15 minutos. O 14,15-EEZE, quando administrado no grupo *sham*, não foi capaz de alterar o limiar nociceptivo (Figura 64).

De forma semelhante, a administração intraplantar de MS-PPOH (10 µg/pata), um inibidor das epoxigenases do citocromo P450, reduziu o limiar nociceptivo no 6º dia após a cirurgia de constrição do nervo ciático, evidenciando, portanto, uma potencialização da nocicepção durante o desenvolvimento da dor neuropática induzida pela cirurgia. Esse efeito foi observado 5 minutos após a injeção do MS-PPOH e prolongou-se por 15 minutos. Salienta-se que esse inibidor, quando

administrado no grupo *sham*, não foi capaz de alterar o limiar nociceptivo (Figura 65).

Outra estratégia utilizada avaliar o envolvimento dos EETs no controle endógeno periférico da dor foi a inibição da degradação dessas substâncias utilizando o TPPU, um inibidor da EHs, e uma abordagem não farmacológica com camundongos *knockout* para a enzima EHs (EHs KO). Observou-se que a administração intraplantar de TPPU (0,4 µg/pata), nos camundongos Swiss, aumentou o limiar nociceptivo no 12º dia após a cirurgia de constrição do nervo ciático, evidenciando, portanto, um efeito antinociceptivo desse inibidor frente a dor neuropática já instalada. Esse efeito foi observado 30 minutos após a injeção do TPPU e prolongou-se até 240 minutos. O TPPU, quando administrado no grupo *sham*, não promoveu nenhuma alteração no limiar nociceptivo (Figura 66). Utilizando a estratégia de deleção da enzima EHs, os camundongos C57BL/6 KO apresentaram uma hiperalgesia reduzida se comparado com os animais controle (WT). Esse efeito é equiparado ao obtido com a injeção de TPPU nos camundongos Swiss, no entanto, apresenta uma ação mais duradoura (Figura 67A). Para a verificação da sensibilidade dos camundongos C57BL/6 ao TPPU, esse inibidor foi administrado na pata e observou-se que os animais EHs KO não apresentaram nenhuma alteração no limiar nociceptivo, enquanto nos animais WT foi observado um efeito antinociceptivo (Figura 67B).

Além do comportamento nociceptivo utilizando o método de compressão da pata, também foi investigado o comportamento motor dos camundongos C57BL/6 antes e após a CCI em animais WT e EHs KO utilizando o *CatWalk*. Foi demonstrado que os animais operados (WT e EHs KO) apresentam menor área de impressão da pata se comparado aos seus pares *sham* e o tratamento com TPPU não alterou esse comportamento (Figura 68). De maneira similar, observou-se uma redução na intensidade média de contato da pata com a superfície nos animais operados sem qualquer alteração quando tratados com TPPU (Figura 69A-B). Em relação à fase de apoio, verificou-se que os animais operados (WT e EHs KO) gastam menos tempo com a pata apoiada na plataforma quando comparados aos seus pares *sham*. Adicionalmente, foi observado que dentre os animais operados, o grupo WT teve uma maior redução na fase de apoio e esse efeito foi parcialmente

recuperado mediante o tratamento com TPPU (Figura 69C-D). Analisando a fase de balanço, observou-se que os animais WT operados gastaram mais tempo sem a pata apoiada se comparado aos seus pares *sham* e esse efeito foi revertido pelo tratamento com TPPU. Além disso, foi possível observar que os animais EHs KO não apresentaram diferença entre os grupos *sham* e operado (Figura 69E-F).

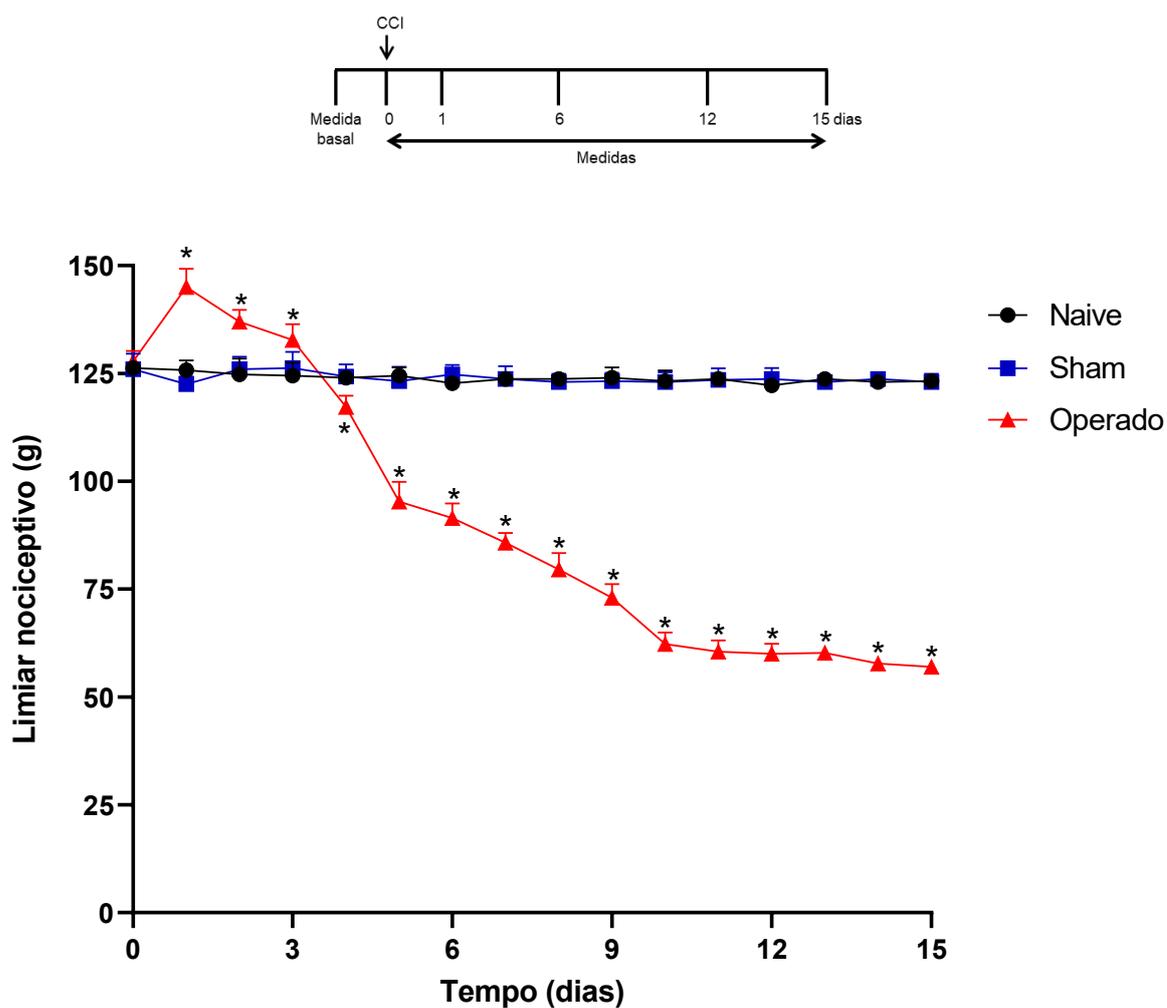


Figura 63. Avaliação temporal do desenvolvimento da dor neuropática na pata de camundongos após constrição do nervo ciático. A constrição do nervo ciático (CCI) foi realizada no dia 0. As medições foram realizadas nos tempos indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). $n = 5$ camundongos/grupo. $*p < 0,05$ comparado com o grupo *sham*. $F(2, 12) = 984,2$.

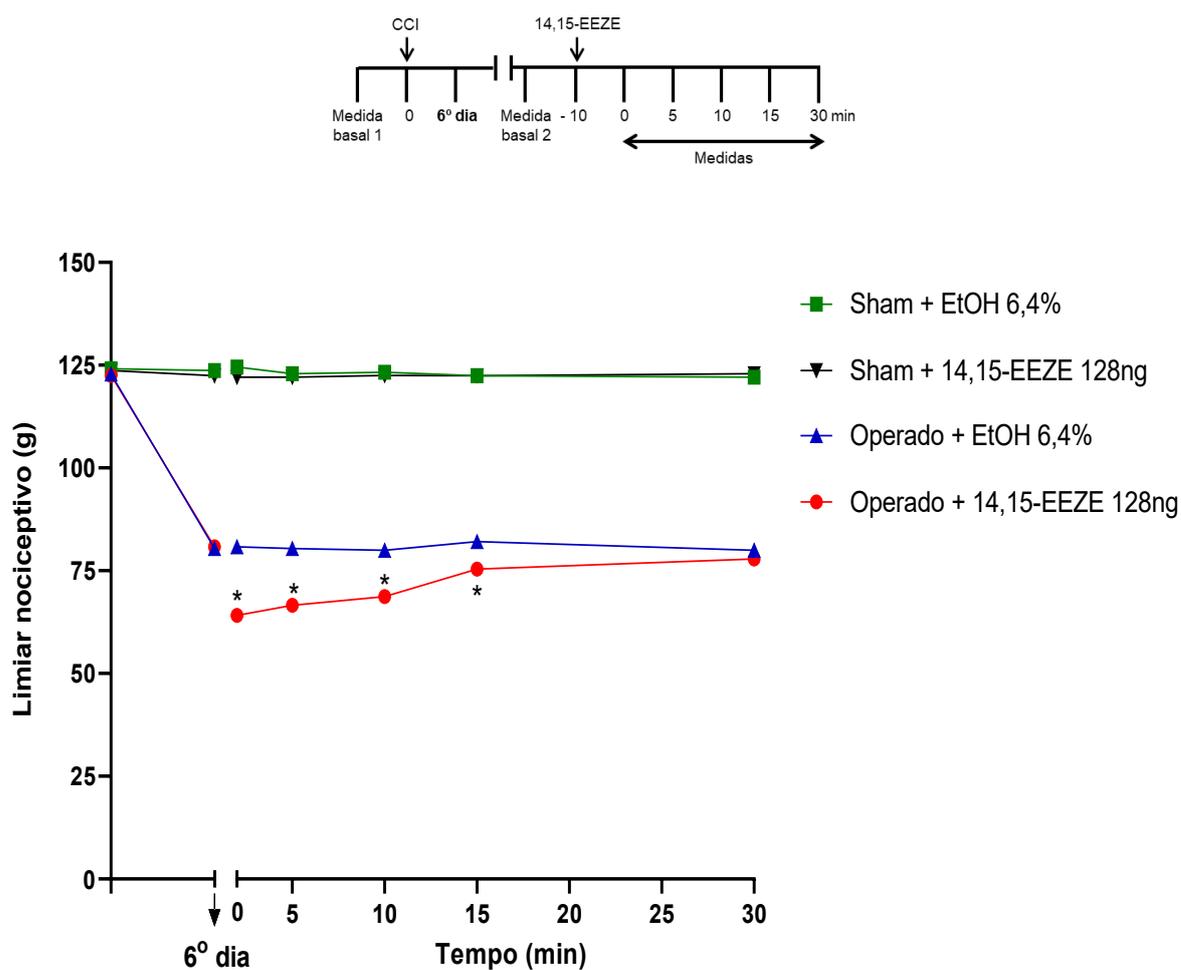


Figura 64. Efeito do 14,15-EEZE sobre a dor neuropática. 14,15-EEZE (128 ng/pata) foi administrado na pata posterior direita 6 dias após a constrição do nervo ciático. Os tempos de administração do 14,15-EEZE, bem como das medições, estão indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). $n = 4$ camundongos/grupo. $*p < 0,05$ comparado com o grupo operado + EtOH 6,4% em salina. EtOH = etanol. $F(3, 12) = 3110$.

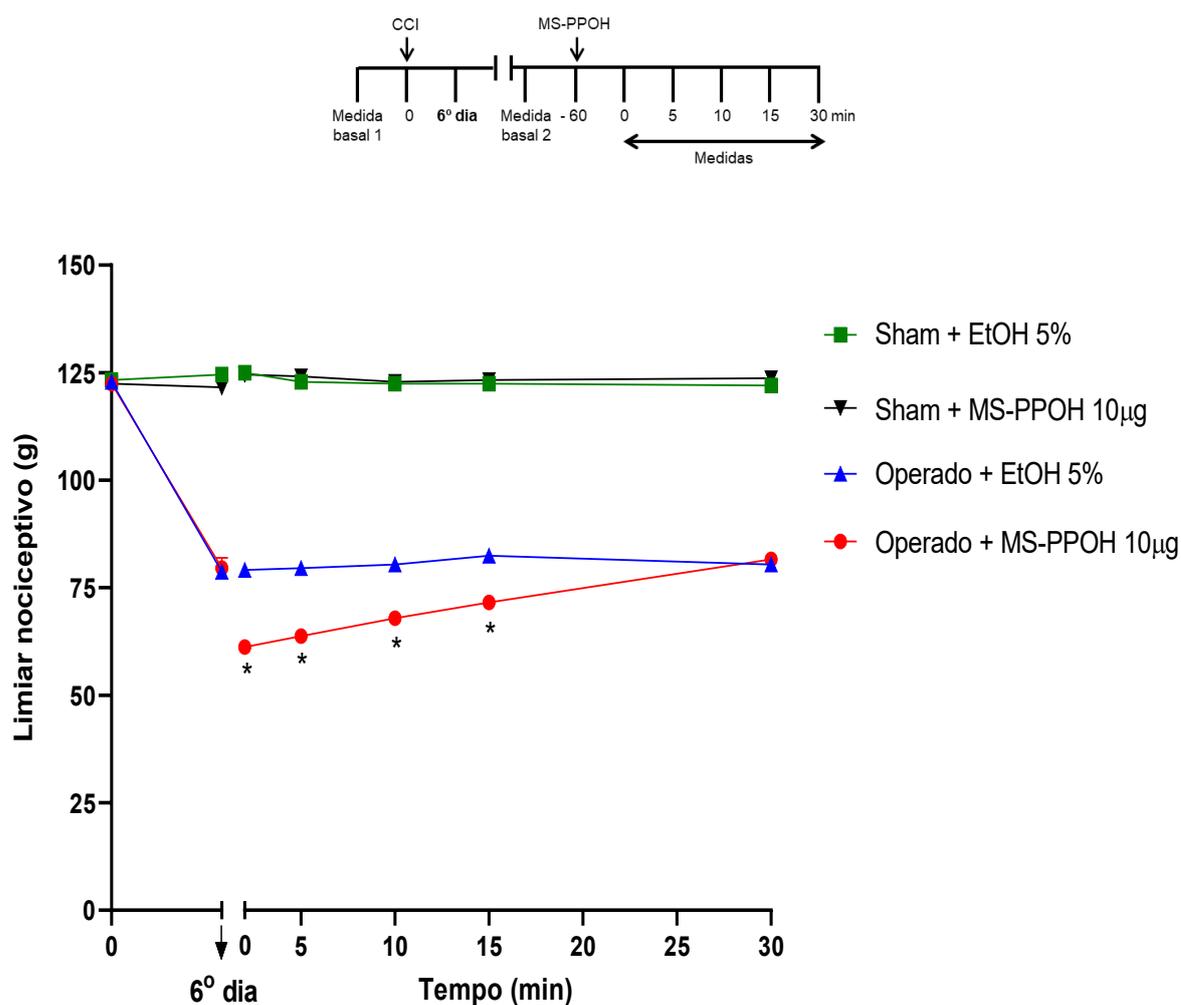


Figura 65. Efeito do MS-PPOH sobre a dor neuropática. MS-PPOH (10 µg/pata) foi administrado na pata posterior direita 6 dias após a constrição do nervo ciático. Os tempos de administração do MS-PPOH, bem como das medições, estão indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). $n = 4$ camundongos/grupo. * $p < 0,05$ comparado com o grupo operado + EtOH 5% em salina. EtOH = etanol. $F(3, 12) = 3108$.

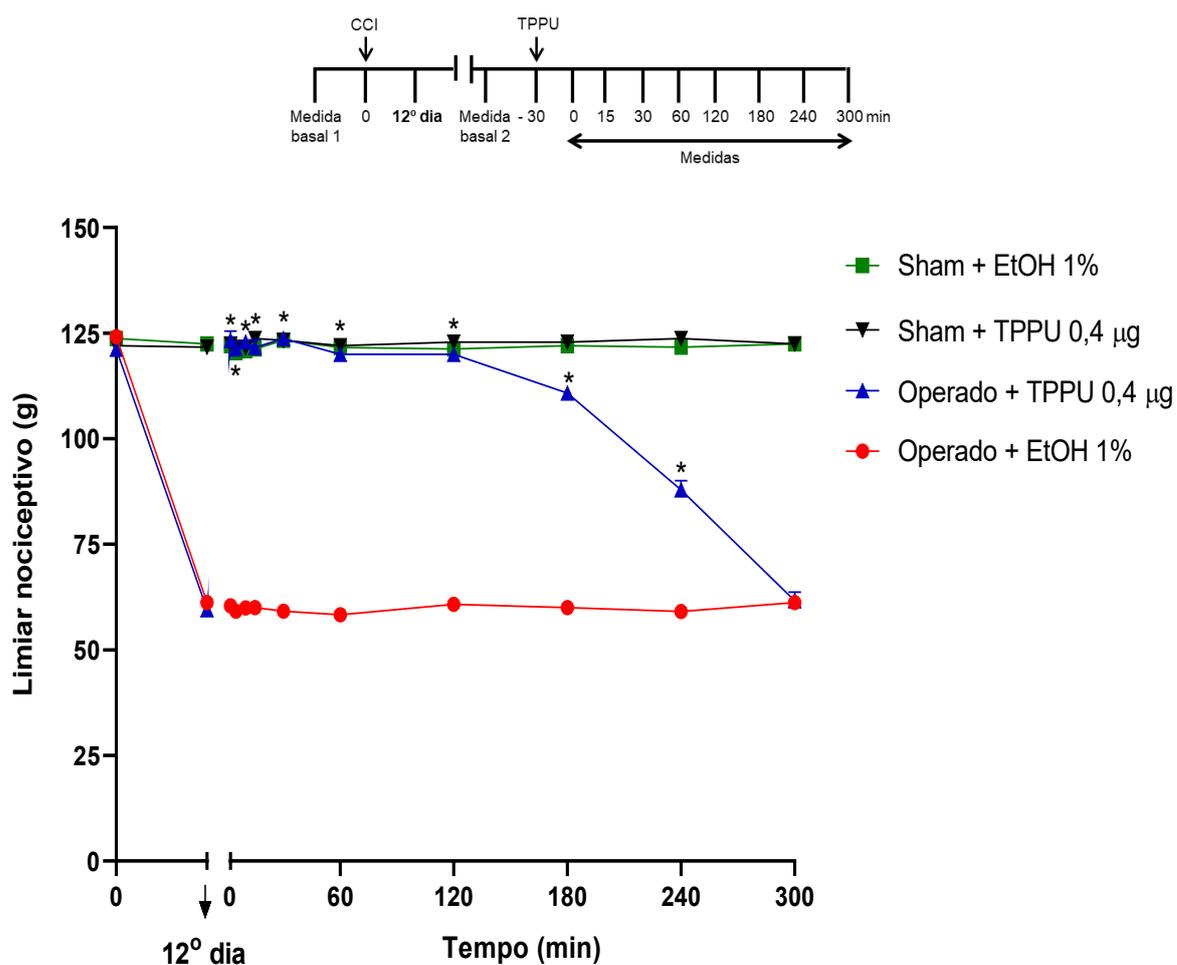


Figura 66. Efeito do TPPU sobre a dor neuropática em camundongos Swiss. TPPU (0,4 µg/pata) foi administrado na pata posterior direita 12 dias após a constrição do nervo ciático. Os tempos de administração do TPPU, bem como das medições, estão indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). n= 4 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo operado + EtOH 1% em salina. EtOH = etanol. F (3, 12) = 1822.

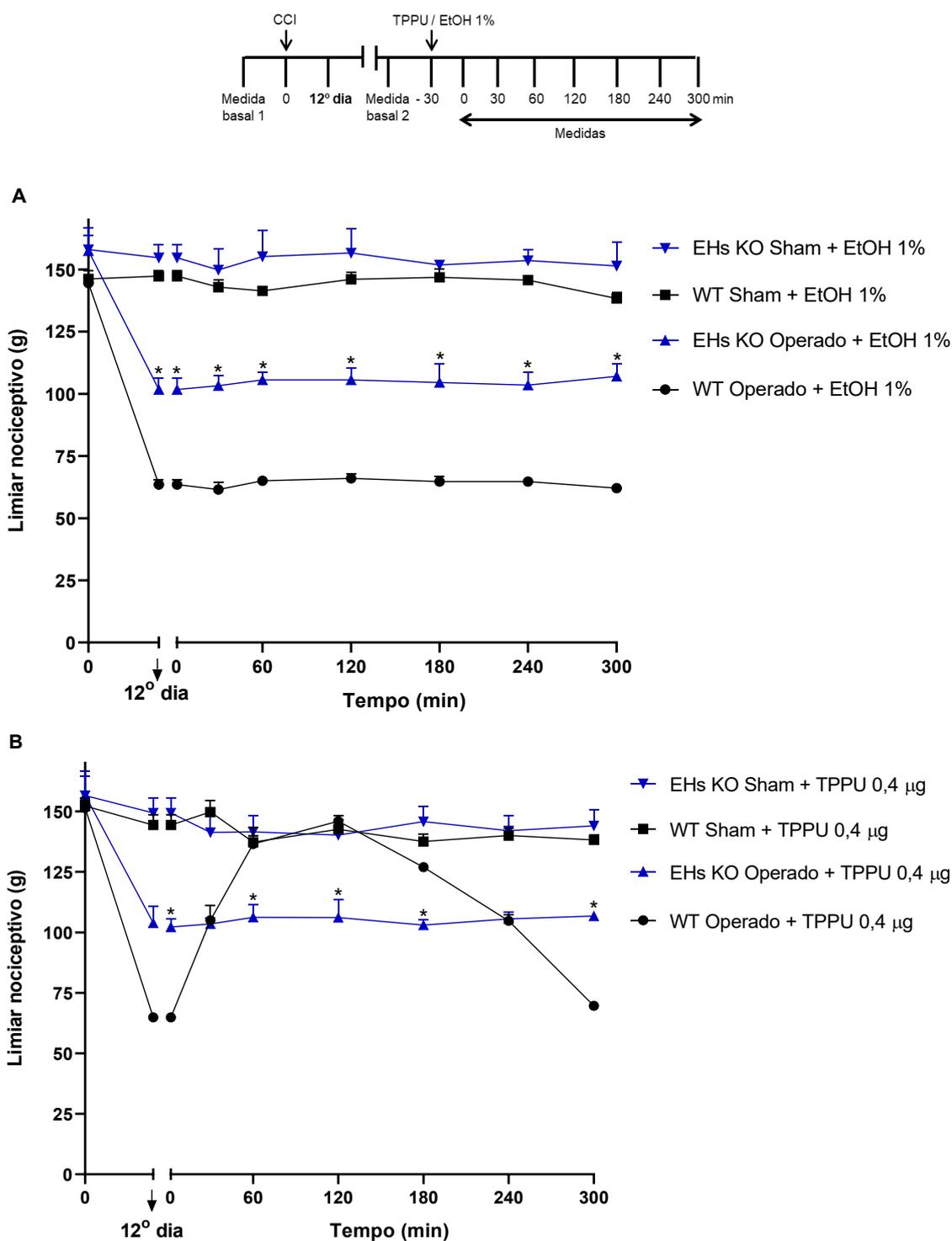


Figura 67. Efeito da deleção da enzima EHS (EHS KO) sobre a dor neuropática em camundongos C57BL/6. (A) EtOH 1% ou (B) TPPU (0,4 µg/pata) foi administrado na pata posterior direita 12 dias após a constrição do nervo ciático (CCI) em camundongos WT e EHS KO. Os tempos de administração das drogas, bem como das medições, estão indicados no diagrama sobre o gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). n= 5-8 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo WT Operado + EtOH 1% / TPPU. EtOH = etanol, EHS = enzima epóxido hidrolase solúvel.

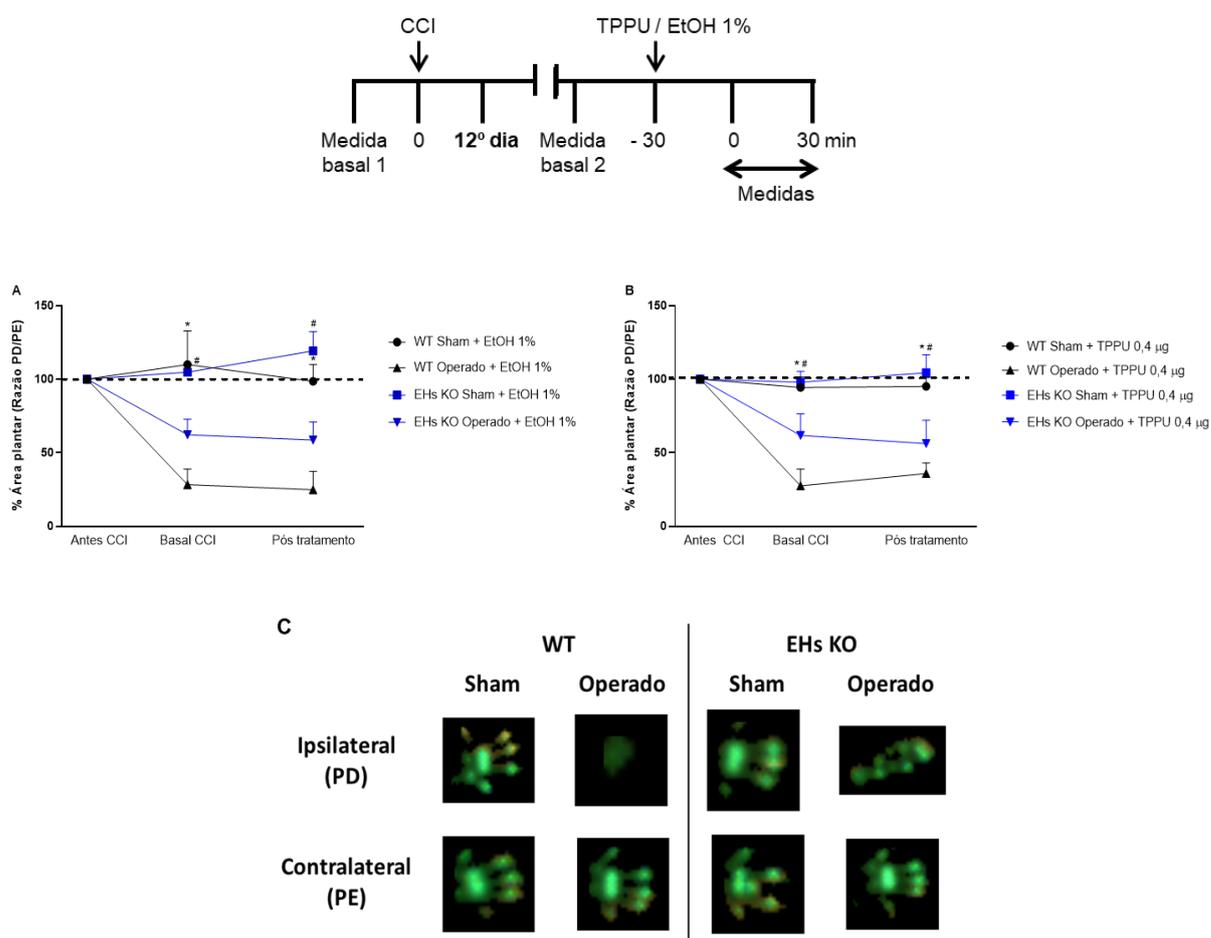


Figura 68. Área de impressão da pata por análise da marcha pelo *CatWalk* em camundongos C57BL/6 submetidos à dor neuropática. (A) EtOH 1% ou **(B)** TPPU (0,4 µg/pata) foi administrado na pata posterior direita 12 dias após a CCI em camundongos WT e EHs KO. Os tempos de administração das drogas, bem como das medições, estão indicados no diagrama sobre o gráfico. **(C)** Imagens capturadas das patas traseiras dos grupos *Sham* e *Operado* em animais WT e EHs KO. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). n= 5-6 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo WT Operado + EtOH 1% / TPPU. #p<0,05 comparado com o grupo EHs KO Operado + EtOH 1% / TPPU. CCI = constrição do nervo ciático, PD = pata traseira direita, PE = pata traseira esquerda, EtOH = etanol, EHs = enzima epóxido hidrolase solúvel.

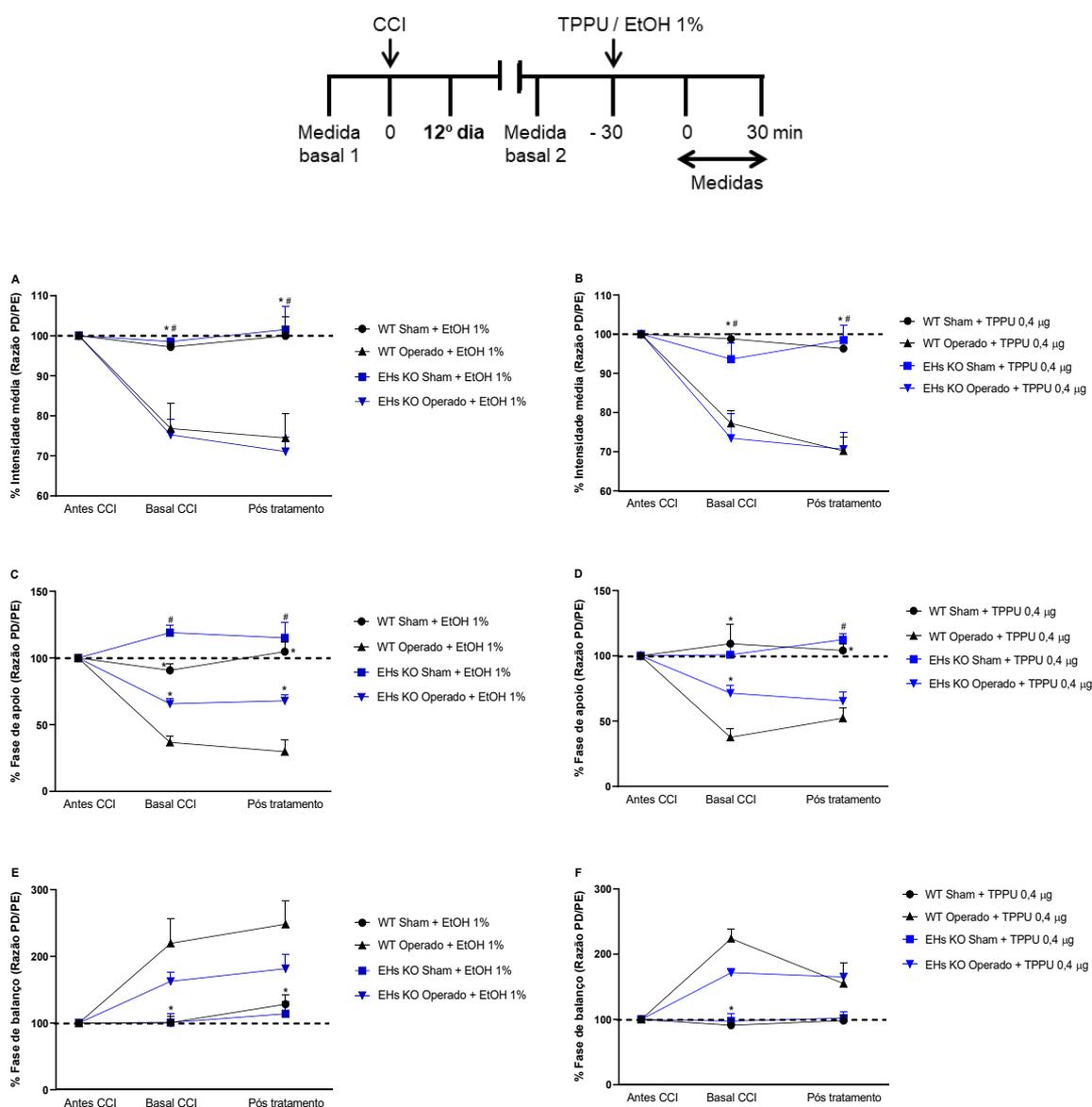


Figura 69. Parâmetros associados à análise da marcha pelo *CatWalk* em camundongos C57BL/6 submetidos à dor neuropática. (A, C, E) EtOH 1% ou (B, D, F) TPPU (0,4 µg/pata) foi administrado na pata posterior direita 12 dias após a CCI em camundongos WT e EHs KO. Os tempos de administração das drogas, bem como das medições, estão indicados no diagrama sobre o gráfico. Foram avaliados a (A, B) intensidade média de contato da pata com a superfície, a (C, D) duração da fase de apoio e a (E, F) duração da fase de balanço. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo medido, em gramas (g). n= 5-6 camundongos/grupo. *p<0,05 comparado com o grupo WT Operado + EtOH 1% / TPPU. #p<0,05 comparado com o grupo EHs KO Operado + EtOH 1% / TPPU. CCI = constrição do nervo ciático, PD = pata traseira direita, PE = pata traseira esquerda, EtOH = etanol, EHs = enzima epóxido hidrolase solúvel.

5.8 Detecção e mensuração dos níveis de EETs através da técnica de LC-MS/MS

Para avaliar o envolvimento dos EETs na modulação endógena periférica da dor inflamatória e da dor neuropática, utilizamos a quantificação dos EETs nos coxins plantares de camundongos Swiss tratados com inibidores da síntese (MS-PPOH) e da degradação (TPPU) dos AGEPs, que inclui os EETs.

A CG não foi capaz de elevar os níveis dos EETs de forma detectável. Além disso, no modelo de dor inflamatória, a administração intraplantar de MS-PPOH (10 µg/pata) não promoveu nenhuma alteração considerável nos níveis dos EETs (Figura 70A). Por outro lado, o tratamento com TPPU (0,4 µg/pata) foi responsável por um aumento dos EETs no grupo CG + TPPU se comparado com o grupo CG + Veículo (Figura 70B).

Avaliando o modelo de dor neuropática, o tratamento com MS-PPOH (10 µg/pata) também não promoveu nenhuma alteração considerável nos níveis dos EETs. No entanto, observou-se que a cirurgia ocasionou um aumento nos níveis dessas substâncias, conforme mostrado no grupo CCI + Veículo se comparado ao grupo *Sham* + Veículo (Figura 70C). O tratamento com TPPU (0,4 µg/pata) não foi capaz de alterar os níveis de EETs (Figura 70D).

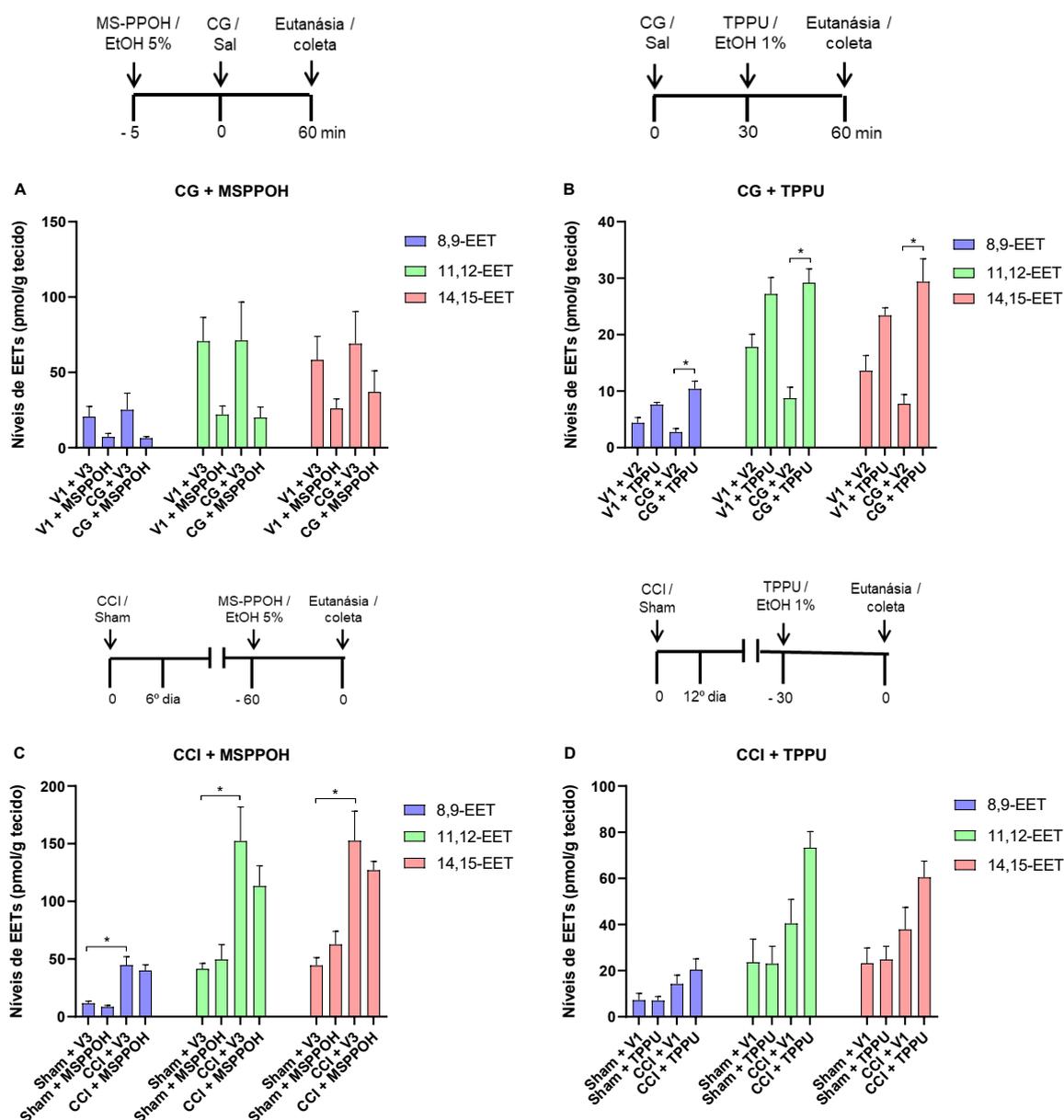


Figura 70. Níveis de EETs medidos no coxim plantar de camundongos Swiss em modelos de dor inflamatória e neuropática (CCI). Para a indução da nocicepção utilizou-se (A e B) carragenina (100 / 200 $\mu\text{g/pata}$) ou (C e D) a constrição do nervo ciático (6^o ou 12^o dia após a CCI), seguido da administração intraplantar de (A e C) MS-PPOH (10 $\mu\text{g/pata}$) ou (B e D) TPPU (0,4 $\mu\text{g/pata}$). Os tempos de administração das drogas e realização da cirurgia, bem como da coleta do tecido, estão indicados nos diagramas sobre os gráficos. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. $n = 5$ camundongos/grupo. * $p < 0,05$. V1 (veículo 1) = salina; V2 (veículo 2) = EtOH 1%; V3 (veículo 3) = EtOH 5%.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A dor pode se manifestar espontaneamente (independente de estímulo) ou após a estimulação nociva (hiperalgesia) ou inócua (alodinia) com danos, ou alterações, nos neurônios sensoriais (dor evocada pelo estímulo) (Woolf & Mannion, 1999). Em relação à dor inflamatória, consequente da liberação de inúmeros mediadores, destaca-se a PGE₂. Estudos *in vivo* mostraram que a injeção periférica de PGE₂ produz hiperalgesia tanto em animais experimentais como em humanos (Ferreira, 1972; Kuhn & Willis, 1973). Esse efeito nociceptivo está relacionado com a capacidade da PGE₂ de diminuir o limiar de ativação de neurônios aferentes primários nociceptivos devido a um aumento na excitabilidade neuronal (Kassuya et al., 2007). Como via de sinalização intracelular, estudos mostraram que essa alteração na excitabilidade neuronal está relacionada a ativação dos receptores de PGE₂ com consequente ativação das proteínas quinases A (PKA) e C (PKC), que por sua vez ativam múltiplos alvos, incluindo receptores de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1), canais de cálcio ou sódio dependentes de voltagem, e inibem canais de potássio dependentes de voltagem em nociceptores, levando à hiperalgesia (Kawabata, 2011; Moriyama et al., 2005; Sachs et al., 2009). A sensibilização dos nociceptores induzida pela PGE₂ não depende da participação de células ou mediadores intermediários (Kawabata, 2011), e já foi demonstrada uma ativação direta de nociceptores *in vitro* por altas concentrações de PGE₂ (Schaible & Schmidt, 1988). Sendo assim, é vantajosa a utilização desse modelo de dor induzido pela PGE₂ frente a outros modelos, como por exemplo, a CG, já que elimina a possibilidade do efeito da substância estudada ser resultante de um bloqueio na liberação ou ação de mediadores envolvidos no processo inflamatório (Vinegar et al., 1987).

Dessa forma, no presente trabalho foi utilizado o agente hiperalgésico PGE₂ como modelo experimental com o intuito de verificar se os EETs apresentavam efeito antinociceptivo periférico e quais os mecanismos de ação envolvidos nesse efeito. Nossos resultados demonstraram que o 5,6-, 8,9-, 11,12- ou 14,15-EET, quando administrados na pata de camundongos, induziram antinocicepção periférica frente à hiperalgesia da PGE₂ e esse efeito foi restrito a pata tratada, não alterando a hiperalgesia induzida pela PGE₂ na pata contralateral, o que indica que as doses

máximas de EET utilizadas são eficazes apenas localmente. Esses dados estão de acordo com estudos prévios mostrando que a administração tópica de uma mistura de EETs reduziu a hiperalgesia térmica em um modelo de dor induzido pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) na pata de ratos (Inceoglu et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que a administração intracerebroventricular do 14,15-EET também induz antinocicepção (Terashvili et al., 2008). Por outro lado, Brenneis et al. (2011) mostraram que o 8,9-EET induz hiperalgesia mecânica, mas não térmica. De forma semelhante, Sisignano et al. (2012) demonstraram que a administração intraplantar de 5,6-EET induz nocicepção mecânica, mas não térmica, e esse evento é dependente do receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1).

Os EETs são responsáveis por uma diversidade de respostas bioquímicas e funcionais, portanto, acredita-se que mais de um mecanismo ou via de transdução de sinal sejam responsáveis por todas as suas ações. Alguns efeitos funcionais dos EETs, como a capacidade de regular a expressão gênica, sugerem uma ação intracelular dessas substâncias (Node et al., 1999; Schmelzer et al., 2005). No entanto, outras evidências indicam que os EETs atuam por meio de um local ou receptor de ligação à membrana (Chen et al., 2011; Potente et al., 2003, 2002; Wang et al., 2003). Estudos sugerem que as ações dos EETs são, em parte, mediadas por meio da sinalização de receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Sendo assim, foram selecionados possíveis GPCRs candidatos aos receptores dos EETs e foi observado que os EETs, assim como outros ácidos graxos livres, se ligam com baixa afinidade aos receptores GPR40 (Park et al., 2018) e GPR132 (Lahvic et al., 2018). No entanto, apesar de uma intensa busca por mecanismos moleculares subjacentes às ações biológicas dos EETs, até o presente momento, esses ainda não são totalmente compreendidos e a identidade de um receptor para os EETs permanece desconhecida. A literatura já apresentou a identificação dos requisitos estruturais para a atividade biológica induzida pelos EETs sendo possível então, a caracterização de antagonistas específicos para essas substâncias (Gauthier et al., 2004). Dentre a utilização dos antagonistas farmacológicos não seletivos dos EETs podemos citar o 14,15-EEZE que inibiu o relaxamento vascular induzido por 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET em artérias coronárias bovinas (Gauthier

et al., 2002). Gross et al. (2008) mostraram que esse mesmo antagonista reduz a ação protetiva dos EETs exógenos e endógenos em corações de cães. Além disso, o 14,15-EEZE inibiu a motilidade celular no carcinoma da próstata induzida pelo 11,12-EET (Nithipatikom et al., 2010).

Os antagonistas são ferramentas farmacológicas importantes para identificar as ações biológicas de substâncias que são objetos de estudo. Dessa forma, utilizamos o antagonista dos EETs, o 14,15-EEZE, para comprovar o efeito antinociceptivo periférico dessas substâncias na hiperalgesia induzida pela PGE₂. Foi demonstrado que esse antagonista reverteu o efeito antinociceptivo periférico dos EETs, confirmando, portanto, que essas substâncias induzem antinocicepção via ativação de receptores.

Opioides

Já foi demonstrado que a deleção genética ou a inibição farmacológica das epoxigenases do CYP450 no cérebro de camundongos aboliu a antinocicepção da morfina administrada sistemicamente, sugerindo que as enzimas epoxigenases do CYP450 neuronais, e por conseguinte, seus produtos, medeiam as propriedades analgésicas da morfina (Conroy et al., 2010). Os EETs são importantes produtos derivados das epoxigenases do CYP450 (Wagner et al., 2014a) e, considerando que uma grande proporção (cerca de 50 a 80%) dos efeitos analgésicos produzidos por opioides administrados sistemicamente podem ser mediados por receptores opioides periféricos (Labuz et al., 2007), nos propomos a avaliar o envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo periférico apresentado pelos EETs.

Em nossos experimentos, observamos que a administração intraplantar de naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opioides, reverteu de maneira dose-dependente a antinocicepção periférica do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET. No entanto, a antinocicepção induzida pelo 8,9-EET não foi alterada. Dessa forma, nossas observações experimentais sugerem a participação dos receptores opioides na antinocicepção periférica dos EETs supracitados. Esse dado corrobora achados na literatura em que foi demonstrado que a naloxona inibiu a antinocicepção induzida por um inibidor da EHs (IEHs), portanto, reduzindo a degradação dos EETs,

em um modelo de dor neuropática induzida por estreptozocina em camundongos (Wagner et al., 2017b).

Os opioides exercem os seus efeitos através de três principais tipos de receptores acoplados a proteína $G_{i/o}$: mu (μ), delta (δ) e kappa (κ) (Cox, 2012). Para elucidar qual receptor opioide estaria envolvido na ação antinociceptiva periférica do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET, foram utilizados antagonistas seletivos desses receptores. O antagonista do receptor κ -opioide, nor-binaltorfimina, inibiu de maneira dose-dependente a resposta antinociceptiva periférica dos EETs em questão. Por outro lado, os antagonistas dos receptores μ e δ opioide (CTOP e naltrindole, respectivamente) não alteraram a antinocicepção desses EETs. No entanto, o CTOP, na mesma dose utilizada, foi capaz de reverter a ação antinociceptiva periférica do agonista μ opioide DAMGO (Zambelli et al., 2014), enquanto o naltrindole reverteu a antinocicepção periférica do aripiprazole (Ferreira et al., 2017). Assim, nossos resultados sugerem a participação do receptor κ -opioide no efeito antinociceptivo periférico do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET e que os receptores μ e δ opioides parecem não estar envolvidos nesse evento. Corroborando nossos dados, um estudo mostrou que a estimulação de receptores κ -opioides na periferia, pela injeção intraplantar de U50488, inibe a hiperalgesia induzida pela PGE_2 em ratos e camundongos, provavelmente pela ativação dos receptores κ -opioides expressos nos neurônios nociceptivos primários, ativando a via NO/GMPc (Cunha et al., 2012). Em se tratando dos EETs e os receptores opioides, Terashvili et al. (2008), diferentemente, mostraram que a administração central de 14,15-EET produz antinocicepção devido à liberação de β -endorfina e met-enkefalina, que subsequentemente ativam os receptores μ e δ opioides. Gross et al. (2010) demonstraram que o 11,12- e o 14,15-EET apresentam um efeito cardioprotetor dependente da ativação de receptores δ e κ opioides.

A modulação da dor pelo sistema opioide está associada à ação de ligantes endógenos. Até o momento três principais peptídeos opioides endógenos foram identificados: β -endorfina, enkefalinas e dinorfinas, que se ligam com maior afinidade aos receptores μ , δ e κ opioide, respectivamente (Holden et al., 2005; Stein & Lang, 2009). Nesse contexto, avaliamos o envolvimento de opioides endógenos na antinocicepção periférica dos EETs. Para tanto, utilizamos a bestatina, um inibidor

da aminopeptidase, enzima envolvida na degradação de peptídeos opioides endógenos. Observamos que essa droga foi capaz de potencializar o efeito antinociceptivo de baixas doses do 5,6-, 11,12- e 14,15-EET, tornando-os equiparáveis ao efeito dos EETs em suas doses máximas. Sendo assim, sugere-se o envolvimento de opioides endógenos na antinocicepção periférica dos EETs avaliados.

Uma vez que foi observado o envolvimento do receptor κ opioide na antinocicepção periférica desses EETs, acredita-se que a dinorfina possa ser o opioide endógeno envolvido nesse processo. Sendo assim, realizamos ensaios de imunofluorescência para detecção de dinorfina nos tecidos dos coxins plantares de camundongos. Em uma análise qualitativa das imagens obtidas foi possível observar a presença de dinorfina em todos os grupos que receberam PGE₂, porém nos grupos tratados com 5,6-, 11,12- e 14,15-EET notou-se uma maior frequência de células inflamatórias imunopositivas para dinorfina, além da marcação desse peptídeo em estruturas similares às fibras nervosas, sugerindo que a dinorfina pode estar contribuindo para o efeito antinociceptivo periférico desses EETs. Corroborando com o aumento de células inflamatórias positivas para dinorfina observado nos nossos experimentos, a literatura já demonstrou que, no local da lesão, as interações entre os peptídeos opioides derivados de células imunes e os receptores opioides nas terminações nervosas sensoriais periféricas, resultam em potentes efeitos analgésicos em modelos animais e em humanos (Cabot, 2001; Machelska & Celik, 2020). Já foi demonstrado também que, em tecidos inflamados, há uma regulação positiva de receptores opioides nos nociceptores periféricos devido a um aumento no transporte axonal desses receptores, bem como pelo fato de receptores opioides inativos se tornarem ativos, culminando com o aumento no número desses receptores nos terminais nervosos periféricos (Stein, 1995). Dessa forma, também é possível que haja um aumento de receptores κ -opioides na periferia o que contribuiria para que discretas diferenças nos níveis de dinorfina sejam responsáveis pelo expressivo efeito antinociceptivo observado com os EETs, no entanto, essa é uma hipótese que precisa ser testada e confirmada.

Em conjunto, os dados sobre o sistema opioide sugerem que o efeito antinociceptivo periférico apresentado pelo 5,6-, 11,12- e 14,15-EET, mas não do

8,9-EET, pode ser devido à liberação do opioide endógeno dinorfina, com subsequente ativação dos receptores κ -opioide, mas não dos receptores μ e δ opioides, a nível periférico, inibindo a hiperalgesia induzida pela PGE₂.

Canabinoides

O sistema opioide está relacionado ao sistema canabinoide no que diz respeito à localização, transdução de sinal e propriedades farmacológicas (Desroches & Beaulieu, 2010). Essa interação farmacológica entre os sistemas opioide e canabinoide já foi demonstrada na literatura com trabalhos que mostram o envolvimento de receptores canabinoides na analgesia induzida por opioides (Pacheco et al., 2009; Desroches et al., 2014) e vice-versa (Maldonado & Valverde, 2003). Além disso, estudos prévios mostram um efeito sinérgico com a utilização de agonistas opioides e canabinoides (Cichewicz, 2004; Massi et al., 2001). Sendo assim, uma vez que observamos o envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo periférico dos EETs e considerando as evidências científicas sobre a existência de uma interação entre os sistemas opioide e canabinoide, nos propusemos a avaliar o envolvimento do sistema canabinoide na atividade antinociceptiva dos EETs.

O sistema canabinoide é composto por dois receptores já bem caracterizados, receptores canabinoides tipo 1 e 2 (CB₁ e CB₂), seus respectivos ligantes e compostos relacionados a síntese, recaptção e degradação desses ligantes. Os receptores canabinoides, assim como os opioides, são pertencentes à família de receptores acoplados à proteína Gi/o (Howlett, 2002) e possuem mecanismos de sinalização intracelular semelhantes.

A fim de estudar o envolvimento dos receptores canabinoides na antinocicepção periférica induzida pelos EETs, nós utilizamos o AM251 e o AM630, antagonistas seletivos dos receptores CB₁ e CB₂, respectivamente. O AM251 inibiu de forma dose-dependente a antinocicepção periférica dos EETs, sugerindo o envolvimento do receptor CB₁ nessa ação. Diferentemente, o AM630 não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo periférico de nenhum dos EETs. Por outro lado, nessa mesma dose, o AM630 reverteu a antinocicepção induzida pela

palmitoletanolamina (Romero et al., 2013). Estudos de *binding* demonstraram que uma mistura de EETs foi capaz de deslocar agonistas dos receptores CB₂, embora com baixa afinidade (Inceoglu et al., 2007). Diferentemente dos nossos resultados, Wagner et al. (2011) mostraram que os receptores CB₂ desempenham um papel na antinocicepção mediada por IEHs, uma vez que um antagonista do receptor CB₂, mas não do CB₁, bloqueou a antinocicepção induzida por essa substância em um modelo de hiperalgesia térmica induzida por LPS. No entanto, já foi demonstrado na literatura que os receptores CB₁ são sintetizados no gânglio da raiz dorsal (DRG) e transportados para os neurônios sensoriais periféricos (Hohmann & Herkenham, 1999), o que suporta em substrato anatômico a ideia de uma antinocicepção periférica via receptores CB₁, sustentando os nossos dados.

Assim como no sistema opioide, a modulação da dor pelo sistema canabinoide também está associada à ação de ligantes endógenos (Donvito et al., 2018). Os dois canabinoides endógenos mais bem estudados são a AEA (Devane et al., 1992) e o 2-AG (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995), sendo que o primeiro tem maior afinidade para o receptor CB₁, enquanto o último parece ativar os receptores CB₁ e CB₂ (Di Marzo, 2009). A AEA, o 2-AG e os EETs são provenientes do mesmo precursor, o AA, e compartilham características estruturais (Wagner et al., 2011b). Nesse contexto, avaliamos o envolvimento de endocanabinoides na antinocicepção periférica dos EETs.

Como ferramentas farmacológicas utilizamos o VMD11 e o MAFP, respectivamente, um inibidor do transportador membranar de AEA e um inibidor da FAAH, enzima envolvida na hidrólise da AEA. Tanto o VDM11, quanto o MAFP, potencializaram o efeito antinociceptivo de baixas doses dos EETs. Por outro lado, o JZL184, inibidor da MAGL, enzima envolvida na hidrólise do 2-AG, não potencializou esse efeito, embora na mesma dose, tenha potencializado o efeito antinociceptivo periférico do peltatosídeo (Oliveira et al., 2016). Uma vez que encontramos evidências do envolvimento do receptor CB₁ no efeito antinociceptivo periférico dos EETs, tanto AEA como 2-AG podem estar envolvidos. No entanto, como não houve potencialização da antinocicepção dos EETs utilizando o inibidor da hidrólise do 2-AG, sugere-se que o endocanabinoide envolvido nessa ação seja a AEA.

Em conjunto, nossos dados sobre o sistema canabinoide sugerem que o efeito antinociceptivo apresentado pelo 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET pode ser devido à liberação do endocanabinoide AEA, com subsequente ativação dos receptores CB₁, mas não dos receptores CB₂, a nível periférico, inibindo a hiperalgesia induzida pela PGE₂.

Nitrérgico

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador envolvido em vários processos fisiológicos (Esplugues, 2002; Paradise et al., 2010). Dentre a sua diversidade de funções, o NO desempenha um complexo e controverso papel na modulação da dor, apresentando uma característica dual, na qual essa molécula é capaz de atuar tanto em processos hiperalgésicos (Freire et al., 2009; Malmberg & Yaksh, 1993; Moore et al., 1991; Toriyabe et al., 2004) como na antinocicepção (Duarte et al., 1990; Duarte & Ferreira, 1992; Lorenzetti & Ferreira, 1996). Esse efeito contraditório da via arginina/NO/GMPc pode ser explicado considerando que a ativação dessa via é dependente do tipo de fibras nociceptivas envolvidas na resposta e/ou dependente dos níveis teciduais de NO (Kawabata et al., 1994). Vários estudos têm demonstrado que o NO está envolvido na analgesia de diversos compostos analgésicos, tais como opioides e anti-inflamatórios não esteroidais (Cunha et al., 2010; Lorenzetti & Ferreira, 1996; Romero et al., 2011). Ademais, tem sido sugerida uma correlação entre a sinalização do NO com agonistas opioides (Amarante & Duarte, 2002; Pacheco et al., 2005), canabinoides (Romero et al., 2012a) e adrenérgicos (Romero et al., 2012b) em mecanismos antinociceptivos periféricos.

Diante do exposto, nos propomos a avaliar o envolvimento da via arginina/NO/GMPc na antinocicepção periférica induzida pelos EETs. Com esse propósito, utilizamos um inibidor não seletivo das enzimas NOS (L-NOArg), sendo observado que a inibição dessas enzimas preveniu a antinocicepção periférica dos EETs, sugerindo o envolvimento das enzimas NOS nesse evento. Sabe-se que a NOS apresenta três tipos distintos de isoformas: neuronal (NOS_n) e endotelial (NOS_e), sendo ambas isoformas constitutivas, e a induzível (NOS_i) (Nathan, 1992). Para elucidar qual isoforma da NOS está relacionada à antinocicepção induzida

pelos EETs, utilizamos inibidores seletivos para cada isoforma. Os inibidores seletivos de NOS_i (L-NIL) e NOS_e (L-NIO) reduziram parcialmente o efeito antinociceptivo dos EETs, diferentemente do inibidor seletivo de NOS_n (L-NPA), que não alterou a antinocicepção periférica induzida pelos EETs. Dessa forma, sugere-se que a administração intraplantar dos EETs ativa a NOS_i e NOS_e, mas não a NOS_n, com conseqüente produção de NO. Corroborando nossos resultados, estudos mostraram que os EETs são capazes de ativar a NOS_e induzindo a liberação de NO e, como conseqüência, ocasionando a vasodilatação (Hercule et al., 2009; Wang et al., 2003).

O NO, uma vez formado, promove a ativação da enzima GCs que, por sua vez, intensifica a conversão GTP-GMPc, resultando em um aumento de GMPc intracelular (Moncada et al., 1989). Esse segundo mensageiro está relacionado com efeitos antinociceptivos na periferia (Duarte et al., 1990; Ferreira et al., 1991; Pacheco et al., 2005; Romero & Duarte, 2009). Sendo assim, avaliamos o envolvimento da enzima GCs na antinocicepção periférica dos EETs utilizando um inibidor dessa enzima, o ODQ. A inibição da GCs reduziu o efeito antinociceptivo dos EETs, sugerindo que o GMPc esteja envolvido nesse processo.

O GMPc é rapidamente degradado por fosfodiesterases (PDE) (Beavo, 1995), logo a inibição dessas enzimas prolongaria o efeito desse segundo mensageiro. Assim sendo, utilizamos um inibidor seletivo da PDE específica do GMPc, o Zaprinast, para avaliar o envolvimento do GMPc na antinocicepção periférica dos EETs. Observou-se que a inibição da PDE potencializou os efeitos antinociceptivos de baixas doses dos EETs, sugerindo que os níveis de GMPc são relevantes para este fim.

Esses resultados em conjunto sugerem que o 5,6-, 8,9-, 11,12- e 14,15-EET, quando administrados periféricamente, podem ativar a NOS_i e a NOS_e, mas não a NOS_n. A ativação seletiva dessas NOS induz a produção de NO, que por sua vez ativa a GCs, resultando em um aumento de GMPc, que culmina com o efeito antinociceptivo apresentado por essas substâncias.

Canais iônicos

A literatura já demonstrou uma relação entre a via NO/GMPc e a ativação de canais para potássio na antinocicepção periférica (Rodrigues & Duarte, 2000; Soares & Duarte, 2001; Sachs et al., 2004). Dessa forma, nosso próximo passo foi avaliar se o efeito antinociceptivo dos EETs via NO/GMPc culminaria com a abertura desses canais. Com esse intuito, utilizamos bloqueadores seletivos dos diferentes canais para potássio, a saber: sensíveis ao ATP (Glib), dependentes de voltagem (TEA) e ativados por cálcio de baixa (DQ) e alta (Pax) condutância. No entanto, nenhum desses bloqueadores foi capaz de alterar a antinocicepção induzida pelos EETs, sugerindo, portanto, que os canais para potássio não estejam envolvidos nesse evento. Ressalta-se que as doses avaliadas nesses experimentos já foram anteriormente utilizadas com resultados positivos pelo nosso grupo de pesquisa, mostrando que a Glib foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo periférico da ketamina (Romero & Duarte, 2013), da palmitoletanolamina (Romero & Duarte, 2012) e da dipirona (Alves & Duarte, 2002); enquanto o TEA reverteu a antinocicepção periférica induzida pelo Baclofeno (Reis & Duarte, 2006) e o DQ reverteu o efeito antinociceptivo periférico da dopamina (Queiroz, 2020).

Trabalhos científicos mostraram que os EETs podem ser considerados como fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) porque eles levam à hiperpolarização com consequente relaxamento de células do músculo liso vascular, devido à abertura de canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância (Baron et al., 1997; Campbell et al., 1996; Fisslthaler et al., 1999; Quilley & McGiff, 2000). Embora os EETs tenham apresentado essa função na vasculatura mediada por canais para potássio, no nosso modelo nenhum dos canais para potássio avaliados parecem estar envolvidos com o efeito antinociceptivo apresentado por essas substâncias. Alinhado aos nossos experimentos, Amarante et al. (2004) demonstraram que os canais para potássio não estão envolvidos na antinocicepção periférica da bremazocina, um agonista κ -opioide, embora essa droga induza a ativação da via do NO/GMPc.

Por outro lado, a literatura apresenta o envolvimento de outros canais relacionados à antinocicepção. Estudos prévios demonstraram que a ativação de receptores opioides (Pacheco et al., 2012a, 2012b) e canabinoides (Romero et al.,

2013) induzem uma antinocicepção dependente de canais para cloreto ativados por cálcio (CaCCs). Ademais, foi demonstrado um padrão de expressão proeminente dos CaCCs na via nociceptiva (Oh & Jung, 2016). Dessa forma, utilizamos um bloqueador dos CaCCs, o ácido niflúmico, para avaliar o envolvimento dos mesmos na antinocicepção periférica dos EETs. No entanto, o bloqueio do CaCCs não alterou o efeito antinociceptivo periférico induzido pelos EETs, sugerindo, portanto, que os canais para cloreto ativados por cálcio também não estão envolvidos nessa ação.

Diversos trabalhos mostraram que os canais para cálcio desempenham um papel fundamental na modulação da informação nociceptiva (Damaj et al., 1993; Prado, 2001; Vanegas & Schaible, 2000). Malmberg & Yaksh (1994) mostraram que o bloqueio dos canais para cálcio sensíveis à voltagem do tipo N e P, mas não do tipo L, inibiram a nocicepção induzida pela formalina em ratos. Similarmente, Pan et al. (2017) sugeriram que a antinocicepção apresentada pelo resveratrol se deve ao bloqueio dos canais para cálcio. Outro trabalho mostrou que o agonista κ -opioide U-69,593 induz antinocicepção dependente da inibição de canais para cálcio do tipo L (Barro et al., 1995). Além disso, já foi demonstrado que os EETs regulam canais para cálcio do tipo L no coração (Xiao, 2007; Xiao et al., 1998). Dessa forma, apesar de experimentos adicionais serem necessários, sugerimos um envolvimento dos canais para cálcio na antinocicepção dos EETs. A ativação da via NO/GMPc poderia culminar com o bloqueio dos canais para cálcio levando ao efeito antinociceptivo periférico apresentado por nossos dados.

Endógeno

O processo nociceptivo global é resultante do balanço entre a ativação de via nociceptiva e vias de modulação endógena, envolvendo o controle medular (Melzack & Wall, 1965) e supramedular descendentes (Reynolds, 1969). Evidências mostraram que a modulação da dor também pode ocorrer em nível periférico, nos terminais dos neurônios aferentes, onde foi demonstrada uma regulação positiva de receptores opioides durante o processo inflamatório (Stein, 1995; 2013; Stein et al., 2001; Stein & Lang, 2009). Ademais, foi demonstrado que concomitantemente aos

efeitos pró-inflamatórios e pró-nociceptivos provocados pelos mediadores em lesões teciduais, mecanismos endógenos que combatem a dor e a inflamação são requisitados (Millan, 1999; Stein & Lang, 2009). Stein et al. (1989) demonstraram que a administração intraplantar, mas não a administração sistêmica, de agonistas dos receptores opioides μ , δ e κ produziu efeitos antinociceptivos na inflamação da pata de ratos induzida pela injeção do adjuvante de Freund, e que esse efeito é revertido por substâncias que antagonizam seletivamente esses receptores. Adicionalmente, essa antinocicepção foi observada apenas em tecidos inflamados em comparação com tecidos não inflamados, sugerindo que os receptores opioides participam na modulação periférica da dor inflamatória (Stein et al., 1989). Nosso grupo de pesquisa vêm demonstrando um controle periférico da dor a partir de diferentes sistemas e substâncias, dentre elas temos: os opioides (Alves et al., 2012; Quintão et al., 2021), acetilcolina (Gonzaga, 2017; Motta et al., 2011), angiotensina 1-7 (Costa et al., 2014) e NO/GMPc (Alves et al., 2013).

Dessa forma, uma vez que foi demonstrado o envolvimento de diversos mediadores no controle endógeno periférico da dor e visto o efeito antinociceptivo periférico dos EETs exógenos, nos propusemos a avaliar o envolvimento dos EETs endógenos no controle periférico da dor inflamatória e neuropática. Para a indução da dor inflamatória utilizamos a injeção intraplantar de CG, um modelo amplamente utilizado para o estudo da inflamação e dor inflamatória desde que foi introduzido por Winter et al. (1962). A CG é um polissacarídeo altamente sulfatado extraído da alga *Chondrus crispus* (Di Rosa, 1972) e, quando injetada na pata, produz uma intensa inflamação local com concomitante hiperalgesia (Cunha et al., 2005; Vinegar et al., 1987). Para a indução da dor neuropática utilizamos uma adaptação do modelo de constrição frouxa e crônica do nervo ciático proposto por Bennett & Xie (1988). Esse modelo é amplamente utilizado, confiável, facilmente reproduzível e validado para a produção de hiperalgesia, além de mimetizar bem os sinais da neuropatia em humanos (Campbell & Meyer, 2006; Challa, 2015; Sousa et al., 2016).

Nosso estudo mostrou que os modelos empregados foram eficientes em reproduzir as dores inflamatória (Alves et al., 2012; Quintão et al., 2021) e neuropática (Motta et al., 2011; Medeiros et al., 2020), obtendo respostas similares as já estabelecidas na literatura. A partir da análise da dinâmica das curvas de

indução de dor nos dois modelos, utilizamos a estratégia de: (i) injetar uma dose intermediária de CG (100 µg/pata) e utilizar o dia seis (6) após o procedimento cirúrgico, situações que condizem com uma hiperalgesia de menor intensidade, para os experimentos em que se desejava observar uma potencialização do efeito nociceptivo; (ii) injetar uma dose máxima de CG (200 µg/pata) e utilizar o dia doze (12) após a CCI, situações em que há uma hiperalgesia máxima, para a observação de um efeito antinociceptivo.

Para avaliar o envolvimento dos EETs endógenos nos modelos de dor mencionados acima, inicialmente utilizamos o 14,15-EEZE, um antagonista não seletivo dos receptores dos EETs. Apesar de ainda não ser caracterizado um receptor específico para os EETs, diversos estudos utilizaram esse mesmo antagonista revertendo os mais variados efeitos dos diferentes EETs (Gauthier et al., 2002; Gross et al., 2008; Nithipatikom et al., 2010). No nosso estudo, observamos que a administração intraplantar dessa droga induziu uma redução do limiar nociceptivo, ou seja, potencializou a hiperalgesia induzida pela dose intermediária de CG 60 minutos após a injeção da mesma, mas não foi capaz de alterar a hiperalgesia da PGE₂. Similarmente, o 14,15-EEZE também reduziu o limiar nociceptivo no 6º dia após a CCI. Adicionalmente, foi observado que o 14,15-EEZE não alterou o limiar nociceptivo basal sem a presença de um estímulo nociceptivo (CG ou CCI). Sendo assim, sugere-se que os EETs estejam envolvidos na modulação endógena periférica da dor inflamatória e neuropática, uma vez que na situação de impedimento do seu acesso aos sítios de ligação, houve um quadro de intensificação desses tipos de dor, e que a sua ação é dependente de um estímulo nociceptivo e não apenas da sensibilização (PGE₂).

Utilizando uma abordagem farmacológica diferente, avaliamos a modulação endógena periférica da dor inflamatória e da dor neuropática pelos EETs, através da inibição de sua síntese. De fato, o MS-PPOH, um inibidor das enzimas epoxigenases do citocromo P450, potencializou a hiperalgesia induzida pela dose intermediária de CG e pela CCI no 6º dia após a cirurgia. Quando administrado sem a presença do estímulo nociceptivo, o MS-PPOH não foi capaz de alterar o limiar nociceptivo basal. Esses dados reforçam a ideia de que os EETs endógenos sejam capazes de modular periféricamente a dor inflamatória e neuropática. Fazendo uso

do mesmo inibidor (MS-PPOH), a literatura vem demonstrando que os produtos gerados endogenamente pelas epoxigenases medeiam a motilidade tônica em células de carcinoma da próstata (Nithipatikom et al., 2010), bem como a hipertensão hipóxica em camundongos (Pokreisz et al., 2006) e também a capacidade de autorregulação do fluxo sanguíneo renal pela vasculatura pré-glomerular (Imig et al., 1999).

Adicionalmente utilizamos como estratégia a inibição da degradação dos EETs e uma abordagem não farmacológica com camundongos EHs KO. Após a injeção intraplantar de TPPU, em IEHs, observamos uma redução da hiperalgesia induzida pela dose máxima de CG e pela CCI no 12º dia após a cirurgia. Foi igualmente observado que os animais EHs KO também apresentaram uma hiperalgesia reduzida se comparado com os animais WT nos dois modelos avaliados. Corroborando nossos achados, a literatura vem demonstrando que IEHs apresentam atividade antinociceptiva em diferentes modelos de dor neuropática, como por exemplo em um modelo de neuropatia diabética (Wagner et al., 2014b) e em um modelo de diabetes mellitus tipo 1 utilizando camundongos geneticamente modificados (Akita) (Wagner et al., 2017a). Também foi demonstrado que um IEHs foi capaz de reduzir substancialmente a inflamação aguda e sistêmica induzida por LPS em camundongos (Schmelzer et al., 2005).

A dor não pode ser medida diretamente em roedores e, portanto, muitos métodos que quantificam a nocicepção foram desenvolvidos. Esses métodos comportamentais podem ser divididos em nocicepção evocada por estímulo ou não evocada por estímulo, com base no fato de a aplicação de um estímulo externo ser ou não usada para obter uma resposta de retirada (Deuis et al., 2017). Recentemente, estudos sugeriram que a análise da marcha, um método não evocado por estímulo, produz dados importantes em animais neuropáticos (Isvoranu et al., 2021; Kang et al., 2017). Sendo assim, adicionalmente aos resultados obtidos com o Randall-Selitto, um método evocado por estímulo (Deuis et al., 2017), empregamos uma outra abordagem para avaliar o efeito do IEHs utilizando a análise da marcha (*CatWalk*) nos camundongos C57BL/6 submetidos a CCI.

Pela análise do *CatWalk* verificamos que, após a CCI, os animais operados (WT e EHs KO) apresentaram menor área de impressão da pata, redução na

intensidade média de contato da pata e da fase de apoio, e aumento na fase de balanço se comparado aos seus controles *sham*. Como o *CatWalk* nos traz diversos parâmetros como resposta, a escolha dos que foram utilizados levou em conta estudos recentes relacionando os parâmetros mais relevantes para o estudo da dor (Heinzel et al., 2020; Kappos et al., 2017). Os resultados encontrados entre os grupos operado e *sham* condizem com a literatura, uma vez que o animal neuropático apresenta um comportamento de poupar a pata operada, levando a mudanças em sua marcha e uma redução na área de impressão e intensidade de contato da pata (Deuis et al., 2017; Jacobs et al., 2014; Kang et al., 2017). No entanto, não observamos um comportamento diferente, com base nos parâmetros avaliados, entre os animais operados WT e EHs KO como evidenciado pelo método de compressão da pata (Randall-Selitto). Essa diferença foi observada apenas na fase de apoio e de balanço, mostrando que os animais operados EHs KO tiveram uma menor redução no tempo em que permaneceram com a pata apoiada na plataforma se comparado aos animais operados WT e, como consequência, ficaram mais tempo com a pata no ar (fase de balanço). A diferença entre as análises pelo Randall-Selitto e pelo *CatWalk* provavelmente se deve justamente ao estímulo que está presente no primeiro método, mas ausente no segundo.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que, sob um estímulo nociceptivo (CG ou CCI), o organismo poderia mobilizar EETs endógenos limitando a intensidade do sinal de dor a nível periférico. Sendo assim, para adicionar evidências que suportem nossa sugestão, avaliamos os níveis dos EETs, através da técnica de LC-MS/MS, no coxim plantar de camundongos tratados com inibidores da síntese e da degradação dos EETs. Salienta-se que foram obtidos apenas os níveis de 8,9-, 11,12- e 14,15-EET pois devido à proximidade entre os grupos epóxi e carboxila no 5,6-EET, esse lípido sofre alterações químicas tornando-se instável e de difícil mensuração (Balazy, 1991; Yuan et al., 2018), sendo, portanto, comumente excluído dessa análise.

A partir da técnica de LC-MS/MS, observamos uma diferença considerável nos níveis dos EETs apenas na dor inflamatória, no grupo tratado com CG + TPPU se comparado ao grupo CG + veículo. No entanto, podemos observar também um aumento equivalente de EETs no grupo sem estímulo tratado com TPPU. Embora

exista uma repercussão de EETs no animal não estimulado com CG nessa análise, isso não é refletido no experimento comportamental com aumento de limiar nociceptivo. Corroborando o achado do experimento comportamental, já está bem estabelecido na literatura que os IEHs, de forma análoga à ação dos anti-inflamatórios não esteroidais, só têm efeito mediante a presença de um estímulo (Inceoglu et al., 2011, 2006; Wagner et al., 2011a).

Em relação ao fato de não termos observado um aumento significativo de EETs nos animais neuropáticos tratados com TPPU, Brenneis et al. (2011) demonstraram que camundongos EHs KO apresentaram níveis mais elevados de EETs apenas no DRG e, curiosamente, não aumentaram os níveis de EETs no local da inflamação induzida por zimosan. Sendo assim, essa é uma possibilidade que também pode estar acontecendo nos nossos animais. Ademais, salienta-se que os AGEPs compartilham as mesmas vias metabólicas que os EETs (Wagner et al., 2014a), leia-se as enzimas CYP e EHs avaliadas nesse estudo, e portanto, outros AGPEs podem estar contribuindo para o efeito antinociceptivo observado no modelo de dor neuropática.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os resultados discutidos acima fornecem evidências de que os EETs apresentam efeito antinociceptivo periférico, cujo mecanismo de ação envolve a participação dos sistemas opioide (dinorfina / receptor κ) e canabinoide (AEA / CB_1), e a ativação da via NO/GMPc para o 5,6-, 11,12- e 14,15-EET; enquanto para o 8,9-EET, apenas os dois últimos mecanismos parecem estar envolvidos (Figura 71).

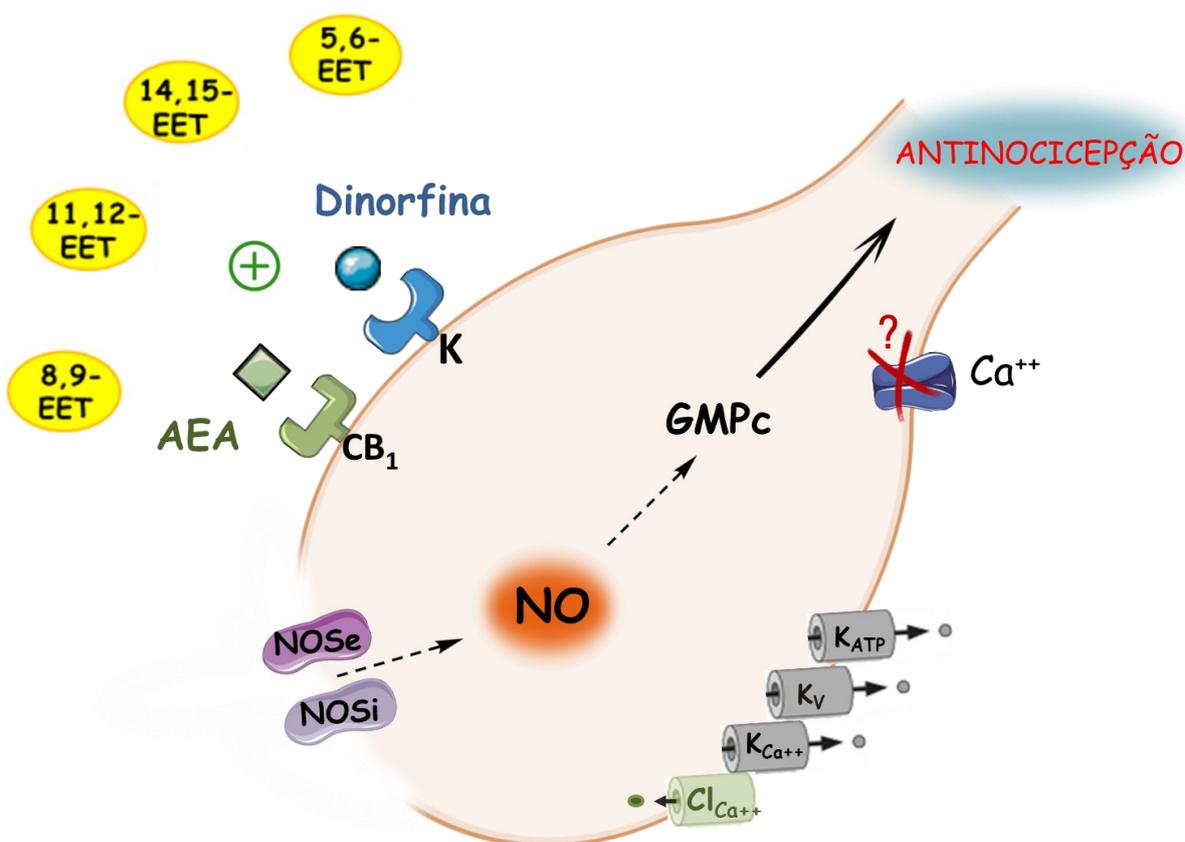


Figura 71. Representação esquemática dos possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva periférica dos EETs. A antinocicepção periférica dos EETs frente à hiperalgesia induzida pela PGE_2 envolve a participação de receptores κ -opioides, com exceção do 8,9-EET, e CB_1 canabinoides, possivelmente, devido à liberação de dinorfina e anandamida (AEA). A ativação das enzimas óxido nítrico sintase induzível (NOSi) e endotelial (NOSe) inicia a via arginina/NO/GMPc levando à produção de óxido nítrico (NO), que por sua vez ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs), resultando em um aumento de GMPc, que culmina, possivelmente pelo fechamento dos canais para cálcio, com o efeito antinociceptivo apresentado por essas substâncias.

Adicionalmente, nossos achados sugerem uma modulação da dor, especialmente a dor inflamatória, pelos EETs endógenos como um mecanismo de controle da transmissão dos impulsos nociceptivos limitando, portanto, a intensidade do sinal de dor a nível periférico. Em relação a dor neuropática, pode haver a participação de mais AGEPs nessa modulação periférica da dor (Figura 72).

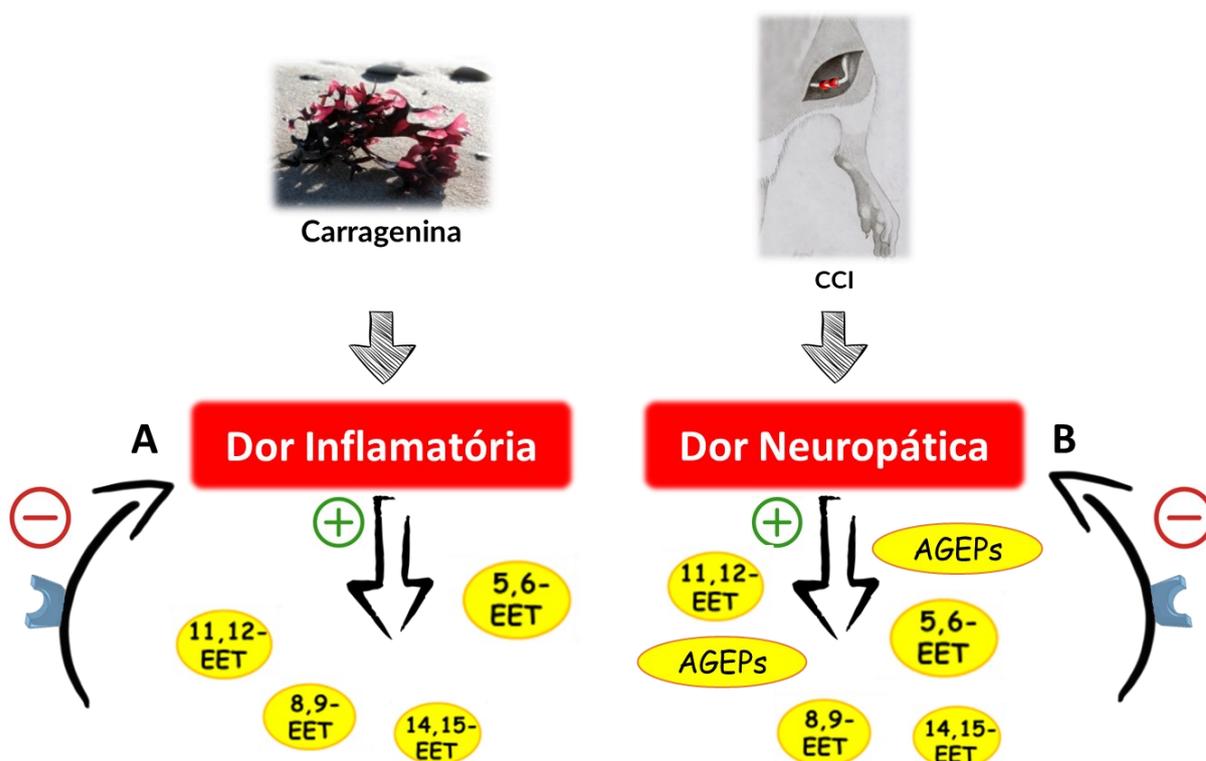


Figura 72. Representação esquemática da possível modulação endógena periférica da dor. (A) Envolvimento dos EETs na modulação da dor inflamatória. **(B)** Envolvimento dos EETs e AGEPS na modulação da dor neuropática. CG, carragenina. CCI, constrição do nervo ciático. EETs, ácidos epoxieicosatrienoicos. AGEPS, ácidos graxos epoxigenados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Alves, D., Duarte, I., 2002. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrrone. *Eur. J. Pharmacol.* 444, 47–52.
- Alves, D.P., Da Motta, P.G., Lima, P.P., Queiroz-Junior, C.M., Caliari, M. V., Pacheco, D.F., Pacheco, C.F., Francischi, J.N., Duarte, I.D.G., 2012. Inflammation mobilizes local resources to control hyperalgesia: The role of endogenous opioid peptides. *Pharmacology* 89, 22–28.
- Alves, D.P., da Motta, P.G., Romero, T.R.L., Klein, A., Duarte, I.D.G., 2013. NO/cGMP production is important for the endogenous peripheral control of hyperalgesia during inflammation. *Nitric Oxide* 28, 8–13.
- Amarante, L.H., Alves, D.P., Duarte, I.D.G., 2004. Study of the involvement of K⁺ channels in the peripheral antinociception of the κ -opioid receptor agonist bremazocine. *Eur. J. Pharmacol.* 494, 155–160.
- Amarante, L.H., Duarte, I.D.G., 2002. The κ -opioid agonist (\pm)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 454, 19–23.
- Anastas, T.M., Meints, S.M., Gleckman, A.D., Hirsh, A.T., 2019. Social Influences on Peer Judgments about Chronic Pain and Disability. *J. pain* 20, 698–705.
- Apkarian, A.V., Bushnell, M.C., Treede, R.D., Zubieta, J.K., 2005. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur. J. Pain* 9, 463–484.
- Balazyz, M., 1991. Metabolism of 5,6-Epoxyeicosatrienoic Acid by the Human Platelet FORMATION OF NOVEL THROMBOXANE. *J. Biol. Chem.* 35, 23561–23567.
- Baron, A., Frieden, M., Bény, J.L., 1997. Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance, Ca²⁺-dependent K⁺ channel on pig coronary artery endothelial cells. *J. Physiol.* 504, 537–543.
- Barro, M., Ruiz, F., Hurlé, M.A., 1995. K-Opioid Receptor Mediated Antinociception in Rats Is Dependent on the Functional State of Dihydropyridine-Sensitive Calcium Channels. *Brain Res.* 672, 148–152.
- Beavo, J.A., 1995. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* 75, 725–748.
- Bennett, G.J., Xie, Y.K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87–107.
- Brash, A.R., 1999. Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *J. Biol. Chem.* 274, 23679–23682.
- Brenneis, C., Sisignano, M., Coste, O., Altenrath, K., Fischer, M.J., Angioni, C., Fleming, I., Brandes, R.P., Reeh, P.W., Woolf, C.J., Geisslinger, G., Scholich, K., 2011. Soluble epoxide hydrolase limits mechanical hyperalgesia during inflammation. *Mol. Pain* 7, 1–13.
- Brodal, P., 2017. A neurobiologist's attempt to understand persistent pain. *Scand. J. Pain* 15, 140–147.
- Cabot, P.J., 2001. Immune-derived opioids and peripheral antinociception. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28, 230–2.
- Campbell, J.N., Meyer, R.A., 2006. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 52, 77–92.
- Campbell, W.B., Gebremedhin, D., Pratt, P.F., Harder, D.R., 1996. Identification of

- Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Circ. Res.* 78, 415–423.
- Capdevila, J.H., Falck, J.R., Harris, R.C., 2000. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation: Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J. Lipid Res.* 41, 163–181.
- Challa, S.R., 2015. Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. *Int. J. Neurosci.* 125, 170–4.
- Chalon, S., Vancassel, S., Zimmer, L., Guilloteau, D., Durand, G., 2001. Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: Focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids* 36, 937–944.
- Chen, Y., Falck, J.R., Manthati, V.L., Jat, J.L., Campbell, W.B., 2011. 20-Iodo-14,15-epoxyeicosa-8(Z)-enoyl-3-azidophenylsulfonamide: photoaffinity labeling of a 14,15-epoxyeicosatrienoic acid receptor. *Biochemistry* 50, 3840–8.
- Cichewicz, D.L., 2004. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. *Life Sci.* 74, 1317–1324.
- Cioffi, C.L., 2018. Modulation of glycine-mediated spinal neurotransmission for the treatment of chronic pain. *J. Med. Chem.* 61, 2652–2679.
- Conroy, J.L., Fang, C., Gu, J., Zeitlin, S.O., Yang, W., Yang, J., Vanalstine, M.A., Nalwalk, J.W., Albrecht, P.J., Mazurkiewicz, J.E., Snyder-Keller, A., Shan, Z., Zhang, S.Z., Wentland, M.P., Behr, M., Knapp, B.I., Bidlack, J.M., Zuiderveld, O.P., Leurs, R., Ding, X., Hough, L.B., 2010. Opioids activate brain analgesic circuits through cytochrome P450/epoxygenase signaling. *Nat. Neurosci.* 13, 284–286.
- Costa, A.C.O., Romero, T.R.L., Pacheco, D.F., Perez, A.C., Savernini, A., Santos, R.R.A., Duarte, I.D.G., 2014. Participation of AT1 and Mas receptors in the modulation of inflammatory pain. *Peptides* 61, 17–22.
- Cox, B.M., 2012. Recent Developments in the Study of Opioid Receptors. *Mol. Pharmacol.* 83, 723–728.
- Cunha, T.M., Roman-Campos, D., Lotufo, C.M., Duarte, H.L., Souza, G.R., Verri, W.A., Funez, M.I., Dias, Q.M., Schivo, I.R., Domingues, A.C., Sachs, D., Chiavegatto, S., Teixeira, M.M., Hothersall, J.S., Cruz, J.S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2010. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K /AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 4442–4447.
- Cunha, T.M., Souza, G.R., Domingues, A.C., Carreira, E.U., Lotufo, C.M., Funez, M.I., Verri, W.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2012. Stimulation of peripheral Kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3K γ /AKT/nNOS/NO signaling pathway. *Mol. Pain* 8, 1–8.
- Cunha, T.M., Verri, W.A., Silva, J.S., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2005. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1755–1760.
- Damaj, M.I., Welch, S.P., Martin, B.R., 1993. Involvement of calcium and L-type channels in nicotine-induced antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266, 1330–8.
- Das Mahapatra, A., Choubey, R., Datta, B., 2020. Small Molecule Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors in Multitarget and Combination Therapies for Inflammation and Cancer. *Molecules* 25.
- Desroches, J., Beaulieu, P., 2010. Opioids and cannabinoids interactions: involvement in pain management. *Curr. Drug Targets* 11, 462–73.

- Desroches, J., Bouchard, J.F., Gendron, L., Beaulieu, P., 2014. Involvement of cannabinoid receptors in peripheral and spinal morphine analgesia. *Neuroscience* 261, 23–42.
- Deuis, J.R., Dvorakova, L.S., Vetter, I., 2017. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 1–17.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946–9.
- Di Marzo, V., 2009. The endocannabinoid system: Its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol. Res.* 60, 77–84.
- Di Rosa, M., 1972. Biological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmacol.* 24, 89–102.
- Donvito, G., Nass, S.R., Wilkerson, J.L., Curry, Z.A., Schurman, L.D., Kinsey, S.G., Lichtman, A.H., 2018. The Endogenous Cannabinoid System: A Budding Source of Targets for Treating Inflammatory and Neuropathic Pain. *Neuropsychopharmacology* 43, 52–79.
- Du, Y., Taylor, C.G., Aukema, H.M., Zahradka, P., 2020. Role of oxylipins generated from dietary PUFAs in the modulation of endothelial cell function. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 160, 102160.
- Duarte, I.D.G., Ferreira, S.H., 1992. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 221, 171–174.
- Duarte, I.D.G., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H., 1990. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 186, 289–293.
- Enayetallah, A.E., French, R.A., Thibodeau, M.S., Grant, D.F., 2004. Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 447–54.
- Esplugues, J. V., 2002. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1079–1095.
- Ferreira, R.C.M., Almeida-Santos, A.F., Duarte, I.D.G., Aguiar, D.C., Moreira, F.A., Romero, T.R.L., 2017. Peripheral Antinociception Induced by Aripiprazole Is Mediated by the Opioid System. *Biomed Res. Int.* 2017, 1–6.
- Ferreira, S.H., 1972. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat. New Biol.* 240, 200–3.
- Ferreira, S.H., Duarte, I.D.G., Lorenzetti, B.B., 1991. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.* 201, 121–122.
- Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D.R., Fleming, I., Busse, R., 1999. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries, *Nature*.
- Freire, M.A.M., Guimarães, J.S., Leal, W.G., Pereira, A., 2009. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. *Front. Neurosci.* 3, 175–181.
- Freitas, C.C., Vieira, P.R., Torres, G.V.B., Pereira, C.R., 2009. Avaliação da dor com o uso das escalas unidimensionais. *Rev. Dor* 10, 56–62.
- Garland, E., 2013. Pain Processing the Human Nervous System: A Selective Review of Nociceptive and Biobehavioral Pathway. *Prim. Care - Clin. Off. Pract.* 39, 561–571.
- Gauthier, K.M., Deeter, C., Krishna, U.M., Reddy, Y.K., Bondlela, M., Falck, J.R., Campbell,

- W.B., 2002. 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: A selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Circ. Res.* 90, 1028–1036.
- Gauthier, K.M., Falck, J.R., Reddy, L.M., Campbell, W.B., 2004. 14,15-EET analogs: characterization of structural requirements for agonist and antagonist activity in bovine coronary arteries. *Pharmacol. Res.* 49, 515–524.
- Gonzaga, A.C., 2017. Participação de mediadores inflamatórios na modulação endógena da dor periférica induzida pela ativação do sistema colinérgico.
- Gross, G.J., Baker, J.E., Hsu, A., Wu, H., Falck, J.R., Nithipatikom, K., 2010. Evidence for a role of opioids in epoxyeicosatrienoic acid-induced cardioprotection in rat hearts. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 298, H2201–H2207.
- Gross, G.J., Gauthier, K.M., Moore, J., Falck, J.R., Hammock, B.D., Campbell, W.B., Nithipatikom, K., 2008. Effects of the selective EET antagonist, 14,15-EEZE, on cardioprotection produced by exogenous or endogenous EETs in the canine heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H2838–H2844.
- Guo, Z., Johnson, V., Barrera, J., Porras, M., Hinojosa, D., Hernández, I., McGarrah, P., Potter, D.A., 2018. Targeting cytochrome P450-dependent cancer cell mitochondria: cancer associated CYPs and where to find them. *Cancer Metastasis Rev.* 37, 409–423.
- Heinzel, J., Längle, G., Oberhauser, V., Hausner, T., Kolbenschlag, J., Prahm, C., Grillari, J., Hercher, D., 2020. Use of the CatWalk gait analysis system to assess functional recovery in rodent models of peripheral nerve injury – a systematic review. *J. Neurosci. Methods.*
- Hercule, H.C., Schunck, W.H., Gross, V., Seringer, J., Leung, F.P., Weldon, S.M., Da Costa Goncalves, A.C., Huang, Y., Luft, F.C., Gollasch, M., 2009. Interaction Between P450 Eicosanoids and Nitric Oxide in the Control of Arterial Tone in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 54–60.
- Hohmann, A.G., Herkenham, M., 1999. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience* 92, 1171–5.
- Holden, J.E., Jeong, Y., Forrest, J.M., 2005. The endogenous opioid system and clinical pain management. *AACN Clin. Issues* 16, 291–301.
- Howlett, A.C., 2002. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69, 619–631.
- Imaoka, S., Hashizume, T., Funae, Y., 2005. Localization of rat cytochrome P450 in various tissues and comparison of arachidonic acid metabolism by rat P450 with that by human P450 orthologs. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 20, 478–484.
- Imig, J.D., 2012. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. *Physiol. Rev.* 92, 101–30.
- Imig, J.D., Falck, J.R., Inscho, E.W., 1999. Contribution of cytochrome P450 epoxygenase and hydroxylase pathways to afferent arteriolar autoregulatory responsiveness. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1399–1405.
- Imig, J.D., Hammock, B.D., 2009. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 794–805.
- Imig, J.D., Morisseau, C., 2020. Editorial: Clinical Paths for Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors. *Front. Pharmacol.* 11, 10–12.
- Inceoglu, B., Jinks, S.L., Schmelzer, K.R., Waite, T., Kim, I.H., Hammock, B.D., 2006. Inhibition of soluble epoxide hydrolase reduces LPS-induced thermal hyperalgesia and

- mechanical allodynia in a rat model of inflammatory pain. *Life Sci.* 79, 2311–2319.
- Inceoglu, B., Schmelzer, K.R., Morisseau, C., Jinks, S.L., Hammock, B.D., 2007. Soluble epoxide hydrolase inhibition reveals novel biological functions of epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 82, 42–49.
- Inceoglu, B., Wagner, K., Schebb, N.H., Morisseau, C., Jinks, S.L., Ulu, A., Hegedus, C., Rose, T., Brosnan, R., Hammock, B.D., 2011. Analgesia mediated by soluble epoxide hydrolase inhibitors is dependent on cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5093–5097.
- Isvoranu, G., Manole, E., Neagu, M., 2021. Gait analysis using animal models of peripheral nerve and spinal cord injuries. *Biomedicines* 9.
- Jacobs, B.Y., Kloefkorn, H.E., Allen, K.D., 2014. Gait Analysis Methods for Rodent Models of Osteoarthritis. *Curr. Pain Headache Rep.* 18.
- Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210.
- Kang, D.W., Choi, J.G., Moon, J.Y., Kang, S.Y., Ryu, Y., Park, J.B., Kim, H.W., 2017. Automated gait analysis in mice with chronic constriction injury. *J. Vis. Exp.* 2017, 1–5.
- Kappos, E.A., Sieber, P.K., Engels, P.E., Mariolo, A. V., D'Arpa, S., Schaefer, D.J., Kalbermatten, D.F., 2017. Validity and reliability of the CatWalk system as a static and dynamic gait analysis tool for the assessment of functional nerve recovery in small animal models. *Brain Behav.* 7, 1–12.
- Kassuya, C.A.L., Ferreira, J., Claudino, R.F., Calixto, J.B., 2007. Intraplantar PGE 2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: The role of prostanoid e receptors and protein kinases. *Br. J. Pharmacol.* 150, 727–737.
- Kawabata, A., 2011. Prostaglandin E2 and pain--an update. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1170–3.
- Kawabata, A., Manabe, S., Manabe, Y., Takagi, H., 1994. Effect of topical administration of l-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. *Br. J. Pharmacol.* 112, 547–550.
- Kawabata, A., Nishimura, Y., Takagi, H., 1992. L-Leucyl-L-arginine, naltrindole and D-arginine block antinociception elicited by L-arginine in mice with carrageenin-induced hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 107, 1096–1101.
- Klaumann, P.R., Wouk, A.F.P.F., Sillas, T., 2008. Patofisiologia da dor. *Arch. Vet. Sci.* 13, 1–12.
- Kosek, E., Cohen, M., Baron, R., Gebhart, G.F., Mico, J.A., Rice, A.S.C., Rief, W., Sluka, A.K., 2016. Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? *Pain* 157, 1382–1386.
- Kroetz, D.L., Xu, F., 2005. Regulation and Inhibition of Arachidonic Acid ω -Hydroxylases and 20-HETE Formation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 413–438.
- Kuhn, D.C., Willis, A.L., 1973. Proceedings: Prostaglandin E2, inflammation and pain threshold in rat paws. *Br. J. Pharmacol.* 49, 183P-184P.
- Labuz, D., Mousa, S.A., Schäfer, M., Stein, C., Machelska, H., 2007. Relative contribution of peripheral versus central opioid receptors to antinociception. *Brain Res.* 1160, 30–38.
- Lahvic, J.L., Ammerman, M., Li, P., Blair, M.C., Stillman, E.R., Fast, E.M., Robertson, A.L., Christodoulou, C., Perlin, J.R., Yang, S., Chiang, N., Norris, P.C., Daily, M.L., Redfield, S.E., Chan, I.T., Chatrizeh, M., Chase, M.E., Weis, O., Zhou, Y., Serhan, C.N., Zon, L.I., 2018. Specific oxylipins enhance vertebrate hematopoiesis via the receptor GPR132. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 9252–9257.
- Lichtman, A.H., Cook, S.A., Martin, B.R., 1996. Investigation of brain sites mediating

- cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276, 585–93.
- Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H., 1996. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrrone-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflamm. Res.* 45, 308–311.
- Machelska, H., Celik, M., 2020. Immune cell-mediated opioid analgesia. *Immunol. Lett.* 227, 48–59.
- Maldonado, R., Valverde, O., 2003. Participation of the opioid system in cannabinoid-induced antinociception and emotional-like responses. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 13, 401–410.
- Malmberg, A.B., Yaksh, T.L., 1993. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. *Pain* 54, 291–300.
- Malmberg, A.B., Yaksh, T.L., 1994. Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: Blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. *J. Neurosci.* 14, 4882–4890.
- Massi, P., Vaccani, A., Romorini, S., Parolaro, D., 2001. Comparative characterization in the rat of the interaction between cannabinoids and opiates for their immunosuppressive and analgesic effects. *J. Neuroimmunol.* 117, 116–124.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., Pertwee, R.G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., Vogel, Z., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50, 83–90.
- Medeiros, P., de Freitas, R.L., Boccella, S., Iannotta, M., Belardo, C., Mazzitelli, M., Romano, R., De Gregorio, D., Coimbra, N.C., Palazzo, E., Maione, S., 2020. Characterization of the sensory, affective, cognitive, biochemical, and neuronal alterations in a modified chronic constriction injury model of neuropathic pain in mice. *J. Neurosci. Res.* 98, 338–352.
- Meirer, K., Steinhilber, D., Proschak, E., 2014. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: Interfering with multiple pathways. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 114, 83–91.
- Melzack, R., Wall, P.D., 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150, 971–9.
- Merskey, H. and Bogduk, N., 1994. Part III: Pain Terms: A Current List with Definitions and Notes on Usage. In: *Classification of Chronic Pain*. IASP Task Force on Taxonomy, pp. 209–214.
- Millan, M.J., 1995. Serotonin (5-HT) and pain: A reappraisal of its role in the light of receptor multiplicity. *Semin. Neurosci.* 7, 409–419.
- Millan, M.J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57, 1–164.
- Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355–474.
- Mills, S.E.E., Nicolson, K.P., Smith, B.H., 2019. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. *Br. J. Anaesth.* 123, e273–e283.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A., 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1709–1715.
- Moore, P.K., Oluyomi, A.O., Babbidge, R.C., Wallace, P., Hart, S.L., 1991. L-N(G)-nitro

- arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* 102, 198–202.
- Morisseau, C., Hammock, B.D., 2013. Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 37–58.
- Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Iida, T., Segi, E., Sugimoto, Y., Tominaga, T., Narumiya, S., Tominaga, M., 2005. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol. Pain* 1, 1–13.
- Motta, P.G., Perez, A.C., Alves, D.P., Duarte, I.D.G., 2011. Peripheral control of inflammatory but not neuropathic pain by endogenous cholinergic system. *Pharmacology* 88, 18–25.
- Nathan, C., 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051–64.
- Newman, J.W., Morisseau, C., Hammock, B.D., 2005. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* 44, 1–51.
- Nithipatikom, K., Brody, D.M., Tang, A.T., Manthathi, V.L., Falck, J.R., Williams, C.L., Campbell, W.B., 2010. Inhibition of carcinoma cell motility by epoxyeicosatrienoic acid (EET) antagonists. *Cancer Sci.* 101, 2629–36.
- Node, K., Huo, Y., Ruan, X., Yang, B., Spiecker, M., Ley, K., Zeldin, D.C., Liao, J.K., 1999. Anti-inflammatory Properties of Cytochrome P450 Epoxygenase-Derived Eicosanoids. *Science* (80-). 285, 1276–1279.
- Oh, U., Jung, J., 2016. Cellular functions of TMEM16/anoctamin. *Pflugers Arch.* 468, 443–53.
- Oliveira, C., Veloso, C., Ferreira, R., Lage, G., Pimenta, L., Duarte, I., Romero, T., Perez, A., 2016. Peltatoside Isolated from *Annona crassiflora* Induces Peripheral Antinociception by Activation of the Cannabinoid System. *Planta Med.* 83, 261–267.
- Ossipov, M.H., 2012. The Perception and Endogenous Modulation of Pain. *Scientifica* (Cairo). 2012, 1–25.
- Pacheco, D., Klein, A., Perez, A.C., da Fonseca Pacheco, C.M., de Francischi, J.N., Lopes Reis, G.M., Duarte, I.D.G., 2009. Central antinociception induced by μ -opioid receptor agonist morphine, but not δ - or κ -, is mediated by cannabinoid CB 1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 158, 225–231.
- Pacheco, D.D.F., Pacheco, C.M.D.F., Duarte, I.D.G., 2012a. Peripheral antinociception induced by δ -opioid receptors activation, but not μ - or κ -, is mediated by Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *Eur. J. Pharmacol.* 674, 255–259.
- Pacheco, D.D.F., Pacheco, C.M.D.F., Duarte, I.D.G., 2012b. δ -Opioid receptor agonist SNC80 induces central antinociception mediated by Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 1084–1089.
- Pacheco, D.F., Reis, G.M.L., Francischi, J.N., Castro, M.S.A., Perez, A.C., Duarte, I.D.G., 2005. δ -Opioid receptor agonist SNC80 elicits peripheral antinociception via δ 1 and δ 2 receptors and activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Life Sci.* 78, 54–60.
- Pan, X., Chen, J., Wang, W., Chen, Ling, Wang, L., Ma, Q., Zhang, J., Chen, Lichao, Wang, G., Zhang, M., Wu, H., Cheng, R., 2017. Resveratrol-induced antinociception is involved in calcium channels and calcium/caffeine-sensitive pools. *Oncotarget* 8, 9399–9409.
- Panigrahy, D., Kaipainen, A., Greene, E.R., Huang, S., 2010. Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 723–735.

- Paradise, W.A., Vesper, B.J., Goel, A., Waltonen, J.D., Altman, K.W., Kenneth Haines, I., Radosevich, J.A., 2010. Nitric Oxide: Perspectives and Emerging Studies of a Well Known Cytotoxin. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 2715–2745.
- Park, S.K., Herrnreiter, A., Pfister, S.L., Gauthier, K.M., Falck, B.A., Falck, J.R., Campbell, W.B., 2018. GPR40 is a low-affinity epoxyeicosatrienoic acid receptor in vascular cells. *J. Biol. Chem.* 293, 10675–10691.
- Pokreisz, P., Fleming, I., Kiss, L., Barbosa-Sicard, E., Fisslthaler, B., Falck, J.R., Hammock, B.D., Kim, I.H., Szelid, Z., Vermeersch, P., Gillijns, H., Pellens, M., Grimminger, F., Van Zonneveld, A.J., Collen, D., Busse, R., Janssens, S., 2006. Cytochrome P450 epoxygenase gene function in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary vascular remodeling. *Hypertension* 47, 762–770.
- Potente, M., Fisslthaler, B., Busse, R., Fleming, I., 2003. 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid-induced inhibition of FOXO factors promotes endothelial proliferation by down-regulating p27Kip1. *J. Biol. Chem.* 278, 29619–29625.
- Potente, M., Michaelis, U.R., Fisslthaler, B., Busse, R., Fleming, I., 2002. Cytochrome P450 2C9-induced endothelial cell proliferation involves induction of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1, inhibition of the c-Jun N-terminal kinase, and up-regulation of cyclin D1. *J. Biol. Chem.* 277, 15671–15676.
- Prado, W.A., 2001. Involvement of calcium in pain and antinociception. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 34, 449–461.
- Queiroz, B.F., 2020. Estudo sobre os mecanismos antinociceptivos periféricos induzidos pela dopamina. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).
- Quilley, J., McGiff, J.C., 2000. Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 121–124.
- Quintão, J.L.D., Gonzaga, A.C.R., Galdino, G., Romero, T.R.L., Silva, J.F., Lemos, V.S., Campolina-Silva, G.H., Oliveira, C.A. de, Mahecha, G.A.B., Duarte, I.D.G., 2021. TNF- α , CXCL-1 and IL-1 β as activators of the opioid system involved in peripheral analgesic control in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 896, 1–10.
- Raja, S.N., Carr, D.B., Cohen, M., Finnerup, N.B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F.J., Mogil, J.S., Ringkamp, M., Sluka, K.A., Song, X.-J., Stevens, B., Sullivan, M.D., Tutelman, P.R., Ushida, T., Vader, K., 2020. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* 00.
- Rand, A.A., Rajamani, A., Kodani, S.D., Harris, T.R., Schlatt, L., Barnych, B., Passerini, A.G., Hammock, B.D., 2019. Epoxyeicosatrienoic acid (EET)-stimulated angiogenesis is mediated by epoxy hydroxyeicosatrienoic acids (EHETs) formed from COX-2. *J. Lipid Res.* 60, 1996–2005.
- Randall, L.O., Selitto, J.J., 1957. A method for measurement of analgesia activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 113, 233–249.
- Rang, H., Dale, M., Ritter, J., Moore, P., 2004. *Farmacologia*, 5a ed.
- Reis, G.M.L., Duarte, I.D.G., 2006. Baclofen, an agonist at peripheral GABA B receptors, induces antinociception via activation of TEA-sensitive potassium channels. *Br. J. Pharmacol.* 149, 733–739.
- Reynolds, D. V., 1969. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 164, 444–5.
- Rodrigues, A.R.A., Duarte, I.D.G., 2000. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.* 129, 110–

- 114.
- Romanelli, R., 2017. Opioid Prescribing for Chronic Pain in a Community--Based Healthcare System. *Am. J. Manag. Care* 23, 138–146.
- Romero, Pacheco, D., Duarte, I., 2013. Probable involvement of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels (CaCCs) in the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Life Sci.* 92, 815–820.
- Romero, T.R.L., Duarte, I.D.G., 2009. α 2-Adrenoceptor agonist xylazine induces peripheral antinociceptive effect by activation of the l-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat. *Eur. J. Pharmacol.* 613, 64–67.
- Romero, T.R.L., Duarte, I.D.G., 2012. N-Palmitoyl-ethanolamine (PEA) Induces Peripheral Antinociceptive Effect by ATP-Sensitive K⁺-Channel Activation. *J. Pharmacol. Sci.* 118, 156–160.
- Romero, T.R.L., Duarte, I.D.G., 2013. Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by ketamine. *Vet. Anaesth. Analg.* 40, 419–424.
- Romero, T.R.L., Galdino, G.S., Silva, G.C., Resende, L.C., Perez, A.C., Cortes, S.F., Duarte, I.D.G., 2012a. Involvement of the L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in peripheral antinociception induced by N-palmitoyl-ethanolamine in rats. *J. Neurosci. Res.* 90, 1474–1479.
- Romero, T.R.L., Guzzo, L.S., Perez, A.C., Klein, A., Duarte, I.D.G., 2012b. Noradrenaline activates the NO/cGMP/ATP-sensitive K⁺ channels pathway to induce peripheral antinociception in rats. *Nitric Oxide* 26, 157–161.
- Romero, T.R.L., Resende, L.C., Duarte, I.D.G., 2011. The neuronal NO synthase participation in the peripheral antinociception mechanism induced by several analgesic drugs. *Nitric Oxide* 25, 431–435.
- Romero, T.R.L., Resende, L.C., Guzzo, L.S., Duarte, I.D.G., 2013. CB1 and CB2 Cannabinoid Receptor Agonists Induce Peripheral Antinociception by Activation of the Endogenous Noradrenergic System. *Anesth. Analg.* 116, 463–472.
- Sachs, D., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2004. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: Activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 3680–3685.
- Sachs, D., Villarreal, C., Cunha, F., Parada, C., Ferreira, S., 2009. The role of PKA and PKC ϵ pathways in prostaglandin E₂ -mediated hypernociception. *Br. J. Pharmacol.* 156, 826–834.
- Sampaio, I., 2015. *Estatística Aplicada À Experimentação Animal*, 4a ed. FEP MVZ.
- Sandkühler, J., 1996. The organization and function of endogenous antinociceptive systems. *Prog. Neurobiol.* 50, 49–81.
- Schaible, H.G., Schmidt, R.F., 1988. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E₂. *J. Physiol.* 403, 91–104.
- Schmelzer, K.R., Kubala, L., Newman, J.W., Kim, I.-H., Eiserich, J.P., Hammock, B.D., 2005. Soluble epoxide hydrolase is a therapeutic target for acute inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 9772–9777.
- Scholz, J., Woolf, C.J., 2002. Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.* 5 Suppl, 1062–7.
- Sherrington, C.S., 1906. Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. *J. Physiol.* 34, 1–50.

- Sisignano, M., Park, C.-K., Angioni, C., Zhang, D.D., von Hehn, C., Cobos, E.J., Ghasemlou, N., Xu, Z.-Z., Kumaran, V., Lu, R., Grant, A., Fischer, M.J.M., Schmidtko, A., Reeh, P., Ji, R.-R., Woolf, C.J., Geisslinger, G., Scholich, K., Brenneis, C., 2012. 5,6-EET Is Released upon Neuronal Activity and Induces Mechanical Pain Hypersensitivity via TRPA1 on Central Afferent Terminals. *J. Neurosci.* 32, 6364–6372.
- Smith, W.L., Garavito, R.M., DeWitt, D.L., 1996. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271, 33157–33160.
- Soares, A.C., Duarte, I.D., 2001. Dibutyryl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K(+) channels in the rat PGE2-induced hyperalgesic paw. *Br. J. Pharmacol.* 134, 127–31.
- Sousa, A.M., Lages, G.V., Pereira, C.L., Slullitel, A., 2016. Experimental models for the study of neuropathic pain. *Rev. Dor* 17, 27–30.
- Spector, A.A., Fang, X., Snyder, G.D., Weintraub, N.L., 2004. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog. Lipid Res.* 43, 55–90.
- Stein, 1995. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N. Engl. J. Med.* 332, 1685–90.
- Stein, C., 2013. Targeting pain and inflammation by peripherally acting opioids. *Front. Pharmacol.* 4 SEP, 1–3.
- Stein, C., Lang, L.J., 2009. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 3–8.
- Stein, C., Machelska, H., Binder, W., Schäfer, M., 2001. Peripheral opioid analgesia. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1, 62–5.
- Stein, C., Millan, M.J., Shippenberg, T.S., Peter, K., Herz, A., 1989. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248, 1269–75.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K., 1995. 2-arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Terashvili, M., Tseng, L.F., Wu, H., Narayanan, J., Hart, L.M., Falck, J.R., Pratt, P.F., Harder, D.R., 2008. Antinociception Produced by 14, 15-Epoxyeicosatrienoic Acid Is Mediated by the Activation of b-Endorphin and Met-Enkephalin in the Rat Ventrolateral Periaqueductal Gray. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 614–622.
- Toriyabe, M., Omote, K., Kawamata, T., Namiki, A., 2004. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. *Anesthesiology* 101, 983–990.
- Trouvin, A.P., Perrot, S., 2019. New concepts of pain. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 33, 101415.
- Turk, D.C., 2002. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of treatments for patients with chronic pain. *Clin J Pain* 18, 355–365.
- Vanegas, H., Schaible, H.G., 2000. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. *Pain* 85, 9–18.
- Vasudeva, K., Andersen, K., Zeyzus-Johns, B., Hitchens, T.K., Patel, S.K., Balducci, A., Janjic, J.M., Pollock, J.A., 2014. Imaging Neuroinflammation In Vivo in a Neuropathic Pain Rat Model with Near-Infrared Fluorescence and 19F Magnetic Resonance. *PLoS One* 9, 1–12.

- Vinegar, R., Truax, J.F., Selph, J.L., Johnston, P.R., Venable, A.L., McKenzie, K.K., 1987. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed. Proc.* 46, 118–26.
- Wagner, Gilda, J., Yang, J., Wan, D., Morisseau, C., Gomes, A. V., Hammock, B.D., 2017a. Soluble epoxide hydrolase inhibition alleviates neuropathy in Akita (Ins2 Akita) mice. *Behav. Brain Res.* 326, 69–76.
- Wagner, K., Inceoglu, B., Gill, S.S., Hammock, B.D., 2011a. Epoxygenated fatty acids and soluble epoxide hydrolase inhibition: Novel mediators of pain reduction. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2816–2824.
- Wagner, K., Inceoglu, B., Hammock, B.D., 2011b. Soluble epoxide hydrolase inhibition, epoxygenated fatty acids and nociception. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 96, 76–83.
- Wagner, K., Vito, S., Inceoglu, B., Hammock, B.D., 2014a. The role of long chain fatty acids and their epoxide metabolites in nociceptive signaling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 113–115, 2–12.
- Wagner, K., Yang, J., Inceoglu, B., Hammock, B.D., 2014b. Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition Is Antinociceptive in a Mouse Model of Diabetic Neuropathy. *J. Pain* 15, 907–914.
- Wagner, Lee, K.S.S., Yang, J., Hammock, B.D., 2017b. Epoxy fatty acids mediate analgesia in murine diabetic neuropathy. *Eur. J. Pain* 21, 456–465.
- Wang, B., Wu, L., Chen, J., Dong, L., Chen, C., Wen, Z., Hu, J., Fleming, I., Wang, D.W., 2021. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 94.
- Wang, H., Lin, L., Jiang, J., Wang, Y., Lu, Z.Y., Bradbury, J.A., Lih, F.B., Wang, D.W., Zeldin, D.C., 2003. Up-Regulation of Endothelial Nitric-Oxide Synthase by Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Involves Mitogen-Activated Protein Kinase and Protein Kinase C Signaling Pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 753–764.
- Wang, J., Ueda, N., 2009. Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 89, 112–9.
- Wang, T., Fu, X., Chen, Q., Patra, J.K., Wang, D., Wang, Z., Gai, Z., 2019. Arachidonic Acid Metabolism and Kidney Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1–28.
- Wassall, S.R., Brzustowicz, M.R., Shaikh, S.R., Cherezov, V., Caffrey, M., Stillwell, W., 2004. Order from disorder, corralling cholesterol with chaotic lipids: The role of polyunsaturated lipids in membrane raft formation. *Chem. Phys. Lipids* 132, 79–88.
- Watkins, L.R., Mayer, D.J., 1982. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. *Science* (80-.). 216, 1185–1192.
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. *Exp. Biol. Med.* 111, 544–547.
- Wood, P.B., 2008. Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert Rev. Neurother.* 8, 781–97.
- Woolf, C.J., 2004. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Ann. Intern. Med.* 140, 441–451.
- Woolf, C.J., 2010. What is this thing called pain? *J. Clin. Invest.* 120, 3742–4.
- Woolf, C.J., Mannion, R.J., 1999. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* (London, England) 353, 1959–64.

- Xiao, Y.F., 2007. Cyclic AMP-dependent modulation of cardiac L-type Ca²⁺ and transient outward K⁺ channel activities by epoxyeicosatrienoic acids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 82, 11–18.
- Xiao, Y.F., Huang, L., Morgan, J.P., 1998. Cytochrome P450: A novel system modulating Ca²⁺ channels and contraction in mammalian heart cells. *J. Physiol.* 508, 777–792.
- Yang, J., Bruun, D.A., Wang, C., Wan, D., Reynolds, C.B., Inceoglu, B., Lein, P.J., Hammock, B.D., 2019. Lipidomes of brain from rats acutely intoxicated with diisopropylfluorophosphate identifies potential therapeutic targets. *Toxicol Appl Pharmacol.* 382, 1–21.
- Yang, J., Schmelzer, K., Georgi, K., Hammock, B.D., 2009. Quantitative Profiling Method for Oxylipin Metabolome by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 81, 8085–8093.
- Yuan, Z., Majchrzak-hong, S., Keyes, G.S., Iadarola, M.J., Mannes, A.J., Ramsden, C.E., 2018. Lipidomic profiling of targeted oxylipins with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*
- Zambelli, V.O., Fernandes, A.C.D.O., Gutierrez, V.P., Ferreira, J.C.B., Parada, C.A., Mochly-Rosen, D., Cury, Y., 2014. Peripheral Sensitization Increases Opioid Receptor Expression and Activation by Crotalphine in Rats. *PLoS One* 9, e90576.
- Zeldin, D.C., 2001. Epoxygenase Pathways of Arachidonic Acid Metabolism. *J. Biol. Chem.* 276, 36059–36062.
- Zhang, G., Kodani, S., Hammock, B.D., 2014. Stabilized epoxygenated fatty acids regulate inflammation, pain, angiogenesis and cancer. *Prog. Lipid Res.* 53, 108–123.

ANEXO



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 75/2017**Título do projeto:** Avaliação dos ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) no modelo de nocicepção periférica em camundongos**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Igor Dimitri Gama Duarte**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas**Departamento:** Departamento de Farmacologia**Situação atual:** **Decisão Final - Aprovado**Aprovado na reunião do dia 05/06/2017. Validade: 05/06/2017 à 04/06/2022
Belo Horizonte, 05/06/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

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