

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

**EVIDÊNCIAS DE ENVOLVIMENTO DAS VIAS OPIOIDÉRGICA, CANABINOIDÉRGICA E
NITRÉRGICA NOS MECANISMOS ANTINOCICEPTIVOS CENTRAL E PERIFÉRICO DO
RESVERATROL EM CAMUNDONGOS**

Cristina da Costa Oliveira

BELO HORIZONTE

2019

CRISTINA DA COSTA OLIVEIRA

**EVIDÊNCIAS DE ENVOLVIMENTO DAS VIAS OPIOIDÉRGICA, CANABINOIDÉRGICA E
NITRÉRGICA NOS MECANISMOS ANTINOCICEPTIVOS CENTRAL E PERIFÉRICO DO
RESVERATROL EM CAMUNDONGOS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Andrea de Castro Perez.

Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero.

BELO HORIZONTE

2019

043 Oliveira, Cristina da Costa.
Evidências de envolvimento das vias opioidérgica, canabinoidérgica e nitrérgica nos mecanismos antinociceptivos central e periférico do resveratrol em camundongos [manuscrito] / Cristina da Costa Oliveira. – 2019.

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

Orientadora: Profa. Dra. Andrea de Castro Perez. Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero.

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

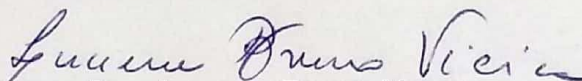
1. Fisiologia - Teses. 2. Farmacologia - Teses. 3. Suplementos Nutricionais. 4 Resveratrol. 5. Canabinoide. 6. Antinocicepção - Teses. 7. Óxido nítrico. I. Perez, Andrea de Castro. II. Romero, Thiago Roberto Lima. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612:615

"EVIDÊNCIAS DE ENVOLVIMENTO DAS VIAS OPIOIDÉRGICA, CANABINOIDÉRGICA E NITRÉRGICA NOS MECANISMOS ANTINOCICEPTIVOS CENTRAL E PERIFÉRICO DO RESVERATROL EM CAMUNDONGOS"

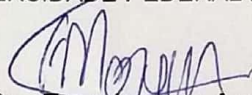
CRISTINA DA COSTA OLIVEIRA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 28 de junho de 2019, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



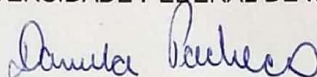
PROFA. DRA. LUCIENE BRUNO VIEIRA

ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



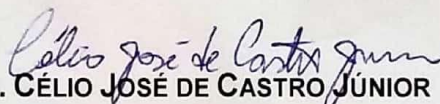
PROF. DR. FABRÍCIO DE ARAUJO MOREIRA

ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



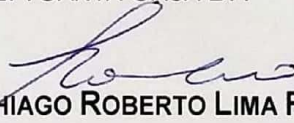
PROFA. DRA. DANIELA DA FONSECA PACHECO

CENTRO UNIVERSITÁRIO NEWTON PAIVA



PROF. DR. CÉLIO JOSÉ DE CASTRO JÚNIOR

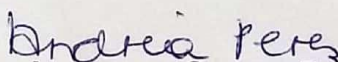
IEP/SANTA CASA BH



PROF. DR. THIAGO ROBERTO LIMA ROMERO

ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

COORIENTADOR



PROFA. DRA. ANDREA DE CASTRO PÉREZ

ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ORIENTADORA

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

Belo Horizonte, 28 de junho de 2019

“Não nos esqueçamos de que a floresta se levantou de sementes quase invisíveis...”

Irmã de Castro Rocha (“Meimei”)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus e todos os seus intercessores, por me guiar, proteger e permitir que eu trilhasse esse caminho tão único e especial, com tantos ensinamentos e aprendizados.

A minha orientadora, Profa. Andrea de Castro Perez, por acreditar em mim e me abrir estas portas que mudaram para sempre, e para melhor, o rumo de minha vida.

Ao meu co-orientador, Prof. Thiago Roberto Lima Romero, por seu entusiasmo e energia, contagiando e motivando todos a sua volta.

Ao nosso estimado e respeitado Professor Sênior do Laboratório de Dor e Analgesia (LDA), Prof. Igor Dimitri Gama Duarte, por sempre acolher e incentivar todos os alunos que têm a sorte de cruzar seu caminho.

Ao meu tutor no Canadá, Prof. Pierre S. Haddad, por me receber tão bem em seu laboratório na Universidade de Montreal, com tanto profissionalismo e atenção.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela seriedade e competência.

Ao meu amado pai, José Arimatéia de Oliveira, por me servir de exemplo e de inspiração, e que apesar de não estar mais presente fisicamente entre nós, sei que de alguma forma sempre esteve e estará presente em minha vida.

A minha querida mãe, mãezinha/mãezona, Jucélia Venâncio da Costa Oliveira, pelo seu apoio e carinho incondicionais.

Ao meu grande irmão, Lucas da Costa Oliveira, por sempre me reanimar com o exemplo da sua dedicação e perseverança.

A minha linda irmã, Luciana da Costa Oliveira, por sempre me contagiar com o seu entusiasmo e a sua alegria.

Ao meu namorado, meu bem-querer, Rafael Correia de Sousa da Silva, por tornar meus dias mais leves e felizes com tanto amor e carinho.

As minhas atuais e antigas companheiras de república, por todos os momentos compartilhados e pela agradável convivência durante tantos anos. Em especial, a Melina Rezende Dias, por ter tido um papel primordial na minha entrada nesse mundo tão singular da pós-graduação. A Mariane Izabella Abreu de Melo, Nayhara Freitas Martins Gomes e Thaís Altoé Moreira, por terem vivenciado junto comigo todas as experiências e aprendizados adquiridos ao longo desses 4 anos de doutorado.

A todos os colegas do Laboratório de Dor e Analgesia (LDA), por todos os ensinamentos e pelo grande companheirismo, tornando a jornada mais amena com tantos momentos de descontração e alegria. Em especial, a Renata Cristina Mendes Ferreira, por vivenciar junto comigo esses 8 anos de LDA, com tanto humor e energia. A Flávia Cristina Sousa Fonseca, pelo seu exemplo de disciplina e organização, ao Douglas Lamounier de Almeida, por alegrar a todos com sua eterna jovialidade e bom humor. Ao Daniel Portela Dias Machado, por nos transmitir tanta tranquilidade e calma, a Danielle Diniz Aguiar, por nos inspirar com sua fé e perseverança. A Loyara Rocha Miranda Teixeira, pela autenticidade e comprometimento, a Bárbara Formiga, por nos mostrar tanta segurança e determinação. A Raquel Rodrigues Santos, por nos deixar sempre em contato com os encantos e as peculiaridades da medicina oriental, ao William Valadares Campos Pereira, pela persistência e disposição. A Mariana Nathuê Lôbo Prata, por ser esse exemplo de pessoa e de farmacêutica, a Thaís de Menezes Noronha, por todo o apoio e cumplicidade. A Amanda Cristina Reis Gonzaga, Marla Calazans e Vanessa Kaiser, por nos mostrar com tanto ânimo e coragem que é possível, sim, conciliar maternidade e pós-graduação.

As minhas contemporâneas da pós-graduação, Ana Flávia Santos Almeida e Luciana Nascimento Moreira, pelo companheirismo e amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Produtos Naturais e Doenças Metabólicas da Universidade de Montreal, por todo suporte e receptividade.

As minhas parceiras “canadenses”, Celline Cardoso Almeida Brasil e Maria Rosana Evaristo da Silva, por ajudarem a aquecer e colorir os dias frios e cinzas de Montreal.

Ao pessoal da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia, em especial Cintya Menezes Fonseca e Rodner Rodrigues Madureira de Almeida, pela paciência e atenção.

Aos bioteristas, Jorge Costa Ferreira e Rinaldo do Nascimento, por iniciarem o nosso trabalho antes de nós mesmos ao zelar pelo bem-estar dos animais de experimentação.

Aos órgãos de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Programa Futuros Líderes nas Américas (ELAP, do inglês *Emerging Leaders in the Americas Program*) pelo auxílio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2-AG** - 2-araquidonoil glicerol
- AEA** - araquidonil etanolamina (anandamida)
- AIE** - anti-inflamatório esteroidal
- AINE** - anti-inflamatório não esteroidal
- AKT (ou PKB)** - proteína quinase B
- AMPA** - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
- AMPc** - monofosfato cíclico de adenosina
- AMT** - transportador membranar de anandamida (do inglês *anandamide membrane transporter*)
- ANOVA** - análise de variância (do inglês *analysis of variance*)
- ATP** - adenosina trifosfato
- BSA** - albumina de soro bovino (do inglês *bovine serum albumin*)
- Ca²⁺** - íon cálcio
- CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CAR** - carragenina
- CB₁** - receptor canabinoide do tipo 1
- CB₂** - receptor canabinoide do tipo 2
- CEBIO** - Centro de Bioterismo
- CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CGRP** - peptídeo relacionado com o gene da calcitonina
- CNPq** - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- COX** - ciclo-oxigenase
- DAG** - diacilglicerol
- DMSO** - dimetilsulfóxido
- DRG** - gânglio da raiz dorsal (do inglês *dorsal root ganglion*)
- ELAP** - Programa Futuros Líderes nas Américas (do inglês *Emerging Leaders in the Americas Program*)
- eNOS** - óxido nítrico sintase endotelial
- EPM** - erro padrão da média

et al - e outros (do latim *et alli*)

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

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

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

Glu - glutamato

GMPc - monofosfato cíclico de guanosina

GPÉR (ou GPR30) - receptor de estrógeno acoplado à proteína G

GTP - guanosina trifosfato

i.c.v. - intracerebroventricular

i.p. - intraperitoneal

i.pl. - intraplantar

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

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

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

K_{ATP} - canais para potássio sensíveis ao ATP

KC - queratinócitos

LDA - Laboratório de Dor e Analgesia

MAGL - monoacilglicerol lipase

mGluR - receptor metabotrópico de glutamato

n - número de animais experimentais

NADA - N-araquidonoil dopamina

NAPE - N-araquidonoil fosfatidiletanolamina

NK-1 - receptor de neurocinina-1

NMDA - N-metil-D-aspartato

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

OEA - oleiletanolamida

PAG - substância cinzenta periaquedutal (do inglês *periaquedutal grey*)

PBS - tampão fosfato-salino (do inglês *phosphate buffered saline*)

PDE - fosfodiesterase

PEA - palmitoiletanolamida

PG - prostaglandina

PI3K - fosfatidilinositol-3-quinase

PKA - proteína quinase A

PKB (ou AKT) - proteína quinase B

PKG - proteína quinase G

RE - receptor de estrógeno

RES - resveratrol

RPRGC - receptor peptídico relacionado ao gene da calcitonina

RVM - medula ventromedial rostral

SCP - substância cinzenta periaquedutal

SNC - sistema nervoso central

SP - substância P

THC - tetrahydrocannabinol

TNF - fator de necrose tumoral

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da transmissão nociceptiva ao longo do nociceptor (Raouf et al. 2010).....	24
Figura 2 - Representação esquemática da via ascendente da dor (Golan et al. 2014)..	25
Figura 3 - Representação esquemática da teoria do portão da dor (Silverthorn 2017).26	
Figura 4 - Representação esquemática da ação dos opioides endógenos (Trang et al. 2015).....	30
Figura 5 - Estrutura molecular de agonistas canabinoides exógenos (A) e endógenos (B e C) (Honório et al. 2006).	33
Figura 6 - Representação esquemática da ação dos endocannabinoides (Saito et al. 2010).....	34
Figura 7 - Representação esquemática do efeito dual do óxido nítrico (NO) na dor (Hamza et al. 2010).....	36
Figura 8 - Gêneros e espécies vegetais fontes de resveratrol (Harikumar & Aggarwal 2008).....	40
Figura 9 - Isomerização <i>cis-trans</i> do resveratrol induzida pela luz (Hui et al. 2011).	41
Figura 10 - Esquema representativo das ações postuladas de fármacos que atuam na via opioide	47
Figura 11 - Esquema representativo das ações postuladas de fármacos que atuam na via canabinoide.....	48
Figura 12 - Esquema representativo das ações postuladas de fármacos que atuam na via do óxido nítrico.	49
Figura 13 - Injeção subcutânea na superfície plantar da pata posterior do camundongo (administração intraplantar).	50
Figura 14 - (A) animal após realização de cirurgia estereotáxica, ainda com o mandril de aço inoxidável no interior da cânula, a fim de evitar a obstrução da mesma. (B) cânula guia conectada à agulha injetora associada a um tubo polietileno de 10 cm (PE-10). (C) administração intracerebroventricular realizada com o auxílio de uma seringa de precisão (HAMILTON®, EUA) de 10 µL.....	52
Figura 15 - Camundongo sendo submetido ao teste de retirada de pata.....	53

Figura 16 - Parte compressora do aparelho (Ugo Basile, Itália) utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de camundongos.	54
Figura 17 - Representação esquemática do reflexo de retirada frente ao estímulo nocivo (Santuz 2018).	55
Figura 18 - Mecanismo da reação envolvida na dosagem de nitrito [NO ₂ ⁻] pelo método de Griess (Ramos et al. 2006).	60
Figura 19 - Curva tempo-resposta da administração intraplantar de resveratrol (RES) na hiperalgesia induzida por carragenina (CAR) em camundongos.	63
Figura 20 - Exclusão do efeito antinociceptivo na pata contralateral na administração intraplantar do resveratrol (RES).	64
Figura 21 - Curva tempo-resposta da administração intracerebroventricular de resveratrol (RES) na hiperalgesia induzida por carragenina (CAR) em camundongos..	65
Figura 22 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com naloxona (NLX) na antinocicepção periférica do resveratrol (RES)	66
Figura 23 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com clocinnamox (CLOC) na antinocicepção periférica do resveratrol (RES).	67
Figura 24 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com naltrindole (NTD) na antinocicepção periférica do resveratrol (RES).	67
Figura 25 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com nor-binaltorfimina (nBNI) na antinocicepção periférica do resveratrol (RES)..	68
Figura 26 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com naloxona (NLX) na antinocicepção central do resveratrol (RES).	69
Figura 27 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com clocinnamox (CLOC) na antinocicepção central do resveratrol (RES).	69
Figura 28 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com naltrindole (NTD) na antinocicepção central do resveratrol (RES).	70
Figura 29 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com nor-binaltorfimina (nBNI) na antinocicepção central do resveratrol (RES)..	70
Figura 30 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com bestatina (BEST) na antinocicepção periférica do resveratrol (RES)..	71
Figura 31 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com bestatina (BEST) na antinocicepção central do resveratrol (RES)..	72

Figura 32 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com AM251 na antinocicepção periférica do resveratrol (RES)	73
Figura 33 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com AM630 na antinocicepção periférica do resveratrol (RES)	73
Figura 34 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com AM251 na antinocicepção central do resveratrol (RES)	74
Figura 35 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com AM630 na antinocicepção central do resveratrol (RES)	75
Figura 36 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com MAFP na antinocicepção periférica do resveratrol (RES)	76
Figura 37 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com VDM11 na antinocicepção periférica do resveratrol (RES)	76
Figura 38 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com MAFP na antinocicepção central do resveratrol (RES)	77
Figura 39 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com VDM11 na antinocicepção central do resveratrol (RES)	78
Figura 40 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com L-NOArg na antinocicepção periférica do resveratrol (RES)	79
Figura 41 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com L-NPA na antinocicepção periférica do resveratrol (RES)	79
Figura 42 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com L-NOArg na antinocicepção central do resveratrol (RES)	80
Figura 43 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com L-NPA na antinocicepção central do resveratrol (RES)	80
Figura 44 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com ODQ na antinocicepção periférica do resveratrol (RES)	81
Figura 45 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com zaprinast (ZAP) na antinocicepção periférica do resveratrol (RES)	82
Figura 46 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com ODQ na antinocicepção central do resveratrol (RES)	82
Figura 47 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com zaprinast (ZAP) na antinocicepção central do resveratrol (RES)	83

Figura 48 - Análise por Western-blot da expressão de nNOS na superfície plantar da pata posterior de camundongos.	84
Figura 49 - Análise por Western-blot do nível de fosforilação da nNOS ^{Ser852} na superfície plantar da pata posterior de camundongos.....	85
Figura 50 - Análise por Western-blot da expressão de nNOS no mesencéfalo de camundongos.....	86
Figura 51 - Análise por Western-blot do nível de fosforilação da nNOS ^{Ser852} no mesencéfalo de camundongos.....	87
Figura 52 - Efeito da injeção intraplantar de resveratrol (RES) na concentração de nitrito [NO ₂ ⁻] no tecido homogeneizado da superfície plantar da pata.....	88
Figura 53 - Efeito da injeção intracerebroventricular de resveratrol (RES) na concentração de nitrito [NO ₂ ⁻] no tecido homogeneizado do mesencéfalo	89
Figura 54 - Representação esquemática dos supostos mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do resveratrol.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação geral das fibras nervosas e seus respectivos diâmetros e velocidades de condução, conforme nível de mielinização (Manzano et al. 2008).	24
Tabela 2 - Concentração de resveratrol em alguns produtos alimentícios (Baur & Sinclair 2006).	40

RESUMO

INTRODUÇÃO: O resveratrol é uma fitoalexina natural presente em uvas e derivados, com atividades terapêuticas amplamente relatadas, incluindo efeitos analgésicos. Entretanto, os mecanismos da ação antinociceptiva do resveratrol ainda não foram completamente elucidados, podendo promover limitações na sua utilização terapêutica. **OBJETIVO:** Este trabalho propõe avaliar os mecanismos do efeito antinociceptivo central e periférico induzido pelo resveratrol, analisando o possível envolvimento dos sistemas opioide, canabinoide e nitrérgico. **MÉTODOS:** O teste de retirada de pata foi utilizado e a hiperalgesia foi induzida pela injeção intraplantar de carragenina (200 µg). O resveratrol e as drogas dos sistemas analgésicos avaliados foram administrados via intraplantar ou intracerebroventricular em camundongos machos (n = 5). Análises estatísticas: One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. **RESULTADOS:** Nossos resultados confirmam que o resveratrol tem atividade antinociceptiva central e periférica, dose e tempo dependentes. Esta antinocicepção deve-se à ativação concomitante dos receptores μ - e δ -opioides e dos receptores canabinoides do tipo CB₁. O efeito anti-hiperalgésico do resveratrol parece também envolver a liberação de opioides endógenos e endocanabinoides, uma vez que a administração de doses não-analgésicas de inibidores da recaptação ou degradação de endocanabinoides e peptídeos opioides intensificaram o efeito antinociceptivo de baixas doses de resveratrol. Além disso, a administração do resveratrol ativou a isoforma neuronal da óxido nítrico sintase e aumentou os níveis teciduais de nitrito quantificado pelo método de Griess. Adicionalmente, a antinocicepção desencadeada pelo resveratrol parece depender da ação da guanilato ciclase solúvel (GCs) e dos níveis de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). **CONCLUSÃO:** Nossos resultados fornecem evidências de que a antinocicepção central e periférica induzida pelo resveratrol está associada à ativação concomitante dos receptores μ - e δ -opioides, dos receptores canabinoides do tipo CB₁ e da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase, com a possível atuação de opioides endógenos, endocanabinoides e GCs/GMPc como mensageiros celulares. **APOIO FINANCEIRO:** CNPq, CAPES e FAPEMIG. **Protocolo CEUA:** 278/2016.

PALAVRAS-CHAVE: nutracêuticos, resveratrol, antinocicepção, opioides, canabinoides, óxido nítrico.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Resveratrol is a natural phytoalexin present in grapes and derivatives, with widely reported therapeutic activities, including analgesic effects. However, the mechanisms of the antinociceptive action of resveratrol have not yet been fully elucidated, and it may promote limitations in its therapeutic use. **OBJECTIVE:** This work proposes to evaluate the mechanisms of central and peripheral antinociceptive effect induced by resveratrol, analyzing the possible involvement of the opioid, cannabinoid and nitrenergic systems. **METHODS:** The paw withdrawal test was used and hyperalgesia was induced by intraplantar injection of carrageenan (200 µg). Resveratrol and drugs from analgesic systems evaluated were administered intraplantarly or intracerebroventricularly in male mice (n = 5). Statistical analyzes: One-Way ANOVA followed by Bonferroni post-test. **RESULTS:** Our results confirm that resveratrol has central and peripheral antinociceptive activity, dose and time dependent. This antinociception is due to the concomitant activation of the μ - and δ -opioid receptors and the CB₁-type cannabinoid receptors. The antihyperalgesic effect of resveratrol also seems to involve the release of endogenous opioids and endocannabinoids, since the administration of non-analgesic doses of inhibitors of the reuptake or degradation of endocannabinoids and opioid peptides has intensified the antinociceptive effect of low doses of resveratrol. In addition, the administration of resveratrol activated a neuronal isoform of nitric oxide synthase and increased the tissue levels of nitrite quantified by the Griess method. Additionally, the antinociception triggered by resveratrol seems to depend on the action of soluble guanylate cyclase (GCs) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels. **CONCLUSION:** Our results provide evidence that central and peripheral resveratrol-induced antinociception is associated with the concomitant activation of μ - and δ -opioid receptors, CB₁-type cannabinoid receptors and the neuronal isoform of nitric oxide synthase, with the possible action of endogenous opioids, endocannabinoids and GCs/cGMPs as cellular messengers. **FINANCIAL SUPPORT:** CNPq, CAPES and FAPEMIG. **CEUA Protocol:** 278/2016.

KEY WORDS: nutraceuticals, resveratrol, antinociception, opioids, cannabinoids, nitric oxide.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Considerações gerais sobre o estudo da dor.....	20
1.2 Via ascendente da dor.....	22
1.3 Modulação endógena da dor.....	26
1.4 Opioides e seu papel na analgesia.....	28
1.5 Canabinoides e seu papel na analgesia.....	31
1.6 Óxido nítrico e seu papel na analgesia.....	35
1.7 Resveratrol e seu potencial analgésico.....	37
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 - Objetivo Geral.....	44
2.2 - Objetivos Específicos.....	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1 Animais de experimentação.....	46
3.2 Drogas e Solventes.....	46
3.2.1 Agente hiperalgésico.....	46
3.2.2 Agente analgésico sob estudo.....	46
3.2.3 Fármacos envolvidos na via opioidérgica.....	46
3.2.4 Fármacos envolvidos na via canabinoidérgica.....	47
3.2.5 Fármacos envolvidos na via nitrérgica.....	48
3.3 Vias de administração das drogas.....	49
3.3.1 Administração Intraplantar.....	49
3.3.2 Administração Intracerebroventricular.....	50
3.4 Teste algesimétrico.....	53
3.4.1 Resposta do animal.....	54
3.4.2 Medida do limiar nociceptivo, hiperalgesia e antinocicepção.....	56
3.4.3 Procedimento experimental.....	57
3.5 Análise da expressão de nNOS pela técnica de Western Blot.....	58
3.6 Dosagem de Nitrito pela Reação de Griess.....	59
3.7 Análise estatística dos resultados.....	61

4. RESULTADOS.....	62
4.1 Administrações intraplantar ou intracerebroventricular de resveratrol (RES) induzem efeito antinociceptivo frente à hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina (CAR) na pata de camundongos	63
4.2 Avaliação do envolvimento de receptores opioides na antinocicepção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES).....	66
4.3 Inibidores da degradação de opioides endógenos intensificam a antinocicepção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES).....	71
4.4 Avaliação do envolvimento de receptores canabinoides na antinocicepção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES).....	72
4.5 Inibidores da degradação e recaptação de endocanabinoides intensificam a antinocicepção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES)	75
4.6 Inibidores da nNOS antagonizam a antinocicepção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES)	78
4.7 Inibidores da guanilato ciclase solúvel (GCs) e da fosfodiesterase (PDE) inibem e intensificam, respectivamente, a antinocicepção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES)	81
4.8 Avaliação da atividade da nNOS e dos níveis nitrito [NO ₂ ⁻] durante a antinocicepção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES)	83
5. DISCUSSÃO.....	90
ANEXO I.....	108
ANEXO II.....	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

1. INTRODUÇÃO

Introdução

1.1 Considerações gerais sobre o estudo da dor

A palavra “dor”, na língua portuguesa, provém do latim (“*dolore*”) e significa sofrimento. Similarmente, na língua inglesa, o termo “*pain*” é oriundo da palavra grega “*poiné*”, a qual significa pena. Apesar da denotação, a princípio, negativa, a dor é um componente essencial do sistema de defesa do organismo, com funções indicadoras imprescindíveis à manutenção da vida. Uma vez que a percepção dolorosa ocorra, ela assume prioridade sobre outras demandas cognitivas competitivas, impulsionando o indivíduo a tentar interromper sua aparente causa. A falta da capacidade de experimentar a dor, como na rara condição de insensibilidade dolorosa congênita, pode causar sérios problemas à saúde, tais como a ocorrência freqüente de lesões, devido aos recorrentes eventos de automutilação inconsciente (Woolf, 2010; Bennett and Woods, 2014; Huang *et al.*, 2017). Porém, tal finalidade protetora da dor é evidentemente perdida em casos de cronicidade, tornando-se patológica e comprometendo seriamente a qualidade de vida do indivíduo (Hecke, Torrance and Smith, 2013; Anastas *et al.*, 2019).

Embora a intensidade da agressão tecidual e a magnitude da percepção da dor estejam, de fato, freqüentemente relacionadas, é possível ocorrer uma dissociação entre essas duas variáveis (Garland, 2013). Durante atividades físicas muito intensas ou em exposições a fatores de estresse e medo, lesões teciduais podem ser geradas sem a ocorrência da percepção dolorosa (Butler and Finn, 2009; Price and Prescott, 2015). Por outro lado, em determinadas situações, a dor pode ocorrer sem a presença direta de dano tecidual, como por exemplo, em áreas amputadas do corpo (Vaso *et al.*, 2014).

Introdução

Tendo em vista que a dor é um fenômeno biopsicossocial complexo, decorrente da interação de múltiplos sistemas neuroanatômicos, bioquímicos, cognitivos e afetivos, sabe-se que ela pode ser muito mais do que apenas uma reação a um estímulo nocivo. Dessa forma, em 1973, John J. Bonica fundou a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), a qual por sua vez, em 1979, definiu a dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial” (Cohen, Quintnerb and van Rysewykc, 2018).

Apesar da presença do componente emocional da dor nos animais não ser questionada (De Waal, 2011; Paul and Mendl, 2018), a sua mensuração, obviamente, não é uma tarefa simples. Por esse motivo, em 1906, Sherrington propôs os termos “nocicepção e antinocicepção”, os quais fazem referência somente ao componente sensorial da dor. Tal proposta foi bem aceita pela comunidade científica e, atualmente, os termos “dor e analgesia” são evitados em publicações de trabalhos *in vivo*, uma vez que se referem ao evento doloroso como um todo e incluem tanto o componente emocional quanto o sensorial, sendo que somente o último desses componentes pode ser mensurado satisfatoriamente na experimentação animal (Loeser and Treede, 2008).

Visto que a dor corresponde a um processo multifatorial, sintomático das mais diversas condições patológicas, o seu tratamento também se torna uma questão complexa (Apkarian *et al.*, 2005; Garland, 2013; Brodal, 2017). A dor é o sintoma mais comumente comunicado em consultas médicas, gerando um significativo impacto monetário e levando a um investimento de vários bilhões de dólares em serviços de saúde em todo o mundo (Turk, 2002; Romanelli, 2017). Somente nos Estados Unidos,

Introdução

calcula-se que aproximadamente 25 milhões de pessoas sofram com sintomas dolorosos diariamente. A perda de produtividade no trabalho devido a condições dolorosas gera um custo estimado de aproximadamente 61,2 bilhões de dólares por ano para os estadunidenses (Stewart, 2003; Nahin, 2015).

Similarmente, no Brasil, um estudo publicado recentemente relatou que dentre 27.345 brasileiros adultos entrevistados, 20.830 (76,17%) apresentaram dor crônica, recorrente ou duradoura (com duração de pelo menos 6 meses). Sendo que mais de metade dos entrevistados com dor crônica apresentava dor diária e a intensidade da dor era moderada em 57,28%. Dessa forma, pôde-se constatar que aproximadamente dois terços da população brasileira adulta sofrem com sintomas dolorosos de forma recorrente (Carvalho *et al.*, 2018).

Em concordância com tais estatísticas, a prescrição de opioides tem aumentado e, juntamente com ela, a ocorrência de efeitos adversos, uso indevido e óbitos relacionados. Somente em 2014, 18.893 americanos tiveram morte por overdose relacionada a opioides (*Number and age-adjusted rates of drug-poisoning deaths involving opioid analgesics and heroin: United States, 2000-2014.*, 2015; Elsesser and Cegla, 2017; Han *et al.*, 2017). Em conjunto, esses dados enfatizam que o gerenciamento da dor precisa ser redirecionado com a inclusão de novas abordagens farmacoterapêuticas.

1.2 Via ascendente da dor

Em 1903, Charles Sherrington propôs a existência de um conjunto de terminações nervosas, cuja função seria receber estímulos nocivos. Tais terminações nervosas propostas eram, de fato, um tipo de receptor sensorial especializado na

Introdução

detecção de estímulos dolorosos e foram, posteriormente, denominadas nociceptores. O que distingue o nociceptor de outros receptores sensoriais é o seu limiar de ativação, o qual, a princípio, é particularmente alto, de tal forma que, somente estímulos muito intensos (potencialmente lesivos) possam ser detectados pelos mesmos (Millan, 1999; Garland, 2013).

Uma vez que um estímulo potencialmente lesivo é detectado no terminal periférico do nociceptor, ocorrem uma série de alterações eletrofisiológicas, gerando um potencial de ação, esse processo é denominado transdução. O potencial de ação gerado percorre toda a extensão do nociceptor até alcançar a extremidade pré-sináptica, onde um influxo de cálcio é gerado, possibilitando a liberação de diversos neurotransmissores, os quais, por sua vez, irão interagir com receptores presentes na membrana do neurônio pós-sináptico, dando continuidade ao processo de condução da informação sensorial nociceptiva da periferia até o sistema nervoso central (Figura 1) (Raouf *et al.*, 2010).

As fibras nervosas podem ser classificadas conforme mielinização, formando dois grandes grupos: fibras A e fibras C, respectivamente, fibras com e sem mielina. Dentro do grupo das fibras mielinizadas, existem subdivisões, conforme o grau de mielinização. Dessa forma, têm-se, em ordem decrescente do diâmetro, fibras A α , A β , A γ e A δ . Quanto mais espessa a camada de mielina, maior a velocidade de condução (Tabela 1). Atualmente, a opinião predominante é a de que as terminações nervosas livres das fibras A δ e C constituam a região sensorial dos principais nociceptores (Dubin and Patapoutian, 2010).

Introdução

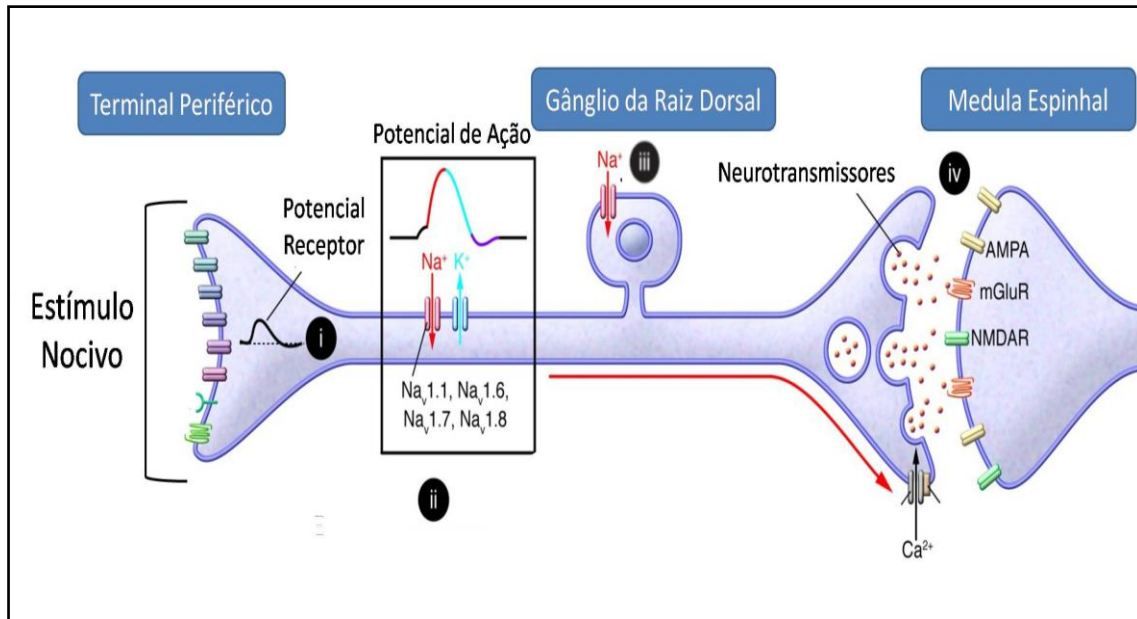


Figura 1 - Representação esquemática da transmissão nociceptiva ao longo do nociceptor. (i) O estímulo nocivo detectado nos terminais periféricos, por diversos receptores e canais iônicos, é convertido em potencial receptor. (ii) Quando um limite definido de despolarização é atingido, os canais de sódio dependentes de voltagem são ativados e um potencial de ação é gerado. (iii) O potencial de ação é propagado ao longo do axônio até os terminais pré-sinápticos. (iv) O influxo de cálcio através de canais de cálcio dependentes de voltagem (VGCC) desencadeia a liberação de neurotransmissores, como o glutamato, a partir de terminais pré-sinápticos. O glutamato pode ativar receptores ionotrópicos (AMPA e NMDA) ou metabotrópicos (mGluR) nos terminais pós-sinápticos da medula espinhal, onde o sinal continua sendo transmitido de forma ascendente até chegar aos centros supra-espinhais. AMPA, alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico. NMDA, N-metil-D-aspartato. mGluR, receptor metabotrópico de glutamato (Raouf *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Classificação geral das fibras nervosas e seus respectivos diâmetros e velocidades de condução, conforme nível de mielinização (Manzano, Giuliano and Nóbrega, 2008).

Tipo de Fibra Nervosa	Diâmetro (μm)	Velocidade de Condução (m/s)	Mielinização
A alfa (α)	12 - 22	70 - 120	Sim
A beta (β)	5 - 12	30 - 70	Sim
A gama (γ)	2 - 8	15 - 30	Sim
A delta (δ)	1 - 5	5 - 30	Sim
C	0,1 - 1,3	0,6 - 2	Não

Introdução

Em resumo, na transmissão ascendente da dor, uma vez detectado o estímulo e ocorrido o processo de transdução, o impulso nervoso é projetado da periferia até o corno dorsal da medula espinhal, por meio de neurônios denominados de primeira ordem, os quais realizam sinapses com neurônios de segunda ordem, que por sua vez, ascendem o trato espinotalâmico contralateralmente, chegando até o tálamo, onde realizam sinapses com neurônios de terceira ordem, os quais, por fim, conduzem o impulso nervoso até o córtex somatossensorial, onde o estímulo nociceptivo é processado e interpretado ao nível da consciência (Figura 2) (Golan *et al.*, 2014).

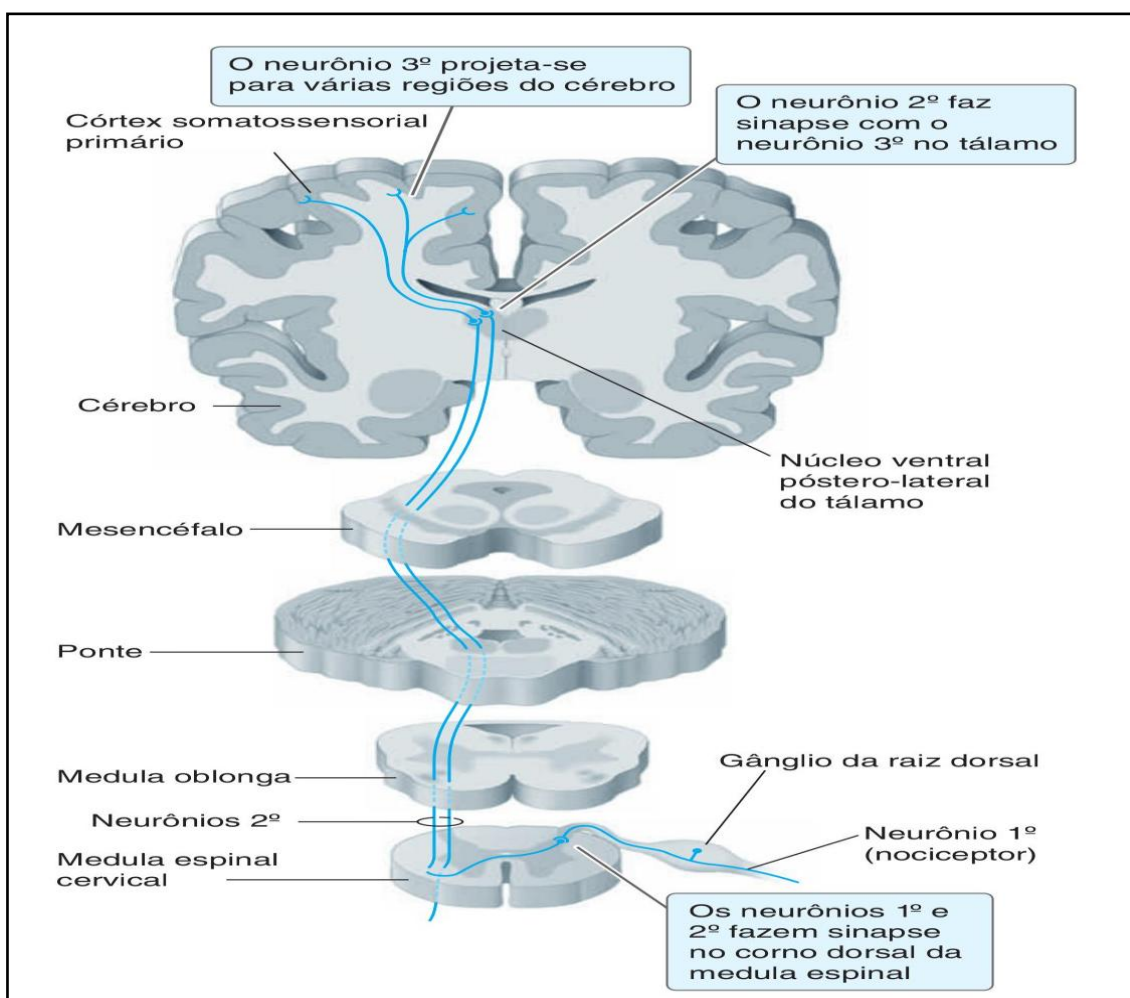


Figura 2 - Representação esquemática da via ascendente da dor. Neurônios de 1ª ordem se projetam da periferia até o corno dorsal da medula espinhal, onde ativam neurônios de 2ª ordem, os quais ascendem a medula contralateralmente, se projetando até o tálamo, onde ativam neurônios de 3ª ordem, os quais, por sua vez, se projetam até o córtex somatossensorial (Golan *et al.*, 2014).

1.3 Modulação endógena da dor

A capacidade do organismo de modular a transmissão nociceptiva começou a ser melhor elucidada em 1965, quando Melzack e Wall formularam a teoria do portão da dor, a qual relatava a influência da estimulação cutânea tátil no alívio da dor. Conforme a teoria postulada, no corno dorsal da medula, existe um mecanismo neural que se comporta como um portão, controlando a passagem dos impulsos nervosos oriundos das fibras nociceptivas periféricas para o sistema nervoso central (Melzack and Wall, 1965). Tal modulação ocorre em razão das fibras táteis ($A\beta$), as quais, uma vez estimuladas, ativam interneurônios inibitórios presentes na substância gelatinosa do corno dorsal da medula espinal, os quais, por sua vez, inibem a transmissão nociceptiva. Por outro lado, a estimulação das fibras nociceptivas ($A\delta$ e C) inibe os interneurônios inibitórios, facilitando a sua própria transmissão. Dessa forma, o balanço entre a atividade das fibras nociceptivas e não-nociceptivas no corno dorsal da medula espinal define o grau de supressão dos sinais dolorosos aferentes (Figura 3) (Millan, 2002; Ossipov, 2012).

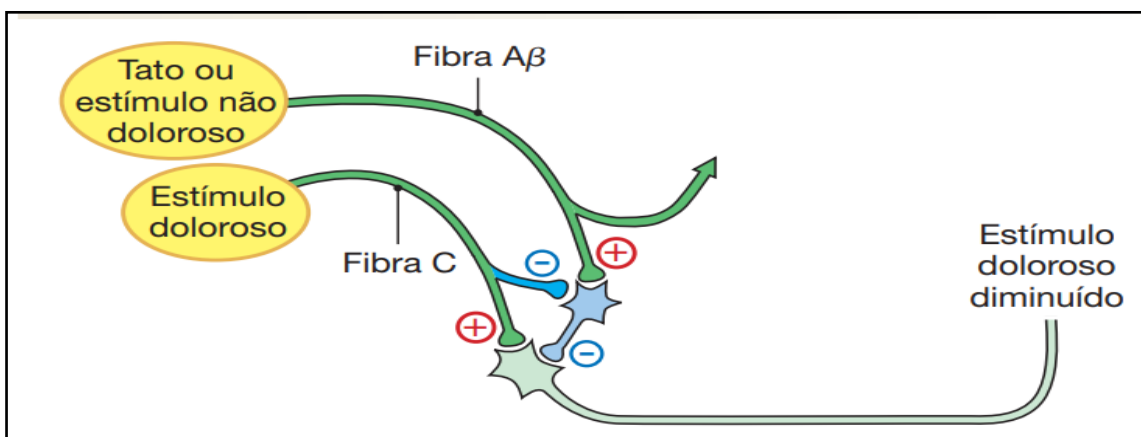


Figura 3 - Representação esquemática da teoria do portão da dor. Uma vez estimuladas, fibras não-nociceptivas ($A\beta$) e fibras nociceptivas (C) estimulam (+) e inibem (-), respectivamente, o mesmo interneurônio inibitório, modulando a transmissão nociceptiva (Silverthorn, 2017).

Introdução

Influências supra-espinhais no “portão da dor” foram evidenciadas em 1967, por Wall, quando o mesmo relatou que células da lâmina V do corno dorsal da medula espinhal de gatos descerebrados passavam a responder mais intensamente os estímulos dolorosos depois da realização de uma secção medular, o que sugeria o envolvimento de estruturas superiores e propunha que a modulação endógena da dor não estava restrita somente à região dorsal da medula (Wall, 1967).

A interferência de estruturas supra-espinhais na modulação da percepção dolorosa foi fortemente suportada por Reynolds, em 1969, ao demonstrar que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (SCP) do mesencéfalo foi capaz de induzir uma analgesia tão profunda, de tal forma que, ratos submetidos a procedimentos cirúrgicos não necessitaram de outro meio anestésico durante o processo (Reynolds, 1969). Posteriormente, a estimulação da SCP mesencefálica (*Deep Brain Stimulation*) foi testada em humanos e, atualmente, tem sido uma alternativa terapêutica para pacientes que sofrem com dores crônicas (Keifer Jr, Riley and Boulis, 2014).

Desde então, diversas outras estruturas supra-espinhais capazes de interferir nos processos dolorosos foram identificadas, dentre elas podemos citar o hipotálamo, o núcleo rostral ventromedial, o qual inclui o núcleo magno da rafe e o núcleo reticular paragigantocelular, o núcleo parabraquial, o locus coeruleus, o núcleo do trato solitário e o núcleo reticular dorsal (Millan, 2002). Uma vez estimulados, esses sítios antinociceptivos supra-espinhais originam vias descendentes modulatórias para o corno dorsal da medula espinhal, suprimindo, em maior ou menor grau, a transmissão das fibras aferentes nociceptivas (via ascendente da dor).

Introdução

A partir dessas evidências experimentais, os neurotransmissores envolvidos na modulação da percepção dolorosa passaram a ser extensivamente pesquisados e houve muita evolução na compreensão dos múltiplos sistemas endógenos envolvidos no controle da dor. Diversos mediadores químicos atuantes na via descendente já foram descritos, como por exemplo, os opioides endógenos, os endocanabinoides e o óxido nítrico (Ossipov, 2012), os quais serão melhor abordados nas sessões seguintes.

1.4 Opioides e seu papel na analgesia

O ópio é uma mistura de alcalóides extraídos de uma espécie de papoula (*Papaver somniferum*), utilizado com fins medicinais ou recreativos pela humanidade, muito provavelmente, antes mesmo do surgimento da escrita. Em 1803, Friedrich Sertürner, na Alemanha, isolou um ingrediente ativo do ópio, dissolvendo-o em ácido e, em seguida, neutralizando-o com amônia. Alguns anos mais tarde, em 1827, a companhia farmacêutica Merck & Co começou a produção comercial dessa mesma substância opiácea isolada, a morfina, estimulando o uso medicinal de substâncias derivadas do ópio (substâncias opiáceas) pela sociedade moderna e aumentando o interesse pelos seus mecanismos de ação (Martins *et al.*, 2012).

A existência de sítios de ligação endógenos específicos capazes de mediar a ação dos opiáceos já era suspeita. De modo consoante, em 1973, receptores opiídeos foram identificados em tecido neural (Pert and Snyder, 1973). O receptor opioide denominado delta (δ) foi o primeiro a ser clonado (Edwards *et al.*, 1992). Em seguida, houve a clonagem dos receptores opioides do tipo kappa (κ) e mu (μ). Tal nomenclatura, utilizando letras gregas, foi questionada e sugeriu-se o uso de siglas em inglês como DOR (receptor opioide delta), KOR (receptor opioide kappa) e MOR

Introdução

(receptor opioide mu), no entanto, as controvérsias persistiram. Por fim, a *International Union of Pharmacologists* (IUPHAR) definiu uma nova nomenclatura conforme a sequência histórica de clonagem desses receptores. Sendo assim, ficou estabelecido que os receptores DOR, KOR e MOR, seriam denominados OP1, OP2 e OP3, respectivamente. Porém, na literatura ainda é possível observar todos os tipos de nomenclaturas existentes (Martins *et al.*, 2012).

Os receptores opioides são pertencentes ao grupo de receptores acoplados a proteína G (subfamília $G_{i/o}$). Uma vez ativados, eles sofrem alterações conformacionais, de tal forma que a subunidade G_{α} se dissocia da subunidade $\beta\gamma$. A subunidade G_{α} induz inibição da enzima adenilato ciclase (AC) e conseqüente redução da conversão do trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Dessa forma, não ocorre a ativação (dependente de AMPc) da proteína cinase A (PKA), enzima responsável por fosforilar e ativar canais iônicos que aumentam a excitabilidade neuronal. Por outro lado, a subunidade $\beta\gamma$ pode interagir com diferentes canais iônicos presentes na membrana celular. Canais para Ca^{2+} ativados por alta voltagem podem ser inibidos e canais para potássio podem ser abertos, ocasionando, respectivamente, a redução do influxo de cálcio e aumento do efluxo de potássio. Toda essa cascata de sinalização resulta em uma hiperpolarização celular, com conseqüente atenuação da excitabilidade dos terminais dos nociceptores e supressão dos estímulos dolorosos aferentes (Figura 4) (Al-Hasani and Bruchas, 2011).

O processo analgésico gerado pela ativação dos receptores opioides pode ocorrer não somente a nível central (supra-espinhal ou espinhal) (Mansour A, H and Lewis ME, 1988), mas também a nível periférico. Agonistas opióides podem produzir efeito antinociceptivo experimentalmente mensurável por meio da ativação de

Introdução

receptores opioides presentes em terminais periféricos de neurônios aferentes primários (Coggeshall, Zhou and Carlton, 1997).

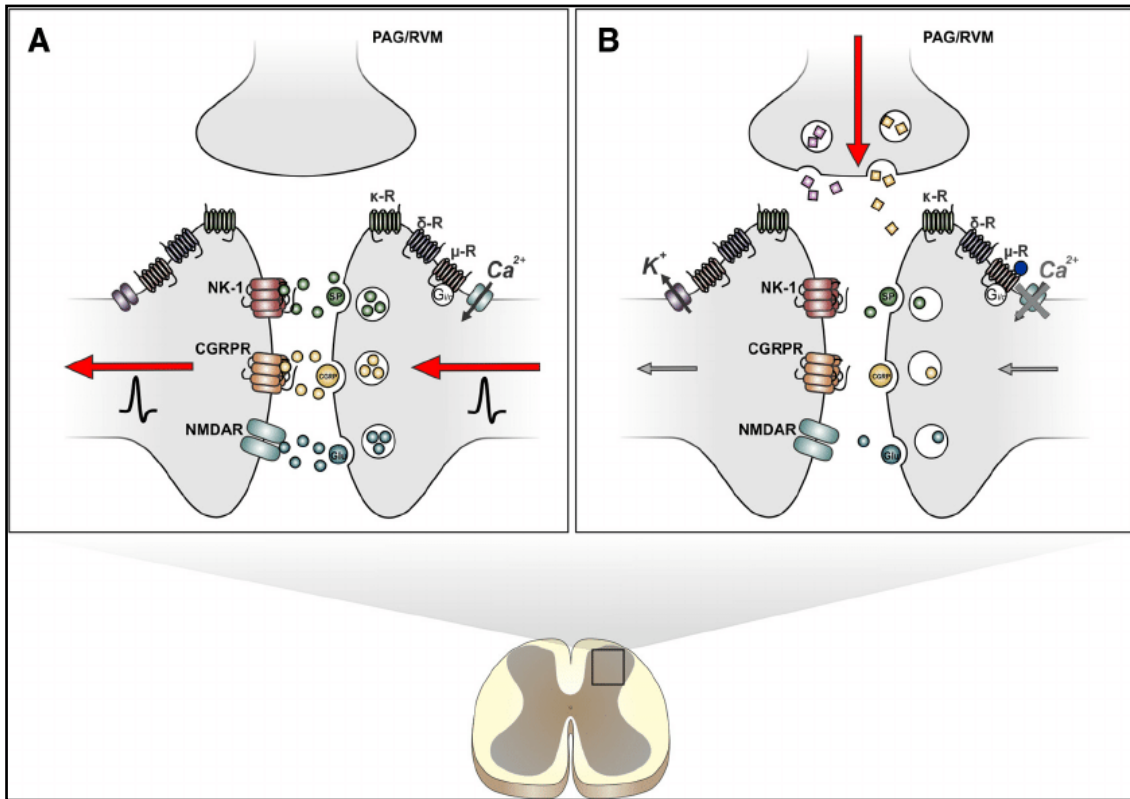


Figura 4 – Representação esquemática da ação dos opioides endógenos. (A) No corno dorsal da medula espinhal, estímulos nociceptivos transduzidos em potencial de ação desencadeiam a liberação de neurotransmissores nociceptivos, como a substância P (SP), peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e L-glutamato (Glu). O receptor de neurocinina-1 (NK-1), receptor peptídico relacionado ao gene da calcitonina (CGRPR), receptore de N-metil-D-aspartato (NMDA), entre outros receptores presentes na membrana do neurônio pós-sináptico, interagem com os neurotransmissores nociceptivos liberados, dando continuidade à transmissão nociceptiva. (B) A transmissão nociceptiva ativa centros analgésicos presentes na substância cinzenta periaquedutal (PAG) e medula ventromedial rostral (RVM), gerando a liberação de opioides endógenos no corno dorsal da medula espinhal, os quais podem interagir com receptores opioides do tipo μ , δ ou κ , ocasionando alterações intracelulares específicas. Nos neurônios pré-sinápticos, os opioides endógenos reduzem a sinalização de AMPc, suprimindo a atividade dos canais para cálcio dependentes de voltagem, o que inibe a liberação de transmissores nociceptivos. Nos neurônios pós-sinápticos, os opioides endógenos, por sua vez, ativam canais para potássio, causando hiperpolarização celular e consequente inibição da via ascendente da dor (Trang *et al.*, 2015).

Introdução

A compreensão dos circuitos modulatórios da dor foi significativamente expandida com a descoberta dos ligantes opioides endógenos. Entende-se por substância opioide qualquer composto natural, semi-sintético ou sintético, capaz de se ligar e interagir com os receptores opioides, de tal forma que induza efeitos similares aos dos opiáceos. Dentre as principais substâncias opioides endógenas já identificadas até então, podemos citar três compostos de natureza peptídica, a β -endorfina, as encefalinas e as dinorfinas, as quais se ligam com maior afinidade aos receptores opioides μ , δ e κ , respectivamente. Além da natural produção e liberação de peptídeos opioides endógenos pelos neurônios sensoriais, estes mediadores neuroquímicos também podem ser encontrados no interior de células imunes, sendo secretados durante a ocorrência de um processo inflamatório (Stein *et al.*, 1990; Batista *et al.*, 2012). Uma vez liberados, os ligantes opioides endógenos, assim como os exógenos, são capazes de interagir com os receptores opioides, desencadeando a cascata de sinalização intracelular associada à ação da proteína G e culminando nos efeitos analgésicos resultantes da ativação da via opioidérgica (Ballantyne and Sullivan, 2017).

1.5 Canabinoides e seu papel na analgesia

Popularmente conhecida no Brasil como “maconha”, a *Cannabis sativa* é um arbusto da família *Cannabaceae* que tem sido utilizado há séculos pela humanidade, devido a suas propriedades terapêuticas e recreacionais. Dentre os vários efeitos farmacológicos induzidos por esta planta medicinal, inclui-se sua ação analgésica. Em 1964, o principal componente psicoativo dessa espécie foi identificado, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (Figura 5A), sendo denominado canabinoide qualquer composto com efeitos biológicos semelhantes aos induzidos pelo Δ^9 -THC (Gaoni *et al.*, 1971).

Introdução

A natureza lipídica de muitos canabinoides fundamentou a suposição de que os mesmos agiriam por interações diretas com a membrana celular lipoproteica, tornando a descoberta dos receptores canabinoides e seus respectivos ligantes um pouco tardia se comparada a de outros sistemas endógenos (Devane *et al.*, 1992). Existem pelo menos dois subtipos de receptores canabinoides, os quais foram nomeados pela IUPHAR, conforme a ordem cronológica de descoberta, como receptores CB₁ e CB₂ (Howlett *et al.*, 2003). O receptor CB₁ é expresso majoritariamente no sistema nervoso central (SNC), enquanto que o receptor CB₂ tem sua localização mais restrita às células imunes (Galiegue *et al.*, 1995). Porém, tais predominâncias não são absolutas, uma vez que receptores CB₁ também podem ser encontrados em determinados terminais periféricos de neurônios sensoriais primários e receptores CB₂, por sua vez, em certos neurônios de localização central ou periférica (Benito *et al.*, 2008).

Assim como os receptores opioides, os receptores canabinoides são acoplados à proteína G_{i/o}. Dessa forma, um agonista canabinoide é capaz de induzir a inibição da adenilato ciclase (AC), ativação dos canais para K⁺ retificadores de influxo (K_{ir}) e inibição dos canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem, culminando em um efeito hiperpolarizante e analgésico (Löttsch, Weyer-Menkhoff and Tegeder, 2018).

O primeiro agonista canabinoide endógeno caracterizado foi o N-araquidonoil etanolamina (AEA) (Figura 5B), também conhecido por anandamida, palavra derivada do sânscrito *ananda*, que significa “felicidade” (Devane *et al.*, 1992). Poucos anos depois, um segundo endocanabinoide foi identificado, o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (Figura 5C) (Sugiura *et al.*, 1995). Desde então, diversos outros ligantes endógenos de receptores canabinoides foram descobertos, como o N-araquidonoil dopamina (NADA)

Introdução

(Bisogno *et al.*, 2000), 2-araquidonoil glicerol éter (noladina) (Abu-Lafi *et al.*, 2001) e o *O*-araquidonoil etanolamina (virodamina) (Porter *et al.*, 2002).

Os dois endocanabinoides isolados mais bem estudados até o momento são a AEA e o 2-AG, sendo que o primeiro liga-se preferencialmente aos receptores do subtipo CB₁, e o segundo parece ser capaz de ativar tanto o subtipo CB₁ quanto o CB₂ (Di Marzo, Bifulco and Petrocellis, 2004). Diferentemente de outros mensageiros químicos, os endocanabinoides são produzidos somente sob demanda, sendo a anandamida produzida a partir da hidrólise do *N*-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NAPE) e o 2-AG sintetizado, principalmente, através do diacilglicerol (DAG) (Donvito *et al.*, 2018).

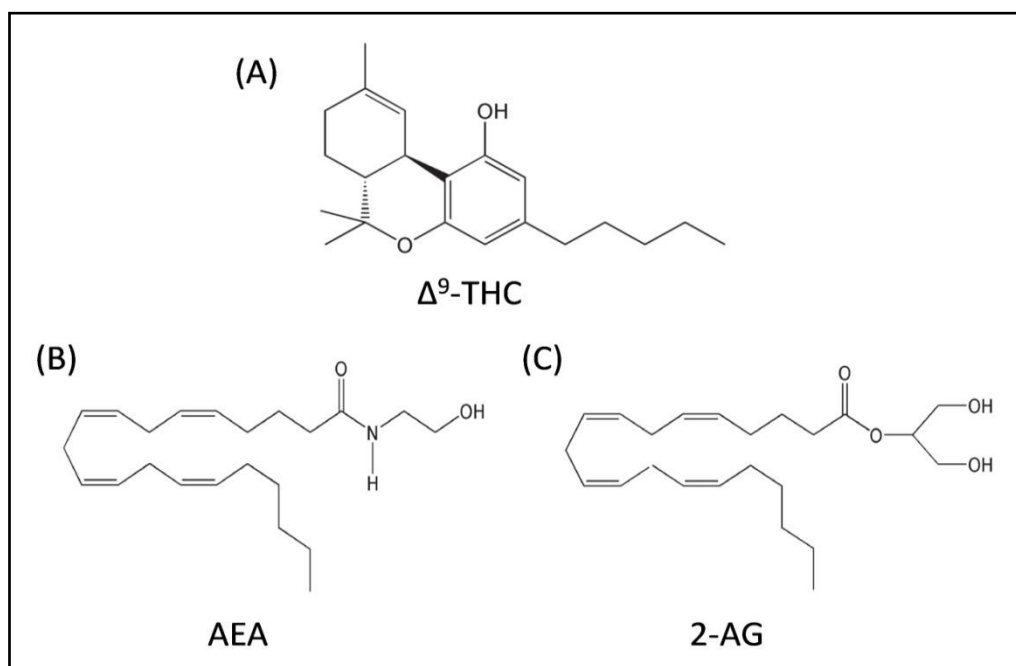


Figura 5 - Estrutura molecular de agonistas canabinoides exógenos (A) e endógenos (B e C). Δ⁹-THC, Δ⁹-tetrahydrocannabinol. AEA, *N*-araquidonoil etanolamina. 2-AG, 2-araquidonoil glicerol (Honório, Arroio e Da Silva, 2006).

Neurotransmissores convencionais são liberados a partir de uma célula pré-sináptica e ativam receptores apropriados em uma célula pós-sináptica. Os endocanabinoides fazem o caminho inverso, sendo liberados por neurônios pós-

Introdução

sinápticos e interagindo com receptores presentes nos terminais pré-sinápticos. Dessa forma, diz-se que os endocanabinoides atuam por meio de um mecanismo de sinalização retrógrada. Tal sinalização é finalizada com o auxílio de transportadores presentes na membrana neuronal, os quais facilitam o deslocamento do endocanabinoide do meio extra para o intracelular (Dalton *et al.*, 2009). Uma vez internalizados, os endocanabinoides são degradados por meio de hidrólise enzimática. A AEA é hidrolisada, nos neurônios pós-sinápticos, pelo ácido graxo amida hidrolase (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*), enquanto, o 2-AG é hidrolisado nos neurônios pré-sinápticos, principalmente, pela monoacilglicerol lipase (MGL) (Figura 6) (Katona *et al.*, 2002).

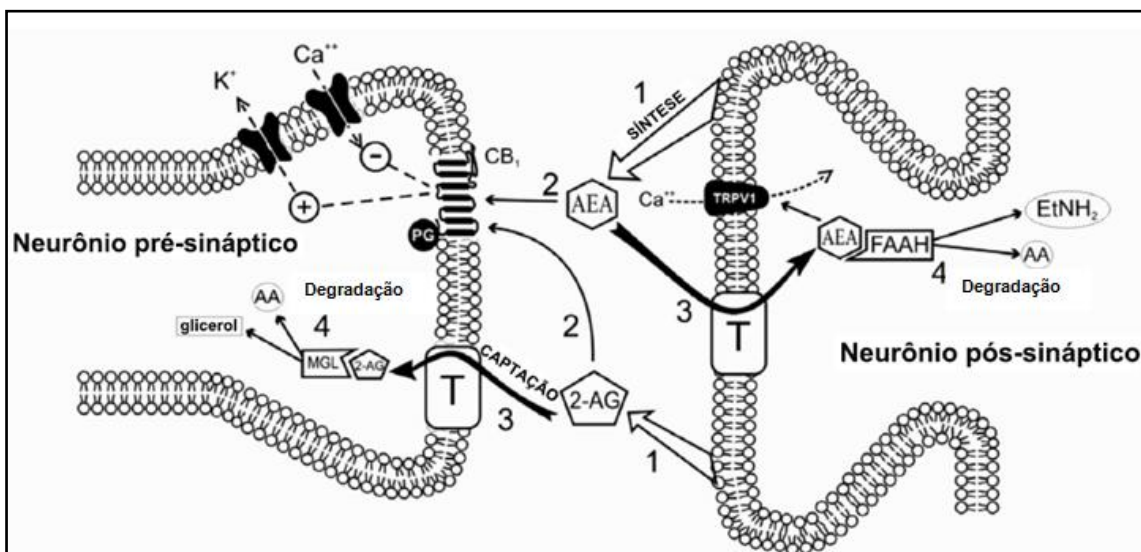


Figura 6 - Representação esquemática da ação dos endocanabinoides. Os endocanabinoides anandamida (AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG) são sintetizados e liberados pelos neurônios pós-sinápticos conforme demanda, após o influxo de cálcio (1). Eles ativam os receptores pré-sinápticos CB_1 gerando inibição e ativação dos canais para Ca^{2+} e K^+ , respectivamente (2). AEA e 2-AG são removidos da fenda sináptica pela captação através de transportadores (T) pré- e pós-sinápticos, respectivamente (3). Uma vez dentro dos neurônios, a anandamida é degradada pela amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e o 2-AG é degradado pelo monoacilglicerol lipase (MGL), se transformando em ácido araquidônico (AA) e etanolamina ($EtNH_2$), e ácido graxo (AA) e glicerol, respectivamente (4). A existência de um transportador endocanabinoide permanece controversa (Saito, Wotjak e Moreira, 2010).

1.6 Óxido nítrico e seu papel na analgesia

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora gasosa que se difunde rapidamente através das membranas celulares e regula uma ampla gama de processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo eventos inflamatórios e dolorosos (Esplugues, 2002; Paradise *et al.*, 2010), sendo capaz de atuar na dor aguda (Toriyabe *et al.*, 2004) e crônica (Paradise *et al.*, 2010) tanto a nível central (Freire *et al.*, 2009) quanto periférico (Miyamoto *et al.*, 2009), desempenhando um complexo papel na modulação da dor.

Apesar da contribuição do NO em processos hiperalgésicos ser amplamente descrita, o envolvimento dessa molécula na antinocicepção é também notável (Cury *et al.*, 2011). Vários estudos têm demonstrado que o NO pode induzir analgesia e mediar a ação de compostos analgésicos, tais como opioides, anti-inflamatórios não esteroidais e produtos naturais (Reis e Rocha, 2007; Cunha *et al.*, 2010; Veloso *et al.*, 2015). Esse efeito dual do NO na percepção dolorosa tem sido associado a diversos fatores, dentre eles os níveis teciduais de NO. Altas concentrações de NO estão mais relacionadas a processos dolorosos, enquanto que baixas concentrações têm sido mais associadas a atividades analgésicas (Figura 7) (Cury *et al.*, 2011).

Introdução

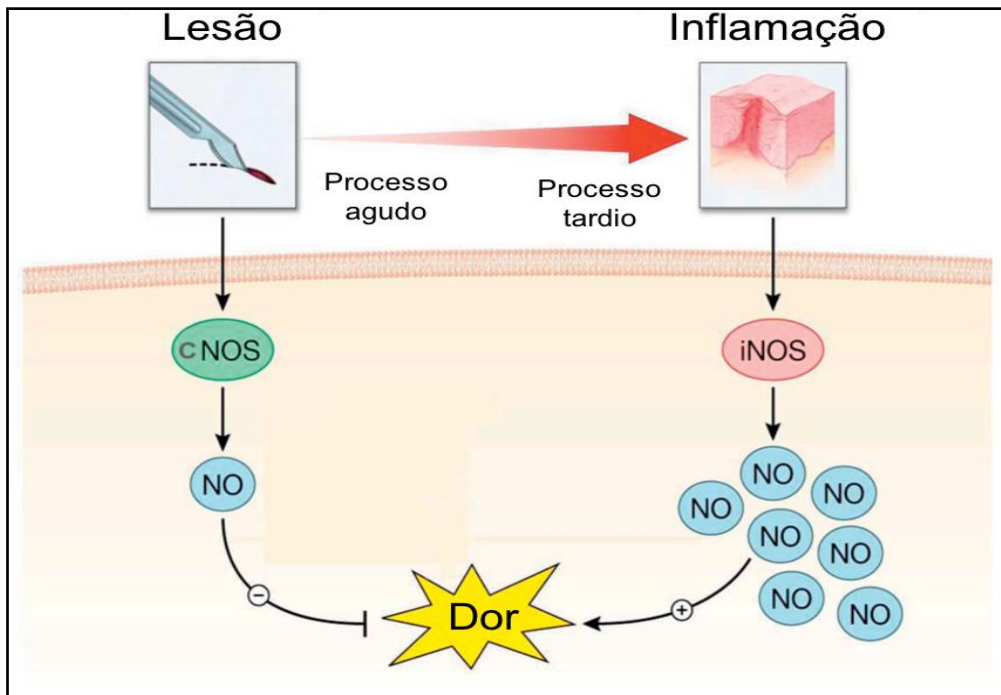


Figura 7 - Representação esquemática do efeito dual do óxido nítrico (NO) na dor. Na fase inicial da lesão tecidual, pode ocorrer ativação de cNOS, gerando um aumento relativamente pequeno nos níveis teciduais de NO e desencadeando um efeito antinociceptivo. No entanto, na fase tardia, a isoforma iNOS pode estar superexpressa, acarretando em um aumento acentuado dos níveis de NO e desencadeando um efeito hiperalgésico. cNOS: óxido nítrico sintase constitutiva. iNOS: óxido nítrico sintase induzível (Hamza *et al.*, 2010).

O NO é sintetizado, no interior celular, por meio da oxidação do aminoácido L-arginina, gerando concentrações equimolares de L-citrulina e NO. Tal reação oxidativa ocorre sob a ação catalítica da óxido nítrico sintase (NOS). Até o presente momento, já foram identificados dois tipos principais de NOS, as isoformas constitutiva e induzível, com várias semelhanças e diferenças entre si. As isoformas constitutivas compreendem a NOS neuronal (n-NOS ou tipo I) e a NOS endotelial (e-NOS ou tipo III). Como a própria nomenclatura já sugere, a n-NOS e a e-NOS são encontradas predominantemente em neurônios e células endoteliais, respectivamente. A síntese e liberação de NO pelas NOS constitutivas é rápida e não dependente de nova síntese

Introdução

protéica, sendo o NO proveniente dessas NOS liberado em pequenas quantidades e por curtos períodos de tempo. Além disso, a ativação, tanto da nNOS, quanto da eNOS, depende da interação com a calmodulina que, por sua vez, é controlada pelos níveis intracelulares de cálcio. Por outro lado, a NOS induzível (iNOS ou tipo II) é cálcio-calmodulina independente e pode ser encontrada principalmente em células do sistema imune, como macrófagos e neutrófilos. Via iNOS, o NO é produzido em maiores quantidades e por longos períodos de tempo, sendo esse processo geralmente dependente de nova síntese protéica. Contrariando a nomenclatura adotada, estudos recentes têm sugerido que a iNOS possa ser expressa constitutivamente em determinados tipos celulares, da mesma forma que a nNOS e eNOS seriam passíveis de indução (Weiner *et al.*, 1994; Förstermann, Boissel e Kleinert, 1998; Förstermann e Sessa, 2012).

Uma vez que o NO é sintetizado no interior da célula, ele ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), a qual, por sua vez, catalisa a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPC). Os níveis aumentados de GMPC favorecem a ativação da proteína cinase G (PKG), a qual, por sua vez, estimula a abertura de canais para potássio. O efluxo de potássio gerado por essa cascata de sinalização dificulta o processo de despolarização celular, podendo suprimir a transmissão do estímulo nociceptivo (Moncada, Radomski e Palmer, 1988; Esplugues, 2002).

1.7 Resveratrol e seu potencial analgésico

Durante os anos de 1985 a 1993, a Organização Mundial de Saúde desenvolveu o Projeto MONICA (*MONItoring system for Cardiovascular disease*), um sistema organizado de dados sobre doenças cardiovasculares, com o objetivo de estudar as

Introdução

características populacionais, regionais e temporais de 37 países, incluindo Canadá, Itália, França, Inglaterra e Estados Unidos (World Health Organization, 1988). Os dados do projeto MONICA levaram ao surgimento do famoso “Paradoxo Francês”, o qual afirmou que os franceses, quando comparados com outros povos do mesmo nível socioeconômico e cultural, apresentavam 2,5 vezes menos mortes por doenças coronarianas, apesar de serem mais sedentários, fumarem mais e consumirem mais gorduras saturadas (Renaud e Lorgeril, 1992; Tunstall-Pedoe *et al.*, 1999; Imhofa *et al.*, 2004). A principal explicação para tal paradoxo estaria no consumo regular e moderado do vinho tinto pela população francesa, o qual estaria associado à redução do risco de morbidade e mortalidade cardiovascular (Renaud e Lorgeril, 1992; Lippi *et al.*, 2010).

Numerosos estudos têm atribuído os efeitos benéficos do vinho a alta concentração de compostos fenólicos presentes nesta bebida, os quais também são amplamente encontrados em outros produtos derivados da uva (Cooper, Chopra e Thurnham, 2004; Leifert e Abeywardena, 2008). De fato, as uvas constituem uma das principais fontes de polifenóis entre as frutas (Breksa *et al.*, 2010). Dessa forma, os vinhos tintos, que são fermentados na presença das cascas e sementes, têm cerca de 10 vezes mais polifenóis (1000-4000 mg/L) que os vinhos brancos (200-300 mg/L), fermentados na ausência delas, atribuindo ao vinho tinto mais benefícios para a saúde quando comparado com o branco (Somkuwar *et al.*, 2018).

Dentre todas as substâncias polifenólicas presentes na uva e seus derivados destaca-se uma em especial: o resveratrol (RES; 3,5,4'-triidroxiestilbeno). Estudos recentes mostraram que os efeitos benéficos do vinho provêm principalmente desta substância, mesmo levando em conta que a bebida em questão contenha diversos

Introdução

outros polifenóis, como a quercetina, as catequinas e os taninos, os quais também podem ser considerados compostos nutricionais com valor terapêutico (“nutracêuticos”) (Borriello *et al.*, 2010; Gresele *et al.*, 2011; Catalgol *et al.*, 2012).

Isolado pela primeira vez, em 1940, das raízes do heléboro branco (*Veratrum grandiflorum*) (Takaoka, 1940), o RES é um polifenol, do tipo não flavonóide, encontrado em pelo menos 72 espécies vegetais, distribuídas em 31 gêneros e 12 famílias (Figura 8) (Jang *et al.*, 1997). Além da uva e seus derivados, outros produtos alimentares também podem conter RES em diferentes concentrações, tais como, o amendoim, o pistache e o mirtilo (Tabela 2) (Saiko *et al.*, 2008).

O RES tem como principal função proteger o vegetal de infecções por micro-organismos patogênicos, ou seja, trata-se de uma fitoalexina (Signorelli e Ghidoni, 2005). Quimicamente, essa molécula orgânica consiste em dois anéis aromáticos unidos por uma ponte metila com três grupos hidroxilas inseridos nos anéis (King, Bomser e Min, 2006). Na uva, o RES é sintetizado predominantemente na casca, onde é formado a partir da condensação de três moléculas de malonil-CoA e uma molécula de p-coumaroil-CoA, em uma reação catalisada pela enzima estilbeno sintase, podendo ser sintetizado sob duas formas isômeras: *cis* e *trans*. O isômero *trans* é responsável pelos efeitos biológicos do RES, porém, é fotossensível, podendo ser convertido, em presença de luz visível, na forma *cis*, perdendo assim a sua função biológica (Figura 9) (Anisimova *et al.*, 2011).

Introdução



Figura 8 - Gêneros e espécies vegetais fontes de resveratrol (Harikumar e Aggarwal, 2008).

Tabela 2 - Concentração de resveratrol em alguns produtos alimentícios (Baur e Sinclair, 2006).

Fonte Alimentar	Concentração de Resveratrol	Referência
Vinho Tinto	0,1 – 14,3 mg/L	(Soleas, Diamandis e Goldberg, 1997; Mark <i>et al.</i> , 1997)
Vinho Branco	0,1 – 2,1 mg/L	(Soleas <i>et al.</i> 1997; Lima <i>et al.</i> 1999)
Uva	0,16 – 3,54 µg/g	(Rimando <i>et al.</i> 2004; Burns <i>et al.</i> 2002)
Suco de Uva Vermelha	0,50 mg/L (média)	(Romero-Pérez <i>et al.</i> , 1999)
Suco de Uva Branca	0,05 mg/L (média)	(Romero-Pérez <i>et al.</i> , 1999)
Amendoim	0,02 – 1,92 µg/g	(Sanders, McMichael Jr. e Hendrix, 2000; Tokusoglu, Tokusoglu, Unal e Yemis, 2005)
Pistache	0,09 – 1,67 µg/g	(Tokusoglu, Unal e Yemis, 2005)
Mirtilo Americano (Blueberry)	Até 32 ng/g	(Lyons <i>et al.</i> , 2003)
Mirtilo Europeu (Bilberry)	Até 16 ng/g	(Lyons <i>et al.</i> , 2003)

Introdução

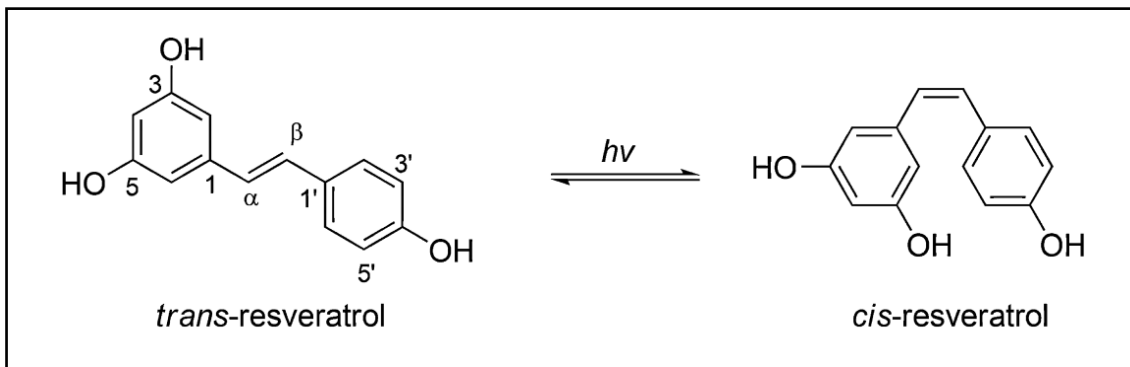


Figura 9 - Isomerização *cis-trans* do resveratrol induzida pela luz (Hui, Li e Chen, 2011).

O RES é capaz de induzir seus efeitos cardiprotetores através de diferentes ações, dentre as quais podemos citar sua ação anti-inflamatória (Poulsen *et al.*, 2015), uma vez que diversas doenças cardiovasculares envolvem estados de inflamação crônica (Lopez-Candales *et al.*, 2017). Tal substância de origem natural suprime a síntese de mediadores próinflamatórios por inibição da lipooxigenase e das ciclooxigenases (COX), tanto do tipo 1 quanto do tipo 2 (Kimura, Okuda e Arichi, 1985; Jang *et al.*, 1997; Maccarrone *et al.*, 1999). A formação de edema tanto na fase aguda quanto na fase crônica da inflamação também é reduzida pelo RES com intensidade semelhante à da indometacina, um anti-inflamatório não esteróide (AINE) (Jang *et al.*, 1997).

Tais ações anti-inflamatórias sugerem que o RES talvez também possa ter uma atividade analgésica, uma vez que a dor é um dos sinais cardinais da inflamação (Lawrence, Willoughby e Gilroy, 2002). Com efeito, atividades antinociceptivas associadas ao RES já foram detectadas tanto a nível periférico, quanto a nível central. Em um modelo de hiperalgesia inflamatória em que carragenina foi injetada na pata posterior de ratos, o RES foi capaz de reverter o processo hiperalgésico (Gentilli *et al.*, 2001). Em outro estudo, o RES, quando administrado por via oral, se mostrou eficiente

Introdução

no tratamento de camundongos com dor neuropática diabética, um tipo de dor pouco responsiva aos tratamentos convencionais (Sharma, Kulkarni e Chopra, 2007).

Também já foi demonstrado que o RES, em ratos, administrado por via endovenosa ou intraperitoneal, induziu analgesia com possível envolvimento do sistema opioide, considerando que houve reversão desse efeito pela naloxona, um antagonista não seletivo para receptores opioides (Gupta, Sharma e Briyal, 2004; Kokuba *et al.*, 2017). Além disso, outro estudo demonstrou que o RES injetado também intraperitonealmente em ratos, aumentou os níveis cerebrais de endocanabinoides (Hassanzadeh *et al.*, 2016). Por outro lado, trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram o envolvimento da via nitrérgica no mecanismo antinociceptivo periférico do endocanabinoide palmitoiletanolamida (PEA) (Romero e Duarte, 2012; Romero *et al.*, 2012) e de agonistas de receptores opioides (Rodrigues e Duarte, 2000; Pacheco *et al.*, 2005) no modelo de hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraplantar de prostagladina (PGE₂).

Nesse contexto, tendo em vista a complexidade do tratamento da dor e o potencial do uso terapêutico do RES, almejamos aprofundar os estudos sobre os efeitos antinociceptivos da substância em questão. Uma vez relatada a possível interação entre o RES e as vias opioidérgica, canabinoidérgica e nitrérgica, nos propomos a avaliar o envolvimento desses três sistemas analgésicos na ação antinociceptiva do RES, administrado periféricamente ou centralmente em camundongos, a fim de auxiliar na elucidação dos mecanismos de ação dessa substância de origem natural.

2. OBJETIVOS

Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

O presente trabalho se propõe a avaliar o envolvimento das vias opioidérgica, canabinoidérgica e nitrérgica na antinocicepção periférica e central induzida pelo resveratrol em camundongos.

2.2 - Objetivos Específicos

- Detectar a ação antinociceptiva do resveratrol frente à hiperalgesia induzida pela carragenina nos níveis:
 - Periférico;
 - Central.

- Verificar a participação da via opioidérgica na ação antinociceptiva do resveratrol nos níveis supracitados, avaliando:
 - Participação dos receptores opioides μ , κ e δ ;
 - Envolvimento de opioides endógenos.

- Verificar a participação da via canabinoidérgica na ação antinociceptiva do resveratrol nos níveis supracitados, avaliando:
 - Participação dos receptores canabinoides CB₁ e CB₂;
 - Envolvimento de endocanabinoides.

- Verificar a participação da via nitrérgica na ação antinociceptiva do resveratrol nos níveis supracitados, avaliando:
 - Variação dos níveis teciduais de óxido nítrico;
 - Ativação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS);
 - Envolvimento de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais de experimentação

Em todos os procedimentos experimentais foram utilizados camundongos da linhagem Swiss machos (30-40 g). Os animais foram provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB/UFMG) e mantidos em caixas plásticas com cama de maravalha, à temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro-escuro (06:00h - 18:00h) e livre acesso à ração e água. Todos os experimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (número de protocolo 278/2016, ANEXO I) e realizados de acordo com as recomendações para avaliação de dor experimental em animais acordados (Zimmermann, 1983).

3.2 Drogas e Solventes

3.2.1 Agente hiperalgésico

- Carragenina λ tipo IV (Sigma, EUA) dissolvida em solução aquosa estéril de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% (solução fisiológica).

3.2.2 Agente analgésico sob estudo

- Resveratrol (RES; *trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (Natick, MA, EUA) dissolvido em etanol 0,5% em solução fisiológica.

3.2.3 Fármacos envolvidos na via opioidérgica

- Naloxona (NLX; Sigma, EUA). Antagonista não seletivo de receptores opioides. Dissolvido em solução fisiológica.
- Clocinnamox (CLOC; Tocris, EUA). Antagonista seletivo dos receptores μ opioides. Dissolvido em solução fisiológica.

Materiais e Métodos

- Naltrindole (NTD; Tocris, EUA). Antagonista seletivo dos receptores δ opioides. Dissolvido em solução fisiológica.
- Nor-binaltorfimina (nBNI; Tocris, EUA). Antagonista seletivo dos receptores κ opioides. Dissolvido em solução fisiológica.
- Bestatina (BEST; Tocris, EUA). Inibidor da enzima aminopeptidase N, enzima envolvida na degradação de peptídeos opioides endógenos. Dissolvido em solução fisiológica (Figura 10).

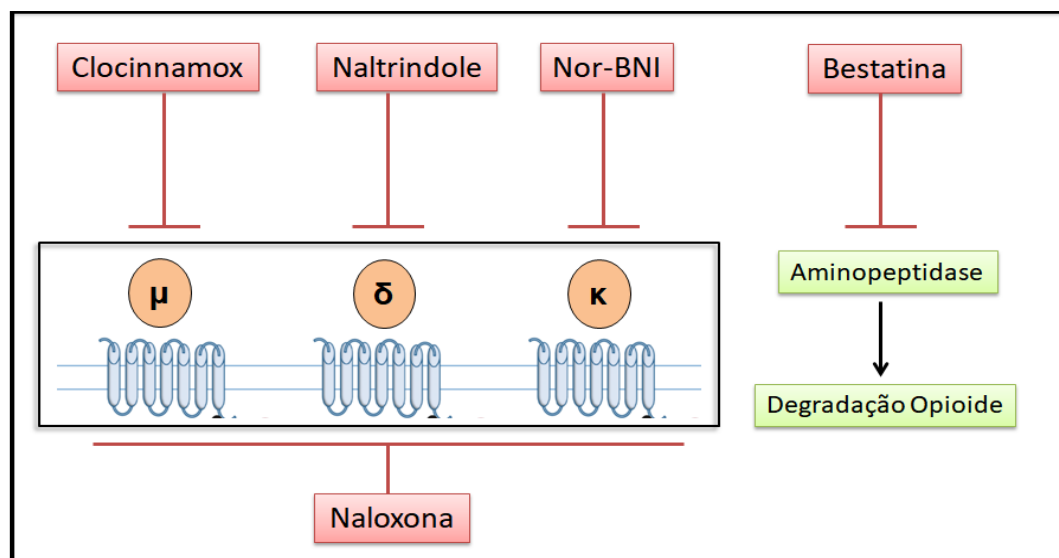


Figura 10 - Esquema representativo das ações postuladas de fármacos que atuam na via opioide. μ , receptor opioide do tipo μ . δ , receptor opioide do tipo δ . κ , receptor opioide do tipo κ . nBNI, nor-binaltorfimina.

3.2.4 Fármacos envolvidos na via canabinoidérgica

- AM251 (Tocris, EUA). Antagonista seletivo dos receptores canabinoides CB_1 . Dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% em solução fisiológica.
- AM630 (Tocris, EUA). Antagonista seletivo dos receptores canabinoides CB_2 . Dissolvido em DMSO 10% em solução fisiológica.

Materiais e Métodos

- VDM11 (Tocris, EUA). Inibidor do transportador de endocanabinoides. Dissolvido em Tocrisolve 10% em solução fisiológica.
- MAFP (Tocris, EUA). Inibidor da enzima ácido graxo amida hidrolase (FAAH, *fatty acid amide hydrolase*). Dissolvido em etanol 3% em solução fisiológica (Figura 11).

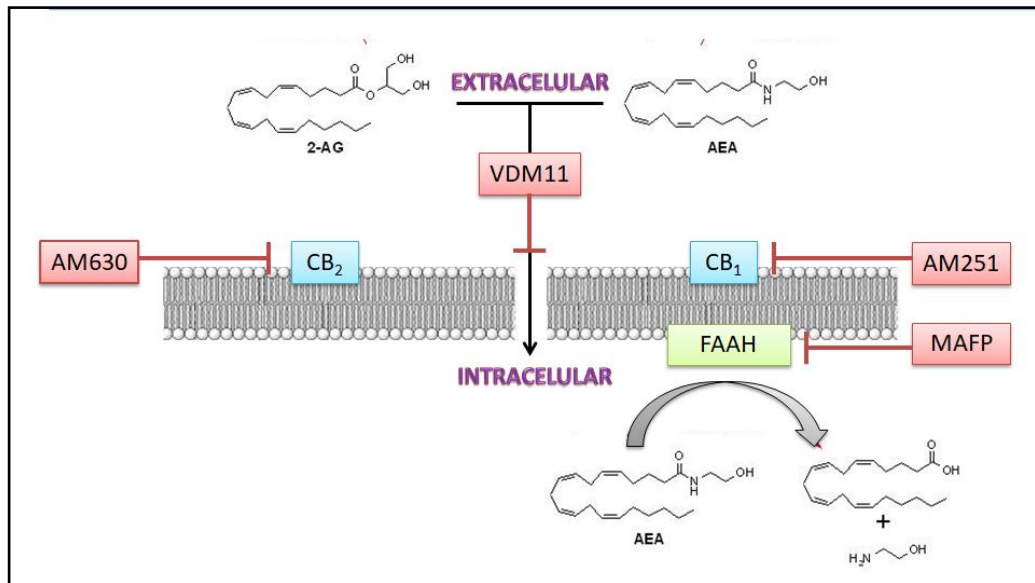


Figura 11 - Esquema representativo das ações postuladas de fármacos que atuam na via canabinoide. CB₁ - receptor canabinoide do tipo 1. CB₂ - receptor canabinoide do tipo 2. AEA, araquidonil etanolamina (anandamida). 2-AG, 2-araquidonoilglicerol. FAAH, *fatty acid amide hydrolase*.

3.2.5 Fármacos envolvidos na via nitrérgica

- L-NOArg (RBI, EUA). Inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase (NOS). Dissolvido em solução fisiológica.
- L-NPA (Sigma, EUA). Inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Dissolvido em solução fisiológica.
- ODQ (RBI, EUA). Inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Dissolvido em DMSO 10% em solução fisiológica.

- Zaprinast (Sigma, EUA). Inibidor seletivo da enzima fosfodiesterase específica do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Dissolvido em DMSO 10% em solução fisiológica (Figura 12).

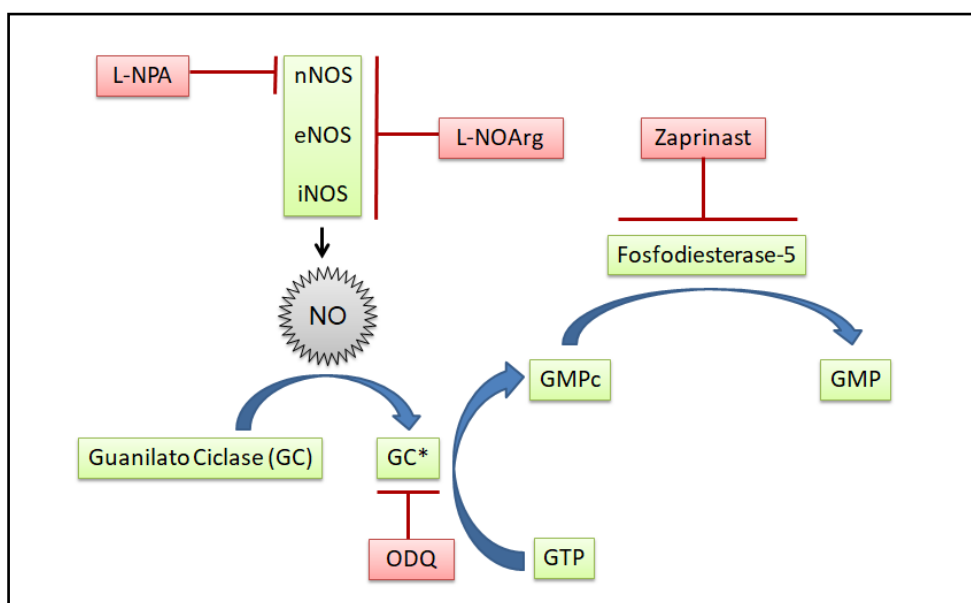


Figura 12 – Esquema representativo das ações postuladas de fármacos que atuam na via do óxido nítrico. nNOS, eNOS, iNOS, óxido nítrico sintase neuronal, endotelial e induzível, respectivamente. GC, guanilato ciclase. GTP, trifosfato de guanosina. GMPc, monofosfato cíclico de guanosina. GMP, monofosfato de guanosina.

3.3 Vias de administração das drogas

3.3.1 Administração Intraplantar

Para análise a nível periférico, as drogas utilizadas foram administradas por via intraplantar (i.pl.), a qual consiste em uma injeção subcutânea na superfície plantar da pata posterior do camundongo, utilizando-se uma agulha com dimensões de 8,0 x 0,3 mm (Figura 13). Em todos os experimentos foi utilizada a pata posterior direita dos animais, com exceção do protocolo utilizado para excluir a possibilidade de um efeito não local, em que foram utilizadas ambas as patas posteriores.



Figura 13 - Injeção subcutânea na superfície plantar da pata posterior do camundongo (administração intraplantar).

3.3.2 Administração Intracerebroventricular

Para análise a nível central, as drogas utilizadas foram administradas por via intracerebroventricular (i.c.v.). A escolha dessa via tem como intuito investigar o envolvimento supramedular dos mediadores envolvidos na antinocicepção induzida pelo resveratrol. Para tanto, foi previamente realizada uma neurocirurgia estereotáxica, a qual é utilizada quando se deseja atuar especificamente sobre uma determinada estrutura encefálica.

A cirurgia foi realizada com auxílio de um aparelho estereotáxico (STOELTING[®], EUA). Os camundongos foram previamente anestesiados com cloridrato de ketamina 10% (Dopalen, Vetbrands, Brasil) na dose de 50 mg/Kg e cloridrato de xilazina 2% (Dopaser, Calier, Brasil) na dose de 5 mg/Kg, injetados por via intraperitoneal (i.p.). Imediatamente após estarem anestesiados, foi realizada uma tricotomia da região superior da cabeça, a qual, por sua vez, foi posicionada e fixada no estereotáxico por

Materiais e Métodos

meio de duas barras auriculares. Após a assepsia da pele com solução contendo álcool iodado, foi realizada uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo-se, assim, a região da calota craniana. A torre do estereotáxico foi colocada em posição vertical (angulação zero) e a cabeça do animal ajustada até que os pontos bregma e lâmbda da calota fiquem nivelados. O ponto de introdução das cânulas-guia (10 mm, confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas de aço inoxidável [25 x 7 mm BD[®], Brasil]), direcionadas para o ventrículo lateral direito, foi determinado a partir do bregma levando em consideração as coordenadas estereotáxicas obtidas em um atlas (Paxinos e Watson, 2013), as quais são: +0,5 mm posterior ao bregma; +1,0 mm lateral ao bregma; e -1,8 mm inferior ao topo do crânio. Após a localização do ponto de inserção, foi realizada a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício, foram introduzidas as cânulas-guia e, então, fixadas ao crânio do animal através de resina acrílica de uso odontológico e de pequenos parafusos de aço inox, os quais foram fixados na calota craniana previamente às leituras das coordenadas estereotáxicas. Após a completa fixação das cânulas-guia, a torre do estereotáxico é removida e, com o objetivo de evitar a obstrução das cânulas, é introduzido nas mesmas um mandril de aço inoxidável (15 mm). Logo após o processo cirúrgico, os animais receberam uma injeção intramuscular de pentabiótico veterinário (Fort Dodge, Brasil) na dose de 18.000 UI/Kg, a fim de se minimizar eventuais danos infecciosos no tecido neural.

Um período de cinco a sete dias foi dado entre a realização da cirurgia e os experimentos comportamentais a fim de que os animais tivessem tempo para uma recuperação pós-cirúrgica adequada. As drogas e seus respectivos veículos diluentes foram injetados no ventrículo lateral direito, em um volume de 2 µL. Para a

Materiais e Métodos

administração foi utilizada uma seringa de precisão (HAMILTON®, EUA) de 10 μ L, conectada a um tubo polietileno de 10 cm (PE-10) e a uma agulha injetora (3 cm) (Figura 14).

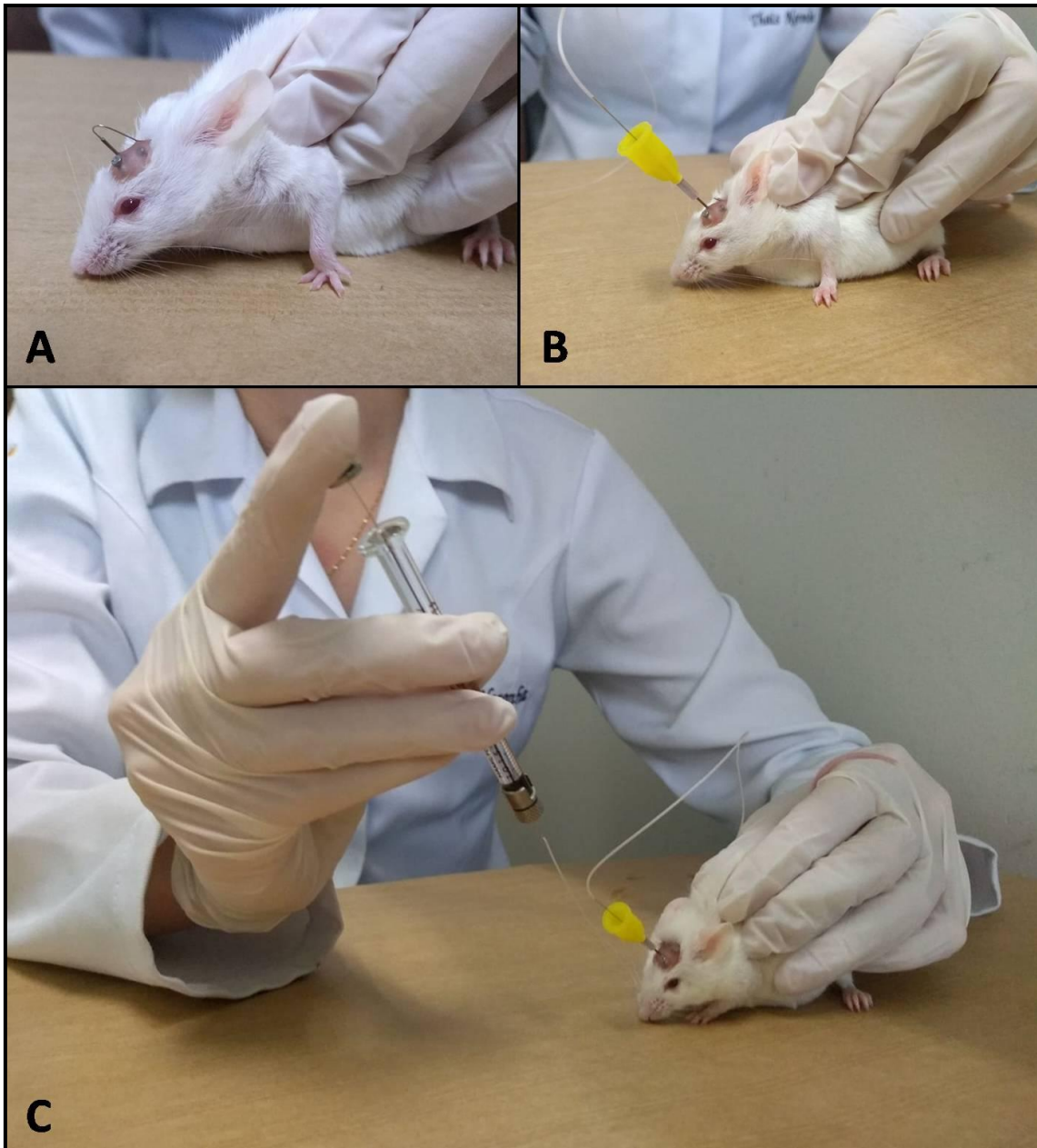


Figura 14 - (A) animal após realização de cirurgia estereotáxica, ainda com o mandril de aço inoxidável no interior da cânula, a fim de evitar a obstrução da mesma. (B) cânula guia conectada à agulha injetora associada a um tubo polietileno de 10 cm (PE-10). (C) administração intracerebroventricular realizada com o auxílio de uma seringa de precisão (HAMILTON®, EUA) de 10 μ L.

3.4 Teste algesimétrico

Para realizar a medida da hiperalgesia, foi utilizado o método de retirada de pata submetida à compressão, com a finalidade de medir o limiar nociceptivo ao estímulo mecânico. Originalmente descrito para ratos (Randall e Selitto, 1957) e posteriormente adaptado para camundongos (Kawabata, Nishimura e Takagi, 1992).

No teste, o animal (camundongo Swiss macho, $n = 5$ por grupo) é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a superfície plantar da pata a ser testada é colocada sob a parte compressora do aparelho algesimétrico (Ugo Basile, Itália) (Figura 15).

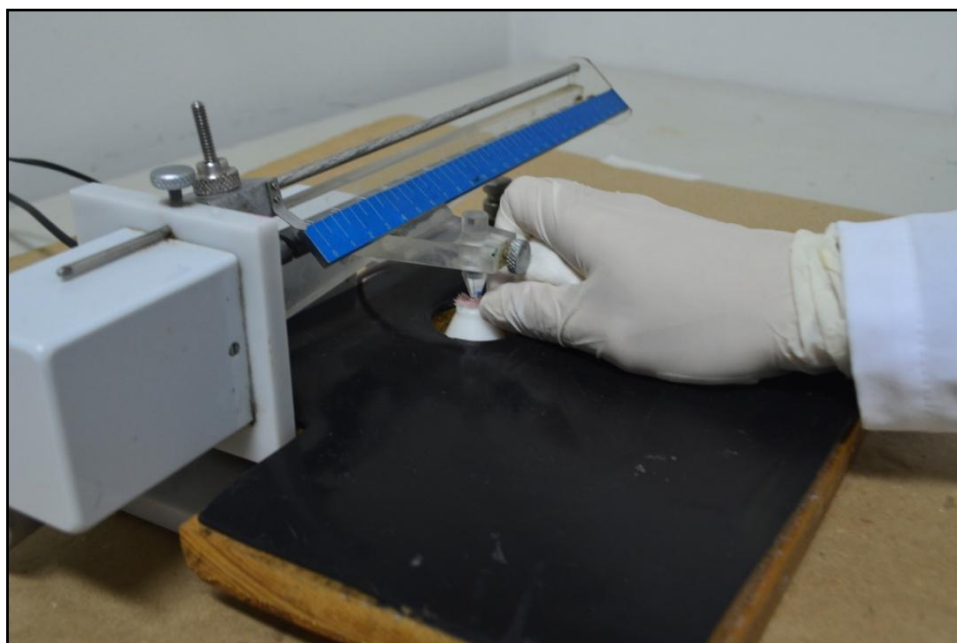


Figura 15 - Camundongo sendo submetido ao teste de retirada de pata.

A parte compressora do aparelho consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se coloca a pata do animal, e outra cônica, com uma área de $1,75 \text{ mm}^2$ na extremidade, por meio da qual é aplicada uma pressão na superfície plantar da pata do camundongo. A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 16 g/s , mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador. Ao

Materiais e Métodos

observar a resposta reflexa nociceptiva do animal, padronizada como retirada da pata, o experimentador desaciona o pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta à pata, sendo que o último valor, correspondente ao limiar nociceptivo, fica indicado na escala do aparelho e expresso em gramas (g). O valor de 160 g foi usado como valor de corte para reduzir a possibilidade de causar uma lesão na pata dos camundongos (Figura 16).



Figura 16 - Parte compressora do aparelho (Ugo Basile, Itália) utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de camundongos.

3.4.1 Resposta do animal

O aprendizado para a medida do limiar nociceptivo na pata do camundongo, consiste no treinamento do experimentador para detectar o momento em que o animal percebe o estímulo como sendo doloroso e desenvolve uma reação. É considerado como resposta o instante inicial dessa reação. Nesse momento, observa-se um reflexo de retirada da pata, também chamado de reflexo nociceptivo ou reflexo

Materiais e Métodos

flexor. Este reflexo é caracterizado pela retirada de um membro do corpo frente a estímulos dolorosos. Isso ocorre graças à integração, na medula, de neurônios nociceptivos com neurônios motores, por meio de neurônios de associação (interneurônios). Tais interneurônios podem ser de caráter excitatório ou inibitório, gerando uma conseqüente excitação (contração) de músculos flexores ou inibição (relaxamento) de músculos extensores (Figura 17) (Longmore, Hill e Hargreaves, 2011).

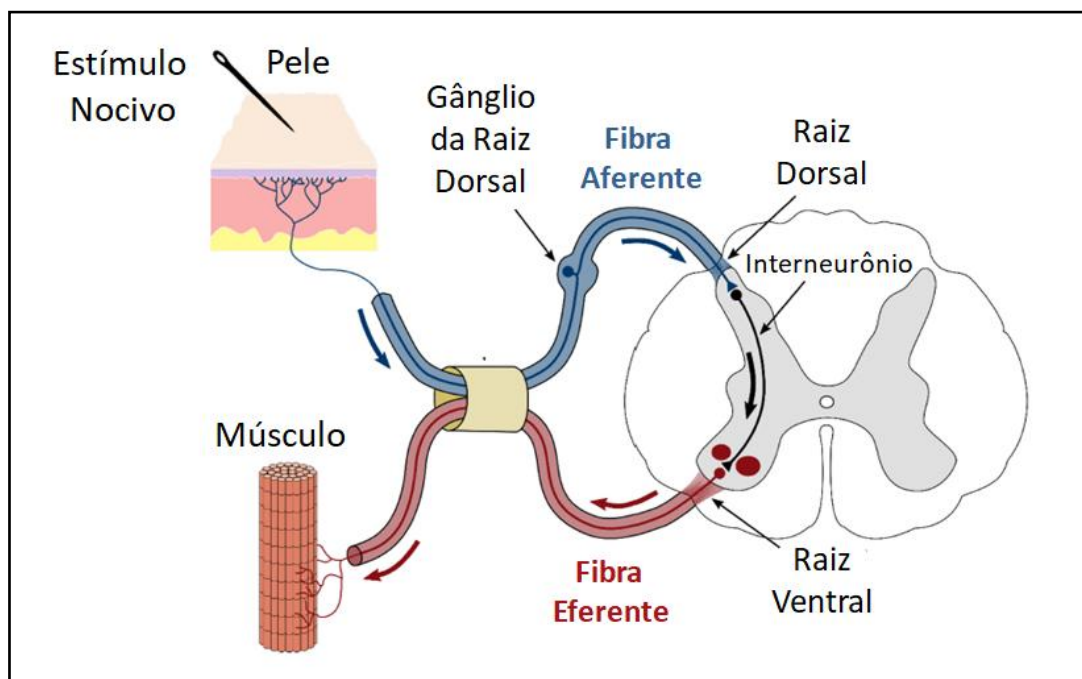


Figura 17 - Representação esquemática do reflexo de retirada frente ao estímulo nocivo. Estímulos nocivos aplicados a regiões inervadas por neurônios sensoriais nociceptivos periféricos provoca a ativação dos mesmos. Dentro do corno dorsal da medula espinhal, esses neurônios sensoriais nociceptivos ativados fazem conexões com interneurônios e motoneurônios, gerando respostas musculares e mediando a resposta reflexa de retirada (Santuz, 2018).

É importante ressaltar que o animal é ambientalizado ao aparelho no dia que antecede o teste, sendo submetido à mesma situação que será vivenciada no dia do experimento. A pata do animal é pressionada pelo aparelho três vezes, até que o mesmo não manifeste mais uma reação de fuga. Esse procedimento é muito

importante, pois permite uma melhor observação da resposta nociceptiva do animal, evitando uma reação aversiva simplesmente devido à situação estranha imposta ao mesmo.

3.4.2 Medida do limiar nociceptivo, hiperalgesia e antinocicepção

O limiar nociceptivo é definido como a pressão, aplicada à pata do animal, em que o mesmo apresenta o reflexo de retirada da pata submetida à compressão. O limiar basal de cada animal foi determinado antes da administração do agente hiperalgésico. Os limiares foram sempre medidos três vezes, observando um intervalo mínimo de 10 segundos entre cada medida, sendo o resultado final a média dessas medidas.

Para avaliação de um possível efeito antinociceptivo periférico ou central do resveratrol, foi realizado o acompanhamento temporal do limiar nociceptivo dos animais, em função da ação desta substância natural frente ao efeito hiperalgésico induzido pela carragenina. Considerando a hiperalgesia como uma diminuição do limiar nociceptivo, nos demais experimentos sua intensidade foi avaliada pela diferença (Δ) do limiar nociceptivo obtido no início do experimento (valor basal), antes de qualquer injeção (tempo zero), em relação ao limiar medido após 3 h da injeção intraplantar de carragenina (tempo em que se observa efeito máximo deste agente hiperalgésico).

Se antes ou durante o desenvolvimento da hiperalgesia induzida pela carragenina for administrado um fármaco com ação antinociceptiva, será verificada uma redução da intensidade de hiperalgesia, ou seja, uma diminuição do Δ do limiar nociceptivo. Do mesmo modo, fármacos com capacidade de interferir na ação desses

Materiais e Métodos

agentes antinociceptivos tendem a reverter esse efeito, ou seja, restaurar o Δ a valores próximos àqueles obtidos quando se administra somente o agente hiperalgésico.

3.4.3 Procedimento experimental

Para verificação do envolvimento das vias analgésicas endógenas na atividade antinociceptiva do resveratrol, o mesmo foi injetado 15 minutos (via intraplantar) ou 10 minutos (via intracerebroventricular) antes da terceira hora após a injeção intraplantar de carragenina (200 $\mu\text{g/pata}$). Tais tempos de administração foram definidos conforme os resultados obtidos na análise temporal da atividade antinociceptiva do resveratrol. De tal maneira que, os picos de ação do agente hiperalgésico (carragenina) e da substância antinociceptiva sob estudo (resveratrol) coincidiram com o momento da medição do limiar nociceptivo.

Nas análises a nível periférico, todas as drogas utilizadas envolvidas na via opioidérgica (naloxona, clocinnamox, naltrindole, *nor*-binaltorfimina e bestatina) foram administradas 30 minutos antes da administração do resveratrol. Já as drogas envolvidas na via canabinoidérgica (AM251, AM630, VDM11 e MAFP) foram administradas 10 minutos antes da administração do resveratrol. E, por fim, sobre as drogas com envolvimento na via nitrérgica, L-NOArg e L-NPA foram administrados 30 minutos antes, enquanto que ODQ e Zaprinas foram administrados, respectivamente, 10 e 60 minutos antes da administração do resveratrol. Todas as administrações feitas para análises periféricas foram via intraplantar. Para a exclusão do efeito não local (efeito sistêmico), o agente hiperalgésico foi administrado em ambas as patas posteriores dos animais. Enquanto que resveratrol e veículo foram administrados

Materiais e Métodos

somente nas patas direita e esquerda, respectivamente. Em seguida, o limiar nociceptivo foi mensurado em ambas as patas.

Para realização das análises a nível central, as drogas envolvidas nos três sistemas analgésicos avaliados foram administradas, via intracerebroventricular, 1 minuto antes da administração, também via intracerebroventricular, do resveratrol.

Todas as doses e o tempo de administração dos fármacos supracitados foram definidos baseando-se em dados da literatura e em estudos prévios realizados em nosso laboratório (Pacheco *et al.*, 2008; Veloso *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2017). A determinação do tempo de latência para retirada da pata, antes (basal) ou após o estímulo nociceptivo (carragenina), foi medida três vezes, sendo que a determinação da média desses valores foi considerada como a medida final.

3.5 Análise da expressão de nNOS pela técnica de Western Blot

15 minutos após a administração intraplantar (100 µg/pata) e 10 minutos após a administração intracerebroventricular (9 µg/animal) do resveratrol, os camundongos foram eutanasiados, por deslocamento cervical, e a superfície plantar da pata ou o mesencéfalo dos mesmos foram coletados. Estes tecidos foram homogeneizados individualmente em 500 µl de tampão RIPA (180 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de TrisHCl, 0,5 mmol/L de EDTA.2Na, 1 mmol/L de MgCl₂, 0,3% de Triton X-100, 0,5% de SDS, pH 7.4), contendo um coquetel de inibidores de protease (SigmaFAST®, Sigma) mais 20 mmol/L de NaF e 20 mmol/L de PMSF. Posteriormente, os lisados foram centrifugados a 16000 x g durante 20 minutos a 4°C e o teor de proteína foi determinado pelo uso do método de Bradford (Bradford, 1976). Quantidades iguais de proteína (50 µg) foram desnaturadas em tampão de carga a 100°C durante 5 min e

Materiais e Métodos

submetidas a SDS-PAGE usando gel de poliacrilamida a 10%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno de 0,45 μm (PVDF Immobilon P; Millipore, MA, EUA). As manchas foram bloqueadas à temperatura ambiente com BSA a 4% em PBS enriquecido com Tween 20 a 0,1% antes da incubação com rabbit polyclonal anti-nNOS (diluído 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EUA; cat. nº SC-5302), mouse monoclonal anti-nNOS Ser852 (diluído 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EUA, cat. nº SC-19826) e anti- β -Actina monoclonal de rato (diluído 1: 1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Posteriormente, as manchas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo primário seguido de incubação com anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rãteos (HRP) durante 2 h à temperatura ambiente. Os imunocomplexos foram detectados por reação quimioluminescente (Luminata™ Forte Western HRP Substrato, Millipore, MA), seguido de análises densitométricas com o software ImageJ 1.46r (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

3.6 Dosagem de Nitrito pela Reação de Griess

Os níveis de nitrito foram medidos usando a reação de Griess (Green *et al.*, 1982). 15 minutos após a administração intraplantar (100 $\mu\text{g/pata}$) ou 10 minutos após a administração intracerebroventricular (9 $\mu\text{g/animal}$) do resveratrol, os camundongos foram eutanasiados, por deslocamento cervical, e a superfície plantar da pata ou o mesencéfalo dos mesmos foram coletados. Estes tecidos foram homogeneizados individualmente em 900 μl de solução tampão contendo: Tris-HCl 30 mM, pH 6,8, EDTA 5 mM, sacarose 250 mM, KCl 30 mM, b-mercaptoetanol a 2%, PMSF (100 $\mu\text{g/ml}$), benzamidina (5 $\mu\text{g/ml}$), aprotinina (2 $\mu\text{g/ml}$) e leupeptina (2 $\mu\text{g/ml}$). As amostras foram

Materiais e Métodos

então centrifugadas (12000g, 4°C, 15 min). Resumidamente, foram aplicados 100 µl do sobrenadante a um poço de placa de ELISA, seguido por 100 µl de reagente de Griess (2% [p/v] de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% [v/v] e 0,2% [p/v] naftililenodiamina) (Figura 18). Após 10 minutos de desenvolvimento de cor à temperatura ambiente, a absorvância foi medida com um leitor de microplacas (Titertek Multiskan MCC/340; Flow Laboratories, McLean, VA) a um comprimento de onda de 545 nm. Cada amostra foi ensaiada em poços triplicados. As curvas de referência padrão de nitrito foram feitas com nitrito de sódio em água destilada em concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 e 1,56 µM. O limite de detecção do ensaio é de $\approx 1,5$ µmol/litro.

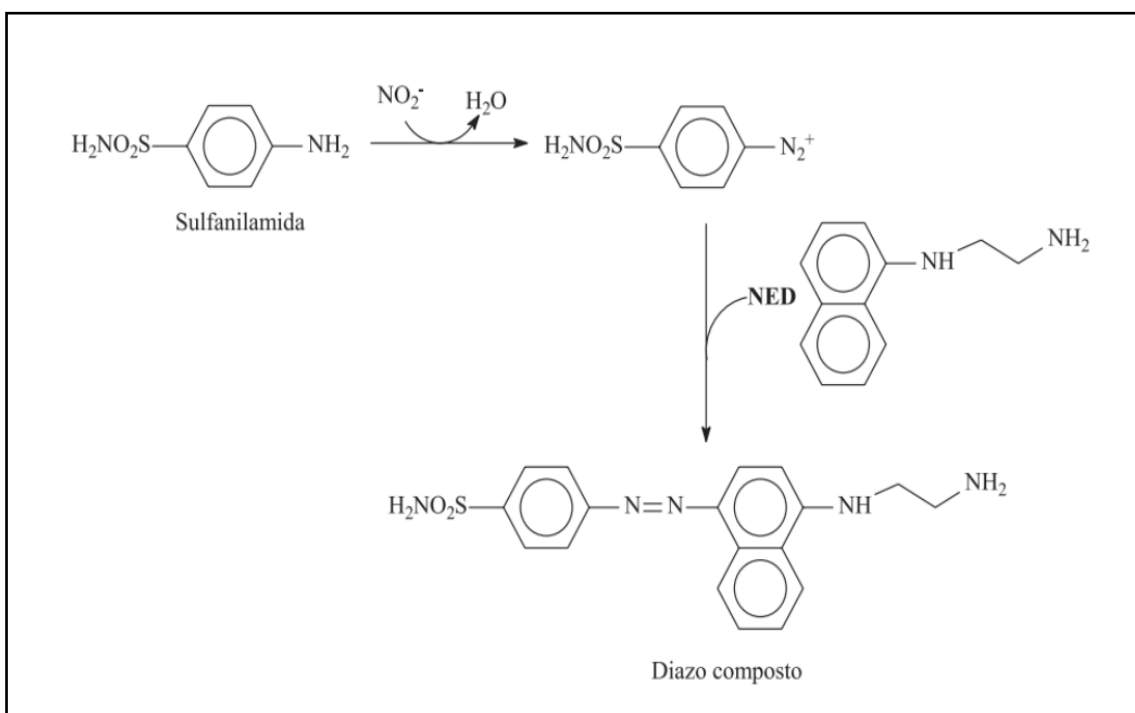


Figura 18 - Mecanismo da reação envolvida na dosagem de nitrito [NO₂⁻] pelo método de Griess. O nitrito reage sequencialmente com sulfanilamida e NED (“reagente de Griess”), gerando um composto (diazo composto) de coloração vermelha intensa. NED, naftililenodiamina (Ramos, Cavalheiro e Cavalheiro, 2006).

3.7 Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram submetidos à análise de variância *one-way* ou *two-way* seguida pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $P < 0.05$. As análises estatísticas foram feitas usando o programa GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS

Resultados

4.1 Administrações intraplantar ou intracerebroventricular de resveratrol (RES) induzem efeito antinociceptivo frente à hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina (CAR) na pata de camundongos

A administração intraplantar de resveratrol (RES; 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/pata}$), na terceira hora após a injeção de carragenina (CAR, 200 $\mu\text{g/pata}$), produziu uma resposta antinociceptiva dependente da dose. O efeito inibitório do RES durou 20 minutos e foi reversível. O pico de ação foi observado 15 minutos após a injeção. 12,5 $\mu\text{g/pata}$ de RES não induziu efeito antinociceptivo significativo, enquanto que uma antinocicepção máxima foi observada com 100 $\mu\text{g/pata}$ de RES. Apesar da maior dose de RES quase completamente reverter a hipernocicepção inflamatória induzida por CAR, essa dose sem a presença do estímulo nociceptivo (CAR) não alterou significativamente o limiar basal nociceptivo (Figura 19).

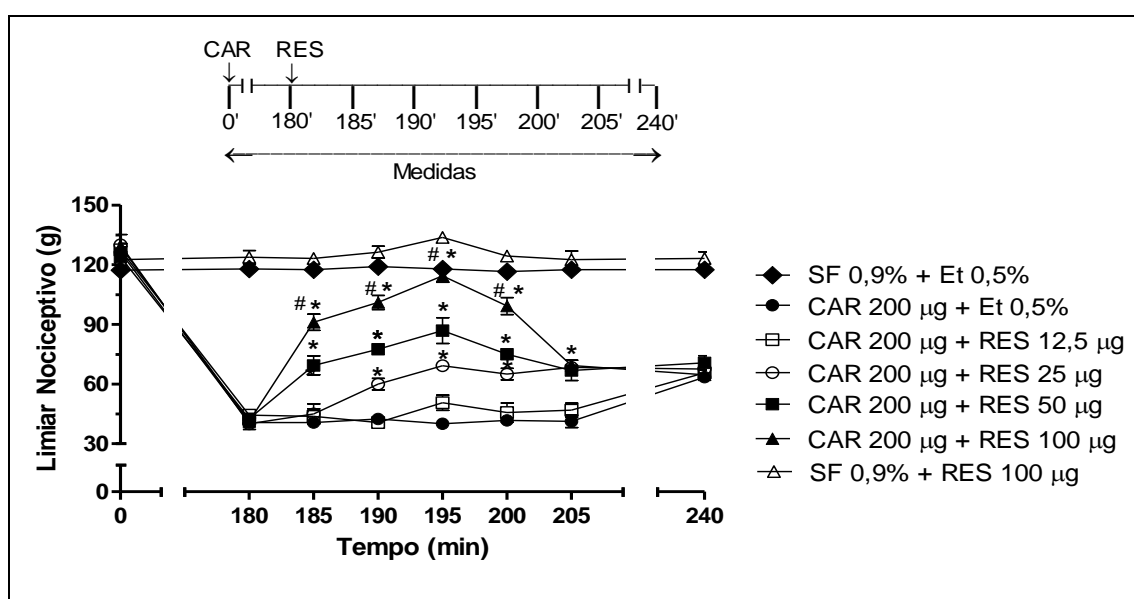


Figura 19 - Curva tempo-resposta da administração intraplantar de resveratrol (RES) na hiperalgesia induzida por carragenina (CAR) em camundongos. A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. CAR (200 $\mu\text{g/pata}$) e RES (12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/pata}$) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 180 min., respectivamente. As medições foram feitas a cada 5 min. entre os tempos 180-205 min. e em 240 min. (diagrama sobre o gráfico). Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) para 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo CAR 200 μg + Et 0,5%. # $P < 0,05$ comparado ao grupo CAR 200 μg + RES 50 μg . SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

Para excluir a possibilidade de efeito antinociceptivo na pata contralateral à pata que recebeu a injeção intraplantar de RES, CAR foi administrada no tempo zero em ambas as patas posteriores e RES (100 ou 200 μg) foi injetado apenas na pata posterior direita 15 minutos antes da terceira hora após a administração de CAR. As medidas do limiar nociceptivo de ambas as patas posteriores foram feitas imediatamente antes e 3h após a injeção intraplantar de CAR, em seguida, a diferença entre as médias das medidas foi calculada (Δ do limiar nociceptivo). RES na dose de 100 μg induziu efeito restrito à pata tratada, não alterando a hiperalgesia induzida por CAR na pata contralateral. Diferentemente da dose de 200 μg de RES, a qual induziu antinocicepção (redução no Δ do limiar nociceptivo) em ambas as patas, mesmo sendo administrado apenas na pata direita (Figura 20).

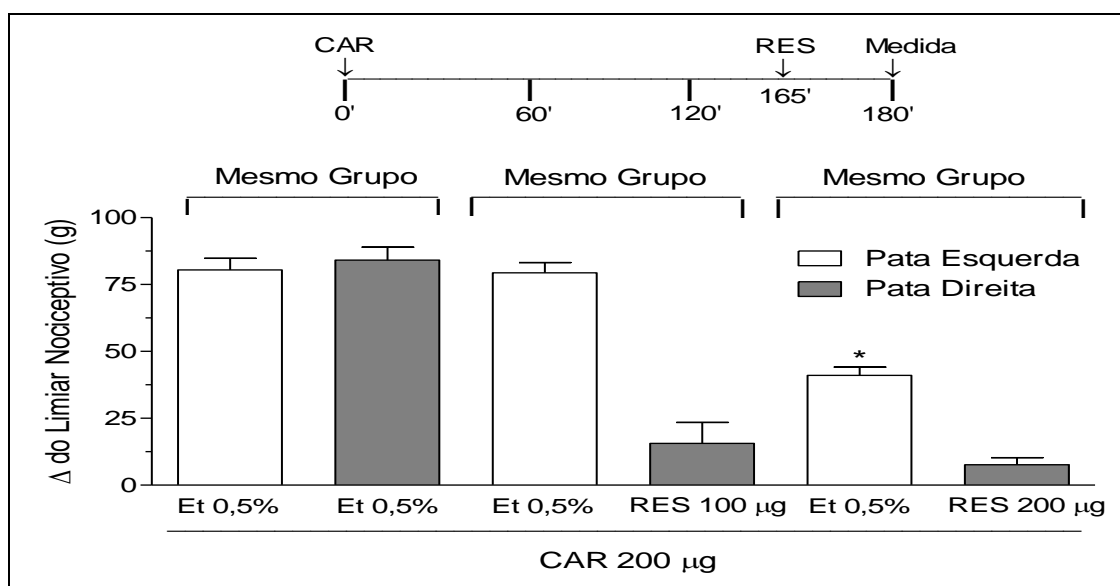


Figura 20 - Exclusão do efeito antinociceptivo na pata contralateral na administração intraplantar do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 μg /pata) foi injetada nas duas patas posteriores no tempo 0. Resveratrol (RES; 100 e 200 μg /pata) e veículo (etanol 0,5%; 20 μl /pata) foram injetados nas patas posteriores direita e esquerda, respectivamente, no tempo 165 min. As medições foram feitas em ambas as patas no tempo 180 min. (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo CAR 200 μg + Et 0,5%. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar medido na terceira hora após a injeção de CAR. Et 0,5%= Etanol 0,5%.

Resultados

A administração intracerebroventricular de resveratrol (RES; 1, 3 e 9 μg), na terceira hora após a injeção de carragenina (CAR, 200 μg /pata), também produziu uma resposta antinociceptiva dependente da dose. O efeito antinociceptivo do RES foi observado logo após a sua administração e perdurou com intensidade média até 1h após a sua administração, quando seu efeito se equiparou ao do grupo que recebeu somente CAR e o veículo do RES (2 μl de etanol 0,5%). O pico de ação foi observado 10 minutos após a injeção. RES na dose de 1 μg induziu efeito inibitório significativo somente 10 minutos após a administração, enquanto que uma antinocicepção máxima foi observada com 9 μg de RES. Apesar da maior dose de RES quase completamente reverter a hipernocicepção inflamatória induzida por CAR, essa dose sem a presença do estímulo nociceptivo (CAR) não alterou com significância o limiar nociceptivo basal (Figura 21).

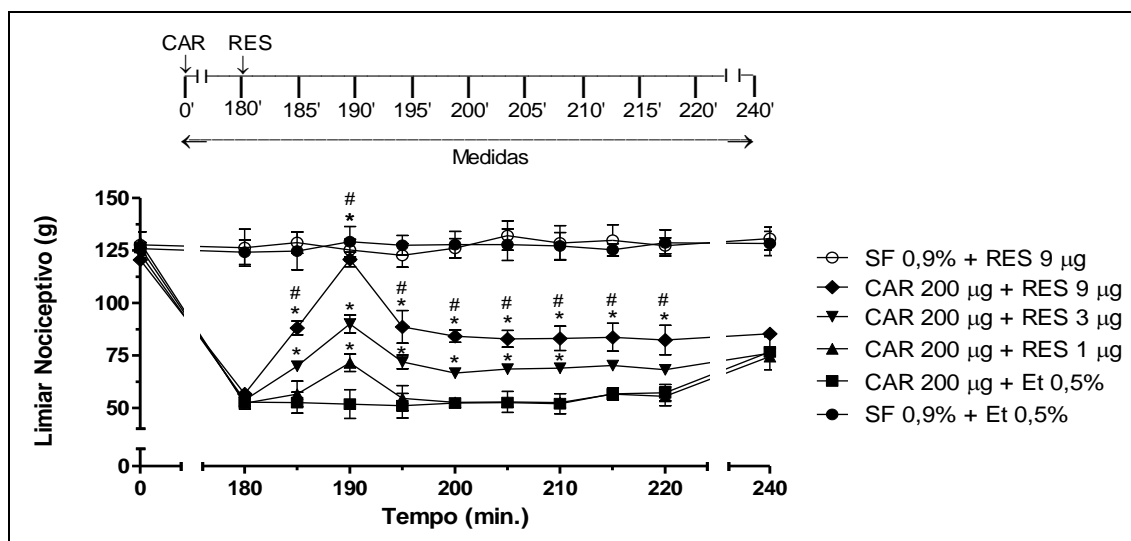


Figura 21 - Curva tempo-resposta da administração intracerebroventricular de resveratrol (RES) na hiperalgesia induzida por carragenina (CAR) em camundongos. A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. CAR (200 μg /pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. Resveratrol (RES; 1, 3 e 9 μg) foi administrado no ventrículo lateral direito no tempo 180 min. As medições foram feitas a cada 5 min. entre os tempos 180-205 min. e em 240 min. (diagrama sobre o gráfico). Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) para 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo CAR 200 μg + Et 0,5%. # $P < 0,05$ comparado ao grupo CAR 200 μg + RES 50 μg . SF 0,9%= Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5%= Etanol 0,5%.

Resultados

4.2 Avaliação do envolvimento de receptores opioides na antinocicepção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES)

A administração intraplantar de naloxona (NLX; 25, 50 e 100 $\mu\text{g/pata}$) antagonizou a antinocicepção periférica induzida pelo RES de maneira dose dependente (Figura 22). Assim como o antagonista do receptor opioide do tipo μ , clocinnamox (CLOC; 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g/pata}$), inibiu de forma dependente da dose a resposta antinociceptiva periférica do RES (Figura 23). Por outro lado, o naltrindole (NTD; 120 $\mu\text{g/pata}$) e o nor-binaltorfimina (nBNI; 100 $\mu\text{g/pata}$), respectivamente, antagonistas dos receptores opioides do tipo δ e κ , não induziram nenhuma alteração significativa na antinocicepção periférica mediada pelo RES frente à hiperalgesia induzida pela CAR (200 $\mu\text{g/pata}$) (Figuras 24 e 25).

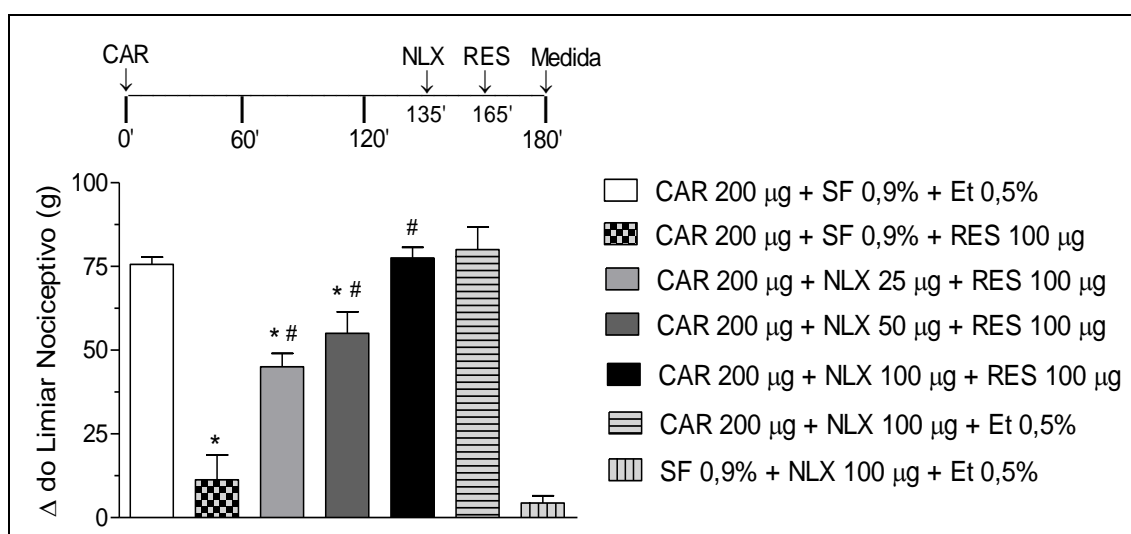


Figura 22 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com naloxona (NLX) na antinocicepção periférica do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 $\mu\text{g/pata}$) e resveratrol (RES; 100 $\mu\text{g/pata}$) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. Naloxona (NLX; 25, 50 e 100 $\mu\text{g/pata}$) foi administrada no tempo 135 min. Todas as medidas foram feitas no tempo 180 min. (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # $P < 0,05$ em comparação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + RES 100 μg . Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9%= Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5%= Etanol 0,5%.

Resultados

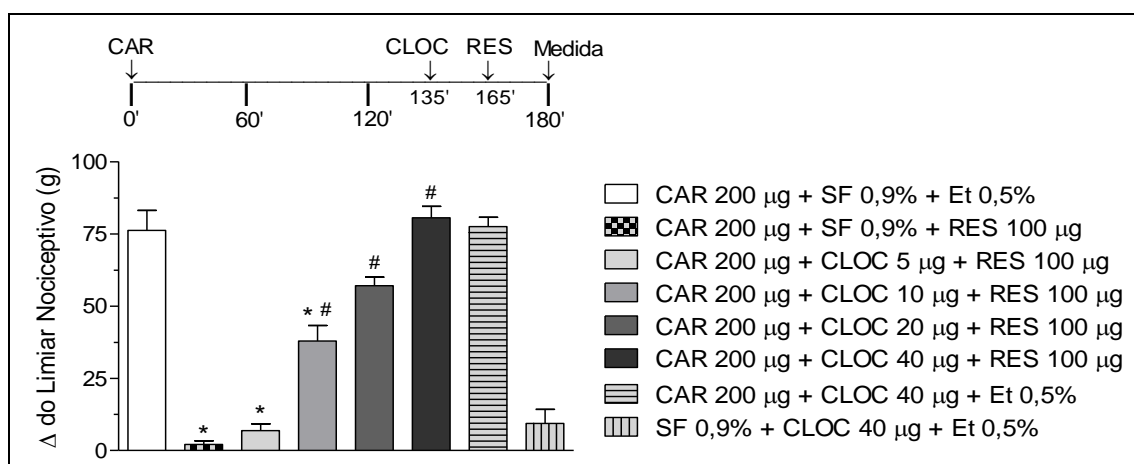


Figura 23 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com clocinnamox (CLOC) na antinociceção periférica do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 μg/pata) e resveratrol (RES; 100 μg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. Clocinnamox (CLOC; 5, 10, 20 e 40 μg/pata) foi administrado no tempo 135 min. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * P <0,05 em relação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # P <0,05 em comparação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + RES 100 μg. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9%= Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5%= Etanol 0,5%.

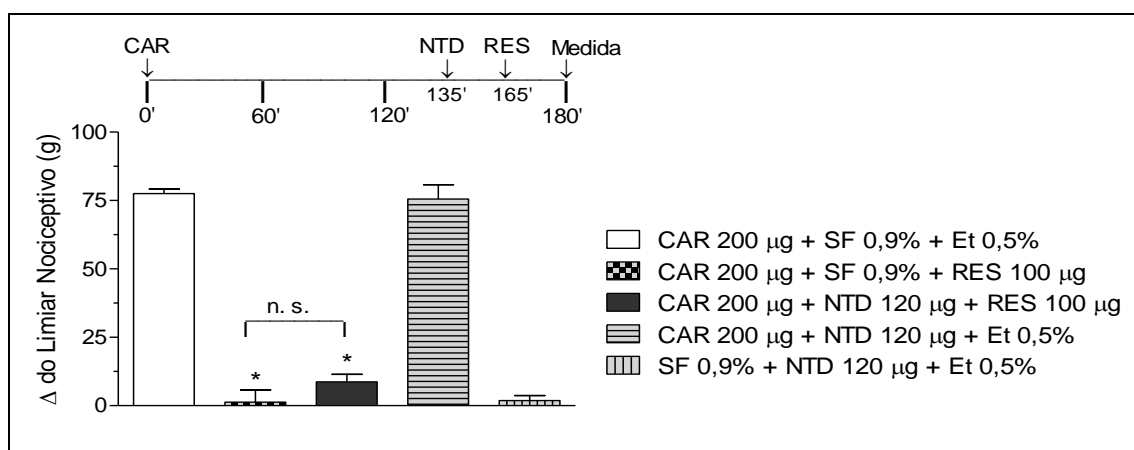


Figura 24 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com naltrindole (NTD) na antinociceção periférica do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 μg/pata) e resveratrol (RES; 100 μg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. Naltrindole (NTD; 120 μg/pata) foi administrado no tempo 135 min. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * P <0,05 em relação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + Et. 0,5%. n.s. = não significativo. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF = Solução Fisiológica. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

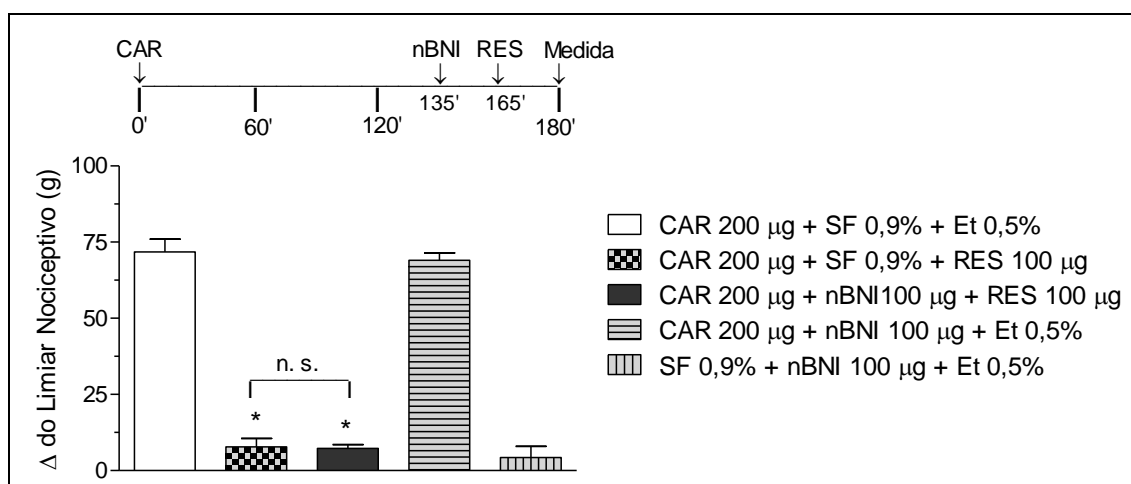


Figura 25 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com nor-binaltorfimina (nBNI) na antinociceção periférica do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 µg/pata) e resveratrol (RES; 100 µg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. Nor-binaltorfimina (nBNI; 100 µg/pata) foi administrado no tempo 135 min. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. n.s. = não significativo. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Os antagonistas de receptores opioides não seletivo e seletivo para o receptor do tipo μ , respectivamente, naloxona (NLX; 5 e 2,5 µg) e clocinnamox (CLOC; 2 e 4 µg), quando administrados por via intracerebroventricular, também inibiram, de forma dependente da dose, a resposta antinociceptiva central do RES (9 µg) (Figuras 26 e 27). Já o antagonista seletivo para o receptor opioide do tipo δ , o naltrindole (NTD; 6 e 12 µg), diferentemente do que foi observado a nível periférico, foi capaz de reverter a antinociceção central induzida pelo RES (9 µg) de maneira dose dependente (Figura 28). Enquanto que a nor-binaltorfimina (nBNI; 20 µg), antagonista seletivo para o receptor opioide do tipo κ , assim como a nível periférico, não induziu centralmente nenhuma alteração significativa na antinociceção mediada pelo RES frente à hiperalgesia induzida pela CAR (200 µg/pata) (Figura 29).

Resultados

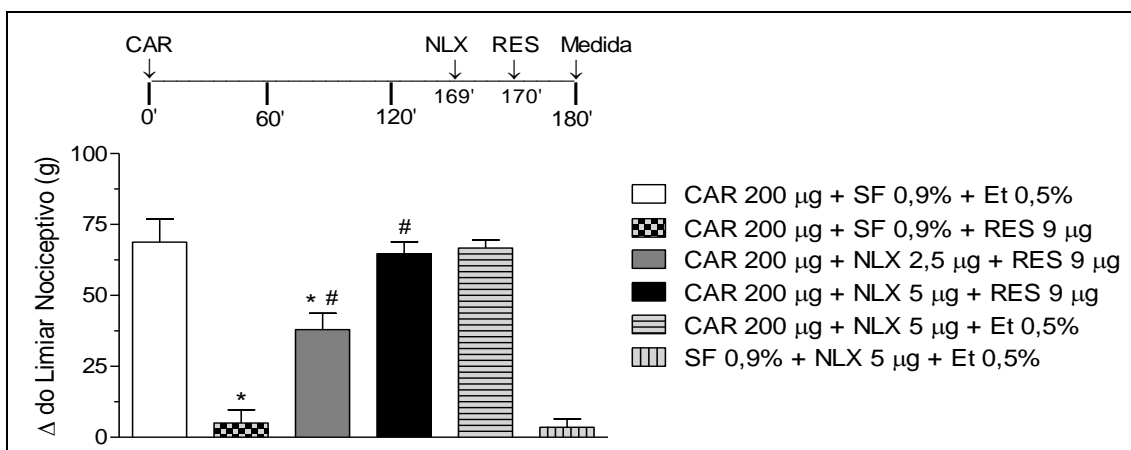


Figura 26 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com naloxona (NLX) na antinocicepção central do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. CAR (200 µg/pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. Naloxona (NLX; 2,5 e 5 µg) e resveratrol (RES; 9 µg) foram administrados no ventrículo lateral direito nos tempos 169 e 170 min., respectivamente. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * P <0,05 em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # P <0,05 em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 9 µg. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

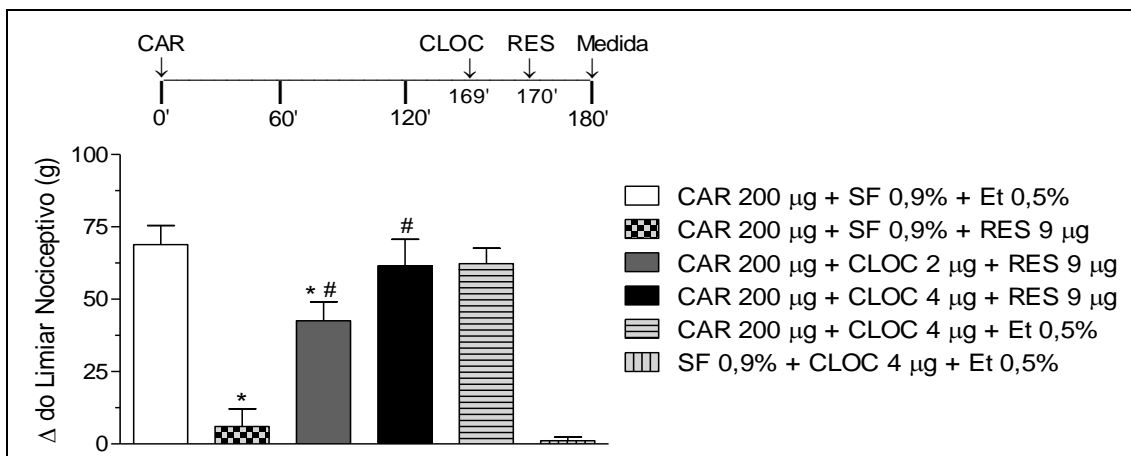


Figura 27 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com clonazepam (CLOC) na antinocicepção central do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. CAR (200 µg/pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. Clonazepam (CLOC; 2 e 4 µg) e resveratrol (RES; 9 µg) foram administrados no ventrículo lateral direito nos tempos 169 e 170 min., respectivamente. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * P <0,05 em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # P <0,05 em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 9 µg. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

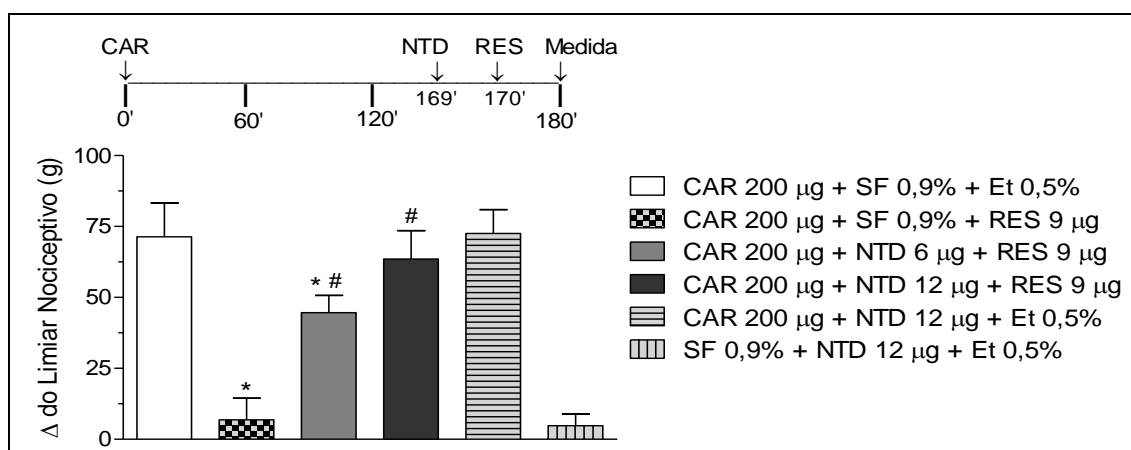


Figura 28 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com naltrindole (NTD) na antinociceção central do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. CAR (200 µg/pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. Naltrindole (NTD; 6 e 12 µg) e resveratrol (RES; 9 µg) foram administrados no ventrículo lateral direito nos tempos 169 e 170 min., respectivamente. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # $P < 0,05$ em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 9 µg. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

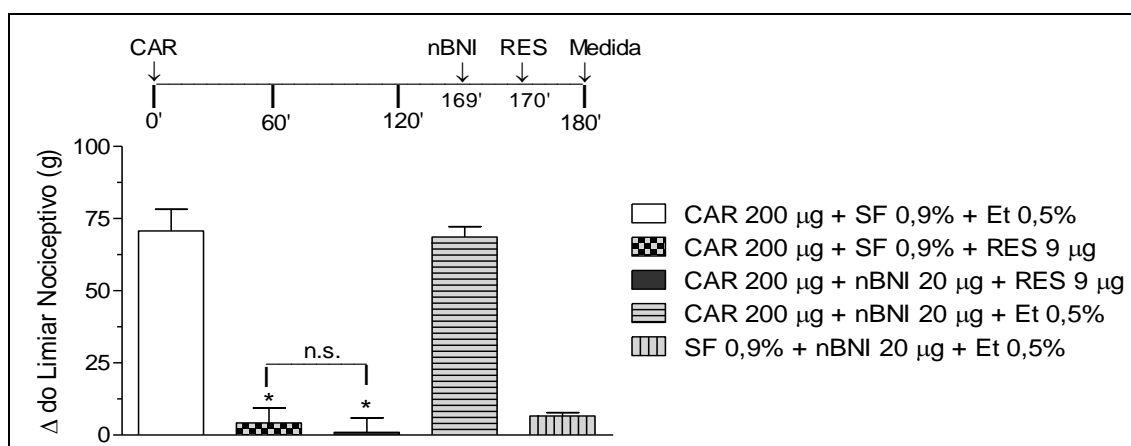


Figura 29 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com nor-binaltorfimina (nBNI) na antinociceção central do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. CAR (200 µg/pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. Nor-binaltorfimina (nBNI; 20 µg) e resveratrol (RES; 9 µg) foram administrados no ventrículo lateral direito nos tempos 169 e 170 min., respectivamente. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. n.s. = não significativo. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

4.3 Inibidores da degradação de opioides endógenos intensificam a antinociceção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES)

Previamente à injeção intraplantar de RES na sua dose de efeito intermediário (50 µg/pata), a bestatina (BEST, 200 µg/pata), inibidora da enzima envolvida na degradação de opioides endógenos (aminopeptidase-N), foi administrada. Utilizou-se uma baixa dose de bestatina, de tal forma que, quando administrada isoladamente, ela não produziu antinociceção significativa frente à hipernociceção da CAR (200 µg/pata). No entanto, a administração da dose intermediária de RES (50 µg/pata) induziu uma antinociceção semelhante à antinociceção induzida pela dose máxima de RES (100 µg/pata) (Figura 30).

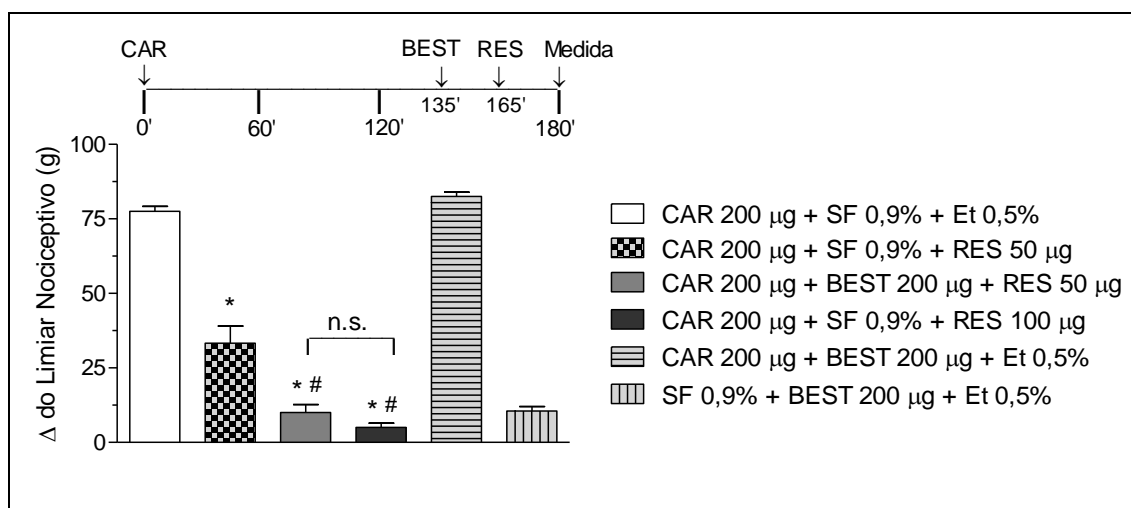


Figura 30 – Intensificação induzida pelo pré-tratamento com bestatina (BEST) na antinociceção periférica do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 µg/pata) e resveratrol (RES; 50 ou 100 µg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. Bestatina (BEST; 200 µg/pata) foi administrada no tempo 135 min. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * P <0,05 em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # P <0,05 em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 50 µg. n.s. = não significativo. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

Evento similar foi observado a nível central, a bestatina (BEST), quando previamente administrada por via intracerebroventricular em baixa dosagem (20 µg), foi capaz de tornar o efeito antinociceptivo da dose intermediária de RES (3 µg) equiparável ao efeito do RES na sua dose máxima (9 µg) (Figura 31).

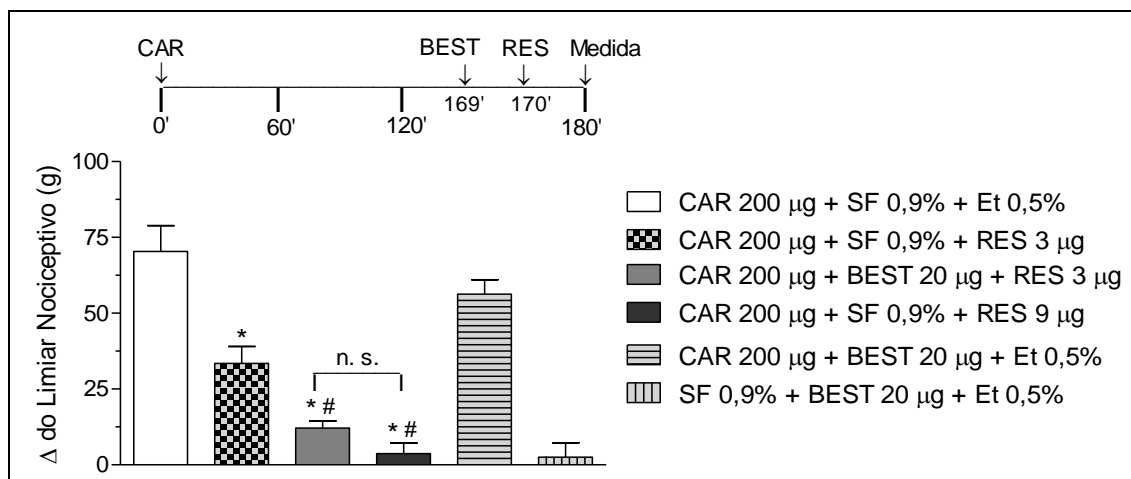


Figura 31 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com bestatina (BEST) na antinocicepção central do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 µg/pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. BEST (20 µg) e RES (3 ou 9 µg) foram administrados no ventrículo lateral direito nos tempos 169 e 170 min., respectivamente. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # $P < 0,05$ em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 3 µg. n.s. = não significativo. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

4.4 Avaliação do envolvimento de receptores canabinoides na antinocicepção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES)

Antagonistas seletivos para receptores canabinoides do tipo CB₁ (AM251) e CB₂ (AM630) também foram administrados por via intraplantar previamente à injeção de RES (100 µg/pata). AM251 (20, 40 e 80 µg/pata) bloqueou de forma dependente da dose a antinocicepção periférica induzida pelo RES (Figura 32). Por outro lado, AM630 (100 µg/pata) foi incapaz de reverter o efeito antinociceptivo periférico associado ao mesmo (Figura 33).

Resultados

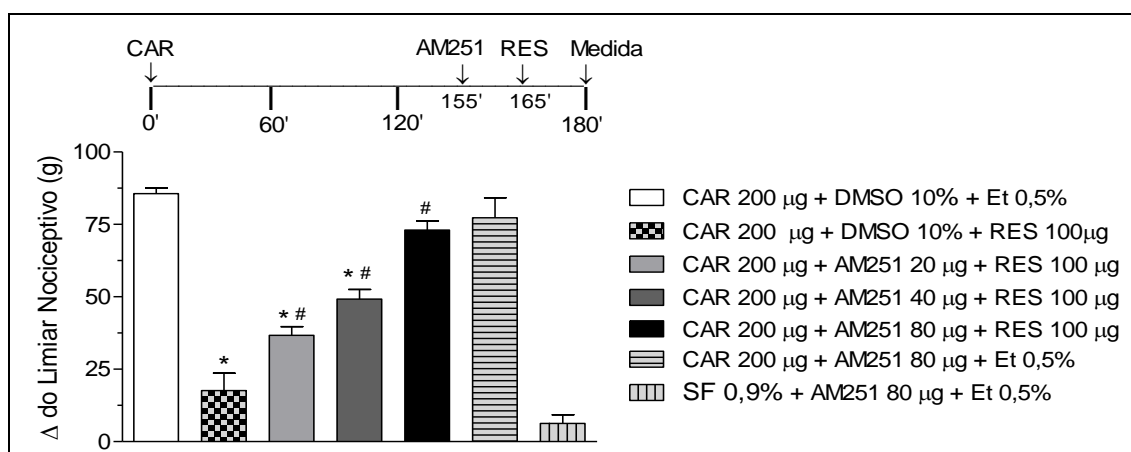


Figura 32 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com AM251 na antinociceção periférica do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 μg/pata) e resveratrol (RES; 100 μg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. AM251 (20, 40 e 80 μg/pata) foi administrada no tempo 155 min. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * P <0,05 em relação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # P <0,05 em comparação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + RES 100 μg. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

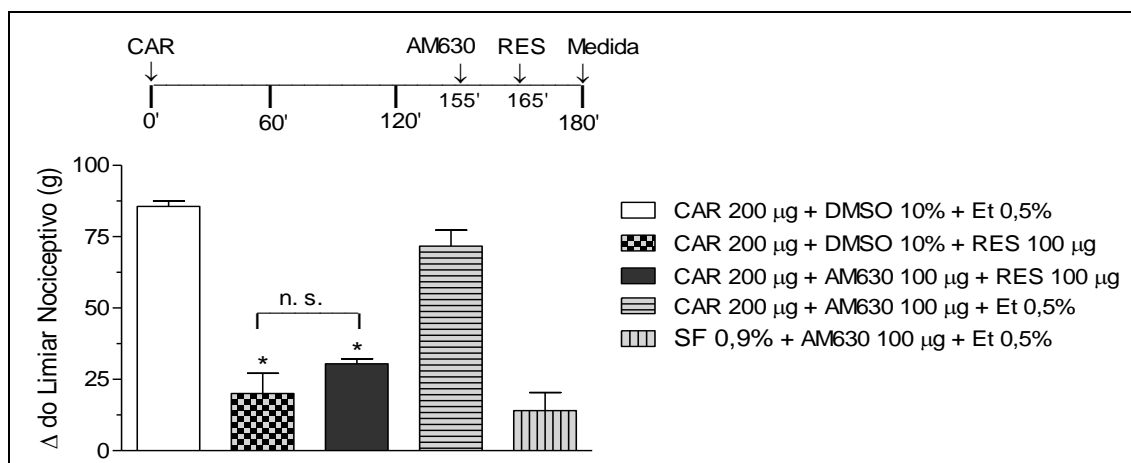


Figura 33 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com AM630 na antinociceção periférica do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 μg/pata) e resveratrol (RES; 100 μg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. AM630 (100 μg/pata) foi administrada no tempo 155 min. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * P <0,05 em relação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + Et. 0,5%. n.s. = não significativo. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

Observações semelhantes foram constatadas a nível central, AM251 (2 e 4 μg) antagonizou o efeito antinociceptivo associado ao resveratrol (RES; 9 μg) administrado por via intracerebroventricular (Figura 34). Enquanto que o AM630 (2 e 4 μg) não induziu nenhuma alteração significativa nesse processo (Figura 35).

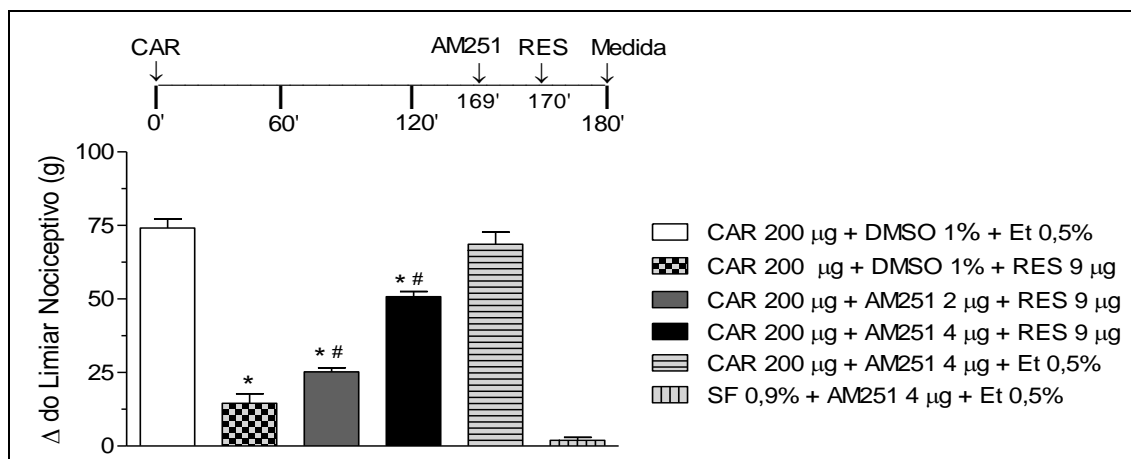


Figura 34 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com AM251 na antinociceção central do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. CAR (200 μg /pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. AM251 (2 e 4 μg) e resveratrol (RES; 9 μg) foram administrados no ventrículo lateral direito nos tempos 169 e 170 min., respectivamente. Todas as medidas foram feitas no tempo 180 min. (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # $P < 0,05$ em comparação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + RES 9 μg . n.s. = não significativo. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

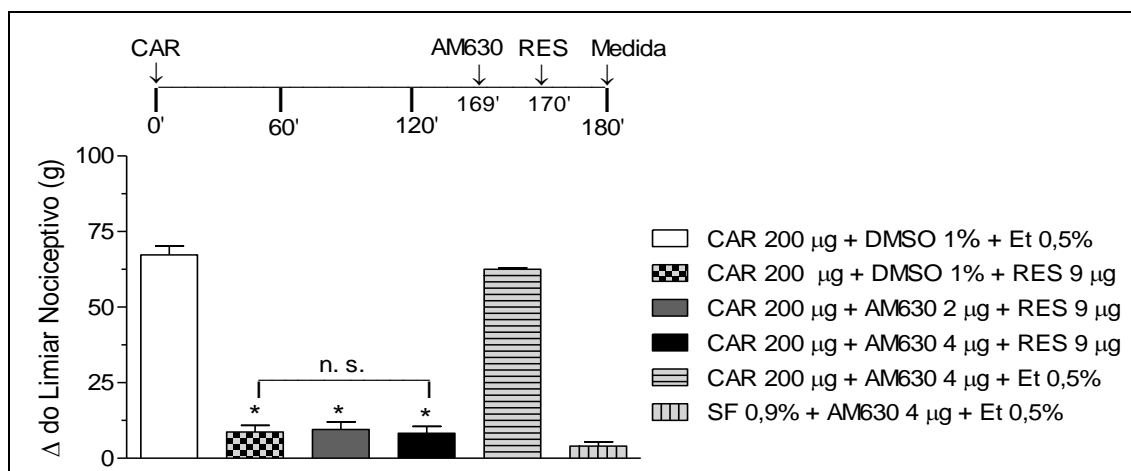


Figura 35 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com AM630 na antinocicepção central do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. CAR (200 μg/pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. AM630 (2 e 4 μg) e resveratrol (RES; 9 μg) foram administrados no ventrículo lateral direito nos tempos 169 e 170 min., respectivamente. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * P <0,05 em relação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + Et. 0,5%. n.s. = não significativo. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

4.5 Inibidores da degradação e recaptação de endocanabinoides intensificam a antinocicepção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES)

Duas drogas capazes de aumentar o tempo de disponibilidade dos endocanabinoides foram utilizadas: (i) o MAFP (0,5 μg/pata), inibidor da amida hidrolase de ácido graxo (FAAH, do inglês *fatty acid amide hydrolase*), enzima com participação na hidrólise da anandamida (AEA); (ii) e o VDM11 (2,5 μg/pata), inibidor do transportador membranar de anandamida (AMT). Ambos foram utilizados em baixas dosagens e quando administradas isoladamente não induziram efeitos antinociceptivos significativos. Porém, quando administrados previamente à administração de RES, foi observada uma intensificação da antinocicepção associada à dose intermediária do mesmo (50 μg/pata), a qual se tornou comparável a antinocicepção induzida pela sua dose máxima (100 μg/pata) (Figuras 36 e 37).

Resultados

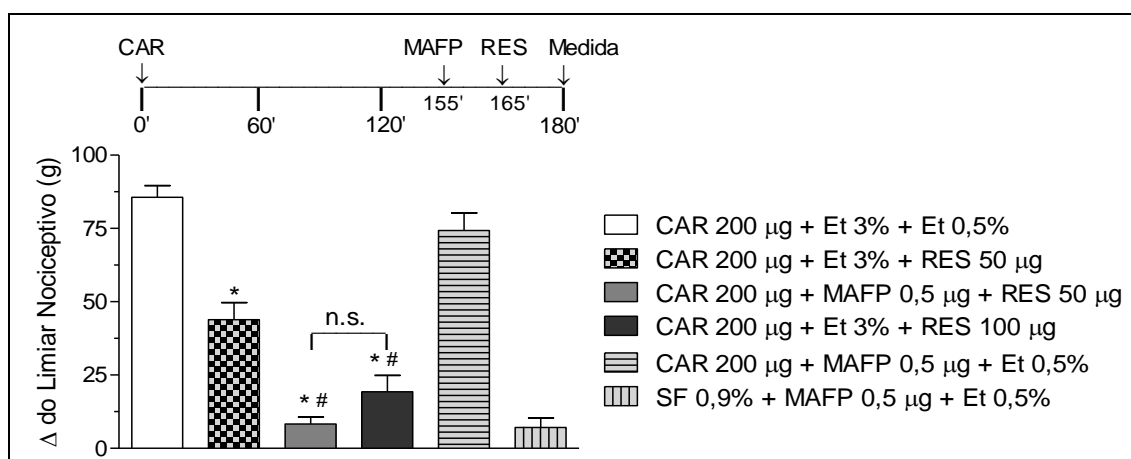


Figura 36 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com MAFP na antinocicepção periférica do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 µg/pata) e resveratrol (RES; 50 ou 100 µg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. MAFP (0,5 µg/pata) foi administrado no tempo 155 min. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # P<0,05 em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 50 µg. n.s. = não significativo. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

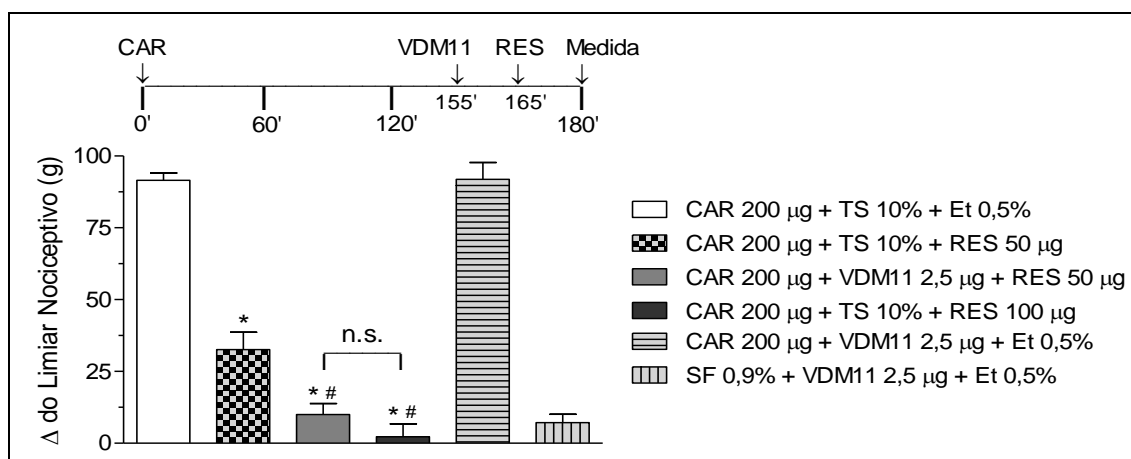


Figura 37 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com VDM11 na antinocicepção periférica do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 µg/pata) e resveratrol (RES; 50 ou 100 µg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. VDM11 (2,5 µg/pata) foi administrado no tempo 155 min. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # P<0,05 em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 50 µg. n.s. = não significativo. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

Mais uma vez, resultados análogos foram observados a nível central, MAFP (0,2 μg) e VDM11 (0,4 μg), quando administrados previamente à injeção intracerebroventricular de RES, foram capazes de elevar significativamente a antinociceção do mesmo em dosagem não máxima (3 μg), apesar de isoladamente não serem capazes de induzir efeitos antinociceptivos nas doses utilizadas (Figuras 38 e 39).

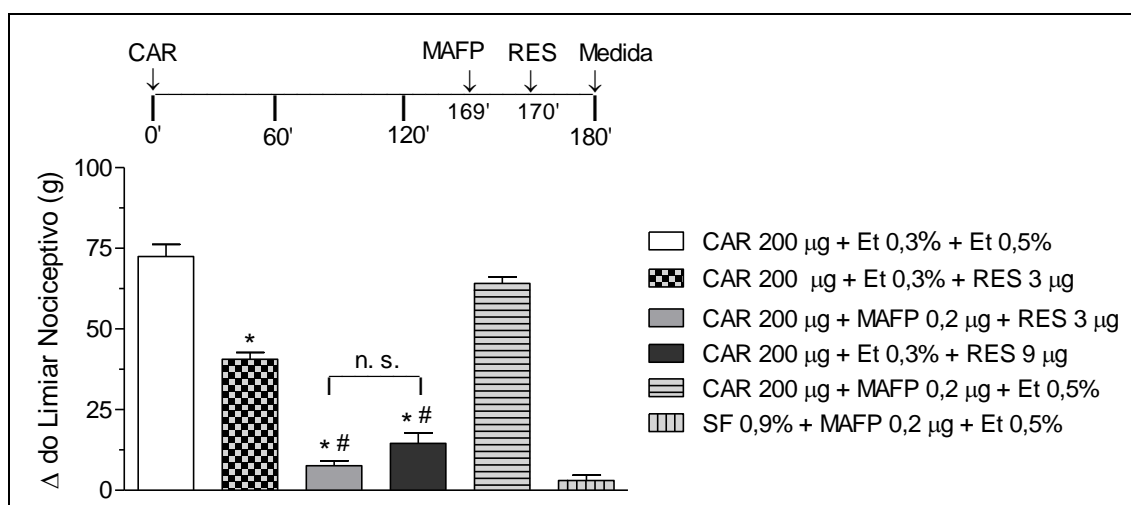


Figura 38 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com MAFP na antinociceção central do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 μg /pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. MAFP (0,2 μg) e resveratrol (RES; 3 ou 9 μg) foram administrados no ventrículo lateral direito nos tempos 169 e 170 min., respectivamente. Todas as medidas foram feitas no tempo 180 min. (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) para 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # $P < 0,05$ em comparação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + RES 3 μg . n.s. = não significativo. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

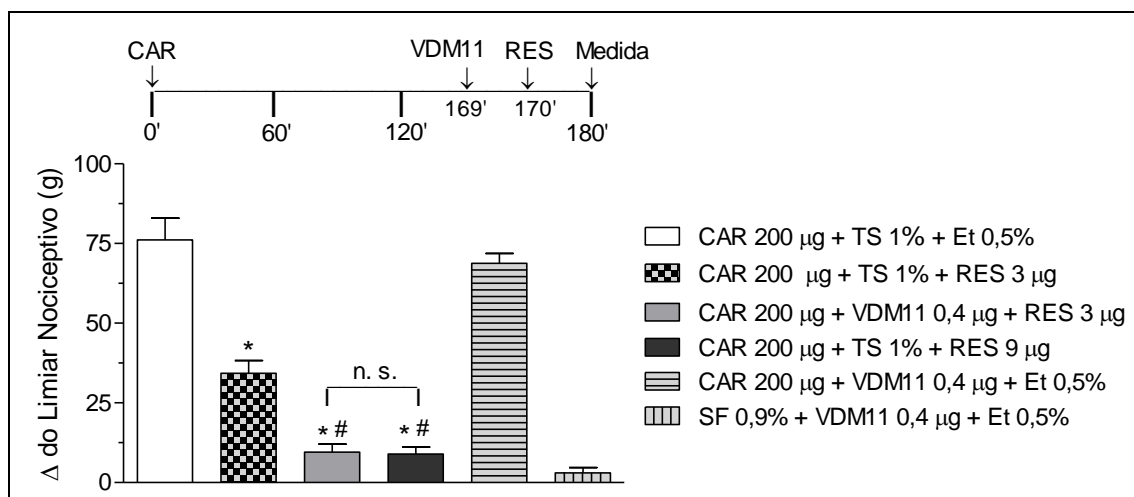


Figura 39 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com VDM11 na antinocicepção central do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 µg/pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. VDM11 (0,4 µg) e resveratrol (RES; 3 ou 9 µg) foram administrados no ventrículo lateral direito nos tempos 169 e 170 min., respectivamente. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # $P < 0,05$ em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 3 µg. n.s. = não significativo. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

4.6 Inibidores da nNOS antagonizam a antinocicepção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES)

O efeito antinociceptivo periférico do RES (100 µg/pata) foi antagonizado pelo L-NOArg (6, 12 e 24 µg/pata), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS) (Figura 40). Similarmente, um inibidor seletivo para NOS do tipo neuronal (nNOS), o L-NPA (6, 12 e 24 µg/pata) também bloqueou a antinocicepção periférica do RES (Figura 41). Além disso, tanto o L-NOArg quanto o L-NPA não induziram hipo ou hiperalgisia por si mesmos (Figuras 40 e 41). A nível central, resultados similares foram observados, L-NOArg (1,2 e 2,4 µg) e L-NPA (1,2 e 2,4 µg) reverteram a antinocicepção do RES (9 µg) administrado por via intracerebroventricular. Apesar de isoladamente não induzirem nenhum efeito significativo sobre o limiar nociceptivo (Figuras 42 e 43).

Resultados

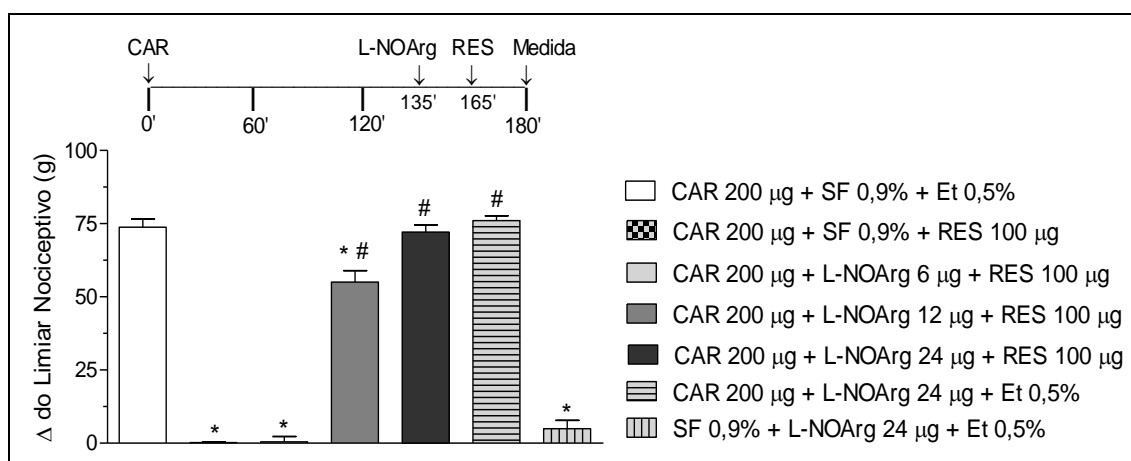


Figura 40 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com L-NOArg na antinocicepção periférica do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 µg/pata) e resveratrol (RES; 100 µg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. L-NOArg (6, 12 ou 24 µg/pata) foi administrado no tempo 135 min. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # P<0,05 em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 100 µg. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

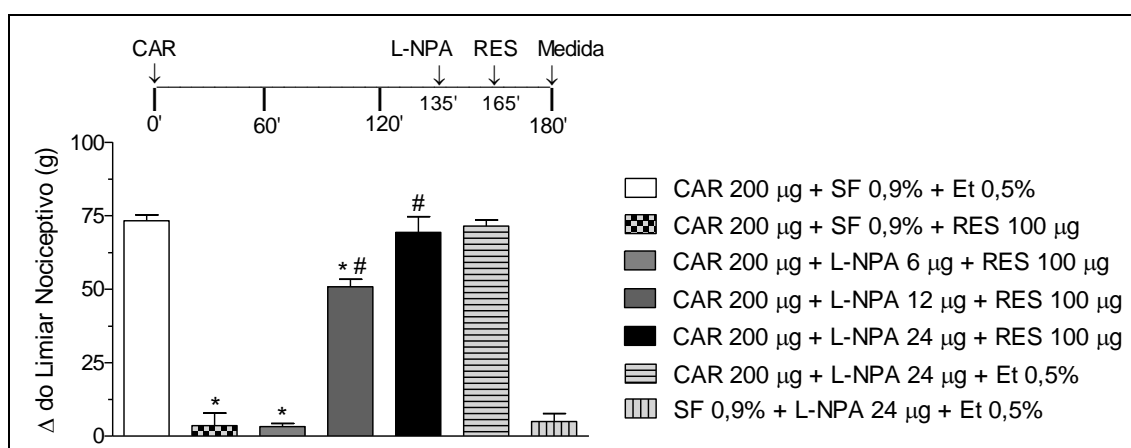


Figura 41 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com L-NPA na antinocicepção periférica do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 µg/pata) e resveratrol (RES; 100 µg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. L-NPA (6, 12 ou 24 µg/pata) foi administrado no tempo 135 min. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # P<0,05 em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 100 µg. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

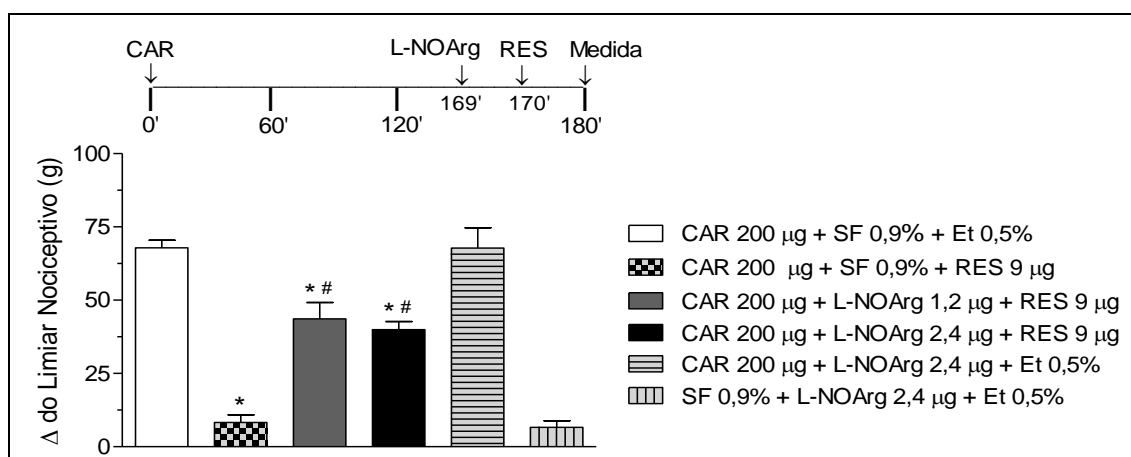


Figura 42 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com L-NOArg na antinocicepção central do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. CAR (200 µg/pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. L-NOArg (1,2 ou 2,4 µg) e resveratrol (RES; 9 µg) foram administrados no ventrículo lateral direito nos tempos 169 e 170 min., respectivamente. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * P<0,05 em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # P<0,05 em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 9 µg. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

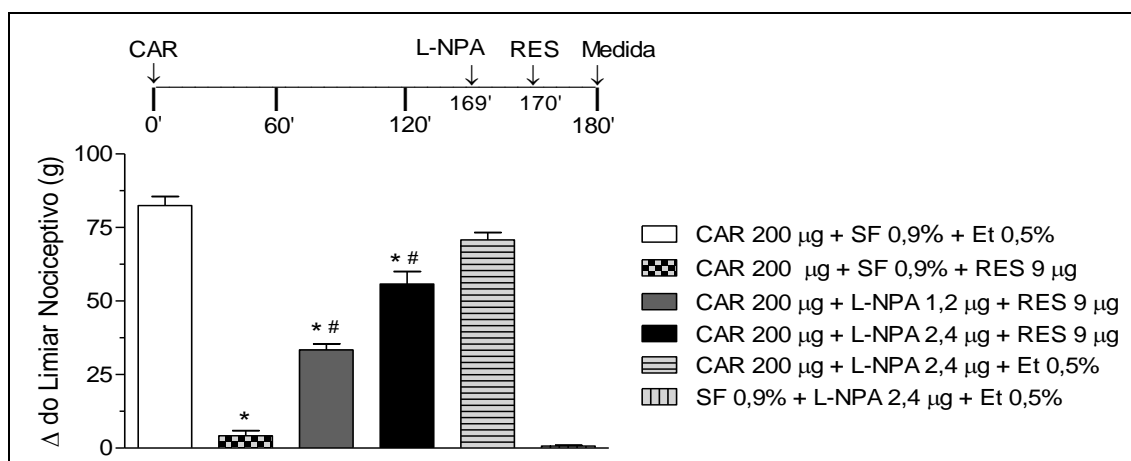


Figura 43 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com L-NPA na antinocicepção central do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. CAR (200 µg/pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. L-NPA (1,2 ou 2,4 µg) e resveratrol (RES; 9 µg) foram administrados no ventrículo lateral direito nos tempos 169 e 170 min., respectivamente. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * P<0,05 em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # P<0,05 em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 9 µg. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

4.7 Inibidores da guanilato ciclase solúvel (GCs) e da fosfodiesterase (PDE) inibem e intensificam, respectivamente, a antinociceção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES)

O inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCs), o ODQ (25, 50 e 100 µg/pata), preveniu o efeito antinociceptivo periférico do RES (100 µg/pata) de uma maneira dependente da dose (Figura 44). Além disso, o zaprinast (ZAP), um inibidor da fosfodiesterase (PDE), quando administrado em dose não antinociceptiva (50 µg/pata), intensificou o efeito antinociceptivo periférico da dose intermediária de RES (50 µg/pata) (Figura 45). ODQ e zaprinast, nas doses mais altas, não apresentaram efeito quando injetados isoladamente em patas normais ou hiperalgésicas. Observações análogas foram feitas a nível central, ODQ (5 e 10 µg) e ZAP (5 µg) antagonizaram e intensificaram, respectivamente, a antinociceção induzida pelo RES (3 e 9 µg) administrado diretamente no ventrículo lateral direito (Figuras 46 e 47).

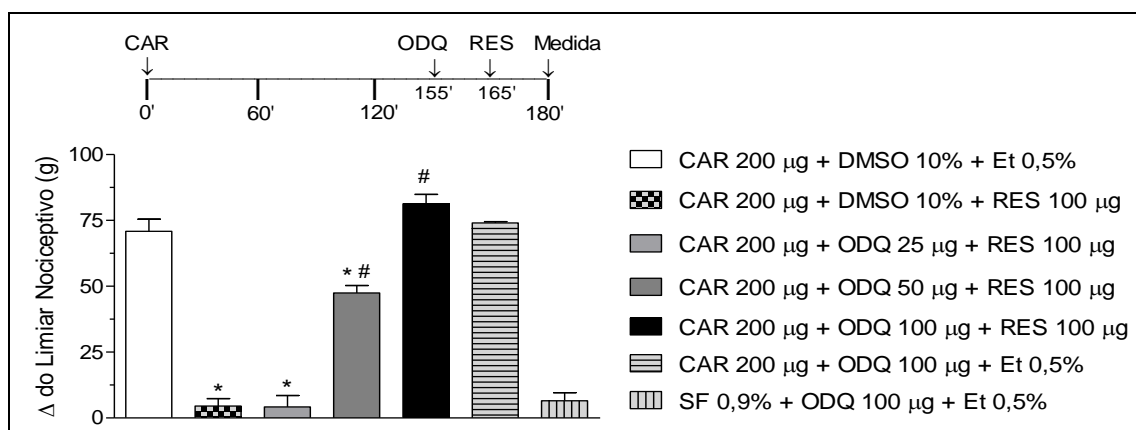


Figura 44 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com ODQ na antinociceção periférica do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 µg/pata) e resveratrol (RES; 100 µg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. ODQ (25, 50 ou 100 µg/pata) foi administrado no tempo 155 min. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. #P<0,05 em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 100 µg. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

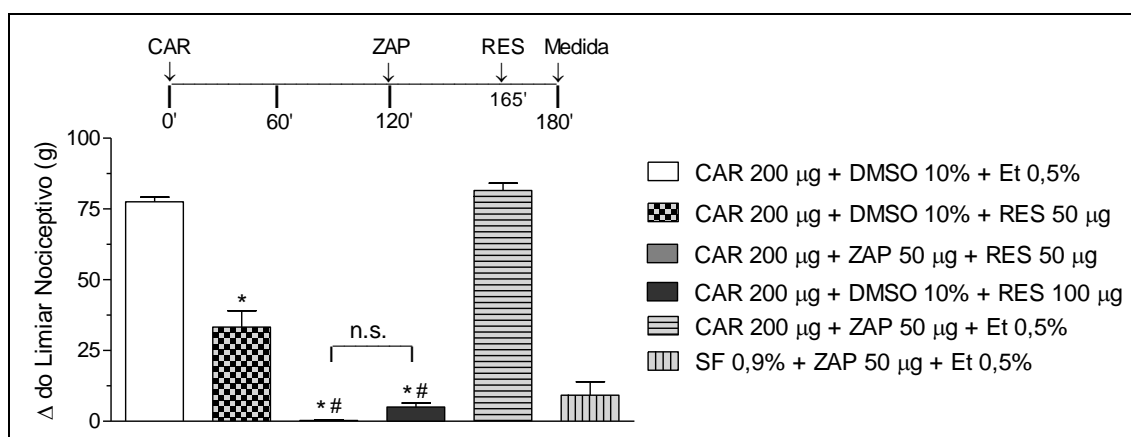


Figura 45 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com zaprinast (ZAP) na antinociceção periférica do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. Carragenina (CAR; 200 μg/pata) e resveratrol (RES; 50 ou 100 μg/pata) foram administrados na pata posterior direita nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. ZAP (50 μg/pata) foi administrado no tempo 120 min. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. *P<0,05 em relação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + Et. 0,5%. #P<0,05 em comparação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + RES 50 μg. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

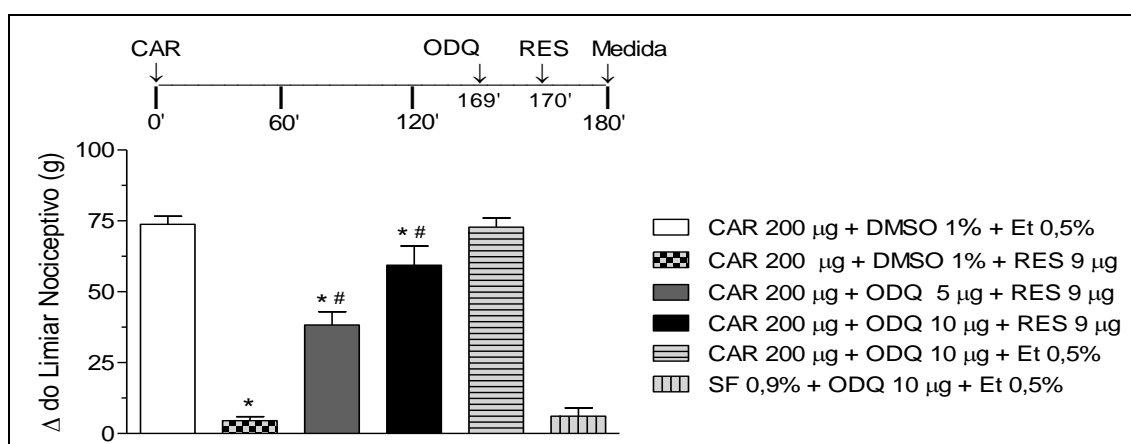


Figura 46 - Efeito induzido pelo pré-tratamento com ODQ na antinociceção central do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. CAR (200 μg/pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. ODQ (5 ou 10 μg) e resveratrol (RES; 9 μg) foram administrados no ventrículo lateral direito nos tempos 169 e 170 min., respectivamente. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * P<0,05 em relação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # P<0,05 em comparação ao grupo CAR 200 μg + SF 0,9% + RES 9 μg. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

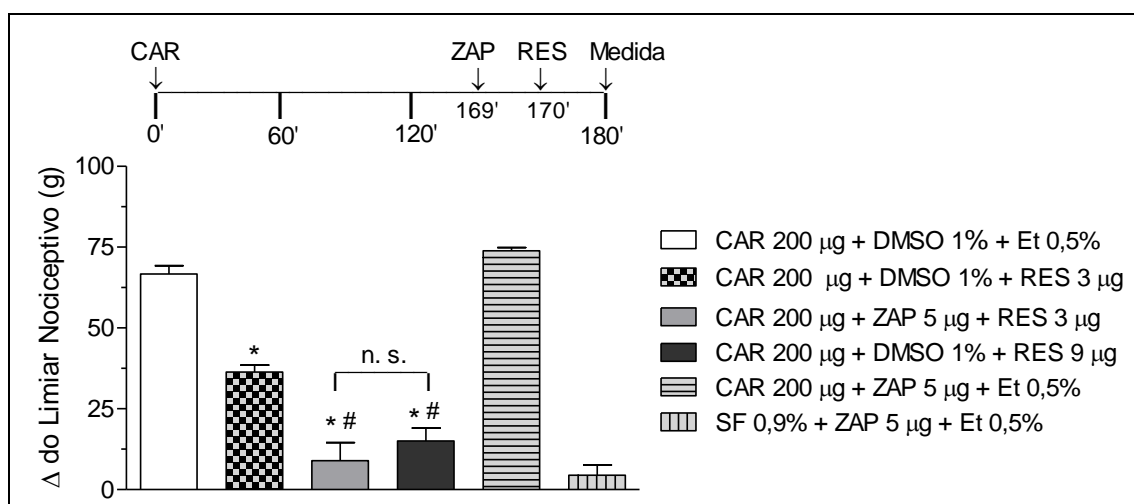


Figura 47 - Intensificação induzida pelo pré-tratamento com zaprinast (ZAP) na antinociceção central do resveratrol (RES). A resposta antinociceptiva foi medida pelo teste de compressão da pata. CAR (200 µg/pata) foi administrada na pata posterior direita no tempo 0. Zaprinast (ZAP; 5 ou 10 µg) e resveratrol (RES; 3 ou 9 µg) foram administrados no ventrículo lateral direito nos tempos 169 e 170 min., respectivamente. Todas as medidas 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) para 5 camundongos por grupo. * P<0,05 em relação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + Et. 0,5%. # P<0,05 em comparação ao grupo CAR 200 µg + SF 0,9% + RES 3 µg. Δ denota a diferença entre a média do limiar nociceptivo obtido antes de qualquer injeção (tempo zero) e a média do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de CAR. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

4.8 Avaliação da atividade da nNOS e dos níveis nitrito [NO₂⁻] durante a antinociceção central e periférica mediada pelo resveratrol (RES)

A expressão de nNOS total permaneceu a mesma entre todos os grupos testados. A administração intraplantar de resveratrol ou de carragenina não alterou a expressão desse tipo enzimático em nenhuma situação avaliada (Figura 48). Entretanto, a injeção de carragenina diminuiu o funcionamento da nNOS, estimulando o aumento do nível de fosforilação no local de inativação da nNOS (Ser852). Interessantemente, a administração de resveratrol impediu a diminuição do funcionamento da nNOS, reduzindo a fosforilação da nNOS^{Ser852} (Figura 49). A nível central também foi observada redução da fosforilação na nNOS^{Ser852} associada ao resveratrol (Figuras 50 e 51).

Resultados

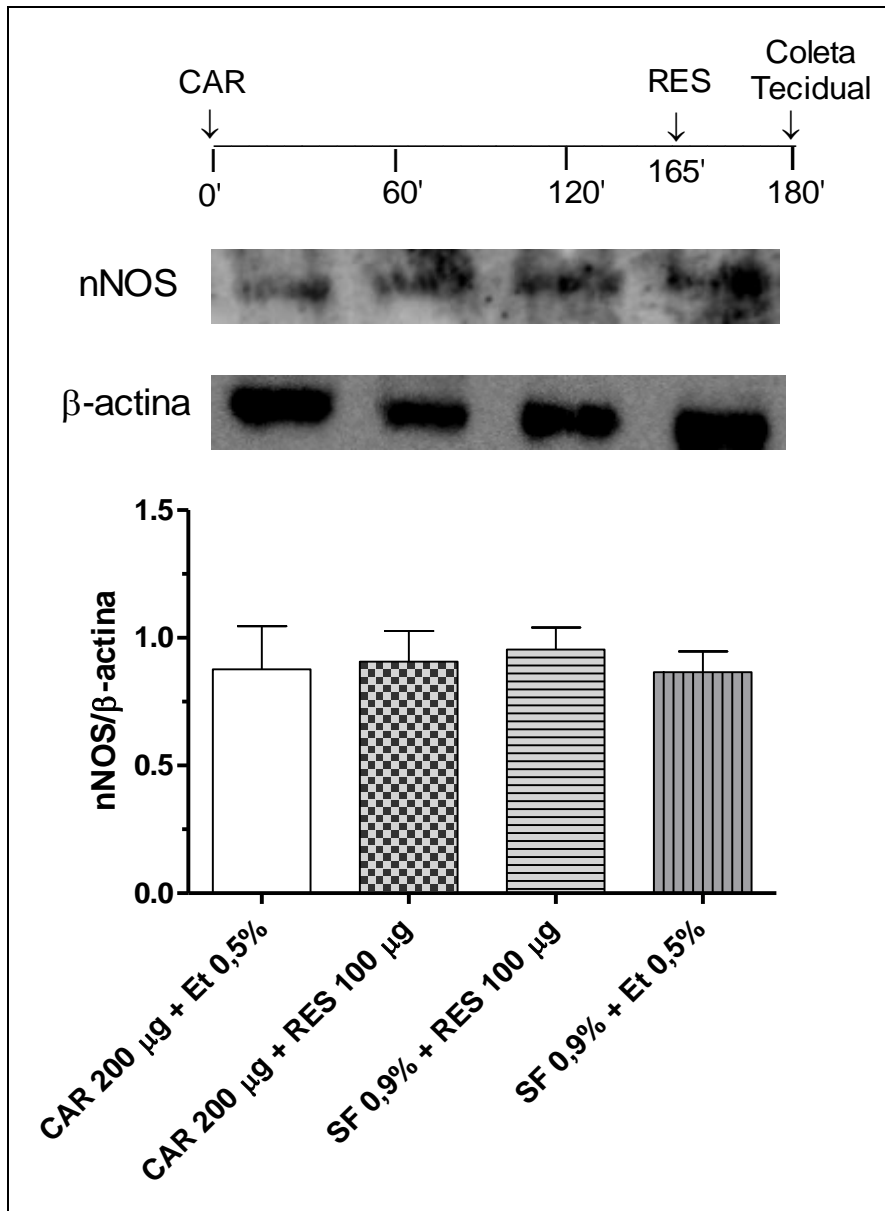


Figura 48 - Análise por Western-blot da expressão de nNOS na superfície plantar da pata posterior de camundongos. Foram administrados por via intraplantar carragenina (CAR; 200 μ g/pata) e resveratrol (RES; 100 μ g/pata), ou respectivos veículos, nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. As amostras foram coletadas para análise no tempo 180 min. (diagrama sobre o gráfico). Imagens representativas para diferentes grupos experimentais também estão localizadas sobre o gráfico. Cada coluna representa a média \pm E.P.M para 5 camundongos por grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos. Análises estatísticas: ANOVA unidirecional seguido de pós-teste de Bonferroni. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

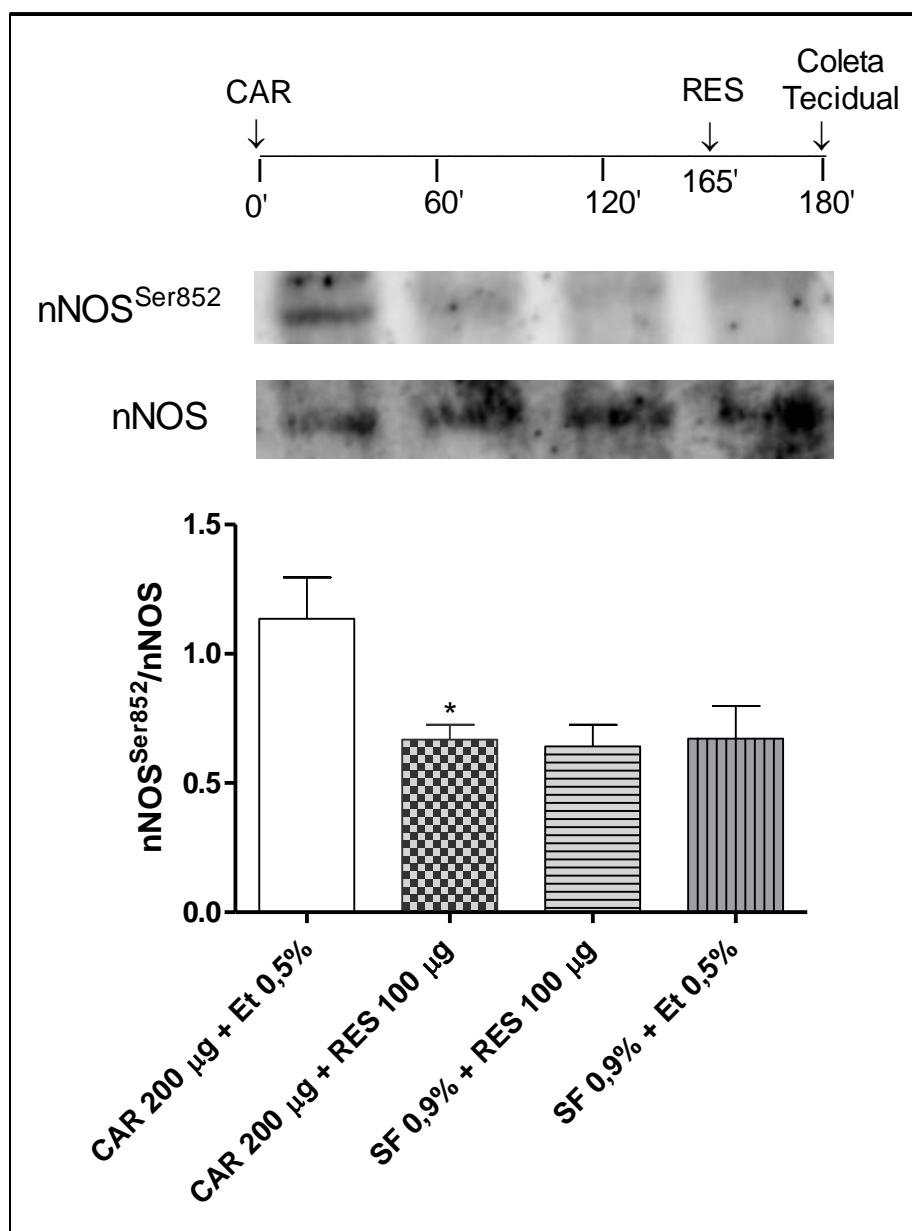


Figura 49 - Análise por Western-blot do nível de fosforilação da nNOS^{Ser852} na superfície plantar da pata posterior de camundongos. Foram administrados por via intraplantar carragenina (CAR; 200 µg/pata) e resveratrol (RES; 100 µg/pata), ou respectivos veículos, nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. As amostras foram coletadas para análise no tempo 180 min. (diagrama sobre o gráfico). Imagens representativas para diferentes grupos experimentais também estão localizadas sobre o gráfico. Cada coluna representa a média ± E.P.M para 5 camundongos por grupo. * P<0,05 em comparação com o grupo CAR 200 µg + Et 0,5%. SF 0,9% = Solução Fisiológica. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

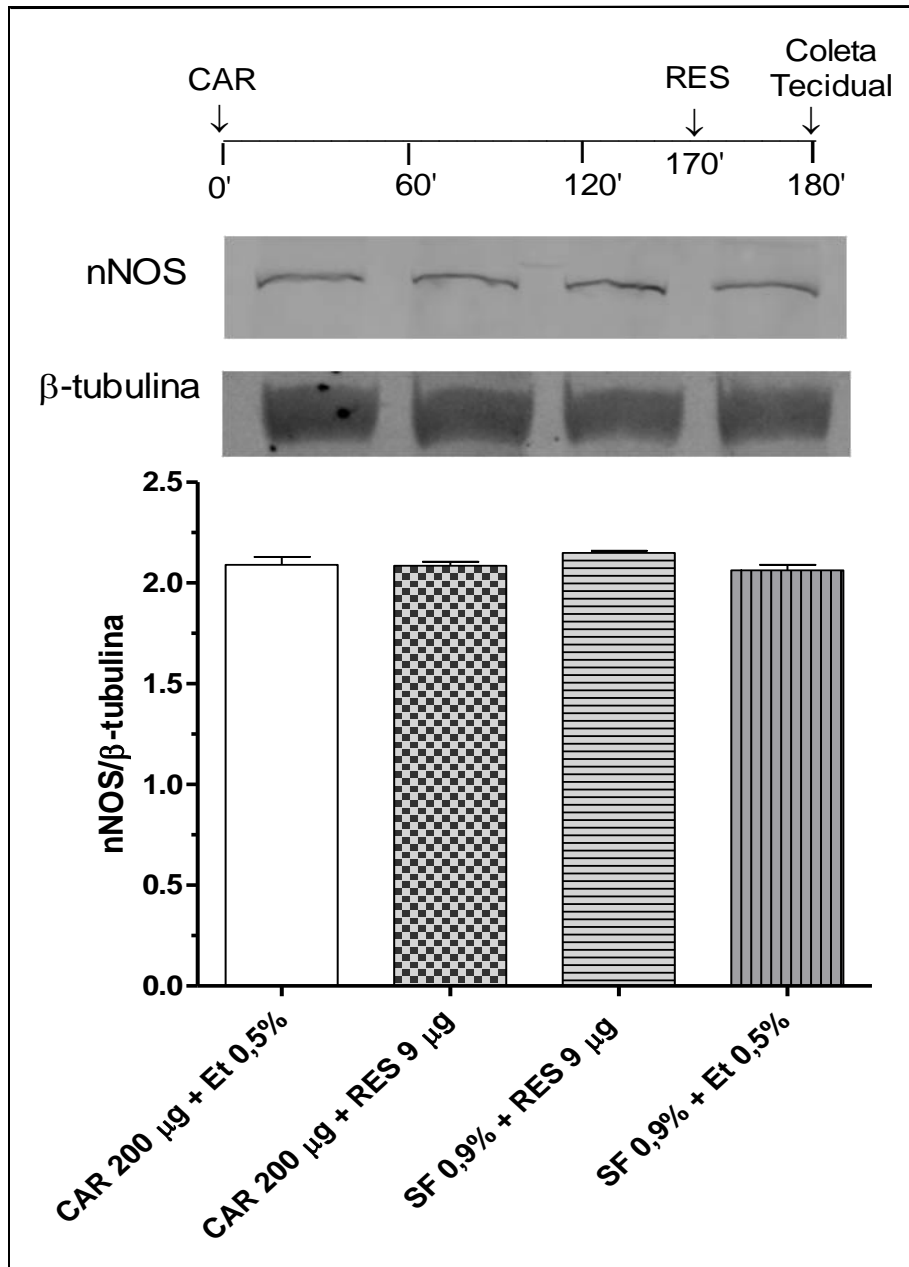


Figura 50 - Análise por Western-blot da expressão de nNOS no mesencéfalo de camundongos. Foram administrados por via intraplantar carragenina (CAR; 200 μ g/pata) e intracerebroventricular resveratrol (RES; 9 μ g), ou respectivos veículos, nos tempos 0 e 170 min., respectivamente. As amostras foram coletadas para análise no tempo 180 min. (diagrama sobre o gráfico). Imagens representativas para diferentes grupos experimentais também estão localizadas sobre o gráfico. Cada coluna representa a média \pm E.P.M para 5 camundongos por grupo. Não houve diferença significativa entre os grupos. Análises estatísticas: ANOVA unidirecional seguido de pós-teste de Bonferroni. SF 0,9% = Solução Fisiológica 0,9%. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

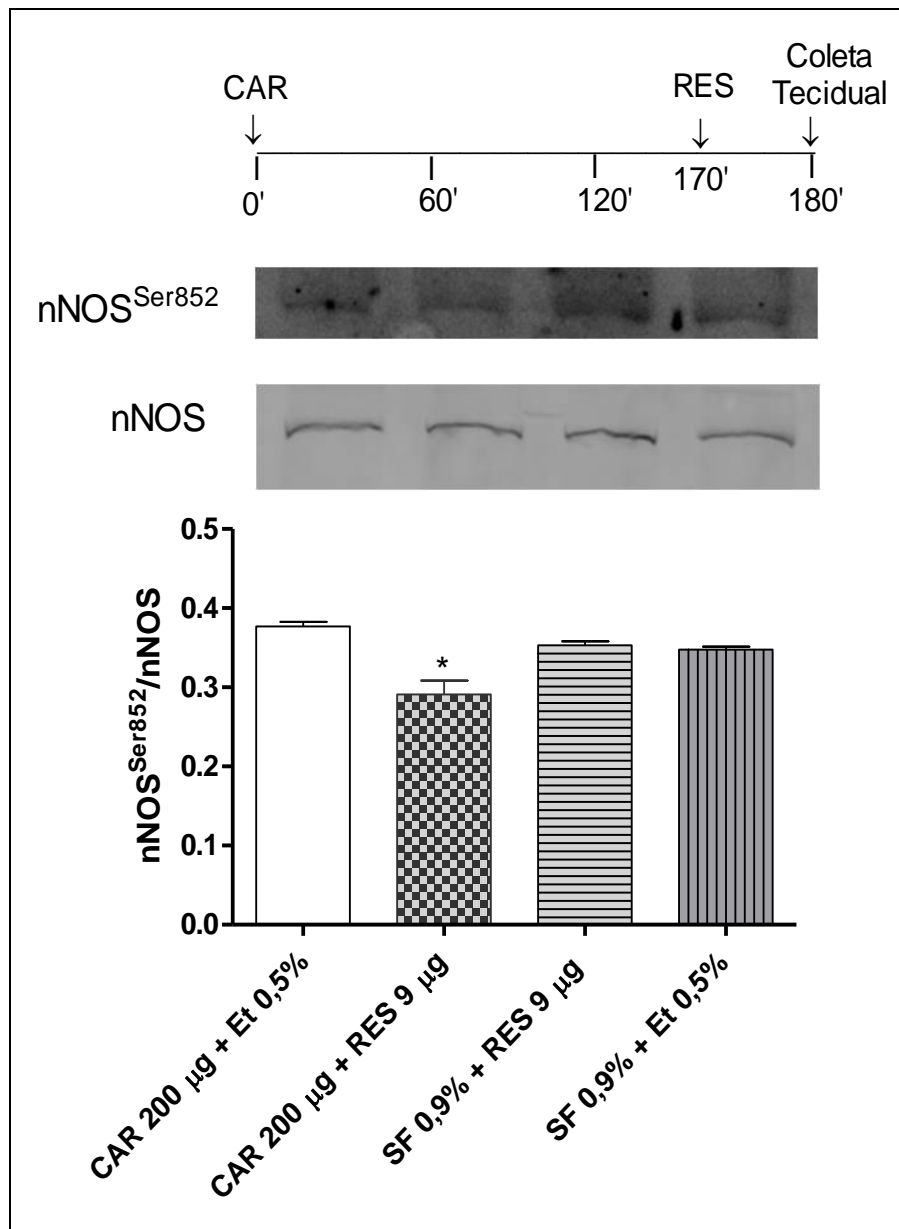


Figura 51 - Análise por Western-blot do nível de fosforilação da nNOS^{Ser852} no mesencéfalo de camundongos. Foram administrados por via intraplantar carragenina (CAR; 200µg/pata) e via intracerebroventricular resveratrol (RES; 9 µg), ou respectivos veículos, nos tempos 0 e 170 min., respectivamente. As amostras foram coletadas para análise no tempo 180 min. (diagrama sobre o gráfico). Imagens representativas para diferentes grupos experimentais também estão localizadas sobre o gráfico. Cada coluna representa a média ± E.P.M para 5 camundongos por grupo. * P<0,05 em comparação com o grupo CAR 200 µg + Et 0,5%. SF 0,9% = Solução Fisiológica. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

Utilizando a metodologia de Griess (Green *et al.*, 1982), foi possível detectar elevações significativas, em relação aos demais grupos, nos níveis de nitrito (NO_2^-) presentes em tecidos homogeneizados da superfície plantar da pata e do mesencéfalo, após a administração de RES por via intraplantar (100 μg /pata) ou intracerebroventricular (9 μg), respectivamente (Figuras 52 e 53).

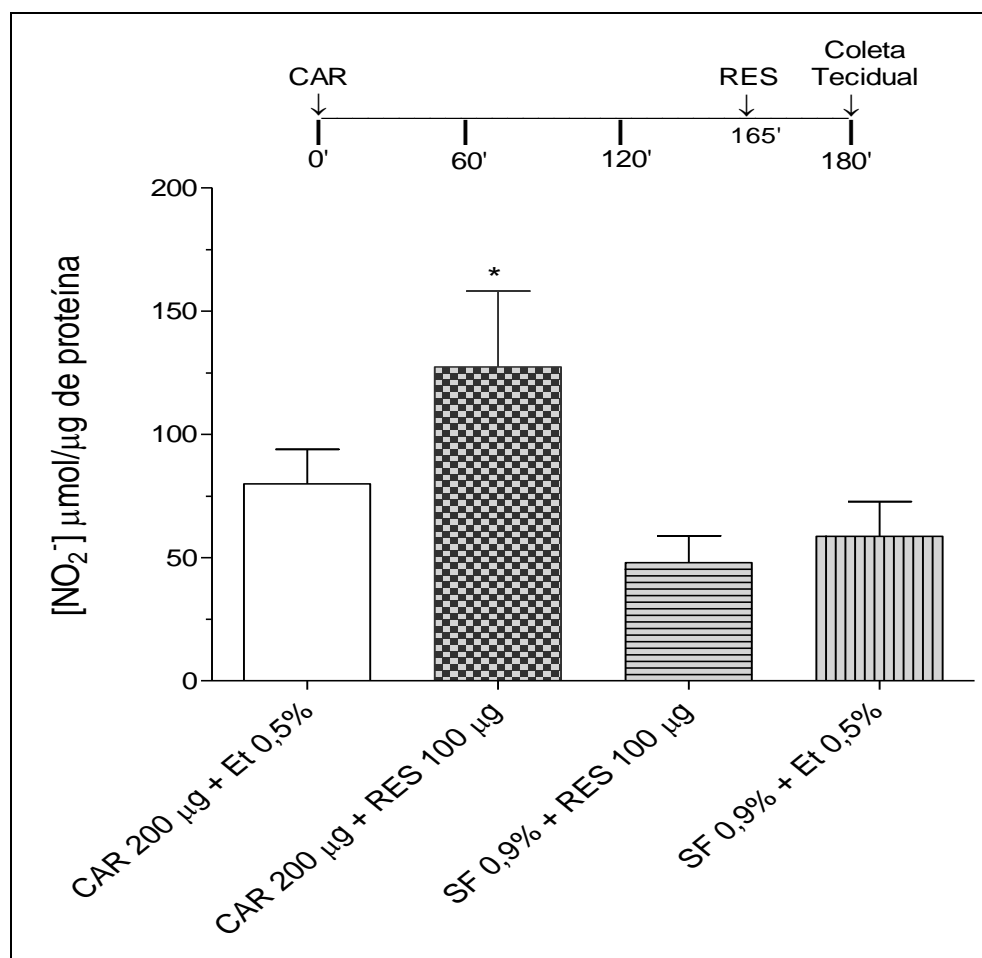


Figura 52 - Efeito da injeção intraplantar de resveratrol (RES) na concentração de nitrito $[\text{NO}_2^-]$ no tecido homogeneizado da superfície plantar da pata. Os níveis de nitrito foram medidos usando a reação de Griess. Foram administrados por via intraplantar carragenina (CAR; 200 μg /pata) e resveratrol (RES; 100 μg /pata), ou respectivos veículos, nos tempos 0 e 165 min., respectivamente. As amostras foram coletadas para análise no tempo 180 min. (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média \pm E.P.M para 5 camundongos por grupo. * $P < 0,05$ em comparação com o grupo CAR 200 μg + Et 0,5%. SF 0,9% = Solução Fisiológica. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

Resultados

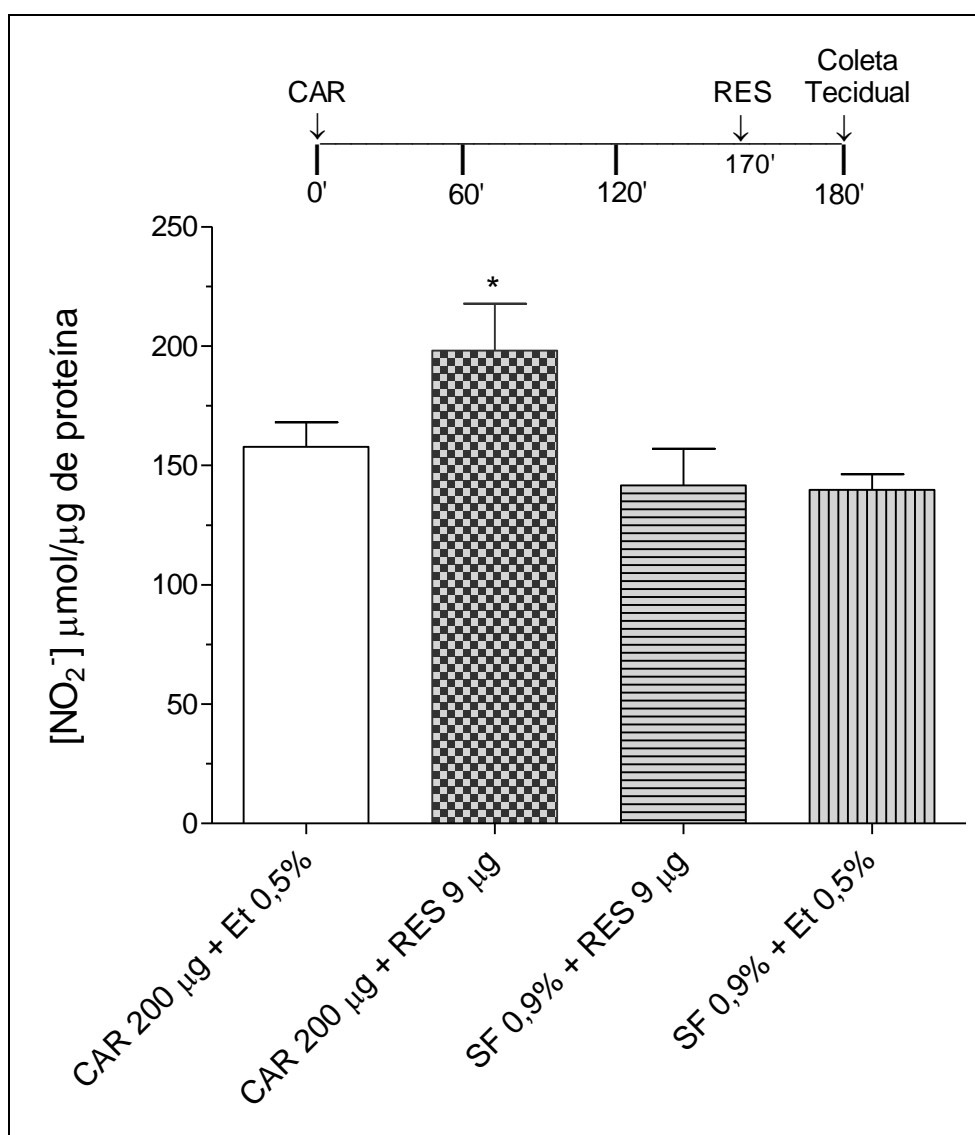


Figura 53 - Efeito da injeção intracerebroventricular de resveratrol (RES) na concentração de nitrito [NO₂] no tecido homogeneizado do mesencéfalo. Os níveis de nitrito foram medidos usando a reação de Griess. Foram administrados por via intraplantar carragenina (CAR; 200 μg/pata) e por via intracerebroventricular resveratrol (RES; 9 μg), ou respectivos veículos, nos tempos 0 e 170 min., respectivamente. As amostras foram coletadas para análise no tempo 180 min. (diagrama sobre o gráfico). Cada coluna representa a média ± E.P.M para 5 camundongos por grupo. * P <0,05 em comparação com o grupo CAR 200 μg + Et 0,5%. SF 0,9% = Solução Fisiológica. Et 0,5% = Etanol 0,5%.

5. DISCUSSÃO

Discussão

As substâncias naturais derivadas de plantas têm sido uma alternativa farmacológica para pacientes refratários a tratamentos convencionais, incluindo terapia de dor (Almeida, Navarro e Barbosa-Filho, 2001). Apesar de todo o desenvolvimento da medicina moderna, 100 compostos derivados de produtos naturais foram submetidos a ensaios clínicos apenas no final de 2013, indicando que a natureza ainda é uma fonte viável de novos candidatos a fármacos (Mishra e Tiwari, 2011; Butler, Robertson e Cooper, 2014). Entre essas substâncias naturais em ensaios clínicos, encontramos o resveratrol (RES; *trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), um composto nutracêutico com potencial para se tornar um fármaco multi-alvo. Esse polifenol não flavonóide é encontrado em cerca de 70 espécies de plantas e tem sido amplamente estudado farmacologicamente (Saiko *et al.*, 2008; Tomé-Carneiro *et al.*, 2013). Estudos em modelos animais atribuíram várias propriedades terapêuticas ao RES, tais como: (i) anticancerígeno, através da inibição de metástase e angiogênese (Ganapathy *et al.*, 2010; Lee, Ha e Kim, 2012; He *et al.*, 2017); (ii) anti-hipertensivo, associado ao relaxamento vascular dependente do endotélio, aumento da atividade de eNOS e aumento dos níveis de glutatona (Bhatt, Lokhandwala e Banday, 2011; Akar *et al.*, 2012; Alturfan *et al.*, 2012); (iii) hipolipidêmico, possivelmente por regulação da secreção hepática de lipoproteínas, metabolismo lipídico hepático e adipocítico (Jeon, Lee e Choi, 2014); (iv) anti-inflamatório, reduzindo níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 e iNOS (Inanaga *et al.*, 2009; Gómez-Zorita *et al.*, 2013; Prata *et al.*, 2017); (v) possível prolongador do tempo de vida, provavelmente envolvendo a indução de SIRT1 (Bhullar e Hubbard, 2015).

Apesar dos abundantes estudos pré-clínicos e de alguns ensaios clínicos já em andamento, muitas questões relacionadas às ações farmacológicas do RES

Discussão

permanecem incertas. Nesse contexto, a mídia e os anúncios comerciais muitas vezes entram em contraponto com a pesquisa científica (Espín, García-Conesa e Tomás-Barberán, 2007; Vang *et al.*, 2011). Os ensaios clínicos realizados até agora demonstraram os efeitos cardioprotetores do RES através da melhoria do perfil de marcadores inflamatórios (Tomé-Carneiro *et al.*, 2013). Uma vez que a dor é um dos quatro sinais cardinais de inflamação, (Lawrence, Willoughby e Gilroy, 2002) alguns estudos em animais foram direcionados para as ações analgésicas do RES (Bertelli *et al.*, 2008; Bazzo *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017). Com efeito, diversos estudos *in vivo*, já demonstraram as propriedades analgésicas do RES frente a diferentes estímulos hiperalgésicos, como por exemplo, a formalina e o glutamato (Granados-Soto, Argüelles e Ortiz, 2002; Torres-López *et al.*, 2002; Bazzo *et al.*, 2013).

Em nossas análises experimentais, o agente hiperalgésico utilizado foi a carragenina (CAR), um polissacarídeo altamente sulfatado obtido a partir de algas vermelhas comestíveis (Rhodophyceae), comumente usado como aditivo alimentar (Necas e Bartosikova, 2013). Quando injetada subcutaneamente, CAR produz inflamação local, designada pelos cinco sinais cardinais: hipersensibilidade, eritema, edema, calor e perda de função (Winter, Risley e Nuss, 1962). A hipernocicepção mecânica induzida por CAR na pata de camundongos já foi detalhadamente descrita (Cunha *et al.*, 2005), o processo começa com a ação de duas citocinas principais, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e quimiocinas derivadas de queratinócitos (KC), sendo essa última envolvida na liberação de aminas simpaticomiméticas. Além disso, tanto TNF- α como KC estimulam a liberação de interleucina 1 β (IL-1 β), a qual, por sua vez, estimula a liberação de prostaglandinas. A resultante dessa cascata é a sensibilização

Discussão

de nociceptores (hipernocicepção), ou seja, mediadores inflamatórios são capazes de reduzir o limiar de ativação dos neurônios nociceptivos (Cunha *et al.*, 2005).

Nossos resultados demonstraram que o RES, quando administrado por via intracerebroventricular em camundongos, induziu antinocicepção frente à hiperalgesia associada à ação inflamatória da CAR. Estudos prévios já demonstraram que a administração sistêmica de RES, porém por injeção intraperitoneal, também foi eficaz contra a ação hipernociceptiva da CAR (Gentili *et al.*, 2001; Pham-Marcou *et al.*, 2008). Além disso, nosso estudo extrapola os dados já previamente publicados e demonstra pela primeira vez que a administração local e aguda de RES também inibe a hipernocicepção induzida por CAR. Considerando a baixa biodisponibilidade amplamente relatada do RES (Walle, 2011), uma ação local poderia evitar esse problema farmacocinético. Outros estudos já demonstraram o efeito local do RES frente diferentes estímulos nociceptivos (Granados-Soto, Argüelles e Ortiz, 2002; Torres-López *et al.*, 2002; Bazzo *et al.*, 2013). Além disso, a injeção local de RES atenua a alodinia induzida por incisão cirúrgica em camundongos e fornece alívio na dor nociceptiva trigeminal em ratos (Tillu *et al.*, 2012; Shimazu *et al.*, 2016), corroborando nossos resultados.

A administração sistêmica de RES, em ratos e camundongos, tem sido relacionada à supressão da tolerância à morfina (Han *et al.*, 2014; He *et al.*, 2014), o que reduziria o uso de doses cada vez maiores de agonistas opioides para induzir uma analgesia efetiva, minimizando a possibilidade de efeitos adversos. Por conseguinte, estudos anteriores demonstraram que a ação antinociceptiva de RES administrado por via intraperitoneal foi revertida pela naloxona, um antagonista não seletivo para receptores opioides (Gupta, Sharma e Briyal, 2004; Kokuba *et al.*, 2017).

Discussão

Demonstrando, dessa forma, o envolvimento da via opioide na ação antinociceptiva do RES. A fim de aprofundarmos tal estudo, nos propomos a avaliar quais receptores opióides poderiam estar envolvidos nesse processo. Além disso, nos propomos a avaliar o possível envolvimento de agonistas opióides endógenos no efeito antinociceptivo da substância em questão.

Em nossos experimentos, pudemos observar que a administração intraplantar ou intracerebroventricular de naloxona em camundongos, realizada previamente ao tratamento com o RES, administrado pelas mesmas vias, reverteu de maneira dose dependente a antinocicepção associada a essa substância de origem natural. Dessa forma, nossas observações experimentais sustentam a hipótese de que a ação antinociceptiva do RES envolva a ativação do sistema opioide, seja a nível central ou periférico.

No sistema nervoso central, os receptores opioides são expressos no corno dorsal da medula espinhal e em regiões cerebrais diversas, tais como o tálamo, córtex cerebral, substância cinzenta periaquedutal, medula rostral ventromedial e amígdala (Mansour A, H e Lewis ME, 1988). Já a nível periférico, os receptores opioides podem ser encontrados em neurônios sensoriais, macrófagos, neutrófilos e queratinócitos (Stein *et al.*, 1990; Coggeshall, Zhou e Carlton, 1997; Bigliardi *et al.*, 2009). Essa ampla distribuição dos receptores opioides no organismo está em conformidade com a nossa proposta de envolvimento do sistema opioide na ação antinociceptiva do RES administrado tanto localmente (via intraplantar), quanto centralmente (via intracerebroventricular).

Os agonistas ou antagonistas opioides podem exercer os seus efeitos por meio da interação com quatro diferentes tipos de receptores opioides acoplados a proteínas

Discussão

$G_{i/o}$: Mu (μ), kappa (κ), delta (δ) e like-1 (L1), sendo esse último o menos caracterizado. O sinal de transdução clássico dos receptores opioides está relacionado à sua capacidade de modular canais para íons de potássio e cálcio, com a consequente hiperpolarização celular e inibição da atividade neuronal (Al-Hasani e Bruchas, 2011). Estudos prévios já demonstraram o potencial do RES de modular canais para cálcio frente a várias patologias, incluindo condições dolorosas (McCalley *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). Uma vez que o envolvimento dos receptores opioides foi observado na ação antinociceptiva periférica e central induzida pelo RES, nosso próximo passo foi avaliar a seletividade desse processo.

O papel dos receptores opioides do tipo μ , δ e κ foi investigado usando seus respectivos antagonistas seletivos, todos eles injetados previamente à administração (intraplantar ou intracerebroventricular) de RES. O antagonista seletivo para o receptor opioide do tipo μ , clocinnamox, inibiu de maneira dose dependente a resposta antinociceptiva periférica e central do RES. O naltrindole, por sua vez, um antagonista seletivo para receptores opioides do tipo δ , antagonizou a atividade antinociceptiva do RES somente a nível central e não a nível periférico. E, por fim, a nor-binaltorfimina, um antagonista seletivo para receptores opioides do tipo κ , não antagonizou a antinocicepção do RES, nem periférica e nem centralmente. No entanto, todas essas drogas, nas mesmas doses, conseguiram reverter a ação antinociceptiva periférica de outras substâncias analgésicas em um modelo experimental similar (Pacheco, Romero e Duarte, 2014; Veloso *et al.*, 2014; Pacheco *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2017). Nossos resultados sugerem a participação dos receptores opioides μ e δ no efeito antinociceptivo central do RES e somente participação do receptor μ na antinocicepção do RES a nível periférico. Além disso, também pudemos deduzir que

Discussão

receptores do tipo κ parecem não estar envolvidos na antinocicepção tanto periférica quanto central mediada pelo RES.

Um estudo pioneiro relatou a ausência de propriedades analgésicas e adictivas da morfina em ratos *knockout* para receptores μ , evidenciando o papel-chave desse receptor tanto nos efeitos desejáveis (analgésicos) quanto nos efeitos indesejáveis (efeitos adversos) dos opioides. As propriedades analgésicas associadas aos receptores do tipo μ , já amplamente relatadas (Labuz *et al.*, 2007), sustentam fortemente nossas observações sobre o envolvimento desse tipo específico de receptor na antinocicepção via RES.

Em relação ao envolvimento de receptores do tipo δ na antinocicepção do RES somente a nível central, a substância cinzenta periaquedutal (SCP) mesencefálica contém altas concentrações de peptídeos opióides endógenos e receptores opioides do tipo μ e δ (Yaksh, Al-Rodhan e Jensen, 1988). A ativação de qualquer um desses receptores pode produzir uma antinocicepção potente em sítios supraespinhais e também ativar as vias descendentes modulatórias da dor (Smith *et al.*, 1988; Pavlovic e Bodnar, 1998), o que suporta anatômica e fisiologicamente os nossos resultados.

Uma vez que o RES não pode ser considerado um análogo estrutural da morfina, sua interação direta com os receptores opioides se torna pouco provável. Porém, a ação antinociceptiva de outros compostos não opioides, como clonidina, celecoxib, quetamina e xilazina também tem sido associada à ativação do sistema opioide (Nakamura e Ferreira, 1988; França *et al.*, 2006; Romero, Pacheco e Duarte, 2013; Pacheco, Romero e Duarte, 2014b). Dessa forma, podemos inferir que a antinocicepção do RES via sistema opioide ocorra por meio da ativação indireta dos receptores opioides.

Discussão

A modulação da dor pelo sistema opioide está associada à ação de ligantes endógenos, os quais têm sido explorados no desenvolvimento de novas terapias analgésicas. As drogas capazes de inibir a degradação de opioides endógenos têm sido descritas como analgésicas (Ballantyne e Sullivan, 2017; Donvito *et al.*, 2018). Nesse contexto, avaliamos o envolvimento de opioides endógenos na antinocicepção periférica e central do RES, um potencial indutor da ativação de receptores opioides, de acordo com nossos resultados anteriormente descritos. Para isso, nós utilizamos a bestatina, um inibidor da aminopeptidase-N, enzima envolvida na degradação de opioides endógenos. A dose utilizada foi sub-terapêutica, de tal forma que, a bestatina não induziu efeito por si só. No entanto, a administração da dose intermediária do RES, após a injeção da bestatina, induziu uma antinocicepção semelhante à antinocicepção induzida pela dose máxima de RES, sugerindo o envolvimento de opioides endógenos na antinocicepção central e periférica do RES.

Três tipos peptídicos principais de opioides endógenos já foram identificados até o momento, a β -endorfina, as encefalinas e as dinorfinas, as quais se ligam com maior afinidade aos receptores opioides do tipo μ , δ e κ , respectivamente (Akil *et al.*, 1997). Uma vez que, em nossos resultados, a antinocicepção periférica do RES foi associada ao receptor opioide do tipo μ , mas não do tipo δ ou κ , nós podemos sugerir que o opioide endógeno envolvido na ação antinociceptiva periférica do RES seja a β -endorfina. Já a nível central, uma vez que foi evidenciado experimentalmente o envolvimento de receptores opioides do tipo μ e δ , de acordo com os dados descritos na literatura, pode-se pressupor que centralmente haja não somente o envolvimento da β -endorfina, mas também das encefalinas.

Discussão

Uma hipótese de como o RES estaria induzindo a liberação de opioides endógenos, seria por intermédio de receptores estrogênicos membranares. A estrutura química do RES é similar a estrutura de um agonista estrógeno sintético, o dietilestilbestrol (Gehm *et al.*, 1997). Corroborando tal analogia estrutural, estudos prévios têm sugerido a interação direta do RES com receptores estrogênicos (Kopp, 1998; Bowers *et al.*, 2000). Dessa forma, o RES é capaz de gerar respostas similares aos estrógenos endógenos, podendo ser considerado um fitoestrógeno. Adicionalmente, numerosos trabalhos têm relatado evidências de uma possível interação dos estrógenos com o sistema opioide (Smith *et al.*, 2006). Receptores de estrógeno já foram detectados em células nervosas imunorreativas para β -endorfina (Lehman e Karsch, 1993). Níveis de dinorfina aumentam gradualmente por toda a medula espinhal à medida que o período gestacional de ratas da linhagem Sprague-Dawley progride (Medina, Dawson-Basoa e Gintzler, 1993). Ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno tiveram seus níveis de leu-encefalina aumentados e receptores de estrógeno do tipo β já foram co-localizados em terminais nervosos onde havia marcação de leu-encefalinas (Torres-Reveron *et al.*, 2008). Adicionalmente, na mesma espécie animal, os níveis de leu-encefalina e dinorfina do tipo B foram significativamente menores durante períodos com baixos níveis de estrógeno circulante (diestro), quando comparado a períodos em que os níveis estrogênicos são maiores (proesto e estro) (Roman *et al.*, 2006). Por outro lado, mulheres com baixos níveis de estradiol demonstram uma menor capacidade de ativar o sistema opioide endógeno frente ao estímulo doloroso (Zubieta *et al.*, 2002), evidenciando assim uma clara interação entre os estrógenos e o sistema opioide.

Discussão

Apesar da sinalização clássica dos estrógenos envolver receptores nucleares e modulação de transcrições gênicas, o que evidentemente não seria passível de ocorrer de forma rápida, uma sinalização estrogênica alternativa tem sido bem caracterizada. Tal sinalização é capaz de gerar efeitos não genômicos, desencadeados dentro de segundos ou minutos. Esses efeitos rápidos também podem ser mediados pelos receptores estrogênicos clássicos (α ou β), porém, quando os mesmos se encontram na membrana plasmática e não no núcleo (Levin, 2009). Uma vez ativados, os receptores de estrógenos associados à membrana podem gerar elevação nos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), aumento do influxo de cálcio e ativação de enzimas, como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e a proteína quinase B (PKB ou AKT) (Irnaten, Blanchard-Gutton e Harvey, 2008; Levin, 2009). Nesse contexto, sugerimos que o RES talvez possa induzir a liberação de opioides endógenos por meio de interação prévia com os receptores estrogênicos do tipo membranares.

Ainda em relação ao sistema opioidérgico, diversos estudos têm sugerido que o mesmo, quando ativado, pode levar a ativação do sistema canabinoide. Dentre os quais, podemos citar um estudo desenvolvido em nosso laboratório de pesquisa, o qual evidencia a participação de endocanabinoides e receptores canabinoides do tipo CB₁ na antinocicepção central (Pacheco *et al.*, 2009) e periférica (Pacheco *et al.*, 2008) induzida pela morfina. Além disso, já foi verificado que a antinocicepção induzida pela morfina e pelo delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), administrados sistematicamente, não foi modificada em camundongos *knockout* para receptores canabinoides ou opioides, respectivamente (Valverde *et al.*, 2000; Ghozland *et al.*, 2002). No entanto, a morfina administrada por via intraplantar mostrou um efeito antinociceptivo reduzido no teste de formalina em animais *knockout* para receptores

Discussão

canabinoides (Desroches *et al.*, 2014). Adicionalmente, vários estudos relatam o envolvimento de receptores opioides do tipo μ e δ , na ação antinociceptiva do Δ^9 -THC em animais de tipo selvagem (Welch, 1993; Smith, Welch e Martin, 1994; Reche, Fuentes e Ruiz-Gayo, 1996b, 1996a).

O sistema opioide parece estar relacionado tanto funcionalmente, quanto anatomicamente, com o sistema canabinoide (Desroches e Beaulieu, 2010), o qual consiste em pelo menos dois receptores canabinoides 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. Receptores canabinoides do tipo CB₁ são expressos principalmente no sistema nervoso central e periférico (Herkenham *et al.*, 1991), enquanto que o receptor canabinoide do tipo CB₂ é encontrado principalmente em células imunológicas periféricas e cerebrais (Galiegue *et al.*, 1995; Benito *et al.*, 2008). Assim como os receptores opioides, receptores canabinoides são receptores acoplados a proteína G_{i/o}. Além disso, os receptores opioides e canabinoides compartilham propriedades similares de transdução de sinal, além de induzir efeitos biológicos por vezes semelhantes, incluindo a analgesia (Desroches e Beaulieu, 2010).

Dessa forma, uma vez já relatado o envolvimento do sistema opioidérgico na antinocicepção induzida pelo RES e considerando as evidências científicas sobre a existência de uma possível interação entre os sistemas opioidérgico e canabinoidérgico, nos propomos a avaliar também o envolvimento da via canabinoidérgica no efeito antinociceptivo do produto natural em questão.

Com o propósito de analisar o envolvimento dos receptores canabinoides na ação antinociceptiva do RES, nós utilizamos o AM251 e o AM630, antagonistas

Discussão

seletivos para receptores canabinoides do tipo CB₁ e CB₂, respectivamente. AM251 inibiu de forma dose dependente a antinocicepção periférica e central do RES. Diferentemente do AM630, o qual não reverteu o efeito antinociceptivo do RES nem periférica nem centralmente. Por outro lado, quando utilizado na mesma dosagem, AM630 foi capaz de reverter a antinocicepção induzida pela palmitoletanolamina (PEA) (Romero *et al.*, 2013). Sendo assim, nossos dados sugerem o envolvimento do receptor CB₁, mas não do receptor CB₂, na antinocicepção periférica e central do RES.

Estudos prévios já descreveram a co-localização anatômica de receptores opioides μ e receptores canabinoides CB₁ em neurônios do corno dorsal da medula espinhal, um importante local de transmissão sináptica dos nociceptores periféricos (Hohmann, Briley e Herkenham, 1999; Salio *et al.*, 2001). Além disso, a forma de heterodímero funcional μ /CB₁ já foi relatada (Hojo *et al.*, 2008), suportando anatomicamente nossa hipótese de que o RES seja capaz de ativar tanto receptores opioides quanto receptores canabinoides, provavelmente de forma indireta, considerando sua estrutura molecular não análoga da morfina.

Supondo a também possível ativação indireta de receptores canabinoides pelo RES e considerando a existência de agonistas canabinoides endógenos (Di Marzo, Bifulco e Petrocellis, 2004), decidiu-se verificar o envolvimento de endocanabinoides na antinocicepção via RES. Para isso utilizou-se como ferramenta farmacológica o VMD11 e o MAFP, respectivamente, um inibidor do transportador membranar de anandamida (AMT) e um inibidor da amida hidrolase de ácido graxo (*FAAH*, do inglês *fatty acid amide hydrolase*), enzima envolvida na hidrólise da anandamida. Tanto o VDM11, quanto o MAFP, quando utilizados em sub-doses, intensificaram o efeito de

Discussão

doses intermediárias do RES, tanto a nível central quanto a nível periférico, o que nos aponta para o provável envolvimento de endocanabinoides nesse processo.

Os dois agonistas endocanabinoides mais bem estudados são a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), o primeiro se liga preferencialmente ao receptor canabinoide CB₁ e o último parece ativar tanto CB₁ quanto CB₂ (Di Marzo, Bifulco e Petrocellis, 2004). Uma vez que encontramos evidências do envolvimento de receptores do tipo CB₁ no efeito antinociceptivo periférico e central do RES, tanto AEA como 2-AG poderiam estar envolvidos. Um estudo anterior demonstrou que o RES, quando administrado de forma sistêmica e crônica, aumentou os níveis de AEA e 2-AG em diferentes regiões do cérebro em ratos (Hassanzadeh *et al.*, 2016). Dessa forma, nossos dados sugerem que talvez essa ação possa ser extrapolada também a nível periférico. Além disso, nosso grupo de pesquisa sugeriu previamente o envolvimento de endocanabinoides na antinocicepção periférica induzida por agonistas opióides seletivos para o receptor do tipo μ em camundongos (Pacheco *et al.*, 2008).

Trabalhos realizados em nosso laboratório também demonstraram o envolvimento da via L-arginina/NO/GMPc e ativação de canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) no mecanismo antinociceptivo periférico de agonistas de receptores opióides (Rodrigues e Duarte, 2000; Pacheco *et al.*, 2005) e dos endocanabinoides anandamida (AEA) (Reis *et al.*, 2009) e palmitoiletanolamida (PEA) (Romero e Duarte, 2012; Romero *et al.*, 2012) no modelo de hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraplantar de prostagladina (PGE₂). Além disso, o mecanismo analgésico da morfina tem sido relatado como fosfatidilinositol-3-quinase gama/proteína quinase B (PI3K γ /AKT) dependente, podendo induzir ativação de óxido nítrico sintase (NOS) e conseqüente produção de NO (Cunha *et al.*, 2010). Dessa forma, dada a possível

Discussão

interação entre os sistemas opioidérgico e canabinoidérgico com o sistema nitrérgico, e uma vez que nossos dados evidenciaram a participação de opioides endógenos e endocanabinoides na antinocicepção tanto central, quanto periférica do RES, nos propomos a analisar se o sistema nitrérgico também não estaria envolvido nesse processo.

A descoberta da via L-arginina/NO/GMPc (Knowles *et al.*, 1989), em 1989, trouxe implicações para a compreensão de mecanismos envolvidos em diversas áreas biológicas e indicou um novo potencial terapêutico para várias doenças, incluindo aquelas de caráter doloroso. Vários estudos têm demonstrado que o NO pode induzir analgesia e mediar a ação de compostos analgésicos, tais como agonistas opioides, anti-inflamatórios não esteroidais e produtos naturais (Reis e Rocha, 2007; Cunha *et al.*, 2010; Veloso *et al.*, 2015).

A produção de óxido nítrico no organismo se dá por meio da ação de um tipo enzimático específico, a óxido nítrico sintase (NOS). Com o propósito de avaliar a participação dessa enzima na ação do RES, um inibidor não seletivo da NOS foi administrado previamente à injeção intraplantar ou intracerebroventricular do RES e foi observado que o bloqueio da NOS preveniu a antinocicepção tanto periférica quanto central do RES, sugerindo o envolvimento desse tipo enzimático no efeito antinociceptivo associado ao RES. Em células de mamíferos, a família enzimática da NOS pode ser composta por pelo menos três tipos distintos de isoenzimas, a isoforma I ou NOS neuronal (nNOS), a isoforma II ou NOS induzível (iNOS) e a isoforma III ou endotelial (eNOS) (Chaitoff, Patel e Ally, 2008). Estudos prévios têm demonstrado a localização tanto periférica, quanto central das NO sintases (Förstermann, Boissel e Kleinert, 1998; Freire *et al.*, 2009; Förstermann e Sessa, 2012). Além disso, vários

Discussão

trabalhos acadêmicos já relataram a associação da NOS do tipo neuronal com processos analgésicos (Cunha *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2014; Galdino, Duarte e Perez, 2015). Portanto, para elucidar se a isoforma neuronal da NO sintase estaria envolvida na antinocicepção do RES, utilizamos um inibidor seletivo para este tipo enzimático, o L-NPA, o qual bloqueou a antinocicepção periférica e central do RES. De acordo com os resultados, sugerimos que o RES, quando administrado periféricamente ou centralmente, ativa a nNOS, a qual, uma vez ativada, induz a produção de NO.

Como proposto por Moncada em 1988 (Moncada, Radomski e Palmer, 1988), o NO derivado da L-arginina promove a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), a qual, uma vez ativada, intensifica a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), resultando em um aumento dos níveis de GMPc intracelular. Esse segundo mensageiro, em níveis elevados, tem sido associado a efeitos analgésicos (Duarte, Lorenzetti e Ferreira, 1990; Duarte *et al.*, 1992; Romero e Duarte, 2009). Portanto, utilizamos um inibidor da GCs, o ODQ, para avaliar o envolvimento do GMPc na antinocicepção central e periférica de RES. A inibição da GCs impediu, centralmente e periféricamente, o efeito antinociceptivo do RES, sugerindo que o GMPc esteja envolvido nesse processo.

O nucleotídeo GMPc é rapidamente degradado por uma fosfodiesterase específica, dessa maneira, sua ação ocorre em um período limitado de tempo (Rybalkin *et al.*, 2002). Substâncias que inibem a fosfodiesterase específica para GMPc podem prevenir a degradação do mesmo, prolongando assim seus efeitos (Duarte e Ferreira, 1992). Nesse contexto, utilizamos um inibidor da fosfodiesterase GMPc específica, o zaprinaste, para avaliar o envolvimento do GMPc na antinocicepção central e periférica do RES. A inibição da fosfodiesterase potencializou os efeitos

Discussão

antinociceptivos de RES em dose intermediária, sugerindo que os níveis de GMPc sejam relevantes para este fim.

A ligação entre a via L-arginina/NO/GMPc e a ativação dos canais para potássio (K^+) na antinocicepção central e periférica tem sido estabelecida (Rodrigues e Duarte, 2000; Soares e Duarte, 2001; Ortiz *et al.*, 2006; Hernández-Pacheco *et al.*, 2008). Em concordância a esses dados, estudos anteriores já demonstraram que o RES é capaz de abrir canais para K^+ ativados por Ca_2^+ de alta e de baixa condutância (Granados-Soto, Argüelles e Ortiz, 2002), corroborando nossa hipótese anterior de que o RES induz antinocicepção de forma NO dependente.

A degradação *in vivo* do NO resulta em dois produtos principais, os íons nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (Gladwin *et al.*, 2005; Lundberg *et al.*, 2009). Por outro lado, em sistemas aquosos puros, a degradação de NO gera primariamente NO_2^- (Ignarro *et al.*, 1993). Dessa forma, a medida dos níveis de nitrito é uma boa medida indireta dos níveis de NO. No presente estudo, verificamos que as injeções intraplantar ou intracerebroventricular de RES induziram um leve aumento detectável pela técnica de Griess nos níveis teciduais de nitrito. Adicionalmente, pela técnica de Western Blotting, foi possível observar que o RES induziu redução da fosforilação do sítio de inativação Ser852 da nNOS, tanto periférica quanto centralmente, ou seja, houve desinibição dessa isoforma enzimática. Esses dados corroboram a nossa hipótese de que o RES induz antinocicepção, em locais periféricos e centrais, através da produção de baixos níveis de NO resultante da ativação moderada da nNOS.

Discussão

Em conclusão, de acordo com os resultados discutidos acima, sugerimos a seguinte hipótese para explicar os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do RES: uma vez administrado, o RES seria capaz de interagir diretamente com receptores membranares de estrógeno (Bowers *et al.*, 2000), presentes nas células neuronais tanto periféricas (Papka *et al.*, 2001), quanto centrais (VanderHorst, Gustafsson e Ulfhake, 2005), essa interação estimularia a liberação de opioides endógenos, os quais, por sua vez, levariam a ativação de receptores opioides (μ e δ). Uma vez que o receptor opioide é ativado, subsequentemente poderia haver ativação de receptores canabinoides (CB₁), com envolvimento de endocanabinoides (AEA e/ou 2-AG), levando em conta que esses dois sistemas analgésicos parecem estar anatômica e funcionalmente interligados (Hojo *et al.*, 2008; Bushlin, Rozenfeld e Devi, 2010; Desroches e Beaulieu, 2010; Desroches *et al.*, 2014). Além disso, a estimulação do sistema opioide endógeno induzida pelo RES, via receptor estrogênico, também poderia ocasionar a ativação da óxido nítrico sintase do tipo neuronal (nNOS), a qual iniciaria a ativação da via L-arginina/NO/GMPc (Cunha *et al.*, 2010). Sugerimos que esse aumento dos níveis de GMPc poderia induzir a antinocicepção provavelmente pela ativação de canais para K⁺, evento também já associado aos efeitos do RES (Granados-Soto, Argüelles e Ortiz, 2002), que levaria a um processo de hiperpolarização celular e conseqüente diminuição da transmissão do sinal nociceptivo (Figura 54).

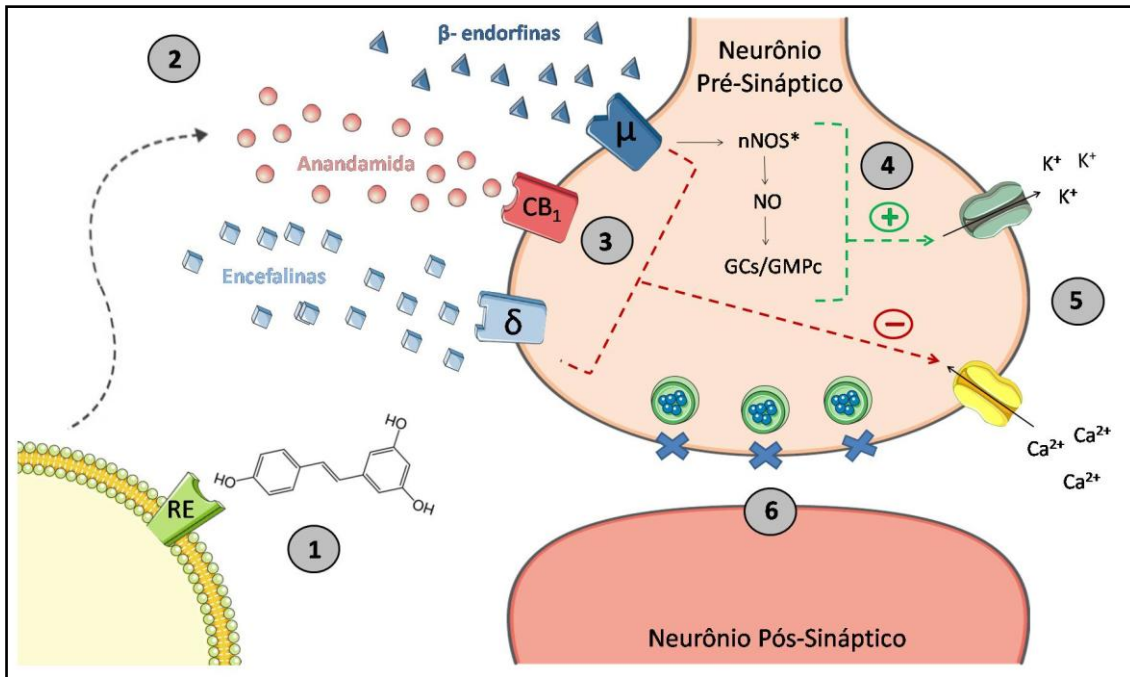


Figura 54 - Representação esquemática dos supostos mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do resveratrol. (1) Interação da molécula de resveratrol com o receptor estrogênico (RE) do tipo membranar. (2) Liberação de opioides endógenos (β -endorfina e/ou encefalinas) e endocanabinoides (AEA e/ou 2-AG). (3) Ativação de receptores opioides (μ e/ou δ) e receptores canabinoides (CB_1). (4) Ativação da óxido nítrico sintase do tipo neuronal (nNOS), iniciando a via L-arginina/NO/GMPc. (5) Ativação de canais para K^+ e inibição de canais para Ca^{2+} . (6) Redução da liberação de neurotransmissores. RE, receptor de estrógeno (do tipo membranar). μ , receptor opioide do tipo μ . CB_1 , receptor canabinoide do tipo CB_1 . δ , receptor opioide do tipo δ . nNOS, óxido nítrico sintase neuronal. NO, óxido nítrico. GCs, guanilato ciclase solúvel. GMPc, monofosfato cíclico de guanosina.

Nossos dados suportam uma possibilidade futura de usar o resveratrol como analgésico, como por exemplo, na forma de adesivos transdérmicos, conforme alguns grupos de pesquisa vêm realizando estudos (Negi *et al.*, 2017). No entanto, reiteramos a necessidade de mais estudos com tais orientações. O presente estudo amplia o conhecimento atual sobre os mecanismos analgésicos do resveratrol, contribuindo para a busca de terapias mais eficazes e financeiramente acessíveis, as quais possam beneficiar pacientes que sofrem com dores refratárias aos tratamentos convencionais.

ANEXO I



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: 278/2016

Título do projeto: Estudo sobre o envolvimento das vias opioidérgica, canabinoidérgica e NO/GMPc/K+ATP nos mecanismos antinociceptivos central e periférico do resveratrol

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Andrea de Castro Perez

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Farmacologia

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

Aprovado na reunião do dia 13/03/2017. Vigência: 13/03/2017 à 12/03/2022

Belo Horizonte, 14/03/2017.

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 - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/taap

Evidence for the involvement of opioid and cannabinoid systems in the peripheral antinociception mediated by resveratrol



Cristina da Costa Oliveira^a, Marina Gomes Miranda e Castor^a, Camila Gomes Miranda e Castor^a, Ághata de França Costa^a, Renata Cristina Mendes Ferreira^a, Josiane Fernandes da Silva^b, Juliana Maria Navia Pelaez^a, Luciano dos Santos Aggum Capettini^a, Virginia Soares Lemos^b, Igor Dimitri Gama Duarte^a, Andrea de Castro Perez^a, Sérgio Henrique Sousa Santos^b, Thiago Roberto Lima Romero^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Physiology, Institute of Biological Sciences, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ABSTRACT

Despite all the development of modern medicine, around 100 compounds derived from natural products were undergoing clinical trials only at the end of 2013. Among these natural substances in clinical trials, we found the resveratrol (RES), a pharmacological multi-target drug. RES analgesic properties have been demonstrated, although the bases of these mechanisms have not been fully elucidated. The aim of this study was to evaluate the involvement of opioid and cannabinoid systems in RES-induced peripheral antinociception. Paw withdrawal method was used and hyperalgesia was induced by carrageenan (200 µg/paw). All drugs were given by intraplantar injection in male Swiss mice ($n = 5$). RES (100 µg/paw) administered in the right hind paw induced local antinociception that was antagonized by naloxone, non-selective opioid receptor antagonist, and cloccinamox, μ OR selective antagonist. Naltrindole and nor-binaltorfimine, selective antagonists for δ OR and κ OR, respectively, did not reverse RES-induced peripheral antinociception. CB_1R antagonist AM251, but not CB_2R antagonist AM630, antagonized RES-induced peripheral antinociception. Peripheral antinociception of RES intermediate-dose (50 µg/paw) was increased by: (i) bestatin, inhibitor of endogenous opioid degradation involved-enzymes; (ii) MAFP, inhibitor of anandamide amidase; (iii) JZL184, inhibitor of 2-arachidonoylglycerol degradation involved-enzyme; (iv) VDM11, endocannabinoid reuptake inhibitor. Acute and peripheral administration of RES failed to affect the amount of μ OR, CB_1R and CB_2R . Experimental data suggest that RES induces peripheral antinociception through μ OR and CB_1R activation by endogenous opioid and endocannabinoid releasing.

1. Introduction

Pain is a multifactorial process, being symptomatic of the most diverse pathological conditions, which makes pain treatment a complex medical issue (Apkarian et al., 2005; Brodal, 2017; Garland, 2013). It is the most commonly reported symptom in medical consultations and it leads to a multi-billion dollar investment in healthcare worldwide (Romanelli, 2017; Turk, 2002). Loss of productivity at work due to painful conditions generate an estimated cost of \$61.2 billion per year in the EUA, where it is calculated that approximately 25 million people suffer from painful symptoms daily (Nahin, 2015; Stewart, 2003). Prescription of opioids has been increasing and, along with it, the concern about adverse effects, misuse and deaths. 28,647 Americans had opioid overdose-related death only in 2014 (Elsesser and Cegla, 2017; Han et al., 2017; Rudd et al., 2016). Taken together, these data emphasize that pain management needs to be redirected with the inclusion of new pharmacotherapeutic approaches.

Plant-derived natural substances has been appeared as a pharmacological alternative for refractory patients to conventional treatments, including pain therapy (Almeida et al., 2001). Despite all the development of modern medicine, 100 compounds derived from natural products were undergoing clinical trials only at the end of 2013, indicating that nature is still a viable source of new drug candidates (Butler et al., 2014; Mishra and Tiwari, 2011). Among these natural substances in clinical trials, we found the resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene; RES; Fig. 1), a nutraceutical compound with potential to become a pharmacological multi-target drug. This non-flavonoid polyphenol is found in about 72 plant species and it has been widely studied pharmacologically (Saiko et al., 2008; Tomé-Carneiro et al., 2013). Animal model studies have attributed several therapeutic properties to RES, such as: (i) anticancer, through the inhibition of metastasis and angiogenesis (Ganapathy et al., 2010; He et al., 2017; Lee et al., 2012); (ii) antihypertensive, associated with endothelium-dependent vascular relaxation, enhanced eNOS activity and increased

* Corresponding author at: Laboratory of Pain and Analgesia, Department of Pharmacology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, 31270-010 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: thiromero@ufmg.br (T.R.L. Romero).

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.02.004>

Received 1 June 2018; Received in revised form 7 February 2019; Accepted 8 February 2019

Available online 11 February 2019

0041-008X/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

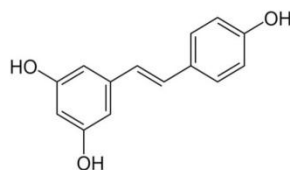


Fig. 1. Resveratrol chemical structure.

glutathione levels (Akar et al., 2012; Alturfan et al., 2012; Bhatt et al., 2011); (iii) hypolipidemic, possibly by regulating the hepatic lipoprotein/apolipoprotein secretion, hepatic and adipocytic lipid metabolism (Jeon et al., 2014); (iv) anti-inflammatory, reducing levels of TNF α , IL-1 β , IL-6, COX-2 and iNOS (Gómez-Zorita et al., 2013; Inanaga et al., 2009; Prata et al., 2017); (v) lifespan prolonger, probably involving the SIRT1 induction (Bhullar and Hubbard, 2015).

Despite the abundant preclinical studies and ongoing clinical trials, many issues related to the RES pharmacological actions remain unclear. In this context, the media and advertisements seem to be moving faster than the scientific research (Espin et al., 2007; Vang et al., 2011). Clinical trials conducted so far have shown the RES cardioprotective effects through the improvement of inflammatory marker profile (Tomé-Carneiro et al., 2013). Since pain is one of the four cardinal signs of inflammation (Lawrence et al., 2002), some animal studies have been directed to the RES analgesic actions (Bazzo et al., 2013; Bertelli et al., 2008; Wang et al., 2017). It was shown that systemically administered RES, in rats, induces analgesia with possible involvement of the opioid system, considering that it has been reversed by naloxone, a nonspecific opioid antagonist (Gupta et al., 2004; Kokuba et al., 2017). In addition, one study demonstrated that intraperitoneally injected RES, also in rats, increases brain levels of endocannabinoids, suggesting a potential for treatment of neuropsychiatric disorders (Hassanzadeh et al., 2016). A major drawback to RES therapy is its rapid intestinal metabolism; the term “resveratrol paradox” was even created, referring to the antagonism between high bioactivity and low bioavailability (Azorín-Ortuño et al., 2011). Given these circumstances, we propose further evaluating the involvement of opioid pathway and analyzing the participation of endocannabinoids, substances widely reported as analgesics (Savage et al., 2016), in the peripheral antinociceptive action of locally administered RES in mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

9 weeks old male Swiss mice (30–40 g), obtained from the Bioterism Center of Federal University of Minas Gerais (CEBIO-UFMG), were used. The mice were housed in standard cages and kept in a temperature-controlled room ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) with an automatic 12-hour light/dark cycle (06:00–18:00 h). The tests were performed during the light phase. Food and tap water were freely provided. Immediately after the testing procedures, the animals were euthanized by an intraperitoneal injection of general anesthetic agents (300 mg/kg of ketamine hydrochloride and 15 mg/kg of xylazine hydrochloride, both Sigma-Aldrich, USA). The experimental protocol was approved by the “Ethics Committee in Animal Experimentation at the Federal University of Minas Gerais” in 13/03/2017 (protocol number 278/2016).

2.2. Measurement of hyperalgesia

Hyperalgesia was measured according to the paw pressure test previously described (Green and Young, 1951; Randall and Selitto, 1957), using an analgesimeter (Ugo-Basile, Italy) with a cone-shaped paw-presser with a round tip, which applies a linearly increasing force to the hindpaw. The hyperalgesic agent used was the lambda type

carrageenan (CAR, 200 μg) administered subcutaneously into the plantar surface of the hind paw. The nociceptive threshold was defined as the weight in grams (g) required eliciting the nociceptive response of paw withdrawal. All the measures were performed three consecutive times and the average was considered the final value. Hyperalgesia was considered as the difference between the averages three hours prior to and after the paw carrageenan injection and expressed in grams (Δ of nociceptive threshold). In order to reduce the possibility of paw damage, a cutoff value of 200 g was used.

2.3. Drug administration

All drugs were administered using an injected volume of 20 μL /paw. Resveratrol (3,4,5-trihydroxy-*trans*-stilbene; purity > 99%; Sigma-Aldrich, USA) was diluted in ethanol 0.5%; whereas hyperalgesic agent carrageenan (Sigma-Aldrich, USA) was dissolved in aqueous solution of sodium chloride (NaCl) sterile 0.9% (sterile saline solution). The broad spectrum opioid antagonist naloxone ([5 α]-4,5-Epoxy-3,14-dihydro-17-[2-propenyl]morphinan-6-one; purity > 99%; Tocris Bioscience, UK), the irreversible μ antagonist clocinnamox (14 β -[*p*-Chlorocinnamoylamino]-7,8-dihydro-*N*-cyclopropylmethylmorphinone; purity > 99%; Tocris Bioscience, UK), the selective non-peptide δ antagonist naltrindole (17-[Cyclopropylmethyl]-6,7-dehydro-4,5 α -epoxy-3,14-dihydroxy-6,7-2',3'-indolomorphinan; purity > 99%; Tocris Bioscience, UK), the κ selective antagonist *nor*-binaltorphimine (17,17'-(Dicyclopropylmethyl)-6,6',7,7'-6,6',7,7'-binoorphinan-3,4',14,14'-tetrol; purity > 98%; Tocris Bioscience, UK) and the aminopeptidase inhibitor bestatin (*N*-[(2*S*,3*R*)-3-Amino-2-hydroxy-1-oxo-4-phenylbutyl]-L-leucine; purity > 99%; Tocris Bioscience, UK) were also dissolved in sterile saline solution. The CB₁ cannabinoid antagonist AM251 (*N*-[Piperidin-1-yl]-5-[4-iodophenyl]-1-[2,4-dichlorophenyl]-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide; purity > 99%; Tocris Bioscience, UK) and the CB₂ cannabinoid antagonist AM630 (6-Iodo-2-methyl-1-[2-{4-morpholinyl}ethyl]-1*H*-indol-3-yl [4-ethoxyphenyl] methanone; purity > 98%; Tocris Bioscience, UK) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) 10%. MAFF ([5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*]-5,8,11,14-eicosatetraenyl-methyl ester phosphonofluoric acid; purity > 98%; Tocris Bioscience, UK), a selective inhibitor of fatty acid amide hydrolase (FAAH), enzyme responsible for anandamide hydrolysis, was dissolved in ethanol 3%. JZL184 (4-[Bis(1,3-benzodioxol-5-yl)hydroxymethyl]-1-piperidinecarboxylic acid 4-nitrophenyl ester; purity > 98%; Tocris Bioscience, UK), a selective inhibitor of monoacylglycerol lipase (MAGL), enzyme responsible for 2-arachidonol glycerol (2-AG) hydrolyses, was dissolved in DMSO 10%. VDM11 ([5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*]-*N*-[4-Hydroxy-2-methylphenyl]-5,8,11,14-eicosatetraenamide; purity > 98%; Tocris Bioscience, UK), a selective inhibitor of the anandamide membrane transporter, was dissolved in Tocrisolve™ 10%.

2.4. Experimental protocol

Carrageenan was administered in the right hind paw and the measurements were performed immediately prior to and 180 min after carrageenan intraplantar injection. Resveratrol (RES) was administered 165 min after the carrageenan administration (except for the time-response curve protocol, in which RES was administered at 180 min. time). The opioid drugs naloxone, clocinnamox, naltrindole, *nor*-binaltorphimine and bestatin were administered 30 min prior to the administration of RES. The cannabinoid drugs AM630, AM251, MAFF, JZL184 and VDM11 were administered 10 min prior to the RES intraplantar injection. In the protocol used to determine whether RES was acting in the central nervous system or the contralateral paw, carrageenan was injected into both hind paws, whereas RES and vehicle were administered into the right and left hind paws, respectively, and the nociceptive threshold was measured in both hind paws. Protocols concerning the time of administration and dose of each drug used in this study were obtained through pilot experiments and literature data (Ferreira et al., 2017; Oliveira et al., 2017; Pacheco et al., 2008; Veloso et al., 2014).

2.5. Western blotting analysis

Following RES stimulation, performed as mentioned above, the animals were sacrificed, by cervical dislocation, and the plantar surfaces of the mouse paws were collected. These tissues were individually homogenized in 500 μ L of RIPA buffer (180 mmol/L NaCl, 50 mmol/L TrisHCl, 0.5 mmol/L EDTA.2Na, 1 mmol/L MgCl₂, 0.3% Triton X-100, 0.5% SDS; pH 7.4), containing a cocktail of protease inhibitors (SigmaFAST[®]; Sigma) plus 20 mmol/L NaF and 20 mmol/L PMSF. Thereafter, lysates were centrifuged at 16000 \times g for 20 min 4 °C and protein content was determined by the use of Bradford method [Bradford, 1976]. Equal amounts of protein (50 μ g) were denatured in the loading buffer at 100 °C for 5 min and subjected to SDS-PAGE using 10% polyacrylamide gel. Proteins were transferred onto a 0.45 μ m polyvinylidene fluoride membrane (PVDF; Immobilon P; Millipore, MA, USA). Blots were blocked at room temperature with 4% BSA in PBS enriched with 0.1% Tween 20 prior to incubation with rabbit polyclonal anti- μ OR (diluted 1:1000; Abcam/ab10275, Cambridge, MA), rabbit polyclonal anti-CB₁R (diluted 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit polyclonal anti-CB₂R (diluted 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), mouse monoclonal anti-GAPDH (diluted 1:1000; Novus Biologicals, Littleton, CO) and mouse monoclonal anti β -Actin (diluted 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Blots were incubated overnight at 4 °C with primary antibody followed by incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies for 2.5 h at room temperature. Immunocomplexes were detected by chemiluminescent reaction (Luminata[™] Forte Western HRP Substrate, Millipore, MA) followed by densitometric analyses with software ImageJ 1.46r (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD).

2.6. Statistical analysis

Graph Pad Prism 5.0 Software[®] was used to analyze the data by analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni post-test. All results were expressed as mean \pm S.E.M. Statistically significance was set at $P < .05$.

3. Results

Intraplantar administration of RES (12.5, 25, 50 and 100 μ g/paw), at the third hour after injection of carrageenan (CAR, 200 μ g/paw), dose-dependently produced an antinociceptive response. RES inhibitory effect lasted for 20 min and it was reversible. The peak of activity was observed 15 min after RES injection. 12.5 μ g/paw RES dose induced no effect, whereas a maximum antinociception was noticed by the 100 μ g/paw. Despite highest RES dose almost completely reversed the CAR-induced inflammatory hypernociception, this dose without the presence of the nociceptive stimulus (CAR) did not alter significantly the basal nociceptive threshold (Fig. 2). To exclude possible systemic effects, CAR was administered at time zero into both hind paws and RES (100 or 200 μ g) was injected only in the right hind paw 15 min prior to the third hour following CAR administration. Nociceptive threshold measurements of both hind paws were made immediately prior to and 3 h after CAR intraplantar injection and then the difference between measure averages was calculated (Δ of nociceptive threshold). RES at dose of 100 μ g induced effect restricted to the treated paw, not altering the CAR-induced hyperalgesia in the contralateral paw, indicating that, at this dose, RES is effective only locally. Differently from 200 μ g RES dose, which induced antinociception in both paws, even administered in only one (Fig. 3).

The intraplantar administration of naloxone (NLX; 25, 50, and 100 μ g/paw) antagonized the RES-induced peripheral antinociception in a dosage-dependent manner (Fig. 4A). The μ OR antagonist cloccinamox (CLOC; 5, 10, 20 and 40 μ g/paw) dose-dependently inhibited RES peripheral antinociceptive response (Fig. 4B). Differently from

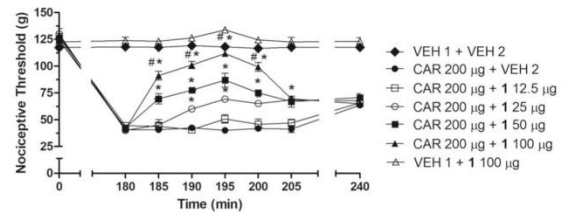


Fig. 2. Time-response curve of intraplantar administration of resveratrol (RES) in carrageenan (CAR) induced hyperalgesia in mice. Antinociceptive response was measured by the paw pressure test. CAR (200 μ g/paw) and RES (12.5, 25, 50 and 100 μ g/paw) were administered in the right hind paw at 0 and 180 min., respectively. Measurements were made at 5 min. Intervals of time 180–205 and 240 min. (diagram upon the graph). Each symbol represents the mean \pm S.E.M. of nociceptive threshold measuring in grams (g) for 5 mice per group. * $P < .05$ compared to CAR 200 μ g + VEH 2 group. # $P < .05$ compared to CAR 200 μ g + RES 50 μ g group. VEH (Vehicle) 1 = Saline. VEH 2 = Ethanol 0.5%.

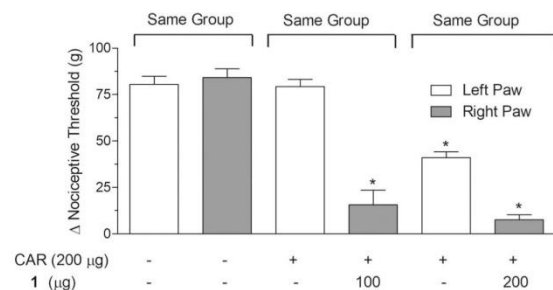


Fig. 3. Exclusion of outside paw antinociceptive effect in the resveratrol (RES) intraplantar administration. Antinociceptive response was measured by the paw pressure test. Carrageenan (CAR; 200 μ g/paw) was injected into the both hind paws at the zero time. RES (100 and 200 μ g/paw) and vehicle for RES (ethanol 0.5%; 20 μ L/paw) were injected into the right and left hind paws, respectively, at 165 min. Time. Measurements were made in both paws at 180 min. Time (diagram upon the graph). Each column represents the mean \pm S.E.M. of Δ nociceptive threshold measuring in grams (g) for 5 mice per group. (+) = positive (drug injection). (-) = negative (vehicle injection). * $P < .05$ compared to CAR 200 μ g + (-) group. Δ denotes the difference between the nociceptive threshold mean obtained prior to any injection (time zero) and the threshold average measured in the third hour following the CAR injection.

naltrindole (NTD; 120 μ g/paw) and nor-binaltorphimine (nBNI; 100 μ g/paw), respectively, δ OR and κ OR antagonists, which did not block the RES peripheral antinociception (Fig. 4C and D). We also used CB₁R (AM251) and CB₂R (AM630) selective antagonists, both administered prior to RES injection. AM251 (20, 40 and 80 μ g/paw) dose-dependently blocked the RES peripheral antinociception (Fig. 5A). Differently, from AM630 (100 μ g/paw), that was unable to reverse the RES peripheral antinociceptive effect (Fig. 5B).

Four drugs that can increase the availability of endogenous opioid or endocannabinoids were used: (i) bestatin (100 μ g/paw; Fig. 6A), an inhibitor of aminopeptidase-N, endogenous opioid degradation involved-enzyme; (ii) MAFP (0.5 μ g/paw; Fig. 6B), an inhibitor of the fatty acid amide hydrolase (FAAH), enzyme involved in hydrolysis of the endocannabinoid anandamide (AEA); (iii) JZL184 (4 μ g/paw; Fig. 6C), an inhibitor of monoacylglycerol lipase (MAGL), enzyme involved in degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG); (iv) and VDM11 (2.5 μ g/paw; Fig. 6D), an endocannabinoid uptake inhibitor. All of them were used in low dosages, in such a way that when administered alone did not produce intense antinociception against the CAR hypernociception. However, RES intermediate-dose

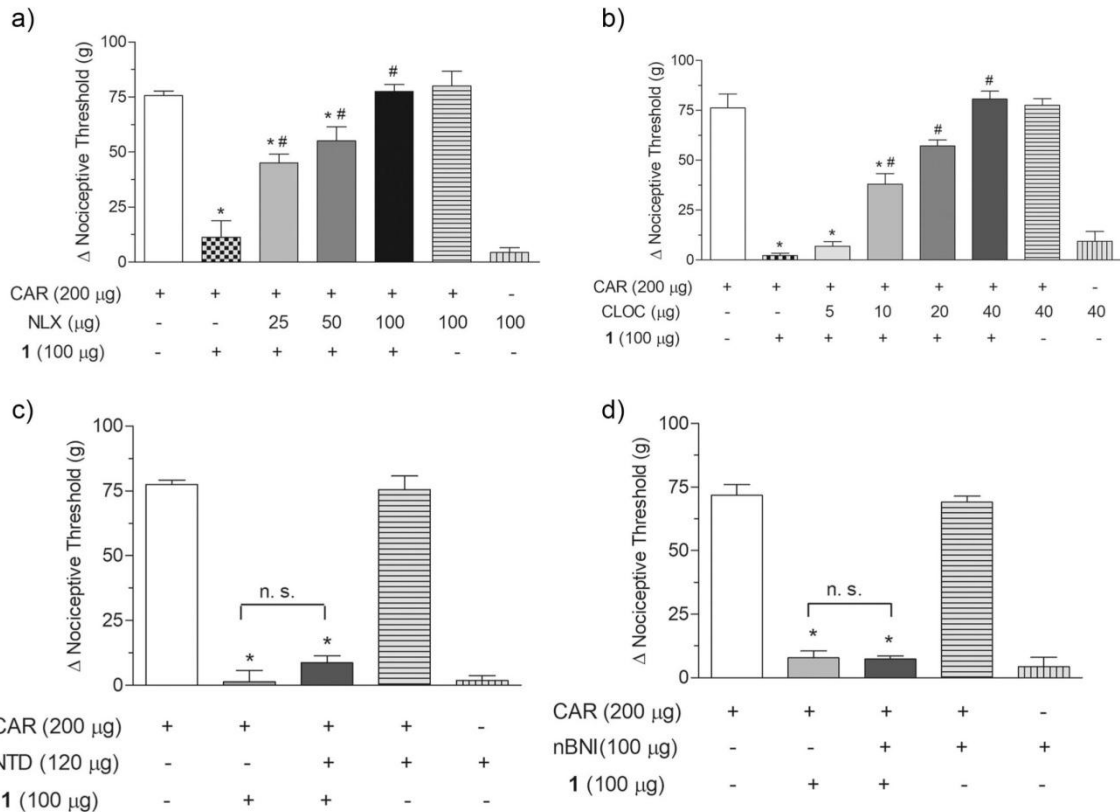


Fig. 4. Effects induced by pretreatment with naloxone (A), clocinnamox (B), naltrindole (C) and *nor*-binaltorphimine (D) in the peripheral antinociception of resveratrol (RES). Antinociceptive response was measured by the paw pressure test. Carrageenan (CAR; 200 µg/paw) and RES (100 µg/paw) were administered in the right hind paws, at 0 and 165 min., respectively. Naloxone (NLX; 25, 50 and 100 µg/paw), clocinnamox (CLOC; 5, 10, 20 and 40 µg/paw), naltrindole (NTD; 120 µg/paw) and *nor*-binaltorphimine (nBNI; 100 µg/paw) were administered at 135 min. Time. All measurements were made at 180 min. Time (diagram upon the graph). Each column represents the mean ± S.E.M. of Δ nociceptive threshold measuring in grams (g) for 5 mice per group. (+) = positive (drug injection). (–) = negative (vehicle injection). * *P* < .05 compared to CAR + (–) + (–) group. # *P* < .05 compared to CAR + (–) + RES group. n.s. = non-significant. CAR, NLX, CLOC, NTD and nBNI vehicles = saline; RES vehicle = ethanol 0.5%. Δ denotes the difference between the nociceptive threshold mean obtained prior to any injection (time zero) and the threshold average measured in the third hour following the CAR injection.

administration (50 µg/paw), following injections of these four drugs at low doses, induced an antinociception similar to the antinociception induced by the RES maximal dose (100 µg/paw). Finally, we evaluated the expression of µOR, CB₁R and CB₂R against the RES peripheral antinociceptive effect. RES failed to affect the regulation of µOR (Fig. 7A), CB₁R (Fig. 7B) and CB₂R (Fig. 7C), according to our assessment at the paw peripheral tissue of CAR intraplantar-injected mice.

4. Discussion

4.1. Resveratrol (RES) intraplantar injection induces peripheral antinociceptive effect against the carrageenan-induced inflammatory hypernociception in mice paw

Carrageenan (CAR) is a highly sulfated polysaccharide obtained from edible red seaweeds (Rhodophyceae), commonly used as food additive (Necas and Bartosikova, 2013). When subcutaneously injected, CAR produces local inflammation, designated by the 5 cardinal signs: hypersensitivity, redness, swelling, heat and loss of function (Winter et al., 1962). CAR-induced mechanical hypernociception in mice paw was previously described (Cunha et al., 2005), the process begins with

the performance of two main cytokines, tumor necrosis factor alpha (TNF-α) and keratinocyte-derived chemokine (KC), the latter being involved in the release of sympathomimetic amines. In addition, both TNF-α and KC stimulate the release of interleukin 1β (IL-1β), which, in turn, stimulates the release of prostaglandins. The resultant of this cascade is nociceptor sensitization (hypernociception) (Cunha et al., 2005). Previous studies have shown that systemically administered RES (intraperitoneal injection) was effective against the CAR hypernociceptive action (Gentili et al., 2001; Pham-Marcou et al., 2008). Our study extrapolates these data and demonstrates for the first time that local and acute administration of RES also inhibits CAR-induced hypernociception. Considering the widely reported low bioavailability of RES (Walle, 2011), a local action could avoid this pharmacokinetic problem. Other studies have already demonstrated the RES local effect against different nociceptive stimuli, such as formalin and glutamate (Bazzo et al., 2013; Granados-Soto et al., 2002; Torres-López et al., 2002), besides that, RES local injection attenuates incision-induced allodynia in mice and provides relief of trigeminal nociceptive pain in rats (Shimazu et al., 2016; Tillu et al., 2012), supporting our data.

ANEXO II

C.d.C. Oliveira, et al.

Toxicology and Applied Pharmacology 369 (2019) 30–38

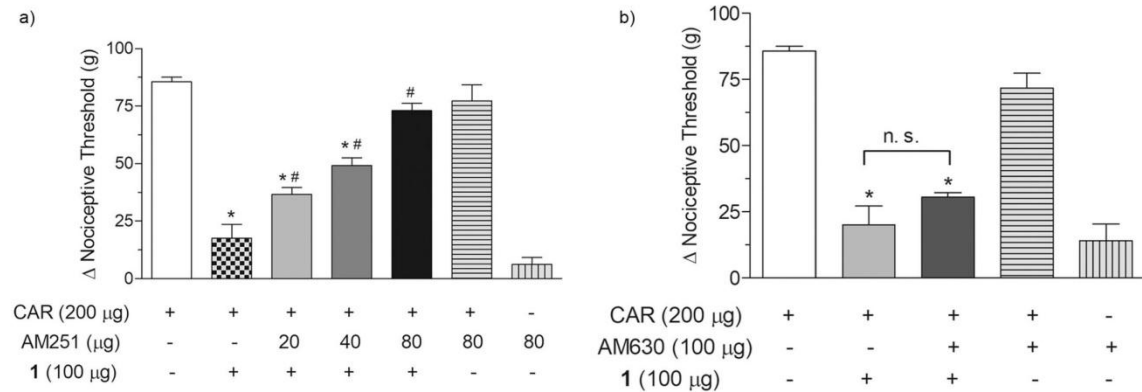


Fig. 5. Effects induced by pretreatment with AM251 (A) and AM630 (B) in the peripheral antinociception of resveratrol (RES). Antinociceptive response was measured by the paw pressure test. Carrageenan (CAR; 200 µg/paw) and RES (100 µg/paw) were administered in the right hind paws, at 0 and 165 min., respectively. AM251 (20, 40 and 80 µg/paw) and AM630 (100 µg/paw) were administered at 155 min. All measurements were made at 180 min. Time (diagram upon the graph). Each column represents the mean \pm S.E.M. of Δ nociceptive threshold measuring in grams (g) for 5 mice per group. (+) = positive (drug injection). (-) = negative (vehicle injection). * $P < .05$ compared to CAR + (-) + (-) group. # $P < .05$ compared to CAR + (-) + RES group. n.s. = non-significant. CAR vehicle = Saline; AM251 and AM630 vehicles = DMSO 10%; RES vehicle = ethanol 0.5%. Δ denotes the difference between the nociceptive threshold mean obtained prior to any injection (time zero) and the threshold average measured in the third hour following the CAR injection.

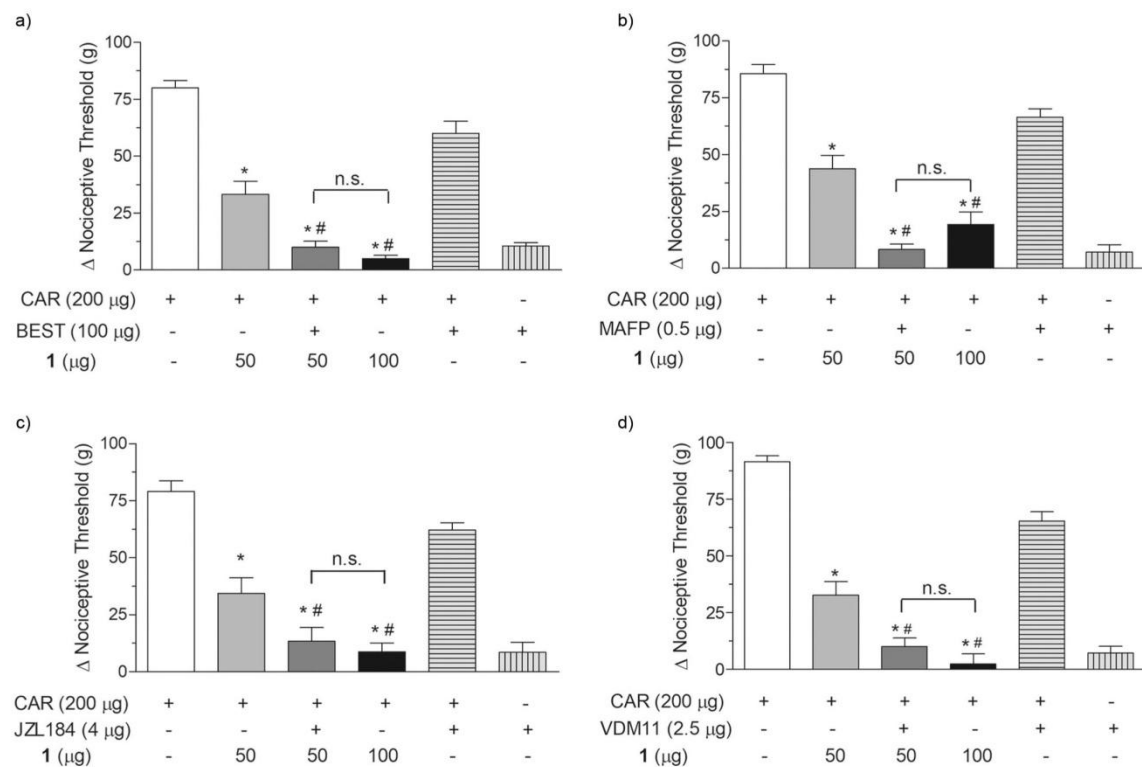


Fig. 6. Bestatin (A), MAFP (B), JZL184 (C) and VDM11 (D) increase the peripheral antinociception mediated by intermediate-dose of resveratrol (RES). Antinociceptive response was measured by the paw pressure test. Carrageenan (CAR; 200 µg/paw) and RES (50 µg/paw) were administered in the right hind paws, at 0 and 165 min., respectively. Bestatin (BEST; 100 µg/paw) was administered at 135 min. MAFP (0.5 µg/paw), JZL184 (4 µg/paw) and VDM11 (2.5 µg/paw) were administered at 155 min. All measurements were made at 180 min. Time (diagram upon the graph). Each column represents the mean \pm S.E.M. of Δ nociceptive threshold measuring in grams (g) for 5 mice per group. (+) = positive (drug injection). (-) = negative (vehicle injection). * $P < .05$ compared to CAR + (-) + (-) group. # $P < .05$ compared to CAR + (-) + RES 50 µg/paw group. n.s. = non-significant. CAR and BEST vehicles = saline. RES, MAFP, JZL184 and VDM11 vehicles = ethanol 0.5%, ethanol 3%, DMSO 10% and Tocrisolve™ 10%, respectively.

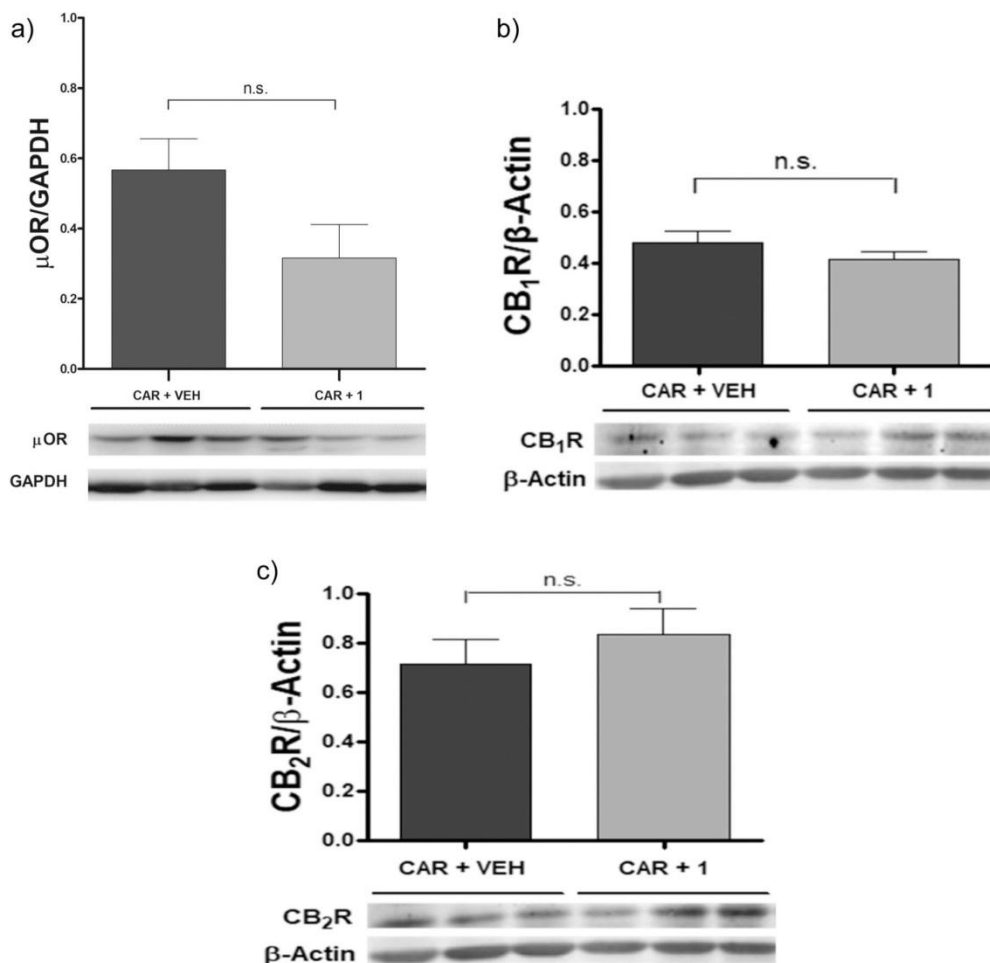


Fig. 7. Effects of resveratrol (RES) intraplantar administration on expression of μOR (A), CB_1R (B) and CB_2R (C) in mice paw, assessed by Western Blotting. Representative images for different experimental groups are located under the graph. Each column represents the mean of five animals and the vertical lines show the SEM. n.s. = non-significant. Statistical analyses: One-Way ANOVA followed by Bonferroni post-test. VEH (Vehicle) = Ethanol 0.5%.

4.2. μOR antagonist, but not δOR or κOR antagonists, inhibits the peripheral antinociception mediated by resveratrol (RES)

The systemic administration of RES, in mice and rats, has been related to suppression of morphine tolerance (Han et al., 2014; He et al., 2014), which would reduce the use of increasingly large doses to elicit effective analgesia, minimizing the possibility of adverse effects. Accordingly, previous studies have shown that the antinociceptive action of systemically administered RES is reversed by naloxone, a non-selective opioid antagonist (Gupta et al., 2004; Kokuba et al., 2017). In the central nervous system, opioid receptors are expressed in the dorsal horn of the spinal cord and subcortical regions of the brain, as the thalamus, cerebral cortex, periaqueductal grey, rostral ventromedial medulla and amygdala (Mansour et al., 1988). At the peripheral level, opioid receptors are expressed in sensory neurons, macrophages, neutrophils and keratinocytes (Bigliardi et al., 2009; Coggeshall et al., 1997; Stein et al., 1990). Since the opioid system is widely distributed both centrally and peripherally, we propose to evaluate whether locally administered RES also has opioid system involvement. The intraplantar

administration of naloxone antagonized the RES-induced peripheral antinociception in a dosage-dependent manner, evidencing our hypothesis that the RES peripheral antinociceptive action involves opioid system activation as well as the RES central action.

Opioids exert their effects through four types of $G_{i/o}$ protein-coupled opioid receptors (OR): Mu (μOR), kappa (κOR), delta (δOR) and like-1 OR(L1), the latter being less characterized. The classical transduction signal of opioid receptors is related to their ability to modulate potassium and calcium ion channels, with consequent cellular hyperpolarization and inhibition of neuronal activity (Al-Hasani and Bruchas, 2011). Previous studies have demonstrated the RES modulatory potential of calcium channels against various pathologies, including painful conditions (McCalley et al., 2014; Pan et al., 2017; Wang et al., 2017), supporting our results. Once the involvement of opioid receptors was observed in the RES-induced peripheral antinociceptive action, the next step was to evaluate the specificity of this process. The role of μOR , δOR and κOR was investigated using their selective antagonists, all them inject prior to RES (100 $\mu\text{g}/\text{paw}$). The μOR antagonist clo-cinnamox dose-dependently inhibited RES peripheral antinociceptive

response. Differently from naltrindole and nor-binaltorphimine, respectively, δ OR and κ OR antagonists, which did not block the RES peripheral antinociception. Nevertheless, these drugs, at the same dosages, were able to reverse the peripheral antinociceptive action of other analgesic substances (Ferreira et al., 2017; Veloso et al., 2014). Our results suggest the participation of μ OR in RES peripheral antinociceptive effect. However, neither δ OR nor the κ OR seems to be involved in the peripheral antinociception mediated by RES. A pioneering study reported the absence of analgesic and addictive properties of morphine in knockout mice for μ OR, evidencing the key role of this receptor in both the desired and undesirable opioid effects. On the other hand, in the same study, δ OR and κ OR did not mediate the major morphine biological actions in the absence of the μ OR (Matthes et al., 1996). In addition, the peripheral antinociceptive action of non-opioid compounds, as clonidine and celecoxib, has been associated with the opioid system activation (França et al., 2006; Nakamura and Ferreira, 1988), corroborating the peripheral antinociceptive action of RES, a non-morphine analogue, through μ OR activation.

4.3. CB₁R antagonist, but not CB₂R antagonist, blocks the peripheral antinociception mediated by resveratrol (RES)

The opioid system seems to be closely related functionally and anatomically with the cannabinoid system (Desroches and Beaulieu, 2010), which consists of at least two well-characterized cannabinoid, type 1 and 2, receptors (CB₁R and CB₂R), their respective ligands and ligand-related synthesis, reuptake and degradation compounds. CB₁R is expressed primarily in the central and peripheral nervous system (Herkenham et al., 1991), while CB₂R is found mainly in peripheral and brain immune cells (Benito et al., 2008; Galiege et al., 1995). As opioid receptors, CB₁R and CB₂R are G_{i/o}-coupled. Besides that, opioid and cannabinoid receptors share similar signal transduction properties, as well as induce similar biological effects, including analgesia (Desroches and Beaulieu, 2010). The antinociception induced by morphine and delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), systemically administered, were not modified in CB₁R or μ OR, κ OR and δ OR knockout mice, respectively (Ghozland et al., 2002; Valverde et al., 2000). However, intra paw morphine showed a reduced antinociceptive effect in the formalin test in CB₁R and CB₂R knockout animals (Desroches et al., 2014). Additionally, in wild-type animals, several studies have reported the μ OR and preferentially κ OR, but not δ OR, involvement in the antinociceptive action of Δ^9 -THC (Reche et al., 1996a, 1996b; Smith et al., 1994; Welch, 1993).

Considering the reported opioid-cannabinoid interaction in pain management (Desroches and Beaulieu, 2010), once our data evidenced the opioid participation in the RES peripheral antinociception, we propose to analyze whether the cannabinoid system is also involved in this process. With this purpose, we used CB₁R (AM251) and CB₂R (AM630) selective antagonists, both administered prior to RES injection. AM251 dose-dependently blocked the RES peripheral antinociception. Differently, from AM630, that was unable to reverse the RES peripheral antinociceptive effect. On the other hand, in this same dosage, AM630 reversed the palmitoylethanolamide-induced antinociception (Romero et al., 2013). Our data suggest the CB₁R, but not CB₂R, involvement in the RES peripheral antinociception. Previous studies have described the anatomical co-localization of μ OR and CB₁R in neurons from dorsal horn of spinal cord, an important site of synaptic transmission for peripheral nociceptors (Hohmann et al., 1999; Salio et al., 2001). Furthermore, μ OR/CB₁R functional heterodimer form has been reported (Hojo et al., 2008), anatomically supporting our hypothesis that RES acts through μ OR and CB₁R activation, probably indirectly considering its nonmorphine-like molecular structure (RES).

4.4. Inhibitors of endogenous opioid and cannabinoid degradation potentiate the peripheral antinociception mediated by resveratrol (RES)

Modulation of pain by the opioid and cannabinoid systems is associated with the action of endogenous ligands, which have been explored in the development of novel analgesic therapies. Drugs that inhibit the reuptake or degradation of endogenous opioids or endocannabinoids have been described as analgesics (Ballantyne and Sullivan, 2017; Donvito et al., 2017). Previous studies have reported the association between the administration of opioid agonists and the increase of endocannabinoid levels (Caille et al., 2007). Conversely, the administration of cannabinoid agonists has also been linked to the increase in endogenous opioid levels (Valverde et al., 2001). In this context, we evaluated the endogenous opioid and endocannabinoid involvement in the peripheral antinociception of RES. Our results showed that bestatin, MAFP, JZL184 and VDM11, in low dosages and when administered alone did not produce intense antinociception against the CAR hypernociception. However, RES intermediate-dose administration (50 μ g/paw), following injections of these four drugs at low doses, induced an antinociception similar to the antinociception induced by the RES maximal dose (100 μ g/paw), suggesting the endogenous opioid and endocannabinoid involvement in the RES peripheral antinociceptive action.

There are three major endogenous opioid peptides identified so far, β -endorphin, enkephalins and dynorphins, which bind with higher affinity to μ OR, δ OR and κ OR, respectively (Akil et al., 1997). Since the RES peripheral antinociception was associated to μ OR, but neither δ OR nor the κ OR, in our results, the endogenous opioid involved could be the β -endorphin. Regarding the modulatory cannabinoid system, the two most well studied endocannabinoids are AEA and 2-AG, the first one binds preferentially to CB₁R and the latter seems to activate both CB₁R and CB₂R (Di Marzo et al., 2004). Once we have found evidence for CB₁R involvement in the RES peripheral antinociceptive effect, both AEA and 2AG may be involved. A previous study reported that systemically administered RES increases both AEA and 2-AG contents in different brain regions in rats (Hassanzadeh et al., 2016), in this way, our data suggest that maybe this action can be extrapolated at the peripheral level. Additionally, our research group previously suggested the endocannabinoids involvement in the peripheral antinociception induced by μ OR, but neither κ OR nor δ OR, agonists in mice (Pacheco et al., 2008), corroborating our results.

4.5. μ -opioid and CB₁-cannabinoid peripheral receptors have their expressions unaltered by intraplantar administration of resveratrol (RES)

In front of all our findings, we evaluated the expression of μ OR, CB₁R and CB₂R against the RES peripheral antinociceptive effect. Despite the evidence of non-involvement of the CB₂R in peripheral antinociception of RES, once there was a pharmacological indication of participation of endocannabinoid 2-AG, an activator of both CB₁R and CB₂R, the expression of both cannabinoid receptors was evaluated. RES failed to affect the regulation of μ OR, CB₁R and CB₂R, according to our assessment at the paw peripheral tissue of CAR intraplantar-injected mice. This result can most probably be explained by the fact that RES was administered acutely, there being no time for significant modulation in the receptor expressions. Possibly a chronic administration might show different results.

In addition, it is well established that RES is a potent activator of AMPK (Song et al., 2015). Data from the literature show that AMPK activators, by themselves, would be potential analgesics, since they seem to be able to reduce the excitability of nociceptive neuronal cells (Price et al., 2016). Another study suggests that tolerance to morphine has relevant microglial participation and the RES, by activating AMPK, is able to inhibit the action of microglia, reducing tolerance to morphine, and consequently, prolonging the activation of the opioid system (Han et al., 2014). It has also been reported that the activation of AMPK

by ghrelin, in peripheral tissues, is abolished by lack of functional CB₁ receptor by direct peripheral effect and partly by the central nervous system, suggesting the existence of a possible ghrelin-CB₁ cannabinoid receptor-AMPK pathway (Kola et al., 2013). In this way, the possible release of endocannabinoids induced by RES, resulting in the activation of CB₁ cannabinoid receptor, could contribute to the RES-induced AMPK activation.

In conclusion, according to the results discussed above, we suggested two hypotheses to explain the mechanisms involved in the peripheral antinociceptive effect of RES: (i) AEA and 2-AG releasing stimulation subsequently causing CB₁R activation and leading to the μ OR indirect activation with endogenous opioid involvement; (ii) endogenous opioids releasing stimulation subsequently causing μ OR activation and leading to the CB₁R indirect activation with AEA and 2-AG involvement. Our data support a future possibility of using RES as a topical painkiller, for example, in the form of transdermal pain relievers containing RES, as some research groups have conducted (Negi et al., 2017). However, we reiterate the need for further studies with such guidance.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest.

References

- Akar, F., Uludağ, O., Aydin, A., Aytakin, Y.A., Elbeg, S., Tuzcu, M., Sahin, K., 2012. High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: protective effect of resveratrol. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2135–2141. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.03.061>.
- Akil, H., Meng, F., Devine, D.P., Watson, S.J., 1997. Molecular and neuroanatomical properties of the endogenous opioid system: implications for treatment of opiate addiction. *Semin. Neurosci.* 9, 70–83. <https://doi.org/10.1006/smns.1997.0108>.
- Al-Hasani, R., Bruchas, M.R., 2011. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent Signalling and behaviour. *Anesthesiology* 115, 1363–1381. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318238bba6>.
- Almeida, R.N., Navarro, D.S., Barbosa-Filho, J.M., 2001. Plants with central analgesic activity. *Phytotherapie* 8, 310–322. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00050>.
- Alturfan, A.A., Tozan-Beceran, A., Şehirli, A.Ö., Demiralp, E., Şener, G., Omurtak, G.Z., 2012. Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol. Biol. Rep.* 39, 4589–4596. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1249-5>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2004.11.001>.
- Azorin-Ortuño, M., Yáñez-Gascón, M.J., Vallejo, F., Pallarés, F.J., Larrosa, M., Lucas, R., Morales, J.C., Tomás-Barberán, F.A., García-Conesa, M.T., Espín, J.C., 2011. Metabolites and tissue distribution of resveratrol in the pig. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 1154–1168. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100140>.
- Ballantyne, J.C., Sullivan, M.D., 2017. The discovery of endogenous opioid systems. *Pain*. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001043>. Epub ahead of print.
- Bazzo, K.O., Souto, A.A., Lopes, T.G., Zanin, R.F., Gomez, M.V., Souza, A.H., Campos, M.M., 2013. Evidence for the analgesic activity of resveratrol in acute models of nociception in mice. *J. Nat. Prod.* 76, 13–21. <https://doi.org/10.1021/np300529x>.
- Benito, C., Tolón, R.M., Pazos, M.R., Núñez, E., Castillo, A.I., Romero, J., 2008. Cannabinoid CB₂ receptors in human brain inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 153, 277–285. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707505>.
- Bertelli, A., Falchi, M., Dib, B., Pini, E., Mukherjee, S., Das, D.K., 2008. Analgesic resveratrol? *Antioxid. Redox Signal.* 10, 403–404. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1926>.
- Bhatt, S.R., Lokhandwala, M.F., Banday, A.A., 2011. Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 667, 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.026>.
- Bhullar, K.S., Hubbard, B.P., 2015. Lifespan and healthspan extension by resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1852, 1209–1218. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2015.01.012>.
- Bigliardi, P.L., Tobin, D.J., Gaveriaux-Ruff, C., Bigliardi-Qi, M., 2009. Opioids and the skin - where do we stand? *Exp. Dermatol.* 18, 424–430. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00844.x>.
- Brodal, P., 2017. A neurobiologist's attempt to understand persistent pain. *Scand J Pain* 15, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.sjpain.2017.03.001>.
- Butler, M.S., Robertson, A.A.B., Cooper, M.A., 2014. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 31, 1612–1661. <https://doi.org/10.1039/C4NP00064A>.
- Caille, S., Alvarez-Jaimes, L., Polis, I., Stouffer, D.G., Parsons, L.H., 2007. Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus Accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *J. Neurosci.* 27, 3695–3702. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4403-06.2007>.
- Coggeshall, R.E., Zhou, S., Carlton, S.M., 1997. Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain Res.* 764, 126–132. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00446-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00446-0).
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409225102>.
- Desroches, J., Beaulieu, P., 2010. Opioids and cannabinoids interactions: involvement in pain management. *Curr. Drug Targets* 11, 462–473 ([https://doi.org/CDT-Tucci HT-3 \[pii\]](https://doi.org/CDT-Tucci HT-3 [pii])).
- Desroches, J., Bouchard, J.F., Gendron, L., Beaulieu, P., 2014. Involvement of cannabinoid receptors in peripheral and spinal morphine analgesia. *Neuroscience* 261, 23–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.12.030>.
- Di Marzo, V., Bifulco, M., De Petrocellis, L., 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 771–784. <https://doi.org/10.1038/nrd1495>.
- Donvito, G., Nass, S.R., Wilkerson, J.L., Curry, Z.A., Schurman, L.D., Kinsey, S.G., Lichtman, A.H., 2017. The endogenous cannabinoid system: a budding source of targets for treating inflammatory and neuropathic pain. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.204>. Epub ahead of print.
- Elsesser, K., Cegla, T., 2017. Long-term treatment in chronic noncancer pain: results of an observational study comparing opioid and nonopioid therapy. *Scand J Pain* 17, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.sjpain.2017.07.005>.
- Espín, J.C., García-Conesa, M.T., Tomás-Barberán, F.A., 2007. Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry* 68, 2986–3008. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.014>.
- 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. <https://doi.org/10.1155/2017/8109205>.
- França, D.S., Ferreira-Alves, D.L., Duarte, I.D.G., Ribeiro, M.C., Rezende, R.M., Bakhle, Y.S., Francischi, J.N., 2006. Endogenous opioids mediate the hypoalgesia induced by selective inhibitors of cyclo-oxygenase 2 in rat paws treated with carrageenan. *Neuropharmacology* 51, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.02.012>.
- Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussosoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., Casellas, P., 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* 232, 54–61. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x>.
- Ganapathy, S., Chen, Q., Singh, K.P., Shankar, S., Srivastava, R.K., 2010. Resveratrol enhances antitumor activity of TRAIL in prostate cancer xenografts through activation of FOXO transcription factor. *PLoS One* 5, e15627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015627>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.pcp.2012.06.013>.
- Gentili, M., Mazoit, J.X., Bouaziz, H., Fletcher, D., Casper, R.F., Benhamou, D., Savouret, J.F., 2001. Resveratrol decreases hyperalgesia induced by carrageenan in the rat hind paw. *Life Sci.* 68, 1317–1321. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)01018-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)01018-3).
- Ghozland, S., Matthes, H.W., Simonin, F., Filliol, D., Kieffer, B.L., Maldonado, R., 2002. Motivational effects of cannabinoids are mediated by μ -opioid and κ -opioid receptors. *J. Neurosci.* 22, 1146–1154.
- Gómez-Zorita, S., Fernández-Quintela, A., Lasa, A., Hijona, E., Bujanda, L., Portillo, M.P., 2013. Effects of resveratrol on obesity-related inflammation markers in adipose tissue of genetically obese rats. *Nutrition* 29, 1374–1380. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.014>.
- Granados-Soto, V., Argüelles, C.F., Ortiz, M.I., 2002. The peripheral antinociceptive effect of resveratrol is associated with activation of potassium channels. *Neuropharmacology* 43, 917–923. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00130-2](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00130-2).
- Green, A.F., Young, P.A., 1951. A comparison of heat and pressure analgesic methods in rats. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 6, 572–587. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1951.tb00668.x>.
- Gupta, Y.K., Sharma, M., Briyal, S., 2004. Antinociceptive effect of trans-resveratrol in rats: involvement of an opioidergic mechanism. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 26, 667–672.
- Han, Y., Jiang, C., Tang, J., Wang, C., Wu, P., Zhang, G., Liu, W., Jamangulova, N., Wu, X., Song, X., 2014. Resveratrol reduces morphine tolerance by inhibiting microglial activation via AMPK signalling. *Eur. J. Pain (United Kingdom)* 18, 1458–1470. <https://doi.org/10.1002/ejp.511>.
- Han, B., Compton, W.M., Blanco, C., Crane, E., Lee, J., Jones, C.M., 2017. Prescription opioid use, misuse, and use disorders in U.S. adults: 2015 national survey on drug use and health. *Ann. Intern. Med.* 1–10. <https://doi.org/10.7326/M17-0865>.
- Hassanzadeh, P., Arbabi, E., Atyabi, F., Dinarvand, R., 2016. The endocannabinoid system and NGF are involved in the mechanism of action of resveratrol: a multi-target nutraceutical with therapeutic potential in neuropsychiatric disorders. *Psychopharmacology* 233, 1087–1096. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4188-3>.
- He, X., Ou, P., Wu, K., Huang, C., Wang, Y., Yu, Z., Guo, Q., 2014. Resveratrol attenuates morphine antinociceptive tolerance via SIRT1 regulation in the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 566, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.02.022>.
- He, L., Fan, F., Hou, X., Gao, C., Meng, L., Meng, S., Huang, S., Wu, H., 2017. Resveratrol suppresses pulmonary tumor metastasis by inhibiting platelet-mediated angiogenic

- responses. *J. Surg. Res.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.05.009>.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 563–583. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1932>.
- Hohmann, A.G., Briley, E.M., Herkenham, M., 1999. Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord. *Brain Res.* 822, 17–25 ([https://doi.org/S0006-8993\(98\)01321-3](https://doi.org/S0006-8993(98)01321-3) [pii]).
- Hojo, M., Sudo, Y., Ando, Y., Minami, K., Takada, M., Matsubara, T., Kanaide, M., Taniyama, K., Sumikawa, K., Uezono, Y., 2008. Mu-opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *J. Pharmacol. Sci.* 108, 308–319. <https://doi.org/10.1254/jphs.08244FP>.
- Inanaga, K., Ichiki, T., Matsuura, H., Miyazaki, R., Hashimoto, T., Takeda, K., Sunagawa, K., 2009. Resveratrol attenuates angiotensin II-induced interleukin-6 expression and perivascular fibrosis. *Hypertens. Res.* 32, 466–471. <https://doi.org/10.1038/hr.2009.47>.
- Jeon, S.-M., Lee, S.-A., Choi, M.-S., 2014. Antioxiessid and vasoprotective effects of resveratrol in apoE-deficient mice. *J. Med. Food* 17, 310–316. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.2885>.
- Kokuba, S., Takehana, S., Oshima, K., Shimazu, Y., Takeda, M., 2017. Systemic administration of the dietary constituent resveratrol inhibits the nociceptive jaw-opening reflex in rats via the endogenous opioid system. *Neurosci. Res.* 119, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.01.005>.
- Kola, B., Wittman, G., Bodnár, I., Amin, F., Lim, C.T., Oláh, M., Christ-crain, M., Lolli, F., Van Thuij, H., Leontiou, C.A., Füzési, T., Dalino, P., Isidori, A.M., Harvey-white, J., Kuno, G., Nagy, G.M., Grossman, A.B., Fekete, C., Korbonits, M., 2013. The CB1 Receptor Mediates the Peripheral Effects of Ghrelin on AMPK Activity but Not on Growth Hormone Release 1–10. <https://doi.org/10.1096/fj.13-232918>.
- Lawrence, T., Willoughby, D.A., Gilroy, D.W., 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 787–795. <https://doi.org/10.1038/nri915>.
- Lee, H.S., Ha, A.W., Kim, W.K., 2012. Effect of resveratrol on the metastasis of 4T1 mouse breast cancer cells in vitro and in vivo. *Nutr. Res. Pract.* 6, 294–300. <https://doi.org/10.4162/nrp.2012.6.4.294>.
- Mansour, A., H. K., Lewis, M.E., 1988. Anatomy of CNS opioid receptors. *Neurosci. Trends* 11, 308–314.
- Matthes, H.W.D., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dollé, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B.P., Kieffer, B.L., 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the μ -opioid-receptor gene. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/383819a0>.
- McCalley, A.E., Kaja, S., Payne, A.J., Koulen, P., 2014. Resveratrol and calcium signaling: molecular mechanisms and clinical relevance. *Molecules* 19, 7327–7340. <https://doi.org/10.3390/molecules19067327>.
- Mishra, B.B., Tiwari, V.K., 2011. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 4769–4807. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.057>.
- Nahin, R.L., 2015. Estimates of pain prevalence and severity in adults: United States, 2012. *J. Pain* 16, 769–780. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2015.05.002>.
- Nakamura, M., Ferreira, S.H., 1988. Peripheral analgesic action of clonidine: mediation by release of endogenous enkephalin-like substances. *Eur. J. Pharmacol.* 146, 223–228. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90296-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90296-8).
- Necas, J., Bartosikova, L., 2013. Carrageenan: A review. *Vet. Med. (Praha)*. 58, 187–205.
- Negi, P., Aggarwal, M., Sharma, G., Rathore, C., Sharma, G., Singh, B., Katara, O.P., 2017. Niosome-based hydrogel of resveratrol for topical applications: an effective therapy for pain related disorder(s). *Biomed. Pharmacother.* 88, 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.083>.
- Oliveira, C.C., Veloso, C.C., Ferreira, R.C., Lage, G.A., Pimenta, L.P.S., Duarte, I.D.G., Romero, T.R.L., Perez, A.C., 2017. Peltatoside isolated from *Annona crassiflora* induces peripheral Antinociception by activation of the cannabinoid system. *Planta Med.* 83, 261–267. <https://doi.org/10.1055/s-0042-113386>.
- Pacheco, D. da F., Klein, A., Perez, A. de C., Pacheco, C.M. da F., Francischi, J.N., Duarte, I.D.G., 2008. The mu-opioid receptor agonist morphine, but not agonists at delta- or kappa-opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 154, 1143–1149. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.175>.
- Pan, X., Chen, J., Wang, W., Chen, L., Wang, L., Ma, Q., Zhang, J., Chen, L., 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. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14090>.
- Pham-Marcou, T.A., Beloeil, H., Sun, X., Gentili, M., Benoit, G., Benhamou, D., Mazoit, J.X., 2008. Antinociceptive effect of resveratrol in carrageenan-evoked hyperalgesia in rats: prolonged effect related to COX-2 expression impairment. *Pain* 140, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.08.010>.
- Prata, M.N.L., Oliveira, C.C., Charlie-Silva, I., Romero, T.R.L., Perez, A.C., 2017. Anti-inflammatory effects of resveratrol. *J. Med. Plants Stud.* 5, 48–55.
- Price, T.J., Das, V., Dussor, G., Scieces, B., 2016. Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activators for the prevention, treatment and potential reversal of pathological pain. *Curr. Drug Targets* 17, 908–920.
- Randall, L.O., Seltito, J.J., 1957. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* 111, 409–419.
- Reche, I., Fuentes, J.A., Ruiz-Gayo, M., 1996a. Potentiation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced analgesia by morphine in mice: involvement of m- and k-opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 318, 11–16.
- Reche, I., Fuentes, J.A., Ruiz-Gayo, M., 1996b. A role for central cannabinoid and opioid systems in peripheral Δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced analgesia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 301, 75–81. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(96\)00045-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(96)00045-3).
- Romanelli, R., 2017. Opioid prescribing for chronic pain in a community-based health-care system. *Am. J. Manag. Care* 23, 138–146.
- 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. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3182707859>.
- Rudd, R.A., Aleshire, N., Zibbell, J.E., Gladden, R.M., 2016. Increases in drug and opioid overdose deaths—United States, 2000–2014. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 64, 1378–1382. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6450a3>.
- Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W., Szekeres, T., 2008. Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 658, 68–94. <https://doi.org/10.1016/j.mrv.2007.08.004>.
- Salio, C., Fischer, J., Franzoni, M.F., Mackie, K., Kaneko, T., Conrath, M., 2001. CB1-cannabinoid and mu-opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. *Neuroreport* 12, 3689–3692. <https://doi.org/10.1097/00001756-200112040-00017>.
- Savage, S.R., Romero-Sandoval, A., Schatman, M., Wallace, M., Fanciullo, G., McCarberg, B., Ware, M., 2016. Cannabis in pain treatment: clinical and research considerations. *J. Pain* 17, 654–668. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2016.02.007>.
- Shimazu, Y., Shibuya, E., Takehana, S., Sekiguchi, K., Oshima, K., Kamata, H., Karibe, H., Takeda, M., 2016. Local administration of resveratrol inhibits excitability of nociceptive wide-dynamic range neurons in rat trigeminal spinal nucleus caudalis. *Brain Res. Bull.* 124, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.06.001>.
- Smith, P.B., Welch, S.P., Martin, B.R., 1994. Interactions between delta 9-tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268, 1381–1387.
- Song, H., Han, Y., Pan, C., Deng, X., Dai, W., Hu, L., Jiang, C., Yang, Y., Cheng, Z., Li, F., Zhang, G., Wu, X., Liu, W., 2015. Activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses neuroinflammation and ameliorates bone cancer pain: involvement of inhibition on mitogen-activated protein kinases. *Anesthesiology* 123, 1170–1185. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000856>.
- Stein, C., Hassan, A.H.S., Przewlocki, R., Gramsch, C., Peter, K., Hertz, A., 1990. Opioids from Immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 5935–5939.
- Stewart, W.F., 2003. Lost productive time and cost due to common pain conditions in the US workforce. *JAMA* 290, 2443–2454. <https://doi.org/10.1001/jama.290.18.2443>.
- Tillu, D.V., Melemedjian, O.K., Asiedu, M.N., Qu, N., De Felice, M., Dussor, G., Price, T.J., 2012. Resveratrol engages AMPK to attenuate ERK and mTOR signaling in sensory neurons and inhibits incision-induced acute and chronic pain. *Mol. Pain* 8, 1–12 (<https://doi.org/papers3://publication/uuid/E0B3655F-186E-4F3A-86B3-A4626E51E4C7>).
- Tomé-Carneiro, J., Larrosa, M., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F. a, García-Conesa, M.T., Espín, J.C., 2013. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr. Pharm. Des.* 19, 6064–6093. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990407>.
- Torres-López, J.E., Ortiz, M.I., Castañeda-Hernández, G., Alonso-López, R., Asomoza-Espinosa, R., Granados-Soto, V., 2002. Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. *Life Sci.* 70, 1669–1676. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)01491-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)01491-1).
- Turk, D.C., 2002. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of treatments for patients with chronic pain. *Clin. J. Pain* 18, 355–365. <https://doi.org/10.1097/00002508-200211000-00003>.
- Valverde, O., Ledent, C., Beslot, F., Parmentier, M., Roques, B.P., 2000. Reduction of stress-induced analgesia but not of exogenous opioid effects in mice lacking CB1 receptors. *Eur. J. Neurosci.* 12, 533–539. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00929.x>.
- Valverde, O., Noble, F., Beslot, F., Dauge, V., Fournié-Zaluski, M.C., Roques, B.P., 2001. Δ^9 -tetrahydrocannabinol releases and facilitates the effects of endogenous enkephalins: reduction in morphine withdrawal syndrome without change in rewarding effect. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1816–1824. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2001.01558.x>.
- Vang, O., Ahmad, N., Baile, C.A., Baur, J.A., Brown, K., Csiszar, A., Das, D.K., Delmas, D., Gottfried, C., Lin, H.Y., Ma, Q.Y., Mukhopadhyay, P., Nalini, N., Pezzuto, J.M., Richard, T., Shukla, Y., Surh, Y.J., Szekeres, T., Szkudelski, T., Walle, T., Wu, J.M., 2011. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One* 6, e19881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019881>.
- Veloso, C.C., Rodrigues, V.G., Ferreira, R.C., Duarte, L.P., Klein, A., Duarte, I.D., Romero, T.R., Perez, A.C., 2014. Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to opioidergic activation. *Planta Med.* 80, 1615–1621. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1383147>.
- Walle, T., 2011. Bioavailability of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215, 9–15. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05842.x>.
- Wang, W., Yu, Y., Li, J., Wang, L., Li, Z., Zhang, C., Zhen, L., Ding, L., Wang, G., Sun, X., Xu, Y., 2017. The analgesic effect of trans-resveratrol is regulated by calcium channels in the hippocampus of mice. *Metab. Brain Dis.* 32, 1311–1321. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-0033-1>.
- Welch, S.P., 1993. Blockade of cannabinoid-induced antinociception by norbinaltorphine, but not N,N-diallyl-tyrosine-Aib-phenylalanine-leucine, ICI 174,864 or naloxone in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 633–640.
- 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. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 544–547.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

Abu-Lafi, S. *et al.* (2001) '2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), pp. 3662–3665. doi: 10.1073/pnas.061029898.

Akar, F. *et al.* (2012) 'High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: Protective effect of resveratrol', *Food and Chemical Toxicology*, 50(6), pp. 2135–2141. doi: 10.1016/j.fct.2012.03.061.

Akil, H. *et al.* (1997) 'Molecular and neuroanatomical properties of the endogenous opioid system: Implications for treatment of opiate addiction', *Seminars in the Neurosciences*, 9(3–4), pp. 70–83. doi: 10.1006/smns.1997.0108.

Al-Hasani, R. and Bruchas, M. R. (2011) 'Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signalling and Behaviour', *Anesthesiology*, 115(6), pp. 1363–1381. doi: 10.1097/ALN.0b013e318238bba6.Molecular.

Almeida, R. N., Navarro, D. S. and Barbosa-Filho, J. M. (2001) 'Plants with central analgesic activity.', *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 8(4), pp. 310–322. doi: 10.1078/0944-7113-00050.

Alturfan, A. A. *et al.* (2012) 'Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats', *Molecular Biology Reports*, 39(4), pp. 4589–4596. doi: 10.1007/s11033-011-1249-5.

Anastas, T. M. *et al.* (2019) 'Social Influences on Peer Judgments about Chronic Pain and Disability', *Journal of Pain*. Elsevier Inc., 00(00), pp. 1–8. doi: 10.1016/j.jpain.2018.12.006.

Anisimova, N. Y. U. *et al.* (2011) 'Trans-, cis-, and dihydro-resveratrol: A comparative study', *Chemistry Central Journal*. Chemistry Central Ltd, 5(1), p. 88. doi: 10.1186/1752-153X-5-88.

Referências Bibliográficas

- Apkarian, A. V. *et al.* (2005) 'Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease', *European Journal of Pain*, 9(4), pp. 463–484. doi: 10.1016/j.ejpain.2004.11.001.
- Ballantyne, J. C. and Sullivan, M. D. (2017) 'Discovery of endogenous opioid systems: what it has meant for the clinician's understanding of pain and its treatment', *Pain*, 158(12), pp. 2290–2300. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001043.
- Batista, J. *et al.* (2012) 'Opioids and the Immune System : Clinical Relevance', *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 62(5), pp. 709–718.
- Baur, J. A. and Sinclair, D. A. (2006) 'Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence', *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(June), pp. 493–506. doi: 10.1038/nrd2060.
- Bazzo, K. O. *et al.* (2013) 'Evidence for the analgesic activity of resveratrol in acute models of nociception in mice', *Journal of Natural Products*, 76(1), pp. 13–21. doi: 10.1021/np300529x.
- Benito, C. *et al.* (2008) 'Cannabinoid CB 2 receptors in human brain inflammation', *British Journal of Pharmacology*, 153(2), pp. 277–285. doi: 10.1038/sj.bjp.0707505.
- Bennett, D. L. H. and Woods, C. G. (2014) 'Painful and painless channelopathies', *The Lancet Neurology*, 13(6), pp. 587–599. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70024-9.
- Bertelli, A. *et al.* (2008) 'Analgesic Resveratrol?', *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(3), pp. 403–404. doi: 10.1089/ars.2007.1926.
- Bhatt, S. R., Lokhandwala, M. F. and Banday, A. A. (2011) 'Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V., 667(1–3), pp. 258–264. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.05.026.

Referências Bibliográficas

- Bhullar, K. S. and Hubbard, B. P. (2015) 'Lifespan and healthspan extension by resveratrol', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 1852(6), pp. 1209–1218. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.01.012.
- Bigliardi, P. L. *et al.* (2009) 'Opioids and the skin - Where do we stand?', *Experimental Dermatology*, 18(5), pp. 424–430. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00844.x.
- Bisogno, T. *et al.* (2000) 'N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo', *Biochemical Journal*, 351, pp. 817–824. doi: 10.1042/0264-6021:3510817.
- Borriello, A. *et al.* (2010) 'Dietary polyphenols: Focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis', *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. Elsevier Ltd, 20(8), pp. 618–625. doi: 10.1016/j.numecd.2010.07.004.
- Bowers, J. L. *et al.* (2000) 'Resveratrol Acts as a Mixed Agonist / Antagonist for Estrogen Receptors Alpha and Beta', *Endocrinology*, 141(10), pp. 3657–3667. doi: 10.1210/endo.141.10.7721.
- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Brekša, A. P. *et al.* (2010) 'Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selections', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 121(3), pp. 740–745. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.01.029.

Referências Bibliográficas

- Brodal, P. (2017) 'A neurobiologist's attempt to understand persistent pain', *Scandinavian Journal of Pain*. Scandinavian Association for the Study of Pain, 15, pp. 140–147. doi: 10.1016/j.sjpain.2017.03.001.
- Burns, J. *et al.* (2002) 'Plant foods and herbal sources of resveratrol', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), pp. 3337–3340. doi: 10.1021/jf0112973.
- Bushlin, I., Rozenfeld, R. and Devi, L. A. (2010) 'Cannabinoid-opioid interactions during neuropathic pain and analgesia', *Current Opinion in Pharmacology*, 10(1), pp. 80–86. doi: 10.1016/j.coph.2009.09.009.
- Butler, M. S., Robertson, A. A. B. and Cooper, M. A. (2014) 'Natural product and natural product derived drugs in clinical trials', *Nat. Prod. Rep.* Royal Society of Chemistry, 31(11), pp. 1612–1661. doi: 10.1039/C4NP00064A.
- Butler, R. K. and Finn, D. P. (2009) 'Stress-induced analgesia', *Progress in Neurobiology*, 88(3), pp. 184–202. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.04.003.
- Carvalho, R. C. de *et al.* (2018) 'Prevalence and characteristics of chronic pain in Brazil: a national internet-based survey study', *Brazilian Journal Of Pain*, 1(4), pp. 331–338. doi: 10.5935/2595-0118.20180063.
- Catalgol, B. *et al.* (2012) 'Resveratrol: French paradox revisited', *Frontiers in Pharmacology*, 3 JUL(July), pp. 1–18. doi: 10.3389/fphar.2012.00141.
- Chaitoff, K. A., Patel, D. and Ally, A. (2008) 'Effects of endothelial NOS antagonism within the periaqueductal gray on cardiovascular responses and neurotransmission during mechanical, heat, and cold nociception', *Brain Research*, 1236, pp. 93–104. doi: 10.1016/j.brainres.2008.08.004.

Referências Bibliográficas

- Coggeshall, R. E., Zhou, S. and Carlton, S. M. (1997) 'Opioid receptors on peripheral sensory axons', *Brain Research*, 764(1–2), pp. 126–132. doi: 10.1016/S0006-8993(97)00446-0.
- Cohen, M., Quintner, J. and van Rysewyk, S. (2018) 'Reconsidering the International Association for the Study of Pain definition of pain', *PAIN Reports*, 3(2), p. e643. doi: 10.1097/pr9.0000000000000643.
- Cooper, K. A., Chopra, M. and Thurnham, D. I. (2004) 'Wine polyphenols and promotion of cardiac health', *Nutrition Research Reviews*, 17(01), p. 111. doi: 10.1079/nrr200482.
- Costa, A. *et al.* (2014) 'Ang-(1-7) activates the NO/cGMP and ATP-sensitive K⁺ channels pathway to induce peripheral antinociception in rats', *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. Elsevier Inc., 37(1), pp. 11–16. doi: 10.1016/j.niox.2013.12.007.
- Cunha, T. M. *et al.* (2005) 'A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), pp. 1755–60. doi: 10.1073/pnas.0409225102.
- Cunha, T. M. *et al.* (2010) 'Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K /AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), pp. 4442–4447. doi: 10.1073/pnas.0914733107.
- Cury, Y. *et al.* (2011) 'Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system', *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. Elsevier Inc., 25(3), pp. 243–254. doi: 10.1016/j.niox.2011.06.004.
- Dalton, G. D. *et al.* (2009) 'Signal transduction via cannabinoid receptors.', *CNS & neurological disorders drug targets*, 8(6), pp. 422–31.

Referências Bibliográficas

Desroches, J. *et al.* (2014) 'Involvement of cannabinoid receptors in peripheral and spinal morphine analgesia', *Neuroscience*, 261, pp. 23–42. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.12.030.

Desroches, J. and Beaulieu, P. (2010) 'Opioids and cannabinoids interactions: involvement in pain management.', *Current drug targets*, 11(4), pp. 462–73. doi: CDT-Tucci HT-3 [pii].

Devane, W. *et al.* (1992) 'Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor', *Science*, 258(5090), pp. 1946–1949. doi: 10.1126/science.1470919.

Donvito, G. *et al.* (2018) 'The Endogenous Cannabinoid System: A Budding Source of Targets for Treating Inflammatory and Neuropathic Pain', *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, 43(1), pp. 52–79. doi: 10.1038/npp.2017.204.

Duarte, I. D. G. *et al.* (1992) 'Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway', *European Journal of Pharmacology*, 217(2–3), pp. 225–227. doi: 10.1016/0014-2999(92)90881-4.

Duarte, I. D. G. and Ferreira, S. H. (1992) 'The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway', *European Journal of Pharmacology*, 221(1), pp. 171–174. doi: 10.1016/0014-2999(92)90789-7.

Duarte, I. D. G., Lorenzetti, B. B. and Ferreira, S. H. (1990) 'Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway', *European Journal of Pharmacology*, 186(2), pp. 289–293. doi: 10.1016/0014-2999(90)90446-D.

Referências Bibliográficas

- Dubin, A. E. and Patapoutian, A. (2010) 'Review series Nociceptors: the sensors of the pain pathway', *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), pp. 3760–3772. doi: 10.1172/JCI42843.3760.
- Edwards, R. *et al.* (1992) 'Cloning of a delta opioid receptor by functional expression', *Science*, 258(5090), pp. 1952–1955. doi: 10.1126/science.1335167.
- Elsesser, K. and Cegla, T. (2017) 'Long-term treatment in chronic noncancer pain: Results of an observational study comparing opioid and nonopioid therapy', *Scandinavian Journal of Pain*. Scandinavian Association for the Study of Pain, 17, pp. 87–98. doi: 10.1016/j.sjpain.2017.07.005.
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T. and Tomás-Barberán, F. A. (2007) 'Nutraceuticals: Facts and fiction', *Phytochemistry*, 68(22–24), pp. 2986–3008. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.09.014.
- Esplugues, J. V (2002) 'NO as a signalling molecule in the nervous system', *British Journal of Pharmacology*, 135, pp. 1079–1095. doi: 10.1038/sj.bjp.0704569.
- Ferreira, R. C. M. *et al.* (2017) 'Peripheral Antinociception Induced by Aripiprazole Is Mediated by the Opioid System', *BioMed Research International*, 2017, pp. 1–6. doi: 10.1155/2017/8109205.
- Förstermann, U., Boissel, J. and Kleinert, H. (1998) 'Expressional control of the "constitutive" isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III)', *The FASEB Journal*, 12(10), pp. 773–790. doi: 10.1096/fasebj.12.10.773.
- Förstermann, U. and Sessa, W. C. (2012) 'Nitric oxide synthases: Regulation and function', *European Heart Journal*, 33(7), pp. 1–13. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.

Referências Bibliográficas

- França, D. S. *et al.* (2006) 'Endogenous opioids mediate the hypoalgesia induced by selective inhibitors of cyclo-oxygenase 2 in rat paws treated with carrageenan', *Neuropharmacology*, 51(1), pp. 37–43. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.02.012.
- Freire, M. A. M. *et al.* (2009) 'Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord', *Frontiers in Neuroscience*, 3(SEP), pp. 175–181. doi: 10.3389/neuro.01.024.2009.
- Galdino, G. S., Duarte, I. D. and Perez, A. C. (2015) 'Central release of nitric oxide mediates antinociception induced by aerobic exercise', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(9), pp. 790–797. doi: 10.1590/1414-431X20144160.
- Galiegue, S. *et al.* (1995) 'Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations', *Eur J Biochem*, 232(1), pp. 54–61. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x.
- Ganapathy, S. *et al.* (2010) 'Resveratrol enhances antitumor activity of TRAIL in prostate cancer xenografts through activation of FOXO transcription factor', *PLoS ONE*, 5(12), p. e15627. doi: 10.1371/journal.pone.0015627.
- Gaoni, Y. *et al.* (1971) 'The Isolation and Structure of Δ -Tetrahydrocannabinol and Other Neutral Cannabinoids from Hashish', *Journal of the American Chemical Society*, 93(1), pp. 217–224. doi: 10.1021/ja00730a036.
- Garland, E. (2013) 'Pain Processing the Human Nervous System: A Selective Review of Nociceptive and Biobehavioral Pathway', *Primary Care - Clinics in Office Practice*, 39(3), pp. 561–571. doi: 10.1016/j.pop.2012.06.013.Pain.
- Gehm, B. D. *et al.* (1997) 'Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), pp. 14138–43.

Referências Bibliográficas

- Gentilli, M. *et al.* (2001) 'Resveratrol decreases hyperalgesia induced by carrageenan in the rat hind paw', *Life Sciences*, 68(11), pp. 1317–1321. doi: 10.1016/S0024-3205(00)01018-3.
- Ghozland, S. *et al.* (2002) 'Motivational Effects of Cannabinoids Are Mediated by μ -Opioid and κ -Opioid Receptors', *Journal of Neuroscience*, 22(3), pp. 1146–1154.
- Gladwin, M. T. *et al.* (2005) 'The Emerging Biology of the Nitrite Anion', *Nature Chemical Biology*, 1(6), pp. 308–314. doi: 10.1038/nchembio1105-308.
- Golan, D. E. *et al.* (2014) *Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia*. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Gómez-Zorita, S. *et al.* (2013) 'Effects of resveratrol on obesity-related inflammation markers in adipose tissue of genetically obese rats.', *Nutrition*, 29(11–12), pp. 1374–80. doi: 10.1016/j.nut.2013.04.014.
- Granados-Soto, V., Argüelles, C. F. and Ortiz, M. I. (2002) 'The peripheral antinociceptive effect of resveratrol is associated with activation of potassium channels', *Neuropharmacology*, 43(5), pp. 917–923. doi: 10.1016/S0028-3908(02)00130-2.
- Green, L. C. *et al.* (1982) 'Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids', *Analytical Biochemistry*, 126(1), pp. 131–138. doi: 10.1016/0003-2697(82)90118-X.
- Gresele, P. *et al.* (2011) 'Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: An update', *Journal of Nutritional Biochemistry*. Elsevier Inc., 22(3), pp. 201–211. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.07.004.

Referências Bibliográficas

- Gupta, Y. K., Sharma, M. and Briyal, S. (2004) 'Antinociceptive effect of trans-resveratrol in rats: Involvement of an opioidergic mechanism', *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 26(9), pp. 667-672.
- Hamza, M. *et al.* (2010) 'Nitric oxide is negatively correlated to pain during acute inflammation', *Molecular Pain*, 6, pp. 1–10. doi: 10.1186/1744-8069-6-55.
- Han, B. *et al.* (2017) 'Prescription Opioid Use, Misuse, and Use Disorders in U.S. Adults: 2015 National Survey on Drug Use and Health', *Annals of Internal Medicine*, pp. 1–10. doi: 10.7326/M17-0865.
- Han, Y. *et al.* (2014) 'Resveratrol reduces morphine tolerance by inhibiting microglial activation via AMPK signalling', *European Journal of Pain (United Kingdom)*, 18(10), pp. 1458–1470. doi: 10.1002/ejp.511.
- Harikumar, K. B. and Aggarwal, B. B. (2008) 'Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases.', *Cell Cycle*, 7, pp. 1020–1035. doi: 10.4161/cc.7.8.5740.
- Hassanzadeh, P. *et al.* (2016) 'The endocannabinoid system and NGF are involved in the mechanism of action of resveratrol: A multi-target nutraceutical with therapeutic potential in neuropsychiatric disorders', *Psychopharmacology*, 233(6), pp. 1087–1096. doi: 10.1007/s00213-015-4188-3.
- He, L. *et al.* (2017) 'Resveratrol suppresses pulmonary tumor metastasis by inhibiting platelet-mediated angiogenic responses', *Journal of Surgical Research*. Elsevier Inc, 7, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.jss.2017.05.009.
- He, X. *et al.* (2014) 'Resveratrol attenuates morphine antinociceptive tolerance via SIRT1 regulation in the rat spinal cord', *Neuroscience Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 566, pp. 55–60. doi: 10.1016/j.neulet.2014.02.022.

Referências Bibliográficas

Hecke, O. V., Torrance, N. and Smith, B. H. (2013) 'Chronic pain epidemiology and its clinical relevance', *British Journal of Anaesthesia*, 111(1), pp. 13–18. doi: 10.1093/bja/aet123.

Herkenham, M. *et al.* (1991) 'Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study', *The Journal of Neuroscience*, 11(2), pp. 563–583. doi: 10.1073/pnas.87.5.1932.

Hernández-Pacheco, A. *et al.* (2008) 'Possible participation of the nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channels pathway in the peripheral antinociception of melatonin', *European Journal of Pharmacology*, 596(1–3), pp. 70–76. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.07.068.

Hohmann, A. G., Briley, E. M. and Herkenham, M. (1999) 'Pre- and postsynaptic distribution of cannabinoid and mu opioid receptors in rat spinal cord.', *Brain Research*, 822(1–2), pp. 17–25. doi: S0006-8993(98)01321-3 [pii].

Hojo, M. *et al.* (2008) 'Mu-Opioid Receptor Forms a Functional Heterodimer With Cannabinoid CB Receptor: Electrophysiological and FRET Assay Analysis', *Journal of Pharmacological Sciences*, 108(3), pp. 308–319. doi: 10.1254/jphs.08244FP.

Honório, K. M., Arroio, A. and Da Silva, A. B. F. (2006) 'Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*', *Química Nova*, 29(2), pp. 318–325. doi: 10.1590/S0100-40422006000200024.

Howlett, A. C. *et al.* (2003) 'International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors', *Pharmacological Reviews*, 54(2), pp. 161–202. doi: 10.1124/pr.54.2.161.

Referências Bibliográficas

Huang, J. *et al.* (2017) 'Sodium channel Na V 1 . 9 mutations associated with insensitivity to pain dampen neuronal excitability Find the latest version : Sodium channel Na V 1 . 9 mutations associated with insensitivity to pain dampen neuronal excitability', *The Journal of Clinical Investigation*, 127(7), pp. 2805–2814. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI92373>.

Hui, Y., Li, X. and Chen, X. (2011) 'Assessment for the light-induced cis-trans isomerization of rhapontigenin and its glucoside rhaponticin by capillary electrophoresis and spectrometric methods', *Journal of Chromatography A*, 1218(34), pp. 5858–5866. doi: 10.1016/j.chroma.2011.06.100.

Ignarro, L. J. *et al.* (1993) 'Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), pp. 8103–8107. doi: 10.1073/pnas.90.17.8103.

Imhofa, A. *et al.* (2004) 'Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille)', *European Heart Journal*, 25(23), pp. 2092–2100. doi: 10.1016/j.ehj.2004.09.029.

Inanaga, K. *et al.* (2009) 'Resveratrol attenuates angiotensin II-induced interleukin-6 expression and perivascular fibrosis', *Hypertens Res.* Nature Publishing Group, 32(6), pp. 466–471. doi: 10.1038/hr.2009.47.

Irnatén, M., Blanchard-Gutton, N. and Harvey, B. J. (2008) 'Rapid effects of 17 β -estradiol on epithelial TRPV6 Ca²⁺ channel in human T84 colonic cells', *Cell Calcium*, 44(5), pp. 441–452. doi: 10.1016/j.ceca.2008.02.007.

Referências Bibliográficas

- Jang, M. *et al.* (1997) 'Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol , a Natural Product Derived from Grapes', *Science*, 275, pp. 218–220. doi: 10.1126/science.275.5297.218.
- Jeon, S.-M., Lee, S.-A. and Choi, M.-S. (2014) 'Antiobesity and vasoprotective effects of resveratrol in apoE-deficient mice.', *Journal of medicinal food*, 17(3), pp. 310–6. doi: 10.1089/jmf.2013.2885.
- Katona, I. *et al.* (2002) 'Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), pp. 10819–10824. doi: 10.1073/pnas.152334899.
- Kawabata, A., Nishimura, Y. and Takagi, H. (1992) 'l-Leucyl-l-arginine, naltrindole and d-arginine block antinociception elicited by l-arginine in mice with carrageenin-induced hyperalgesia', *British Journal of Pharmacology*, 107(4), pp. 1096–1101. doi: 10.1111/j.1476-5381.1992.tb13413.x.
- Keifer Jr, O. P., Riley, J. P. and Boulis, N. M. (2014) 'Deep Brain Stimulation for Chronic Pain: Intracranial Targets, Clinical Outcomes, and Trial Design Considerations', *Neurosurgery Clinics of North America*, 25(4), pp. 671–692. doi: 10.1016/j.nec.2014.07.009.Deep.
- Kimura, Y., Okuda, H. and Arichi, S. (1985) 'Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes', *Biochimica et Biophysica Acta*, 834, pp. 275–278.
- King, R. E., Bomser, J. A. and Min, D. B. (2006) 'Bioactivity of resveratrol', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(3), pp. 65–70. doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.00001.x.

Referências Bibliográficas

Knowles, R. G. *et al.* (1989) 'Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(13), pp. 5159–5162. doi: 10.1073/pnas.86.13.5159.

Kokuba, S. *et al.* (2017) 'Systemic administration of the dietary constituent resveratrol inhibits the nociceptive jaw-opening reflex in rats via the endogenous opioid system', *Neuroscience Research*. Elsevier Ireland Ltd and Japan Neuroscience Society, 119, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.neures.2017.01.005.

Kopp, P. (1998) 'Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the "French paradox"?', *European Journal of Endocrinology*, 138(6), pp. 619–620. doi: 10.1530/eje.0.1380619.

Labuz, D. *et al.* (2007) 'Relative contribution of peripheral versus central opioid receptors to antinociception', *Brain Research*, 1160(1), pp. 30–38. doi: 10.1016/j.brainres.2007.05.049.

Lawrence, T., Willoughby, D. A. and Gilroy, D. W. (2002) 'Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation', *Nature Reviews Immunology*, 2(10), pp. 787–795. doi: 10.1038/nri915.

Lee, H. S., Ha, A. W. and Kim, W. K. (2012) 'Effect of resveratrol on the metastasis of 4T1 mouse breast cancer cells in vitro and in vivo', *Nutrition Research and Practice*, 6(4), pp. 294–300. doi: 10.4162/nrp.2012.6.4.294.

Lehman, M. N. and Karsch, F. J. (1993) 'Do Gonadotropin-Releasing Neurons Contain Estrogen Immunocytochemical Study in the Suffolk Ewe', *Endocrinology*, 133(2), pp. 887–895.

Referências Bibliográficas

- Leifert, W. R. and Abeywardena, M. Y. (2008) 'Cardioprotective actions of grape polyphenols', *Nutrition Research*. Elsevier B.V., 28(11), pp. 729–737. doi: 10.1016/j.nutres.2008.08.007.
- Levin, E. R. (2009) 'Plasma Membrane Estrogen Receptors', *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(10), pp. 477–482. doi: 10.1016/j.tem.2009.06.009. Plasma.
- Lima, M. T. R. De *et al.* (1999) 'Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines', *Journal of Food Chemistry*, 47, pp. 2666–2670.
- Lippi, G. *et al.* (2010) 'Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: Beyond the French Paradox', *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36(1), pp. 59–70. doi: 10.1055/s-0030-1248725.
- Loeser, J. D. and Treede, R.-D. (2008) 'The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology', *Pain*, 137(3), pp. 473–477. doi: 10.1016/j.pain.2008.04.025.
- Longmore, J., Hill, R. G. and Hargreaves, R. J. (2011) 'Neurokinin-receptor antagonists: pharmacological tools and therapeutic drugs', *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 75(6), pp. 612–621. doi: 10.1139/y97-069.
- Lopez-Candales, A. *et al.* (2017) 'Linking Chronic Inflammation with Cardiovascular Disease: From Normal Aging to the Metabolic Syndrome.', *Journal of nature and science*, 3(4), p. e341.
- Lötsch, J., Weyer-Menkhoff, I. and Tegeder, I. (2018) 'Current evidence of cannabinoid-based analgesia obtained in preclinical and human experimental settings', *European Journal of Pain*, 22(3), pp. 471–484. doi: 10.1002/ejp.1148.
- Lundberg, J. O. *et al.* (2009) 'Nitrate and nitrite in biology , nutrition and therapeutics', *Nature Chemical Biology*, 5(12), pp. 865–870.

Referências Bibliográficas

- Lyons, M. M. *et al.* (2003) 'Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries.', *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(20), pp. 5867–5870.
- Maccarrone, M. *et al.* (1999) 'Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity', *European Journal of Biochemistry*, 265(1), pp. 27–34. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00630.x.
- Mansour A, H, K. and Lewis ME (1988) 'Anatomy of CNS opioid receptors.', *Neuroscience Trends*, 11(7), pp. 308–14.
- Manzano, G. M., Giuliano, L. M. P. and Nóbrega, J. A. M. (2008) 'A brief historical note on the classification of nerve fibers', *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 66(1), pp. 117–119. doi: 10.1590/S0004-282X2008000100033.
- Mark, L. *et al.* (2005) 'A validated HPLC method for the quantitative analysis of trans-resveratrol and trans-piceid in Hungarian wines', *Journal of Chromatographic Science*, 43(9), pp. 445–449. doi: 10.1093/chromsci/43.9.445.
- Martins, R. T. *et al.* (2012) 'Receptores opioides até o contexto atual - Opioid receptors to date', *Revista Dor*, 13(1), pp. 75–79.
- Di Marzo, V., Bifulco, M. and Petrocellis, L. De (2004) 'The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation', *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(9), pp. 771–784. doi: 10.1038/nrd1495.
- McCalley, A. E. *et al.* (2014) 'Resveratrol and calcium signaling: Molecular mechanisms and clinical relevance', *Molecules*, 19(6), pp. 7327–7340. doi: 10.3390/molecules19067327.
- Medina, V. M., Dawson-Basoa, M. E. and Gintzler, A. R. (1993) '17 β -estradiol and progesterone positively modulate spinal cord dynorphin: Relevance to the analgesia of pregnancy', *Neuroendocrinology*, 58(3), pp. 310–315. doi: 10.1159/000126555.

Referências Bibliográficas

- Melzack, R. and Wall, P. D. (1965) 'Pain Mechanisms: A New Theory', *Science*, 150(3699), pp. 971–979.
- Millan, M. J. (1999) 'The induction of pain: An integrative review', *Progress in Neurobiology*, 57(1), pp. 1–164. doi: 10.1016/S0301-0082(98)00048-3.
- Millan, M. J. (2002) 'Descending control of pain', *Progress in Neurobiology*, 66(6), pp. 355–474. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00009-6.
- Mishra, B. B. and Tiwari, V. K. (2011) 'Natural products: An evolving role in future drug discovery', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 46(10), pp. 4769–4807. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.07.057.
- Miyamoto, T. *et al.* (2009) 'TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice', *PLoS ONE*, 4(10), p. e7596. doi: 10.1371/journal.pone.0007596.
- Moncada, S., Radomski, M. and Palmer, R. (1988) 'Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function', *Biochemical Pharmacology*, 37(13), pp. 2495–2501. doi: 10.1016/0006-2952(88)90236-5.
- Nahin, R. L. (2015) 'Estimates of Pain Prevalence and Severity in Adults: United States, 2012', *Journal of Pain*. Elsevier Inc, 16(8), pp. 769–780. doi: 10.1016/j.jpain.2015.05.002.
- Nakamura, M. and Ferreira, S. H. (1988) 'Peripheral analgesic action of clonidine: mediation by release of endogenous enkephalin-like substances', *European Journal of Pharmacology*, 146(2–3), pp. 223–228. doi: 10.1016/0014-2999(88)90296-8.
- Necas, J. and Bartosikova, L. (2013) 'Carrageenan: A review', *Veterinarni Medicina*, 58(4), pp. 187–205.

Referências Bibliográficas

Negi, P. *et al.* (2017) 'Niosome-based hydrogel of resveratrol for topical applications: An effective therapy for pain related disorder(s)', *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, 88, pp. 480–487. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.083.

Number and age-adjusted rates of drug-poisoning deaths involving opioid analgesics and heroin: United States, 2000-2014. (2015) U.S. Department of Health and Human Services - Centers for Disease Control and Prevention - National Center for Health Statistics.

Oliveira, C. C. *et al.* (2017) 'Peltatoside Isolated from *Annona crassiflora* Induces Peripheral Antinociception by Activation of the Cannabinoid System.', *Planta Medica*, 83(3–4), pp. 261–267. doi: 10.1055/s-0042-113386.

Ortiz, M. I. *et al.* (2006) 'Possible activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-K+ channels pathway by gabapentin on the formalin test', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 83(3), pp. 420–427. doi: 10.1016/j.pbb.2006.03.002.

Ossipov, M. H. (2012) 'The perception and endogenous modulation of pain.', *Scientifica*, 2012, p. 561761. doi: 10.6064/2012/561761.

Pacheco, D. D. F., Romero, T. R. L. and Duarte, I. D. G. (2014a) 'Central antinociception induced by ketamine is mediated by endogenous opioids and μ - And δ -opioid receptors', *Brain Research*, 1562, pp. 69–75. doi: 10.1016/j.brainres.2014.03.026.

Pacheco, D. D. F., Romero, T. R. L. and Duarte, I. D. G. (2014b) 'Central antinociception induced by ketamine is mediated by endogenous opioids and μ - And δ -opioid receptors', *Brain Research*. Elsevier, 1562, pp. 69–75. doi: 10.1016/j.brainres.2014.03.026.

Referências Bibliográficas

Pacheco, D. da F. *et al.* (2008) 'The mu-opioid receptor agonist morphine, but not agonists at delta- or kappa-opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors.', *British journal of pharmacology*, 154(5), pp. 1143–9. doi: 10.1038/bjp.2008.175.

Pacheco, D. F. *et al.* (2005) 'δ-Opioid receptor agonist SNC80 elicits peripheral antinociception via δ1 and δ2 receptors and activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway', *Life Sciences*, 78(1), pp. 54–60. doi: 10.1016/j.lfs.2005.04.032.

Pacheco, D. F. *et al.* (2009) 'Central antinociception induced by μ-opioid receptor agonist morphine, but not δ- Or κ-, is mediated by cannabinoid CB 1 receptor', *British Journal of Pharmacology*, 158(1), pp. 225–231. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00310.x.

Pacheco, D. F. *et al.* (2016) 'A spider derived peptide, pnp-19, induces central antinociception mediated by opioid and cannabinoid systems', *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 22(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s40409-016-0091-6.

Pan, X. *et al.* (2017) 'Resveratrol-induced antinociception is involved in calcium channels and calcium/caffeine-sensitive pools.', *Oncotarget*, 8(6), pp. 9399–9409. doi: 10.18632/oncotarget.14090.

Papka, R. E. *et al.* (2001) 'Estrogen receptor-α and -β immunoreactivity and mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord', *Cell and Tissue Research*, 304(2), pp. 193–214. doi: 10.1007/s004410100363.

Referências Bibliográficas

- Paradise, W. A. *et al.* (2010) 'Nitric oxide: Perspectives and emerging studies of a well known cytotoxin', *International Journal of Molecular Sciences*, 11(7), pp. 2715–2745. doi: 10.3390/ijms11072715.
- Paul, E. S. and Mendl, M. T. (2018) 'Animal emotion: Descriptive and prescriptive definitions and their implications for a comparative perspective', *Applied Animal Behaviour Science*, 205(January), pp. 202–209. doi: 10.1016/j.applanim.2018.01.008.
- Pavlovic, Z. W. and Bodnar, R. J. (1998) 'Opioid supraspinal analgesic synergy between the amygdala and periaqueductal gray in rats', *Brain Research*, 779(1–2), pp. 158–169. doi: 10.1016/S0006-8993(97)01115-3.
- Paxinos, G. and Watson, C. (2013) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 7^a edição. New York: Academic Press.
- Pert, C. B. and Snyder, S. H. (1973) 'Opiate Receptor: Demonstration in Nervous Tissue', *Science*, 179(4077), pp. 1011–1014. doi: 10.1126/science.179.4077.1011.
- Pham-Marcou, T. A. *et al.* (2008) 'Antinociceptive effect of resveratrol in carrageenan-evoked hyperalgesia in rats: Prolonged effect related to COX-2 expression impairment', *Pain*, 140(2), pp. 274–283. doi: 10.1016/j.pain.2008.08.010.
- Porter, A. C. *et al.* (2002) 'Characterization of a Novel Endocannabinoid, Virodhamine, with Antagonist Activity at the CB1 Receptor', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3), pp. 1020–1024. doi: 10.1124/jpet.301.3.1020.
- Poulsen, M. M. *et al.* (2015) 'Resveratrol and inflammation: Challenges in translating pre-clinical findings to improved patient outcomes', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(6), pp. 1124–1136. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.12.024.

Referências Bibliográficas

- Prata, M. N. L. *et al.* (2017) 'Anti-inflammatory effects of resveratrol', *Journal of Medicinal Plants Studies*, 5(4), pp. 48–55.
- Price, T. J. and Prescott, S. A. (2015) 'Inhibitory regulation of the pain gate and how its failure causes pathological pain', *Pain*, 156(5), pp. 789–792. doi: 10.1097/j.pain.000000000000139.
- Ramos, L. A., Cavalheiro, C. C. S. and Cavalheiro, É. T. G. (2006) 'Determination of nitrite in water using a flower extract', *Quimica Nova*, 29(5), pp. 1114–1120. doi: 10.1590/S0100-40422006000500037.
- Randall, L. O. and Selitto, J. J. (1957) 'A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue.', *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 111(4), pp. 409–419.
- Raouf, R. *et al.* (2010) 'Pain as a channelopathy', *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), pp. 3745–3752. doi: 10.1172/JCI43158.to.
- Reche, I., Fuentes, J. A. and Ruiz-Gayo, M. (1996a) 'A role for central cannabinoid and opioid systems in peripheral Δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced analgesia in mice', *European Journal of Pharmacology*, 301(1–3), pp. 75–81. doi: 10.1016/0014-2999(96)00045-3.
- Reche, I., Fuentes, J. A. and Ruiz-Gayo, M. (1996b) 'Potentiation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced analgesia by morphine in mice: involvement of μ - and κ -opioid receptors', *European Journal of Pharmacology*, 318, pp. 11–16.
- Reis, F. J. and Rocha, N. P. (2007) 'Efeito analgésico de longa duração da dipirona sobre a hiperalgesia persistente induzida pela constrição do nervo ciático em ratos: participação do óxido nítrico', *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(4), pp. 514–522. doi: 10.1590/s1516-93322006000400006.

Referências Bibliográficas

Reis, G. M. L. *et al.* (2009) 'Opioid receptor and NO/cGMP pathway as a mechanism of peripheral antinociceptive action of the cannabinoid receptor agonist anandamide', *Life Sciences*, 85, pp. 351–356. doi: .1037//0033-2909.126.1.78.

Renaud, S. and Lorgeril, M. (1992) 'Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease', *The Lancet*, 339, pp. 1523–1526. doi: 10.1016/0140-6736(92)91277-F.

Reynolds, D. (1969) 'Surgery in the Rat during Electrical Analgesia Induced by Focal Brain Stimulation', *Science*, 164(3878), pp. 444–445.

Rimando, A. M. *et al.* (2004) 'Resveratrol, Pterostilbene, and Piceatannol in Vaccinium Berries', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 4713–4719.

Rodrigues, A. R. A. and Duarte, I. D. G. (2000) 'The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels', *British Journal of Pharmacology*, 129(1), pp. 110–114. doi: 10.1038/sj.bjp.0703038.

Roman, E. *et al.* (2006) 'Variations in opioid peptide levels during the estrous cycle in Sprague-Dawley rats', *Neuropeptides*, 40(3), pp. 195–206. doi: 10.1016/j.npep.2006.01.004.

Romanelli, R. (2017) 'Opioid Prescribing for Chronic Pain in a Community--Based Healthcare System', *American Journal of Managed Care*, 23(5), pp. 138–146.

Romero-Pérez, A. I. *et al.* (1999) 'Piceid, the Major Resveratrol Derivative in Grape Juices', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), pp. 1533–1536. doi: 10.1021/jf981024g.

Referências Bibliográficas

Romero, T. R. L. *et al.* (2012) 'Involvement of the L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in peripheral antinociception induced by N-palmitoyl-ethanolamine in rats', *Journal of Neuroscience Research*, 90(7), pp. 1474–1479. doi: 10.1002/jnr.22797.

Romero, T. R. L. *et al.* (2013) 'CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonists induce peripheral antinociception by activation of the endogenous noradrenergic system', *Anesthesia and Analgesia*, 116(2), pp. 463–472. doi: 10.1213/ANE.0b013e3182707859.

Romero, T. R. L. and Duarte, I. D. G. (2009) 'Alpha(2)-adrenoceptor agonist xylazine induces peripheral antinociceptive effect by activation of the l-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat', *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V., 613(1–3), pp. 64–67. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.04.031.

Romero, T. R. L. and Duarte, I. D. G. (2012) 'N-palmitoyl-ethanolamine (PEA) induces peripheral antinociceptive effect by ATP-sensitive K⁺-channel activation.', *Journal of pharmacological sciences*, 118(2), pp. 156–160. doi: 10.1254/jphs.11150FP.

Romero, T. R. L., Pacheco, D. D. F. and Duarte, I. D. G. (2013) 'Xylazine induced central antinociception mediated by endogenous opioids and μ -opioid receptor, but not δ - or κ -opioid receptors', *Brain Research*. Elsevier, 1506, pp. 58–63. doi: 10.1016/j.brainres.2013.02.030.

Rybalkin, S. D. *et al.* (2002) 'Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells', *Journal of Biological Chemistry*, 277(5), pp. 3310–3317. doi: 10.1074/jbc.M106562200.

Saiko, P. *et al.* (2008) 'Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?', *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 658(1–2), pp. 68–94. doi: 10.1016/j.mrrev.2007.08.004.

Referências Bibliográficas

- Saito, V. M., Wotjak, C. T. and Moreira, F. A. (2010) 'Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: Novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão?', *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 32(SUPPL. 1), pp. 7–14.
- Salio, C. *et al.* (2001) 'CB1-cannabinoid and mu-opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn.', *Neuroreport*, 12(17), pp. 3689–3692. doi: 10.1097/00001756-200112040-00017.
- Sanders, T. H., McMichael Jr., R. W. and Hendrix, K. W. (2000) 'Occurrence of Resveratrol in Edible Peanuts', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), pp. 1243–1246. doi: 10.1021/jf990737b.
- Santuz, A. (2018) *Extracting muscle synergies from human steady and unsteady locomotion: methods and experiments*. Humboldt-Universität zu Berlin. doi: 10.18452/19351.
- Sharma, S., Kulkarni, S. K. and Chopra, K. (2007) 'Effect of resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, on thermal hyperalgesia in a mouse model of diabetic neuropathic pain', *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 21(1), pp. 89–94. doi: 10.1111/j.1472-8206.2006.00455.x.
- Shimazu, Y. *et al.* (2016) 'Local administration of resveratrol inhibits excitability of nociceptive wide-dynamic range neurons in rat trigeminal spinal nucleus caudalis', *Brain Research Bulletin*. Elsevier Inc., 124, pp. 262–268. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.06.001.
- Signorelli, P. and Ghidoni, R. (2005) 'Resveratrol as an anticancer nutrient: Molecular basis, open questions and promises', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(8), pp. 449–466. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.01.017.

Referências Bibliográficas

Silverthorn, D. U. (2017) *Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada*. 7ª Edição.

Porto Alegre: Artmed Editora Ltda.

Smith, D. J. *et al.* (1988) 'The μ opiate receptor is responsible for descending pain inhibition originating in the periaqueductal gray region of the rat brain', *European Journal of Pharmacology*, 156(1), pp. 47–54. doi: 10.1016/0014-2999(88)90145-8.

Smith, P. B., Welch, S. P. and Martin, B. R. (1994) 'Interactions between delta 9-tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice.', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 268(3), pp. 1381–7.

Smith, Y. R. *et al.* (2006) 'Pronociceptive and Antinociceptive Effects of Estradiol through Endogenous Opioid Neurotransmission in Women', *Journal of Neuroscience*, 26(21), pp. 5777–5785. doi: 10.1523/jneurosci.5223-05.2006.

Soares, A. C. and 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(1), pp. 127–131. doi: 10.1038/sj.bjp.0704224.

Soleas, G. J., Diamandis, E. P. and Goldberg, D. M. (1997) 'Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?', *Clinical Biochemistry*, 30(2), pp. 91–103.

Somkuwar, R. G. *et al.* (2018) 'Estimation of polyphenols by using HPLC–DAD in red and white wine grape varieties grown under tropical conditions of India', *Journal of Food Science and Technology*. Springer India, 55(12), pp. 4994–5002. doi: 10.1007/s13197-018-3438-x.

Stein, C. *et al.* (1990) 'Opioids from Immunocytes Interact with Receptors on Sensory nerves to Inhibit Nociception in Inflammation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, pp. 5935–5939.

Referências Bibliográficas

- Stewart, W. F. (2003) 'Lost Productive Time and Cost Due to Common Pain Conditions in the US Workforce', *Jama*, 290(18), pp. 2443–2454. doi: 10.1001/jama.290.18.2443.
- Sugiura, T. *et al.* (1995) '2-arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215(1), pp. 89–97. doi: 10.1006/bbrc.1995.2437.
- Takaoka, M. J. (1940) 'Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.)', *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido Imperial University*, 3, pp. 1–16.
- Tillu, D. V *et al.* (2012) 'Resveratrol engages AMPK to attenuate ERK and mTOR signaling in sensory neurons and inhibits incision-induced acute and chronic pain', *Molecular Pain*, 8(5), pp. 1–12. doi: papers3://publication/uuid/E0B3655F-186E-4F3A-86B3-A4626E51E4C7.
- Tokusoglu, O., Unal, M. K. and Yemis, F. (2005) 'Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass Spectrometry (GC-MS)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), pp. 5003–5009.
- Tomé-Carneiro, J. *et al.* (2013) 'Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence.', *Current Pharmaceutical Design*, 19, pp. 6064–93. doi: 10.2174/13816128113199990407.
- Toriyabe, M. *et al.* (2004) 'Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation', *Anesthesiology*, 101(4), pp. 983–990. doi: 10.1097/00000542-200410000-00025.

Referências Bibliográficas

Torres-López, J. E. *et al.* (2002) 'Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test', *Life Sciences*, 70(14), pp. 1669–1676. doi: 10.1016/S0024-3205(02)01491-1.

Torres-Reveron, A. *et al.* (2008) 'Ovarian steroids modulate leu-enkephalin levels and target leu-enkephalinergic profiles in the female hippocampal mossy fiber pathway', *Brain Research*, 1232, pp. 70–84. doi: 10.1016/j.brainres.2008.07.058.

Trang, T. *et al.* (2015) 'Pain and Poppies: The Good, the Bad, and the Ugly of Opioid Analgesics', *Journal of Neuroscience*, 35(41), pp. 13879–13888. doi: 10.1523/jneurosci.2711-15.2015.

Tunstall-Pedoe, H. *et al.* (1999) 'Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA Project populations', *Lancet*, 353(9164), pp. 1547–1557. doi: 10.1016/S0140-6736(99)04021-0.

Turk, D. C. (2002) 'Clinical effectiveness and cost-effectiveness of treatments for patients with chronic pain', *Clin J Pain*, 18(6), pp. 355–365. doi: 10.1097/00002508-200211000-00003.

Valverde, O. *et al.* (2000) 'Reduction of stress-induced analgesia but not of exogenous opioid effects in mice lacking CB1 receptors', *European Journal of Neuroscience*, 12(2), pp. 533–539. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00929.x.

VanderHorst, V. G. J. M., Gustafsson, J. Å. and Ulfhake, B. (2005) 'Estrogen receptor- α and - β immunoreactive neurons in the brainstem and spinal cord of male and female mice: Relationships to monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems', *Journal of Comparative Neurology*, 488(2), pp. 152–179. doi: 10.1002/cne.20569.

Referências Bibliográficas

- Vang, O. *et al.* (2011) 'What is new for an old molecule? systematic review and recommendations on the use of resveratrol', *PLoS ONE*, 6(6), p. e19881. doi: 10.1371/journal.pone.0019881.
- Vaso, A. *et al.* (2014) 'Peripheral nervous system origin of phantom limb pain', *Pain*. International Association for the Study of Pain, 155(7), pp. 1384–1391. doi: 10.1016/j.pain.2014.04.018.
- Veloso, C. C. *et al.* (2014) 'Tingenone, a Pentacyclic Triterpene, Induces Peripheral Antinociception Due to Opioidergic Activation', *Planta Medica*, 80(17), pp. 1615–1621. doi: 10.1055/s-0034-1383147.
- Veloso, C. C. *et al.* (2015) 'Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to NO/cGMP and ATP-sensitive K⁺ channels pathway activation in mice', *European Journal of Pharmacology*, 755, pp. 1–5. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.02.038.
- Vitrac, X. *et al.* (2005) 'Determination of stilbenes (δ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), pp. 5664–5669. doi: 10.1021/jf050122g.
- De Waal, F. B. M. (2011) 'What is an animal emotion?', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1224(1), pp. 191–206. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05912.x.
- Wall, P. D. (1967) 'The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses', *The Journal of Physiology*, 188, pp. 403–423.
- Walle, T. (2011) 'Bioavailability of resveratrol', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), pp. 9–15. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05842.x.

Referências Bibliográficas

Wang, W. *et al.* (2017) 'The analgesic effect of trans-resveratrol is regulated by calcium channels in the hippocampus of mice', *Metabolic Brain Disease*. *Metabolic Brain Disease*, 32(4), pp. 1311–1321. doi: 10.1007/s11011-017-0033-1.

Weiner, C. P. *et al.* (1994) 'Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), pp. 5212–6.

Welch, S. P. (1993) 'Blockade of cannabinoid-induced antinociception by norbinaltorphimine, but not N,N-diallyl-tyrosine-Aib-phenylalanine-leucine, ICI 174,864 or naloxone in mice.', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 265(2), pp. 633–640.

Winter, C. A., Risley, E. A. and Nuss, G. W. (1962) 'Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs.', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111, pp. 544–547.

Woolf, C. J. (2010) 'What is this thing called pain?', *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), pp. 3742–3744. doi: 10.1172/JCI45178.3742.

World Health Organization (1988) 'The world health organization monica project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): A major international collaboration', *Journal of Clinical Epidemiology*, 41(2), pp. 105–114. doi: 10.1016/0895-4356(88)90084-4.

Yaksh, T. L., Al-Rodhan, N. R. F. and Jensen, T. S. (1988) 'Sites of action of opiates in production of analgesia', *Progress in Brain Research*, 77(C), pp. 371–394. doi: 10.1016/S0079-6123(08)62803-4.

Zimmermann, M. (1983) 'Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals', *Pain*, 16(2), pp. 109–110.

Referências Bibliográficas

Zubieta, J.-K. *et al.* (2002) 'μ-Opioid Receptor-Mediated Antinociceptive Responses Differ in Men and Women', *The Journal of Neuroscience*, 22(12), pp. 5100–5107. doi: 10.1523/jneurosci.22-12-05100.2002.