

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE SUBSTÂNCIAS ANALGÉSICAS
OPIOIDE, CANABINOIDE, NÃO ESTEROIDAL E ESTEROIDAL EM
LARVAS DE *Drosophila melanogaster* NO MODELO DE NOCICEPÇÃO
TÉRMICA POR RADIAÇÃO INFRAVERMELHA**

Thamyris Santos Silva

Belo Horizonte

2018

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE SUBSTÂNCIAS ANALGÉSICAS
OPIOIDE, CANABINOIDE, NÃO ESTEROIDAL E ESTEREOIDAL EM
LARVAS DE *Drosophila melanogaster* NO MODELO DE NOCICEPÇÃO
TÉRMICA POR RADIAÇÃO INFRAVERMELHA**

Thamyris Santos Silva

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

Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte.

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lígia Araújo Naves

Belo Horizonte

2018

"Avaliação do efeito de substâncias analgésicas opioides, canabinoides, não esteroidal e estereoidal em larvas drosophila melanogaster no modelo de nocicepção térmica por radiação infravermelha"

THAMYRIS SANTOS SILVA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 20 de novembro de 2018, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



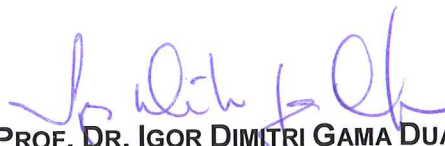
PROF. DR. GUSTAVO CAMPOS E SILVA KUHN
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. MÁRCIO DE MATTOS COELHO
FACULDADE DE FARMÁCIA/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DR^a. LÍGIA ARAÚJO NAVES KUSHMERICK
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COORIENTADORA



PROF. DR. IGOR DIMITRI GAMA DUARTE
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

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

Belo Horizonte, 20 de novembro de 2018.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.” (Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

Serei eternamente grata aos meus pais, Silvia dos Santos e Celson da Silva, que com muito esforço batalharam para me oferecer a oportunidade de estudar. Sem dúvidas, o conhecimento é a melhor herança que eu poderia receber. Obrigada pelo apoio em todos os momentos e ao verdadeiro amor que nos une.

Agradeço ao meu eterno companheiro Caio, por estar sempre ao meu lado, sendo meu confidente, conselheiro e melhor amigo. Obrigada por não permitir que eu desistisse ou questionasse a minha capacidade. Por me ajudar a ser uma pessoa melhor e mais paciente. Agradeço por cada momento que dividimos nessa caminhada. Muito obrigada por realizar esse sonho junto comigo.

Em especial, agradeço ao Prof. Igor Dimitri Gama Duarte, por me receber de portas abertas no laboratório e confiar a mim o início do desenvolvimento de uma nova linha de pesquisa. Foi uma tarefa difícil, mas entusiasmante. Obrigada por me mostrar que a ciência pode ser além do convencional. Por possibilitar a convivência com outros pesquisadores e diversas linhas de pesquisa através das parcerias multidisciplinares que fizemos. Agradeço as orientações e aos ensinamentos teóricos e experimentais que contribuíram para minha formação como farmacologista. Meu muito obrigado por proporcionar essa oportunidade única de crescimento pessoal.

Agradeço o Prof. Thiago Roberto Lima Romero por propor a ideia inicial deste trabalho. Agradeço a Prof.^a Andrea de Castro Perez pela agradável convivência.

Agradeço a Prof.^a Lígia Araújo Naves pela disposição em nos ajudar e nos receber em seu laboratório. Obrigada pela receptividade, interesse e contribuição para este trabalho. Agradeço aos colegas do laboratório Eletrocel, em especial a Jennifer Diniz Soares Guimarães, que com muita paciência e disposição nos auxiliou na padronização da técnica de injeção das soluções. Obrigada a todos pela agradável convivência.

Agradeço ao Prof. Gustavo Campos e Silva Kuhn e seus alunos por nos disponibilizar o essencial para nosso estudo, as *Drosophila melanogaster*. Obrigada por de fato viabilizar esse trabalho e contribuir com o desenvolvimento de algo tão inovador na nossa área.

Agradeço ao Prof. Márcio de Matos Coelho por gentilmente emprestar ao Laboratório de Dor e Analgesia o aparelho de Hargreaves. Ações como essa são fundamentais para transformar a ciência em realidade.

A cada um dos colegas do Laboratório de Dor e Analgesia, meu muito obrigado. Obrigada por cada risada, cada felicidade compartilhada, por todo aprendizado, cooperação e companheirismo. Espero reencontrar com vocês e dividir mais e mais alegrias. Em especial, agradeço a Flávia Cristina de Sousa Fonseca que deixou os meus dias mais agradáveis com toda a sua doçura e gentileza. Obrigada pelo apoio, ensinamentos e confianças. Você é um grande exemplo de pessoa e de profissional.

Agradeço a todos os membros do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia que de alguma forma me ajudaram ou contribuíram para a minha formação acadêmica e desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também as agências de fomento que promovem o desenvolvimento da pesquisa científica no Brasil.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte desta conquista, fica expresso aqui a minha gratidão.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS** - ácido acetilsalicílico
- AEA** - araquidonil etanolamina (anandamida)
- AIE** - anti-inflamatório esteroidal
- AINE** - anti-inflamatório não esteroidal
- ANOVA** - análise de variância
- CB₁** - receptor canabinoide do tipo 1
- CB₂** - receptor canabinoide do tipo 2
- COX** - ciclooxigenase
- COX1** - ciclooxigenase 1
- COX2** - ciclooxigenase 2
- CNV** - cordão nervoso ventral
- EMP** - efeito máximo possível
- E.P.M** - erro padrão da média
- ERG** - elementos de resposta aos glicocorticoides
- et al* - e outros autores
- GR** - complexo glicocorticoide e receptor
- IASP** - Associação Internacional para o Estudo da Dor
- md** - neurônios multidendríticos
- mdI** - neurônios multidendríticos de classe I
- mdII** - neurônios multidendríticos de classe II
- mdIII** - neurônios multidendríticos de classe III
- mdIV** - neurônios multidendríticos de classe IV
- NFκB** - fator nuclear kappa B
- SNa** - neurônios motores do nervo segmentar a
- SNC** - sistema nervoso central

TNF - fator de necrose tumoral

TRPA1 - receptor de potencial transiente anquirina tipo 1

TRPV1 - receptor de potencial transiente vaniloide tipo 1

UV – ultravioleta

ZSE - zona subesofageal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Teoria da dor descrita por Renné Descartés, 1664	18
Figura 2. Classificação dos tipos de dor (figura adaptada de Woolf, 2010).	19
Figura 3. Componentes da resposta sensorial no reino Metazoa (imagem adaptada de Smith & Lewin, 2009).	21
Figura 4. Ciclo de vida da <i>D. melanogaster</i> (figura adaptada de Flagg, 1979).	23
Figura 5. Anatomia da larva de 3º estágio de <i>D. melanogaster</i>	24
Figura 6. Organização do sistema nervoso periférico da larva de 3º estágio de <i>D. melanogaster</i>	25
Figura 7. Morfologia das classes de neurônios multidendriticos (tipo II) da larva de <i>D. melanogaster</i> (imagem adaptada de Grueber et al., 2007).....	26
Figura 8. Esquema do circuito neuronal envolvido na nocicepção de larvas de 3º estágio de <i>D. melanogaster</i> (figura adaptada de Ohyama et al., 2015).....	27
Figura 9. Esquema do circuito neuronal envolvido na nocicepção de larvas de 3º estágio de <i>D. melanogaster</i> (figura adaptada de Burgos et al., 2018).....	28
Figura 10. Esquema do circuito neuronal envolvido na nocicepção de larvas de 3º estágio de <i>D. melanogaster</i> (figura adaptada de Yoshino et al., 2017).....	29
Figura 11. Resposta comportamental da larva de 3º estágio de <i>D. melanogaster</i> frente ao estímulo térmico (figura adaptada de Oswald et al., 2011).....	31
Figura 12. Frascos contendo meio de farinha de milho padrão e várias fases da mosca <i>D. melanogaster</i>	38
Figura 13. Injeção das drogas e dos fármacos no hemocele das larvas 3º estágio de <i>D. melanogaster</i>	40
Figura 14. Teste de nocicepção térmica por radiação infravermelha modificado.....	41
Figura 15. Padronização da intensidade do estímulo nocivo térmico por radiação infravermelha	49
Figura 16. Curva de incremento da temperatura da gota pela incidência da radiação infravermelha em diferentes intensidades	50

Figura 17. Efeito antinociceptivo dose-dependente da morfina em larvas de <i>D. melanogaster</i> no modelo de nocicepção térmica por radiação infravermelha	52
Figura 18. Naloxona reverte o efeito antinociceptivo máximo da morfina.....	53
Figura 19. Efeito antinociceptivo dose-dependente da AEA em larvas de <i>D. melanogaster</i> no modelo de nocicepção térmica por radiação infravermelha	55
Figura 20. O antagonista dos receptores CB ₁ , AM251, não reverte o efeito antinociceptivo máximo da anandamida.....	56
Figura 21. O antagonista dos receptores CB ₂ , AM630, não reverte o efeito antinociceptivo máximo da AEA.....	57
Figura 22. Efeito antinociceptivo dose-dependente da dipirona em larvas de <i>D. melanogaster</i> no modelo de nocicepção térmica por radiação infravermelha	59
Figura 23. Sensibilização térmica após exposição a radiação infravermelha em diferentes intensidade	61
Figura 24. Temperatura da gota de água em relação à latência de saca-rolha da larva de <i>D. melanogaster</i> após a sensibilização térmica em diferentes intensidades.	63
Figura 25. Antinocicepção dose-dependente do ácido acetilsalicílico (AAS) frente a sensibilização térmica induzida por radiação infravermelha em larvas de <i>D. melanogaster</i>	65
Figura 26. Antinocicepção dose-dependente em curto prazo da dexametasona sobre a sensibilização térmica induzida por radiação infravermelha em larvas de <i>D. melanogaster</i>	67
Figura 27. Efeito antinociceptivo dose-dependente da dexametasona em larvas de <i>D. melanogaster</i> no modelo de nocicepção térmica por radiação infravermelha	69
Figura 28. Perfil do fármaco AAS no modelo de nocicepção térmica por radiação infravermelha em larvas de <i>D. melanogaster</i> não sensibilizadas	70
Figura 29. Antinocicepção dose-dependente em longo prazo da dexametasona sobre a sensibilização térmica induzida por radiação infravermelha em larvas de <i>D. melanogaster</i>	71

RESUMO

Introdução: Atualmente, o uso de animais na pesquisa científica, principalmente mamíferos, tem sido discutido amplamente. A tentativa de diminuir a quantidade de animais utilizados no campo da biologia experimental nociceptiva leva ao desenvolvimento de novos métodos e instituição de novos organismos modelos, como por exemplo, as *Drosophilas*. Achados científicos demonstraram que os neurônios multidendríticos de classe IV em larvas de 3º estágio de *Drosophila melanogaster*, são necessários na nocicepção térmica. Dessa forma, o organismo modelo foi utilizado para testar substâncias e procedimentos pró e antinociceptivos frente ao estímulo térmico por radiação infravermelha. **Objetivos:** Avaliar o efeito das substâncias analgésicas morfina, anandamida (AEA), dipirona e dexametasona em larvas de *D. melanogaster* submetidas à estimulação térmica por radiação infravermelha e o efeito do ácido acetilsalicílico (AAS) e da dexametasona após sensibilização por luz infravermelha. **Métodos:** Larvas de terceiro estágio de *D. melanogaster* foram imersas em 20 µL de água. Em seguida, a gota foi posicionada perpendicularmente à radiação infravermelha (aparelho de Hargreaves) com intensidade máxima de 95% da lâmpada para evocar resposta de escape basal, caracterizada por rolamento de 360° em seu próprio eixo. O intervalo de tempo entre o início do estímulo e o movimento é chamado de *latência de saca-rolha*, que é usada como medida de nocicepção. As substâncias em teste foram administradas no hemocele larval no volume de 0,1 µL, diluídas em hemolinfa artificial, utilizando um aparato de microinjeção. Para sensibilização dos nociceptores, cada larva foi estimulada durante 32 s a 95, 97 ou 99% da intensidade do aparelho. A intensidade de 97% foi escolhida para avaliação dos efeitos do AAS e dexametasona. **Resultados:** Para avaliar o perfil antinociceptivo da morfina, mediu-se a latência de saca-rolha após 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60 e 120 minutos (min) da injeção de morfina. Observou-se um efeito dependente da dose (2, 4, 8 e 16 ng), que atingiu o tempo de corte (32 s) com a dose mais alta (16 ng). Este efeito antinociceptivo máximo foi completamente revertido com a administração concomitante de 4 ng de naloxona. As doses de 1 e 2 ng reverteram o efeito parcialmente. Utilizou-se um protocolo semelhante para investigar o efeito antinociceptivo da AEA. Assim como com a morfina, houve antinocicepção dependente da dose (8, 16 e 32 pg). O efeito antinociceptivo máximo foi alcançado com 32 pg e não foi revertido com a administração concomitante de 80 ng do antagonista do receptor CB₁, o AM251, ou 100 ng de AM630, antagonista do receptor CB₂. Antinocicepção dose-dependente também foi observada após a injeção de dipirona (32, 64 e 128 ng) e dexametasona (4, 8 e 16 ng). Quando o protocolo de sensibilização térmica foi utilizado, houve redução na latência de saca-rolha de 12,1 para 7,5 s. No basal, as larvas

exibiram saca-rolhas quando a temperatura chegou a 30°C e após a sensibilização responderam com 28,4°C. Foi observado antinocicepção dose-dependente de AAS (25, 50 e 100 ng) e dexametasona (4, 8 e 16 ng) após a sensibilização térmica. O AAS não apresentou efeito frente à sensibilização prévia. Também observou-se um efeito a longo prazo da dexametasona (16 ng), que reverteu completamente a sensibilização térmica em 150 a 210 minutos, com pico de ação em 190 min. **Conclusão:** Os resultados mostram que o modelo modificado de nocicepção, induzido pela estimulação térmica em larvas *D. melanogaster*, foi adequado para a detecção dos efeitos antinociceptivos dos analgésicos e dos anti-inflamatórios não esteroideais e esteroideais. Nossos resultados abrem perspectivas para a avaliação e descoberta de drogas antinociceptivas usando um modelo biológico não murino.

Suporte Financeiro: CNPq e CAPES.

Palavras chaves: *Drosophila melanogaster*, antinocicepção, resposta saca-rolha, comportamento de rolamento, radiação infravermelha.

ABSTRACT

Introduction: Currently, the use of animals in scientific research, mainly mammals, has been widely discussed. The attempt to reduce the number of animals used in the field of experimental nociceptive biology leads to development of new methods and introduction of new organisms models, such as *Drosophila*. Scientific findings have demonstrated that class IV multidendritic neurons in third stage larvae *Drosophila melanogaster* are required in thermal nociception. In this way, the model organism was used to test substances and pro and antinociceptive procedures against infrared radiation. **Objectives:** To evaluate the effect of analgesic substances morphine, anandamide (AEA), dipyrone and dexamethasone in *D. melanogaster* larvae submitted to thermal stimulation by infrared radiation, and the effect of acetylsalicylic acid (AAS) and dexamethasone after sensitization by infrared light. **Methods:** Third stage larvae of *D. melanogaster* were immersed in 20 μ L of water. Then, the drop was positioned perpendicular to infrared radiation (Hargreaves apparatus) with 95% maximum lamp intensity to evoke basal escape response, characterized by a roll of 360° on its own axis. The time interval between start of the stimulus and movement is called *corkscrew latency*, which is used as a measure of nociception. The substances under test were administered to larval hemocele in 0.1 μ L diluted in artificial hemolymph using a micro-injection apparatus. For sensitization of nociceptors, each larva was stimulated for 32 s at 95, 97 or 99% intensities of the apparatus. The intensity of 97% was chosen for evaluation of the effect of AAS and dexamethasone. **Results:** To evaluate the antinociceptive profile of morphine, we measured the latency of corkscrew after 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60 and 120 minutes (min) of morphine. It was observed a dose dependent effect (2, 4, 8, 16 ng) that reached the cutoff time (32 s) with the highest dose (16 ng). This maximal antinociceptive effect was completely reversed with concomitant administration of 4 ng of naloxone. Doses of 1 and 2 ng partially reversed the effect. It was used a similar protocol to investigate the antinociceptive effect of AEA. It was observed a dose-dependent antinociception (8, 16 e 32 pg). The maximum antinociceptive effect was achieved with 32 pg and it was not reversed with concomitant administration of 80 ng of CB₁ receptor antagonist, AM251, or 100 ng of AM630, CB₂ receptor antagonist. A dose-dependent antinociception was also observed after injection of dipyrone (32, 64 e 128 ng) and dexamethasone (4, 8 e 16 ng). When the thermal sensitization protocol was used, there was a reduction of the corkscrew latency, from 12 to 7,5 s. At basal level, larvae exhibited corkscrew when the temperature reached 30°C and after sensitization

they responded with 28.4°C. We observed a dose-dependent antinociception of AAS (25, 50 e 100 ng) and dexamethasone (16 ng) after thermal sensitization. AAS had no effect on prior sensitization. It was also observed a long-term effect of dexamethasone (16 ng), which completely reverted thermal sensitization over 150 to 210 min, with peak action in 190 min.

Conclusion: The results show that the modified model of nociception induced by thermal stimulation in *D. melanogaster* larvae was suitable for detection the antinociception actions of analgesics and nonsteroidal and steroidal anti-inflammatory drugs. Our findings open perspectives for the evaluation and discovery of antinociceptive drugs using a non-murine biological model. **Financial Support:** CNPq and CAPES.

Key words: *Drosophila melanogaster*, antinociception, corkscrew response, rolling behavior, infrared radiation.

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.1. Considerações sobre o estudo da dor	18
1.2. Modelos animais na nocicepção.....	20
1.3. Modelo experimental <i>D. melanogaster</i>	22
1.4. Nocicepção em larvas de 3º estágio de <i>D. melanogaster</i>	24
1.5. Nocicepção térmica em larvas de 3º estágio <i>D. melanogaster</i>	30
2. Justificativa	32
3. Objetivos	34
3.1. Objetivo Geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. Materiais e Métodos	37
4.1. Animais de experimentação	38
4.2. Drogas e solventes.....	38
4.2.1. Hemolinfa artificial	38
4.2.2. Analgésicos e/ou anti-inflamatórios	39
4.2.3. Via de administração das drogas e dos fármacos	39
4.3. Teste de nocicepção térmica por radiação infravermelha modificado	40
4.4. Padronização da intensidade da radiação infravermelha.....	42
4.5. Avaliação da temperatura da água submetida a diferentes intensidades da radiação infravermelha	42
4.6. Procedimento experimental para a avaliação do efeito de substâncias analgésicas em larvas <i>D.</i> <i>melanogaster</i> no modelo de nocicepção térmica por radiação infravermelha	42
4.7. Procedimento experimental para a indução da sensibilização térmica em larvas de <i>D.</i> <i>melanogaster</i>	43
4.8. Procedimento experimental para a avaliação de substâncias analgésicas e/ou anti-inflamatórias em larvas de <i>D. melanogaster</i> após sensibilização térmica	44
4.9. Estatística	45
4.9.1. Cálculo do n amostral.....	45

4.9.2. Análise dos resultados	45
5. Resultados	47
5.1. Padronização da intensidade do estímulo térmico por radiação infravermelha	48
5.2. Avaliação da temperatura da gota de água submetida a diferentes intensidades da radiação infravermelha	48
5.3. Avaliação da ação antinociceptiva da morfina em larvas <i>D. melanogaster</i> na nocicepção térmica por radiação infravermelha.....	51
5.4. Avaliação da ação antinociceptiva da anandamida (AEA) em larvas de <i>D. melanogaster</i> na nocicepção térmica por radiação infravermelha.....	54
5.5. Avaliação da ação antinociceptiva da dipirona em larvas de <i>D. melanogaster</i> no modelo de nocicepção térmica por radiação infravermelha.....	58
5.6. Curva temporal da sensibilização térmica induzida por radiação infravermelha em larvas de <i>D. melanogaster</i>	60
5.7. Avaliação da atividade antinociceptiva do ácido acetilsalicílico (AAS) após sensibilização térmica induzida em larvas de <i>D. melanogaster</i>	64
5.8. Avaliação da atividade antinociceptiva da dexametasona após sensibilização térmica induzida em larvas de <i>D. melanogaster</i>	66
6. Discussão.....	72
7. Referências Bibliográficas	86

1. Introdução

1.1. Considerações sobre o estudo da dor

Após o Renascimento, o cérebro começou a ser reconhecido como o centro das sensações. Nessa época, em 1664, René Descartes foi o primeiro filósofo a descrever um conceito científico da dor (revisto por Moayedi & Davis, 2013). Para ele, a percepção da informação sensorial abria portões que conectavam as “estruturas tubulares” aos ventrículos cerebrais, onde a dor era processada (revisto por Chen, 2011). Em resposta a percepção da dor, um comportamento motor era iniciado através desses túbulos nervosos (revisto por Moayedi & Davis, 2013). A ilustração da teoria de Descartes (Figura 1) mostra um homem abaixado com os pés próximos a uma fogueira. Para o autor, o calor da chama ativava as fibras nervosas do pé e a informação seguia dentro das estruturas tubulares que atravessavam as pernas até atingir a medula espinhal, e posteriormente, o cérebro, onde a dor seria reconhecida (revisto por Chapman, 2003; Moayedi & Davis, 2013). A partir desse postulado, os processos de transmissão ascendente e modulação descendente da dor em mamíferos foram descobertos e, atualmente, estão bem descritos na literatura (revisto por Scholz & Woolf, 2002).

Com o decorrer dos anos, o conceito de dor foi gradualmente tomando forma (revisto por Chen, 2011). Embora a dor esteja de fato correlacionada ao estímulo nocivo, conforme proposto por Descartes, a percepção da dor pode ocorrer independente da presença do dano tecidual, envolvendo, alterações patológicas orgânicas e o componente emocional do indivíduo (revisto por Woolf, 2010). Dessa forma, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), em 1994, definiu a dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada ao dano tissular real ou potencial”.



Figura 1. Teoria da dor descrita por René Descartes, 1664. “Partículas do fogo” (A) eram reconhecidas por fibras nervosas presentes no pé (B). Em seguida a informação da dor era transmitida por “estruturas tubulares” (C), até atingir “poros” (D e E) que se abriam nos ventrículos cerebrais (F). (Moayedi & Davis, 2013).

A dor pode ser classificada em quatro diferentes tipos, conforme a Figura 2: (i) dor nociceptiva, que representa a resposta normal a qualquer dano tecidual causado por um estímulo externo, como por exemplo, a aplicação de força sobre a superfície corporal, a exposição a gradientes de temperaturas extremas ou o contato com substâncias irritantes (revisto por Woolf, 2010); (ii) dor inflamatória, resultado da presença de mediadores inflamatórios após lesão tecidual ou infecção. Nessa condição, os nociceptores estão ativados ou sensibilizados devido à ação dos mediadores inflamatórios (revisto por Millan, 1999); (iii) dor neuropática, que ocorre mediante a lesão neuronal primária ou funcionamento anormal do sistema nervoso central e periférico (revisto por Costigan et al., 2009); (iv) dor disfuncional ou idiopática, resultante de uma condição na qual não houve dano tecidual ou inflamação prévia, como por exemplo, fibromialgia e dor torácica não cardíaca (revisto por Woolf, 2010).

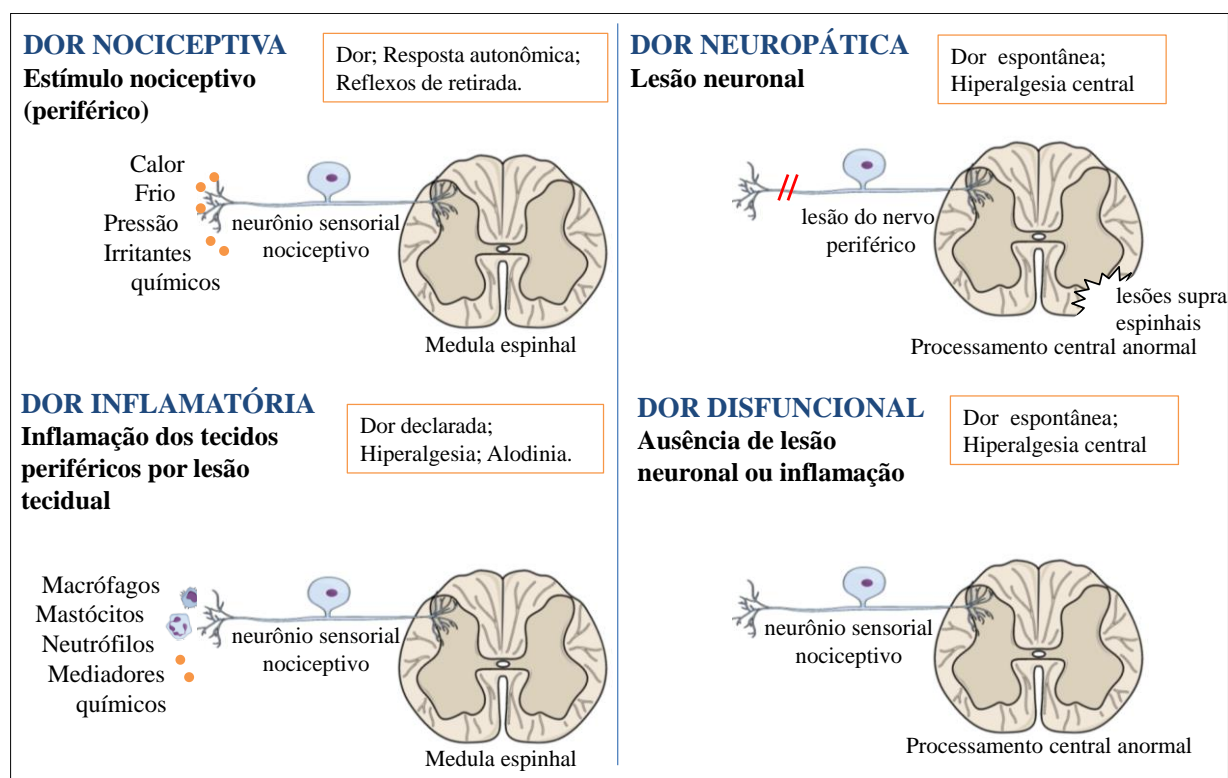


Figura 2. Classificação dos tipos de dor (figura adaptada de Woolf, 2010).

Como podemos perceber, existe certa complexidade quando utilizamos o termo dor, principalmente quanto está relacionado com o componente emocional do indivíduo. Em modelos de experimentação animal, a presença desse componente nos animais não é questionada. Preferencialmente, utilizam-se nos trabalhos com modelos experimentais os

termos nocicepção e antinocicepção, que se referem ao processo neuronal de reconhecimento dos estímulos dolorosos pelo sistema nervoso ou de sua ausência (IASP, 1994).

1.2. Modelos animais na nocicepção

O uso de modelos animais experimentais em pesquisa remonta ao período em que os seres humanos começaram a procurar maneiras de prevenir e curar doenças. Descoberta de novos fármacos e elucidação dos seus mecanismos e daqueles já existentes são devidos ao uso de animais nessas pesquisas. Os roedores, ratos e camundongos, são os animais mais utilizados nas pesquisas que envolvem a nocicepção, uma vez que apresentam semelhanças anatômicas e fisiológicas com outros mamíferos e respondem a estímulos nociceptivos sugestivos de dor (revisto por Le Bars et al., 2001).

Nos últimos anos, os esforços para melhorar os estudos na farmacologia concentraram-se no desenvolvimento de modelos animais "de alto nível", que imitam a biologia humana. Esses esforços incluíram a manipulação genética de modelos animais tradicionais. No entanto, à medida que os modelos animais se tornam mais sofisticados, eles tornam mais custosos. Acontece, também, crescente ação para limitar o uso de animais a situações em que eles são absolutamente necessários, por exemplo, nos estudos de toxicidade pré-clínica e avaliação de segurança medicamentosa. Dessa forma, tem ocorrido a inserção de alternativas para a experimentação animal. Como exemplo de um novo organismo modelos, têm o peixe zebrafish, *Danio rerio*. Esta abordagem não elimina a necessidade de ensaios em mamíferos, mas tem como vantagem a sua utilização nas ocasiões em que o custo, a escala e a eficiência são mais importantes do que a replicação perfeita da fisiologia humana.

Dentro do campo da biologia experimental nociceptiva, a habilidade de detectar e responder aos estímulos nocivos parece estar presente em todo o reino Metazoa, incluindo vertebrados mamíferos e não mamíferos (Figura 3). Existem evidências de que invertebrados também exibem respostas aos estímulos nocivos (revisto por Elwood, 2011). Os artrópodes, nematódeos, anelídeos e moluscos apresentam componentes do sistema nervoso que atuam na detecção da nocicepção, como por exemplo, os nociceptores (revisto por Smith & Lewin, 2009) (Figura 3).

Entre os invertebrados, a mosca *Drosophila melanogaster* se destaca como organismo modelo experimental no estudo da nocicepção. Ambos os estágios, larval e adulto, apresentam

componentes anatomicos e fisiológicos que desencadeiam respostas com o intuito de evitar os estímulos potencialmente lesivos (revisito por Im & Galko, 2012). Em especial, temos as larvas de 3ª estágio de *D. melanogaster*. Essas possuem um sistema nervoso relativamente simples e exibem uma resposta sensorial para estímulo mecânico de alta intensidade e para temperaturas extremas, ou seja, apresentam respostas nociceptivas frente a estímulos nocivos mecânicos e/ou térmicos (Oswald et al., 2011).

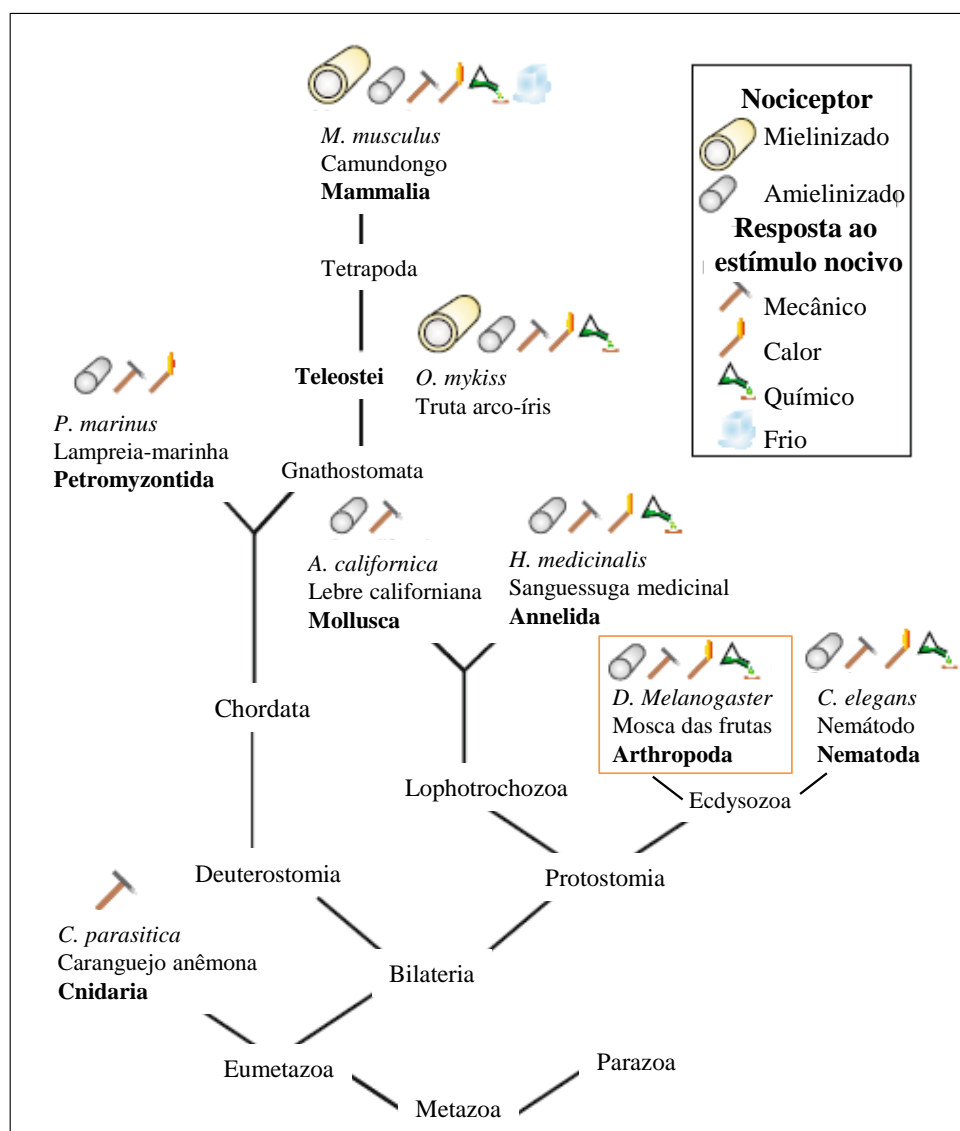


Figura 3. Componentes da resposta sensorial no reino Metazoa. Aquisição de diferentes componentes da resposta sensorial de um ponto de vista evolutivo. Em destaque (quadrado laranja) a espécie *Drosophila melanogaster* com a capacidade de sentir estímulos mecânicos, térmicos e químicos através de nociceptores amielinizados (imagem adaptada de Smith & Lewin, 2009).

Os estudos com a *D. melanogaster* se iniciaram no começo do século XX. A princípio, a *Drosophila* se consolidou como modelo na genética, uma vez que foi o primeiro organismo complexo a ter o genoma codificado (Adams et al., 2000). Estima-se que 75% dos genes

relacionados a doenças em humanos têm ortólogos funcionais na mosca, fato esse que ampliou o seu uso como modelo experimental. Além de o modelo possibilitar descrições fenotípicas de genes similares aos dos seres humanos, também é possível definir aspectos moleculares e terapêuticos, investigar possíveis fármacos e compreender alguns processos fisiológicos (revisto por Pandey & Nichols, 2011).

1.3. Modelo experimental *D. melanogaster*

D. melanogaster é uma mosca pertencente à família Drosophilidae, conhecida popularmente como mosca da fruta. O ciclo de vida do invertebrado acontece em aproximadamente 12 dias (25°C), variando com a temperatura do ambiente (Figura 4). A primeira fase refere-se ao desenvolvimento embrionário do ovo. Após 24 horas da fecundação, a larva eclode e inicia-se a segunda fase do ciclo, que persiste de 3 a 5 dias (Flagg, 1979).

A fase larval se divide em três estágios que variam desde a eclosão da larva até a sua pupação. O primeiro e o segundo estágios têm duração de um dia cada, já o terceiro estágio acontece de 2 a 3 dias (Kohsaka et al., 2017). Quando a larva atinge seu último estágio tem o comprimento de 3 a 5 milímetros (mm) e peso de 0,6 miligramas (mg), aproximadamente (Kohsaka et al., 2017; Vandal & Shivanna, 2007). A larva é dividida em 11 segmentos, sendo três torácicos (T1-T3) e oito abdominais (A1- A8) (Kohsaka et al., 2017), ilustrados na Figura 5.B. Nas terminações anterior e posterior existem estruturas especializadas denominadas de espiráculos, cuja função está associada à respiração do animal (Tyler, 2000). Nos segmentos torácicos é possível identificar o sistema nervoso central da larva, o neuropil. Este é composto por dois lóbulos cerebrais, pelo cordão nervoso ventral (CNV, semelhante à medula espinhal dos vertebrados) e pela zona subesofageal (ZSE), situada entre os lóbulos e o CNV (Figura 5.C) (Kohsaka et al., 2017).

O corpo da larva de *Drosophila* é bastante flexível, e envolvido por uma cutícula externa (uma exocutícula fina e uma endocutícula espessa) e uma cutícula interna composta de células epidérmicas. Os demais órgãos da larva como o intestino, os túbulos de malpighian e as gônadas podem ser visualizados por transparência através da transmissão de luz (Tyler, 2000). A larva possui um sistema circulatório aberto, ou seja, uma cavidade (hemocele)

preenchida por um fluido (hemolinfa) que banha os órgãos com oxigênio e nutrientes. Essa hemolinfa é composta por água, sais inorgânicos, tais como sódio, cálcio e potássio, e compostos orgânicos, como exemplo, proteínas (revisto por Wyatt, 1961).

Apos o terceiro estágio da larva, ocorre o processo de metamorfose, a pupação, cuja função é o desenvolvimento do organismo adulto (Tyler, 2000). A pupação ocorre cerca de 12 horas após a formação do pupário, e ao fim de aproximadamente 3 dias os órgão larvais já estão desenvolvidos e ocorre a eclosão da mosca adulta (Kohsaka et al., 2017).

A mosca emerge pela região final anterior do pupário. No momento da emergência, as moscas são mais claras e escurecem durante as primeiras horas, vivendo por aproximadamente um mês e, então, finalizam seu ciclo de vida (Flagg, 1979).

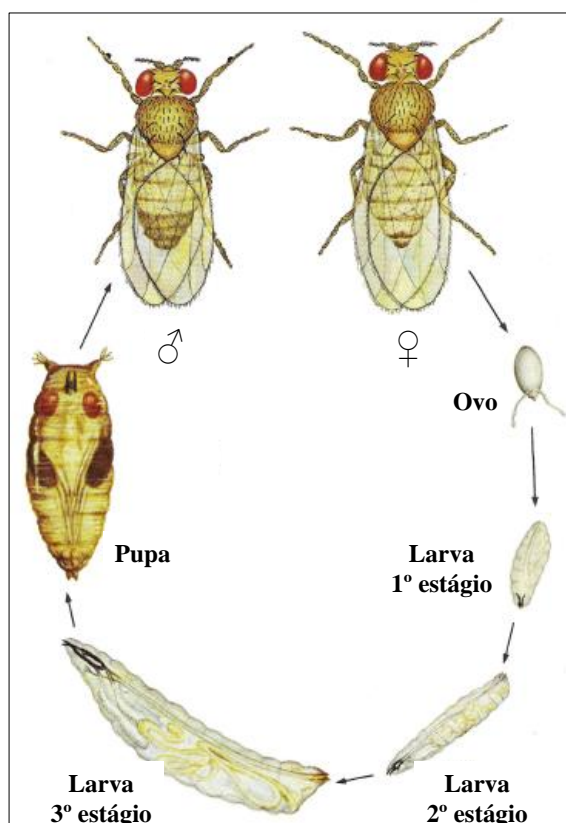


Figura 4. Ciclo de vida da *D. melanogaster* (figura adaptada de Flagg, 1979).

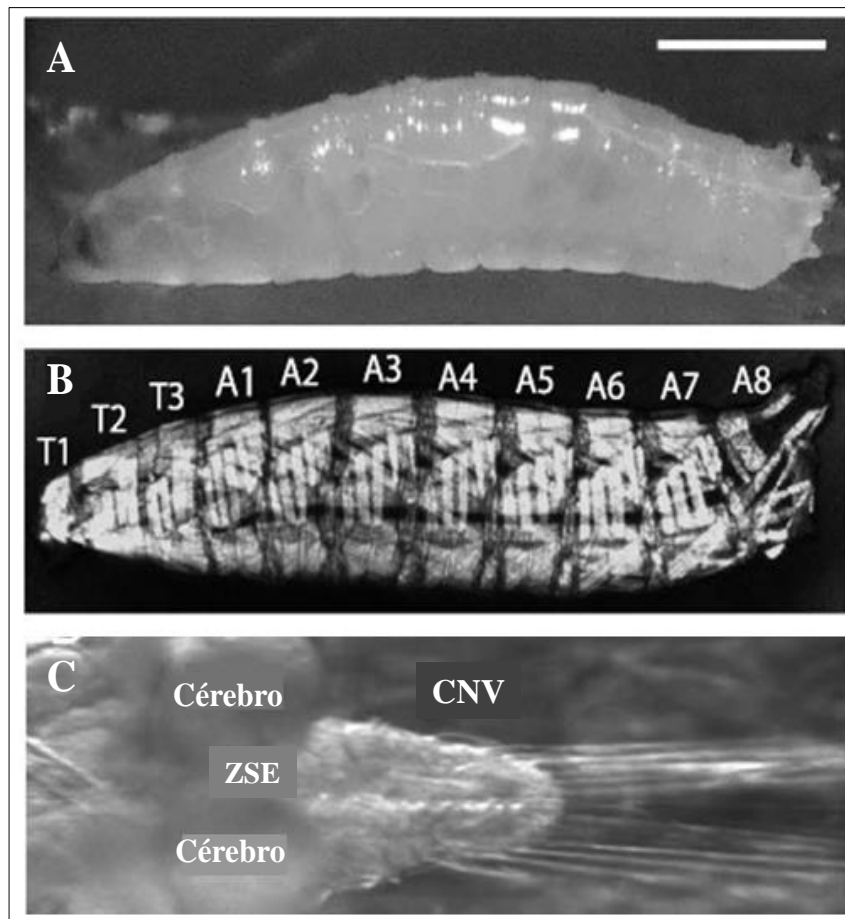


Figura 5. Anatomia da larva de 3º estágio de *D. melanogaster*. **A.** Imagem lateral da larva. Barra de escala: 1 mm; **B.** T1-T3, A1-A8 indicam os segmentos torácicos 1-3 e os segmentos abdominais 1-8; **C.** Imagem do sistema nervoso central da larva, dois lóbulos cerebrais, o cordão nervoso ventral (CNV) e a zona subesofageal (ZSE) localizada atrás do cérebro (imagem adaptada de Kohsaka et al., 2017).

1.4. Nociceção em larvas de 3º estágio de *D. melanogaster*

Nas larvas de *D. melanogaster*, os neurônios do sistema periférico estão localizados ao longo da epiderme e se estendem pela parede do corpo da larva ou em órgãos sensoriais específicos (revisado por Im & Galko, 2012). Os neurônios sensoriais estão organizados de forma segmentar-repetida em aglomerados dorsal, lateral e ventral, e o posicionamento desses é semelhante de animal para animal (revisado por Orgogozo & Grueber, 2005). Os aglomerados são compostos por um dos dois tipos de neurônios: (i) tipo I, com dendrítos ciliares; (ii) tipo II, neurônios multidendríticos (md) (Figura 6).

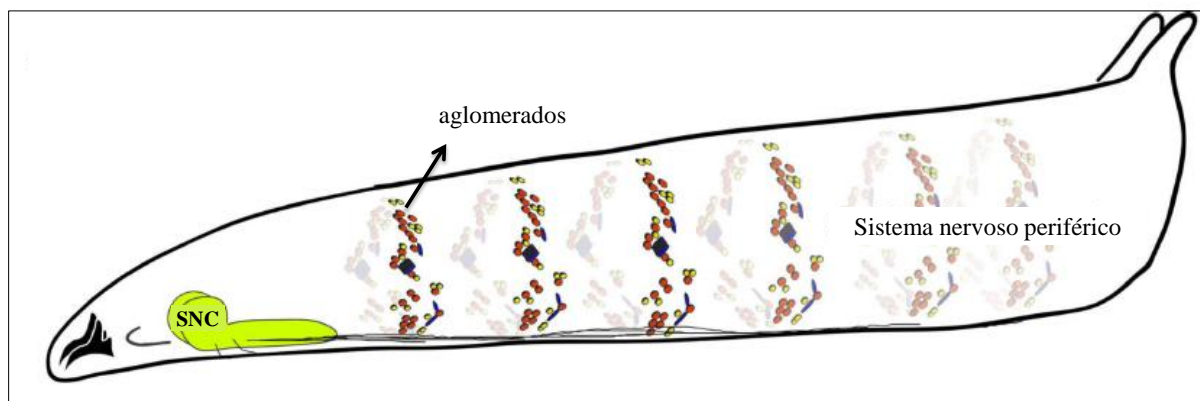


Figura 6. Organização do sistema nervoso periférico da larva de 3º estágio de *D. melanogaster*. Desenho da larva de 3º estágio com seus neurônios sensoriais periféricos em cada segmento abdominal: tipo I (amarelo e azul) e tipo II (vermelho). Sistema nervoso central (SNC) (figura adaptada de Singhanian & Grueber, 2015).

Os neurônios do tipo I possuem arborização dendrítica simples, ou seja, com poucas ramificações. Esses incluem os órgãos sensoriais externos mecanosensoriais – que monitoram as vibrações transmitidas pelo ambiente, e os órgãos cordotonais internos – que estabelecem a posição e o movimento da larva (revisto por Singhanian & Grueber, 2015).

Já os neurônios do tipo II são complexos e altamente ramificados se espalhando ao longo de toda a estrutura da epiderme, sendo no total 15 neurônios md em cada hemisegmento abdominal (Grueber et al., 2002). Cada neurônio md apresenta características específicas relacionadas aos padrões de arborização e extensão territorial ocupada na epiderme. A partir desses parâmetros, os neurônios tipo II são divididos em 4 classes (I – IV) (revisto por Im & Galko, 2012) (Figura 7).

Segundo Grueber e colaboradores (2002), os neurônios md classe I (mdI) inervam a região dorsal e parte da região ventral de cada segmento da larva e apresentam um dendrito primário direcionado dorsalmente, com poucas ramificações laterais e varicosidades neuronais ao longo do seu comprimento. Os md de classe II (mdII), encontrados majoritariamente nas regiões laterais e dorsal da larva, possuem dendritos sinuosos e mais bifurcados que diminuem à medida que se estendem pela epiderme. A terceira classe dos md (mdIII) é semelhante aos mdII. Entretanto, suas ramificações são mais numerosas e extensas (Grueber et al., 2002). Com relação à funcionalidade desses md, sabe-se que as classes I - III estão envolvidas na propriocepção e no reconhecimento de estímulos mecânicos de intensidade leve (revisto por Singhanian & Grueber, 2015).

Por outro lado, os neurônios md de classe IV (mdIV) são nociceptores polimodais, ou seja, têm capacidade de codificar e transduzir diferentes estímulos nocivos (revisto por Im &

Galko, 2012; Smith & Lewin, 2009). Os mdIV estão presentes em toda a extensão das regiões ventral e dorsal e apresentam um padrão de ramificação complexo (Grueber et al., 2002). Após a estimulação dos nociceptores mdIV, a larva elicita uma série de comportamentos em resposta à possível lesão, na tentativa de escape do estímulo nocivo (Chattopadhyay et al., 2012; Oswald et al., 2011). Esses comportamentos iniciam com uma curvatura inicial do corpo (movimento das extremidades) seguida de um rolamento em torno do próprio eixo (Hwang et al., 2007).

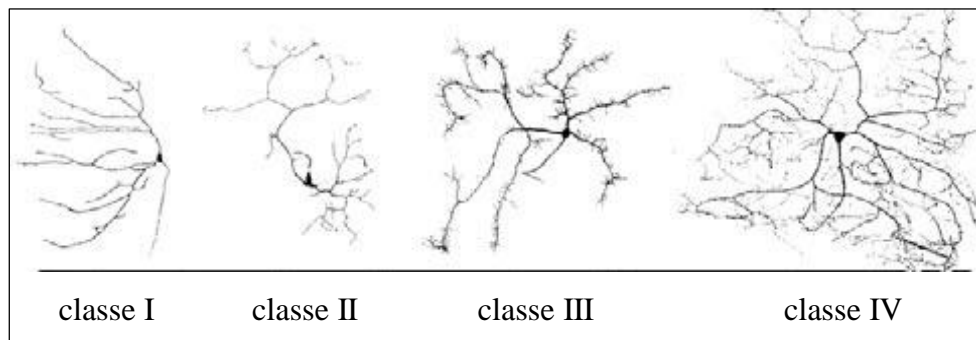


Figura 7. Morfologia das classes (I – IV) de neurônios multidendríticos (tipo II) da larva de *D. melanogaster* (imagem adaptada de Grueber et al., 2007) (ver descrição no texto).

Existem três possíveis hipóteses de circuitaria neuronal das larvas 3º estágio de *D. melanogaster* frente à nocicepção. Na primeira hipótese, descrita por Ohyama e colaboradores, 2015, a informação segue via projeções axonais dos mdIV para a posição médio-lateral no CNV. Ao atingir o domínio sensorial do CNV, os mdIV fazem sinapses com interneurônios *Basin* (estrutura em formato de bacia, o que justifica a sua terminologia). Existem quatro tipos de *Basin*. Entretanto, os mdIV enviam suas projeções para os *Basin-2* e *Basin-4*, localizados nas regiões ventrolateral e ventromedial da larva. Posteriormente, os *Basin-2* localizados no CNV projetam suas terminações para neurônios de segunda ordem (A05q). Esses, por sua vez, fazem conexões com neurônios da região torácica, conhecidos como *Goro* (rolamento em Japonês), situados no domínio motor do CNV. Esses neurônios são classificados como o centro de comando para a resposta de escape das larvas de *Drosophila* (Ohyama et al., 2015).

A nocicepção também ocorre via cérebro, quando os *Basin-4* são ativados por um estímulo nociceptivo e enviam suas projeções para neurônios de segunda ordem (A00c) ascendentes. Os A00c fazem conexões com neurônios de terceira ordem ipsilateral e contralateral nos lóbulos cerebrais que se conectam com neurônios *Goro*, através de projeções

descendentes. Os A00c também se comunicam com neurônios presentes na ZSE do cérebro da larva, que enviam informações para os neurônios *Goro* via A05q, desencadeando o comportamento de escape (Ohyama et al., 2015) (Figura 8).

Portanto, a modulação da resposta pode ocorrer local (via *Basin 2 – Goro*) no CNV e global (via *Basin 4 – Neuropil – Goro*). Ainda não se sabe como os neurônios *Goro* iniciam o comportamento motor de escape, ou seja, como ocorre a ativação do neurônio motor e, conseqüentemente, a atividade muscular (Clark et al., 2018).

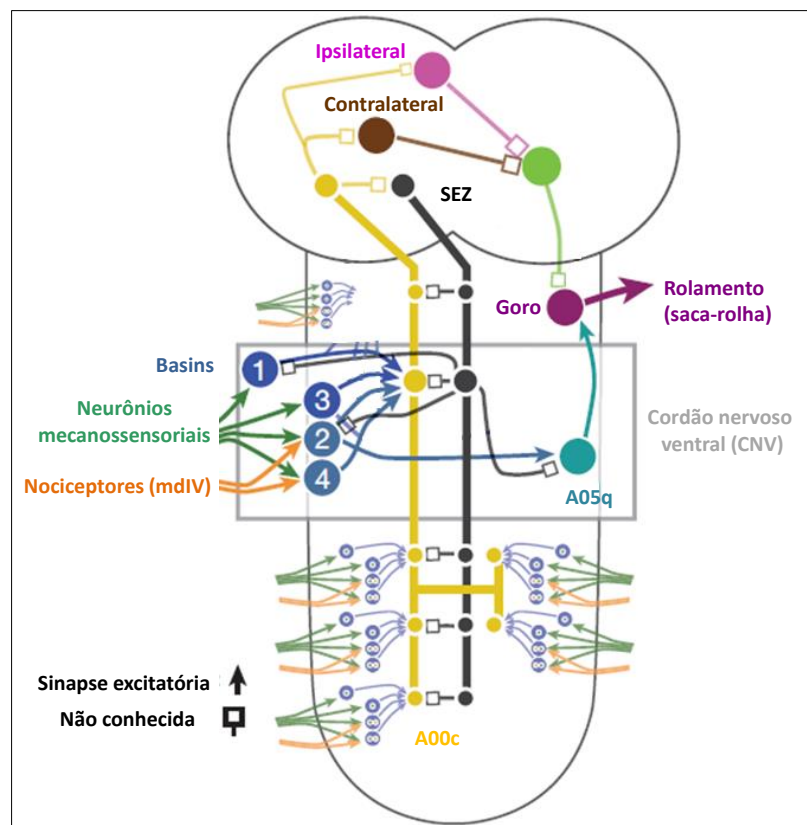


Figura 8. Esquema do circuito neuronal envolvido na nocicepção de larvas de 3º estágio *D. melanogaster*. Os nociceptores (mdIV) fazem conexões com interneurônios *Basin-2* e *4*. Os *Basin-2* se conectam aos neurônios ascendentes A05q, cujos axônios comunicam com o núcleo motor *Goro*, que desencadeia a resposta efetora de rolamento (figura adaptada de Ohyama et al., 2015).

Já na segunda hipótese, os mdIV ativam diretamente os interneurônios *Down – and – Back* (DnB) presentes no CNV da *D. melanogaster* (Burgos et al., 2018). Os DnB fazem sinapse com dois distintos neurônios: A09e e TePn05. Ambos fazem sinapse com o neurônio A02o, que por sua vez ativa diretamente os neurônios *Goro* ou indiretamente via A05q, produzindo a resposta de escape (Burgos et al., 2018). Além disso, os DnB apresentam

elevado número de sinapses com neurônios pré-motores inibitórios glutamatérgicos, que regulam a velocidade de locomoção da larva (Kohsaka et al., 2014). O silenciamento desses neurônios reduz o comportamento de escape da larva, sugerindo a sua ligação com a resposta nociceptiva (Burgos et al., 2018). Evidências também mostram que os DnB fazem sinapses, em menor número, com neurônios motores que inervam alguns músculos da larva (Burgos et al., 2018), que estão correlacionados com comportamentos de correção da posição do corpo da larva (Picao-Osorio et al., 2015). Dessa forma, sugere-se que o movimento inicial de curvatura seguido do rolamento sobre o próprio eixo possa estar correlacionado com a ativação desses neurônios, sendo uma via independente dos neurônios *Goro* (Burgos et al., 2018) (Figura 9).

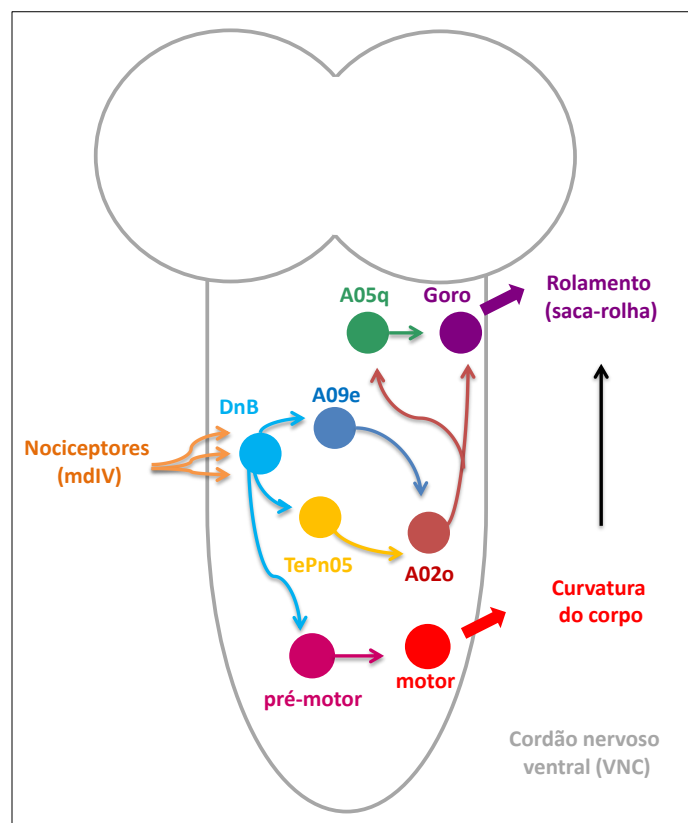


Figura 9. Esquema do circuito neuronal envolvido na nocicepção de larvas de 3º estágio de *D. melanogaster*. Os nociceptores mdIV fazem conexões diretas com os interneurônios *Down – and – Back* (DnB). Esses por sua vez podem fazer conexões com outros dois neurônios (A09e e TePn05) que se comunicam com os A02o. Esses ativam o núcleo motor *Goro* diretamente ou indiretamente. Os DnB também ativam neurônios pré motores, cujos axônios fazem conexões com neurônios motores que desencadeiam o rolamento independentemente de *Goro* (figura adaptada de Burgos et al., 2018).

Segundo Yoshino e colaboradores (2017), a terceira hipótese se baseia na ativação de um determinado aglomerado de interneurônios de segunda ordem (mCSI) presentes no CNV após a estimulação dos nociceptores mdIV. Os mCSIs enviam projeções axonais para a região dorsal do CNV, no domínio motor. É possível observar uma proximidade entre os terminais axonais de mCSI com neurônios motores do nervo segmentar a (SNa). Após a ativação dessa via, ocorre um aumento nos níveis de Ca^{2+} nos SNa e, conseqüentemente, a larva exibe a sua resposta de escape. O silenciamento dos SNa diminui drasticamente o comportamento de escape frente ao estímulo nocivo. Entretanto, não são observadas alterações na locomoção basal da larva. Esse achado sugere que esta via é essencial para as respostas de escape, uma vez que esse comportamento não é alterado quando ocorre o silenciamento dos neurônios *Goro* (Yoshino et al., 2017) (Figura 10).

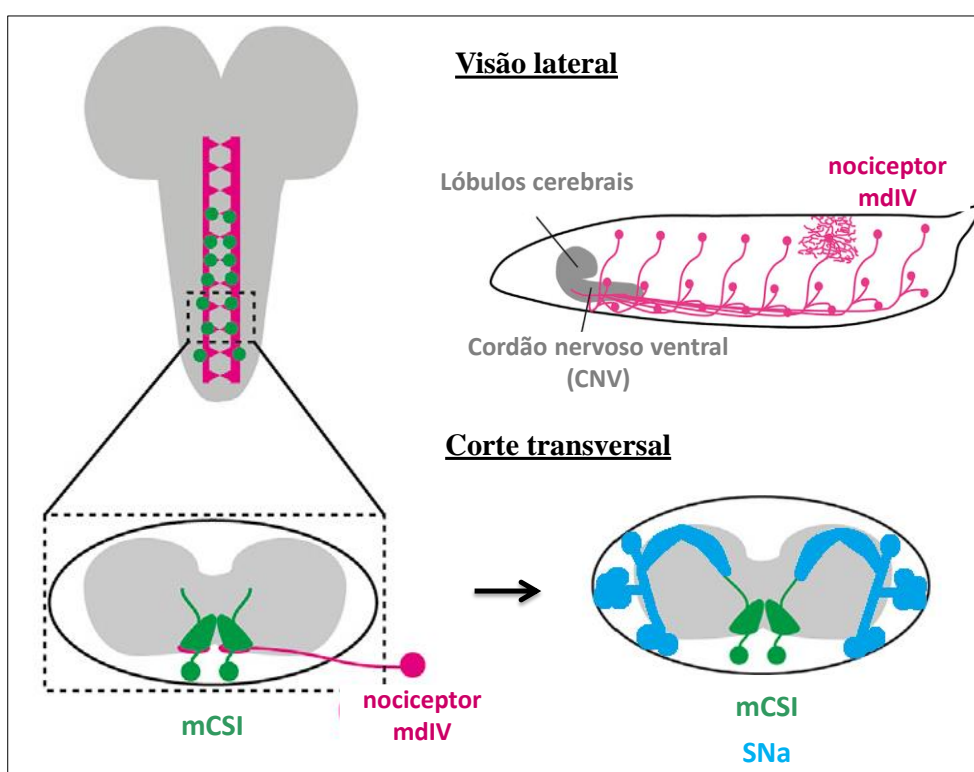


Figura 10. Esquema do circuito neuronal envolvido na nocicepção de larvas de 3º estágio *D. melanogaster*. Os nociceptores mdIV ativam um determinado aglomerado de interneurônios de segunda ordem (mCSI) presentes no cordão nervoso ventral (CNV). Esses enviam projeções axonais para a região dorsal do CNV, no domínio motor, apresentando terminações bem próximas aos neurônios motores do nervo segmentar a (SNa), que desencadeiam o rolamento (figura adaptada de Yoshino et al., 2017).

1.5. Nocicepção térmica em larvas de 3º estágio *D. melanogaster*

Os comportamentos aversivos a elevados gradientes térmicos podem ser visualizados tanto em roedores quanto em moscas das frutas (revisto por Im & Galko, 2012; Le Bars et al., 2001). Nos camundongos e ratos, os modelos para o estudo da nocicepção térmica estão bem elucidados e consistem na aplicação de uma fonte de calor ou frio de alta intensidade em uma determinada superfície do animal, com posterior avaliação da resposta nociceptiva efetora (revisto por Le Bars et al., 2001).

Em 2003, Tracey e colaboradores descreveram um paradigma para o estudo da nocicepção nas larvas de 3º estágio de *D. melanogaster*. Essas apresentam uma resposta de escape frente a um estímulo térmico intenso local, mediada por receptores presentes nos mdIV codificados pelo gene *painless*. No estímulo local, a estimulação térmica consiste em uma agulha com a ponta aquecida gradualmente e pressionada levemente na larva. Uma vez que a agulha toca a larva, essa inicia um movimento preliminar que consiste em movimentar suas extremidades (curvatura). Em seguida, a larva começa a rolar lateralmente sobre o próprio eixo, ou seja, comportamento aversivo de escape (Chattopadhyay et al., 2012).

Nos trabalhos em que um estímulo global é aplicado, utiliza-se o método de imersão, em que a larva é colocada em uma gota de água em uma placa de Petri que está sobre a placa aquecedora (Chattopadhyay et al., 2012; Oswald et al., 2011). A princípio, a larva movimenta sua cabeça lateralmente de forma rápida, brusca e persistente, que pode ser para ambos os lados (Chattopadhyay et al., 2012). Esse movimento também pode ser descrito como curvatura do corpo, em que a cabeça e a cauda se movimentam simultaneamente diminuindo o ângulo formado (Burgos et al., 2018). Em seguida, a larva apresenta movimentos de rolamento sobre o próprio eixo, semelhantes ao de um saca-rolha, que ocorre em número variável e na maioria das vezes com rolamentos de 360° (Chattopadhyay et al., 2012; Oswald et al., 2011) (Figura 11). Após o movimento de saca-rolha, a larva apresenta movimento em chicote (rápidas contrações ao longo do eixo anteroposterior), tremores de alta frequência no corpo inteiro, e por fim paralisia (Chattopadhyay et al., 2012).

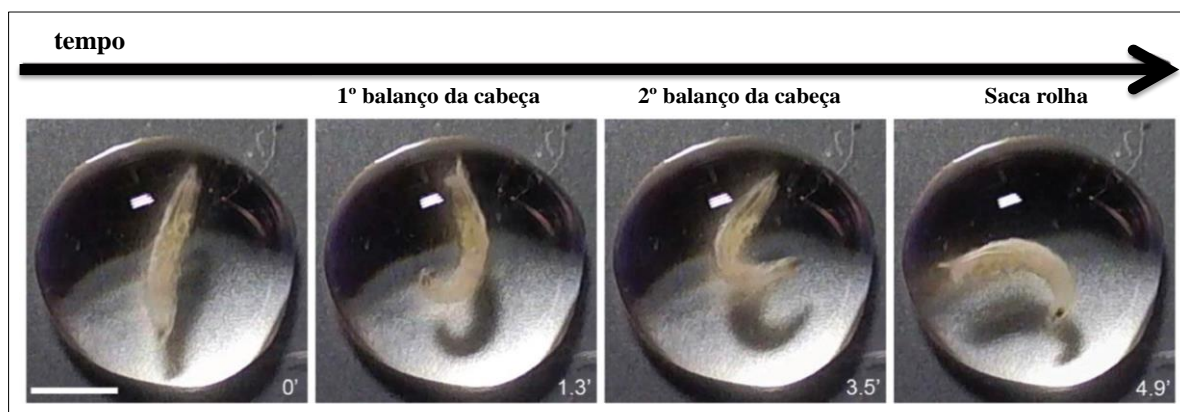


Figura 11. Resposta comportamental da larva de 3º estágio de *D. melanogaster* frente ao estímulo térmico (figura adaptada de Oswald et al., 2011).

A partir desses estudos, o comportamento robusto de resposta ao estímulo térmico nociceptivo em larvas de 3º estágio está bem definido, permitindo determinar a percepção nociceptiva termo-sensorial do animal. Essa resposta permite futuras visualizações e quantificações de vários aspectos da nocicepção térmica.

2. Justificativa

Atualmente, o uso de animais na pesquisa científica, principalmente mamíferos, tem sido discutido amplamente. A tentativa de diminuir o número de animais utilizados leva ao desenvolvimento de novos métodos e instituição de novos modelos experimentais. Estudos com o peixe *Danio rerio*, zebrafish e alguns invertebrados estão em ascensão (revisto por Im & Galko, 2012). O mesmo acontece com a *Drosophila melanogaster*, conhecida como mosca das frutas. A espécie tem sido utilizada por mais de um século nas pesquisas biológicas, tendo uma longa e notável história científica. As *Drosophilas* são um organismo modelo, possibilitando processos de descobrimento de novas drogas, descrições fenotípicas de genes similares aos dos seres humanos, definições moleculares e terapêuticas, entre outros estudos (revisto por Pandey & Nichols, 2011).

As larvas de *D. melanogaster* possuem um sistema nervoso relativamente simples e exibem uma resposta sensorial para estímulo mecânico de alta intensidade e para temperaturas extremas, que pode ser denominada por resposta nociceptiva a um estímulo térmico ou mecânico (Oswald et al., 2011). A fim de verificar a possibilidade de esta resposta poder ser utilizada para testar substâncias e procedimentos pró e antinociceptivos, avaliaremos, no presente trabalho, o efeito de substâncias analgésicas opioides, canabinoides, não esteroidais e esteroidais, através de uma modificação de metodologia nociceptiva térmica utilizando radiação infravermelha. O uso deste método poderá contribuir para o progresso desta área de investigação e a diminuição do uso de mamíferos em experimentação animal.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o efeito de substâncias analgésicas opioide, canabinoide, não esteroidal e esteroidal em larvas de 3º estágio de *Drosophila melanogaster* no método de nocicepção térmica por radiação infravermelha.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar o comportamento da larva de 3º estágio de *D. melanogaster* frente ao estímulo térmico com diferentes intensidades relativas da lâmpada de radiação infravermelha;
- Determinar a intensidade da lâmpada de radiação infravermelha em que a resposta de escape (saca-rolha) das larvas é identificada com facilidade pelo observador;
- Investigar a ação das substâncias analgésicas morfina, anandamida, dipirona e dexametasona, administradas via hemocele, em larvas de 3º estágio de *D. melanogaster* submetidas ao estímulo térmico por radiação infravermelha;
- Avaliar o envolvimento dos receptores opioides na antinocicepção ocasionada pela morfina através do uso do antagonista não seletivo desses receptores, naloxona, em larvas de 3º estágio de *D. melanogaster*;
- Avaliar o envolvimento dos receptores canabinoides na antinocicepção produzida pela anandamida (AEA) através do uso do antagonista dos receptores canabinoides do tipo I (CB₁), AM251, e antagonista dos receptores canabinoides do tipo II (CB₂), AM630, em larvas de 3º estágio de *D. melanogaster*;

- Estabelecer um modelo de sensibilização térmica induzida por exposição prévia a diferentes intensidades relativas da lâmpada de radiação infravermelha em larvas de 3º estágio de *D. melanogaster*;
- Avaliar a ação das substâncias analgésicas e/ou antiinflamatórias, ácido acetilsalicílico (AAS) e dexametasona, administradas via hemocele, em larvas de 3º estágio de *D. melanogaster* submetidas à sensibilização térmica por radiação infravermelha.

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais de experimentação

Foram utilizadas larvas de 3º estágio de *D. melanogaster* fornecidas pelo Professor Gustavo Kuhn do Laboratório de Citogenômica Evolutiva, do Departamento de Biologia Geral do ICB – UFMG. Os animais são provenientes de uma única mosca fêmea. As larvas de *D. melanogaster* foram mantidas a ~ 25°C em um ciclo natural de claro/escuro de ~ 12 horas, em frascos de cultura contendo meio de farinha de milho padrão (51% farinha de milho, 14% ágar, 14% levedura, 11% farinha de soja, 9% açúcar e 1% metilparabeno) preparado com água deionizada (Figura 12).



Figura 12. Frasco de vidro contendo meio de farinha de milho padrão e várias fases de mosca *D. melanogaster*.

4.2. Drogas e solventes

4.2.1. Hemolinfa artificial

- NaCl (117,5 mM), KCl (20 mM), CaCl₂ (2 mM), MgCl₂·6H₂O (8,5 mM), NaHCO₃ (10,2 mM), NaH₂PO₄ (4,3 mM), HEPES (8,6 mM), L-glutamina (10 mM) e glicose (20 mM) (Sigma, EUA).

4.2.2. Analgésicos e/ou anti-inflamatórios

- Morfina ([hidrocloridrato de 7,8-dihidro-4,5-epoxi-17-metilmorfina-3,6-diol], Merck, Alemanha), agonista dos receptores opioide.
- Naloxona (hidrocloridrato dihidratado de naloxona, Sigma, EUA), antagonista não seletivo dos receptores opioides.
- Anadamida (AEA) ([N-(2-Hydroxyethyl)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamida], Tocris, EUA), agonista canabinoide, dissolvido em Tocrisolve.
- AM251 (1-[2,4-diclorofenil]-5-[2-{4-morfolinil}etil]-1H-indol-3il]pirazol-3 carboxamida, Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores canabinoides 1 (CB₁).
- AM630 (6-iodo-2-metil-1-[2-{4-morfolinil}etik]1-H-indol-3il)(4metoxifenil)metanona, Tocris, EUA) antagonista seletivo dos receptores canabinoides 2 (CB₂).
- Dipirona ([[(2,3-diidro-1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-1H-pirazol-4il metilamino], Sigma, EUA), analgésico.
- Dexametasona (Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., Brasil), anti-inflamatório esteroideal (AIE).
- Acido Acetilsalicílico (AAS) ([Acido 2-acetoxibenzoico], Sigma, EUA), anti-inflamatório não esteroideal (AINE).

As substâncias foram dissolvidas ou diluídas em hemolinfa artificial ou DMSO 2%.

4. 2.3. Via de administração das drogas e dos fármacos

- Via hemocele: a larva foi imobilizada sobre uma lâmina de microscópico com uma fita adesiva dupla face e colocada sob um micromanipulador acoplado à objetiva de 4x. Uma ponteira de 200 µL foi usada para confeccionar uma ponta que possibilitasse a transferência de 0,1 µL de solução dos fármacos diluídos em hemolinfa artificial, para uma micropipeta de

vidro com o diâmetro de ponta de aproximadamente 3 μm (Figura 13.A). A micropipeta de vidro foi acoplada a um micromanipulador para inserir a ponta dentro do hemocele, entre os segmentos A4-A5, visualizado pela tela do computador acoplado à objetiva (Figura 13.B). Em seguida, uma pressão de ar positiva fornecida por uma seringa de 5 ml conectada a uma mangueira de polietileno foi usada para dispensar cerca de 0,1 μl das soluções no hemocele (Figura 13.C-D). Imediatamente após a injeção, a larva foi, cuidadosamente, removida da fita adesiva dupla face com auxílio de água e pincel. Esse procedimento foi adaptado de Bijelic et al., (2005) e realizado no Laboratório de Eletrocel, Departamento de Fisiologia, ICB, UFMG sobre orientação da Professora Lígia Araújo Naves.

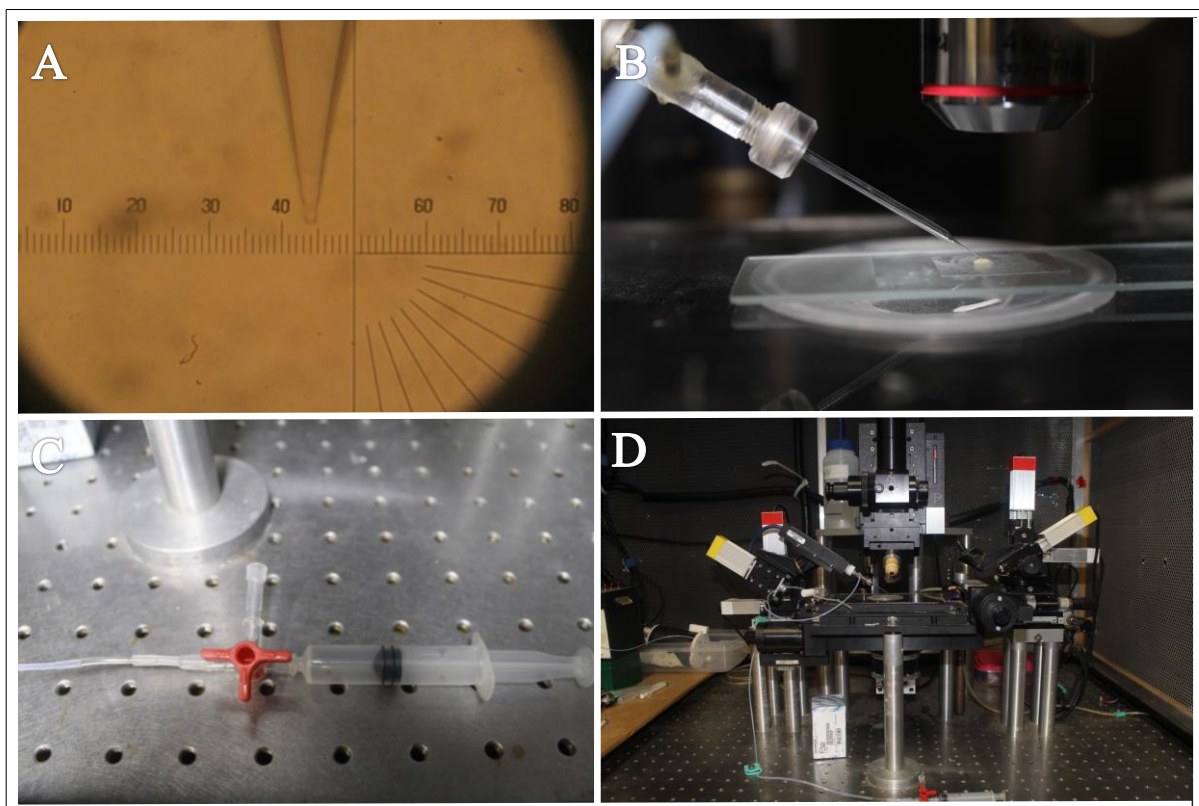


Figura 13. Injeção das drogas e dos fármacos no hemocele das larvas 3^o estágio de *D. melanogaster*. **A.** Micropipeta de vidro com o diâmetro de ponta de aproximadamente 3 μm . Aumento de 400x. **B.** Micropipeta de vidro acoplada a um micromanipulador e larva imobilizada sobre uma lâmina de microscópio com uma fita adesiva dupla face. **C.** Seringa de 5 ml conectada a uma mangueira de polietileno utilizada para dispensar as soluções no hemocele. **D.** Aparato utilizado para a administração dos fármacos nas larvas de terceira fase de *D. melanogaster*.

4.3. Teste de nocicepção térmica por radiação infravermelha modificado

Larvas de *D. melanogaster* foram colocadas, utilizando-se um pincel, em 20 μL de água, sobre uma placa de Petri. A placa foi colocada sobre a superfície de vidro do aparato de

Hargreaves (Ugo Basile), sendo a fonte de radiação infravermelha ajustada sob o vidro (Figura 14). Foi utilizada uma lâmpada alógena de radiação infravermelha com tensão de 8V e potência de 50W. Para visualização do comportamento da larva foi utilizada uma lupa binocular (Aumento de 16x, Zeis). O aparelho foi, então, ligado para a emissão de radiação perpendicular à superfície de vidro, em direção à gota. O tempo decorrido (em segundos, s) desde o início da incidência até se observar o movimento de escape (movimento de rolamento 360° sobre seu próprio eixo) foi medido, e esse intervalo foi definido como *Latência de Sacarolha*. O ponto de corte superior dessa medição foi estabelecido como 32 s, ou seja, ao se atingir esse valor, a lâmpada era desligada automaticamente.

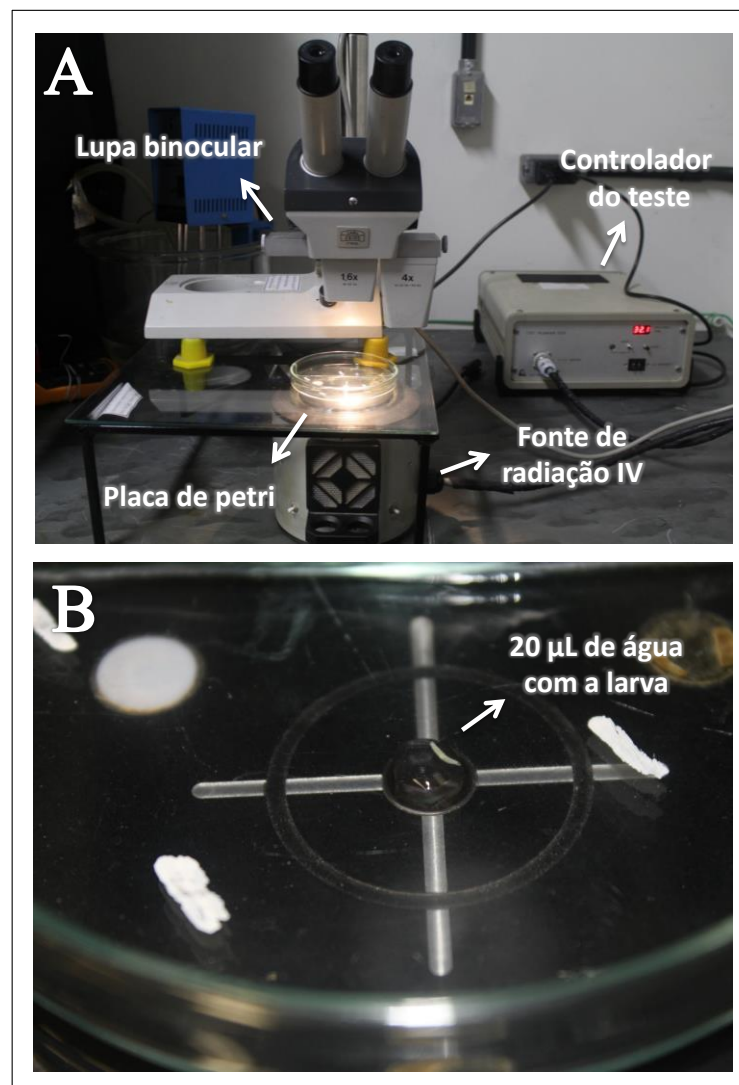


Figura 14. Teste de nociceção térmica por radiação infravermelha modificado. A. Aparato utilizado para o teste de nociceção térmica. Fonte de radiação infravermelha ajustada sob o vidro e lupa binocular (16x) utilizada para visualização do movimento reflexo de sacarolha. Ao fundo da figura é possível observar o controlador do teste. B. Placa de Petri sobre a superfície de vidro do aparato contendo uma larva de *D. melanogaster* imersa em 20 µL de água.

4.4. Padronização da intensidade da radiação infravermelha

A padronização foi conduzida sob diferentes intensidades relativas da lâmpada de radiação infravermelha (85, 90, 95 e 99% da potência máxima do aparelho). Para cada grupo de intensidade foram utilizadas 20 larvas, totalizando 80. A intensidade de 95% foi escolhida para os demais procedimentos uma vez que foi observada a latência de saca-rolha de $11,7 \pm 1,3$ s, o que possibilitou a variação da latência de saca-rolha para menores e maiores valores com os diferentes procedimentos experimentais.

4.5. Avaliação da temperatura da água submetida a diferentes intensidades da radiação infravermelha

Foram realizadas as curvas de incremento da temperatura da água (20 μ L) no tempo para as intensidades de radiação infravermelha mencionadas no item anterior. As medidas foram realizadas por um termopar acoplado ao computador e a leitura foi feita a cada 1 s, por 30 s. O registro do incremento da curva foi realizado pelo software Clampex 10.5 e a análise dos dados foi feita através do software Clampfit 10.5. Esse procedimento foi conduzido no Laboratório de Eletrocel, Departamento de Fisiologia, ICB, UFMG, sobre orientação da Professora Lígia Araújo Naves.

4.6. Procedimento experimental para a avaliação do efeito de substâncias analgésicas em larvas *D. melanogaster* no modelo de nocicepção térmica por radiação infravermelha

Para avaliação do efeito das substâncias analgésicas (morfina, dexametasona, dipirona, AAS e AEA) na nocicepção térmica, inicialmente registrou-se o valor basal da latência de saca-rolha para cada larva ($n = 7$ por grupo). Em seguida, foi injetada em cada larva 0,1 μ L de uma solução de cada uma das substâncias analgésicas. Em seguida, a larva foi colocada na placa de Petri em 20 μ L de água e submetida ao estímulo térmico da radiação infravermelha e a latência de saca-rolha foi medida em intervalos de tempo estabelecidos. Assumiu-se efeito analgésico máximo para latência de saca-rolha = 32 s (ponto de corte superior do aparelho).

A morfina foi avaliada nas doses crescentes de 2, 4, 8 e 16 nanogramas (ng). Após a administração, a latência do saca-rolha foi avaliada nos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 e 120 min. Para controle foi realizada a administração da hemolinfa artificial.

O papel dos receptores opioides nesse efeito foi avaliado utilizando o antagonista não seletivo, naloxona. O efeito analgésico foi avaliado no tempo 0 min (pico de ação analgésica da morfina no modelo) após administração concomitante de morfina 16 ng e naloxona nas doses de 1, 2 ou 4 ng.

Para investigar a ação analgésica da AEA, no modelo em questão, foram administradas as doses 8, 16 e 32 picogramas (pg). Em seguida a latência de saca-rolha foi observada nos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 30 e 60 min. A hemolinfa artificial foi administrada como controle.

O papel dos receptores canabinoides nesse efeito foi avaliado utilizando o antagonista seletivo para CB₁ (AM251) na dose de 80 ng e o antagonista seletivo para CB₂ (AM630) na dose de 100 ng. O efeito analgésico foi avaliado no tempo 0 min (pico de ação analgésica da AEA no modelo) após administração concomitante de AEA 32 pg e os antagonistas nas suas respectivas doses.

A dipirona foi avaliada nas doses de 32, 64 e 128 ng, nos seguintes tempos após a sua administração: 0, 5, 10, 15, 20 e 30 min. Como controle foi utilizada a hemolinfa artificial.

Para a avaliação do efeito antinociceptivo da dexametasona, o fármaco foi administrado nas doses crescentes de 4, 8 e 16 ng. A latência do saca-rolha foi mensurada nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 e 120 min. O controle utilizado foi hemolinfa artificial. Outro controle utilizado foi o grupo tratado com AAS 100 ng, que é um AINE típico.

As doses estabelecidas para cada fármaco ou droga foram estabelecidas a partir das administradas em camundongos, levando em consideração a proporcionalidade entre os pesos dos animais.

4.7. Procedimento experimental para a indução da sensibilização térmica em larvas de *D. melanogaster*

A sensibilização dos nociceptores por radiação infravermelha das larvas foi induzida utilizando três diferentes valores da potência relativa da lâmpada de radiação infravermelha

(95, 97 e 99%). Após a medida do valor basal da latência de saca-rolha, cada larva foi estimulada durante 32 s com a intensidade respectiva ao seu grupo experimental. No grupo SHAM, as larvas foram colocadas sobre o aparato durante o mesmo intervalo de tempo, entretanto, sem exposição ao estímulo térmico. Já no grupo NAIVE, não houve a exposição prévia ao aparato. Em seguida, a latência de saca-rolha foi avaliada de 30 em 30 min até a 5ª hora e de 1 em 1 hora até a 9ª hora de exposição.

A partir dos resultados obtidos, determinou-se que a *sensibilização térmica* consistiria na exposição da larva por 32 s à lâmpada de radiação infravermelha, na intensidade relativa de 97%.

4.8. Procedimento experimental para a avaliação de substâncias analgésicas e/ou anti-inflamatórias em larvas de *D. melanogaster* após sensibilização térmica

Para avaliação da ação analgésica e/ou anti-inflamatória dos fármacos frente à sensibilização térmica, inicialmente foi mensurado o valor basal da latência de saca-rolha para cada larva. O controle utilizado, para todos os fármacos, foi hemolinfa artificial.

As larvas dos grupos tratados com AAS foram submetidas à sensibilização térmica, e após 150 min, as doses de 25, 50 e 100 ng do fármaco foram administradas via hemocele. A latência do saca-rolha foi avaliada de 10 em 10 min durante 60 min.

Para a dexametasona foram utilizados dois protocolos distintos para avaliação do efeito antinociceptivo do fármaco frente à sensibilização térmica, uma vez que são conhecidos os efeitos não-genômicos (curto prazo) e genômicos (longo prazo).

Para avaliação do efeito em curto prazo, as larvas dos grupos tratados com dexametasona foram submetidas à sensibilização térmica, e após 150 min, as doses de 4, 8 e 16 ng do fármaco foram administradas via hemocele. A latência de saca-rolha foi avaliada de 10 em 10 min durante 90 min.

A fim de avaliar o efeito em longo prazo da dexametasona, injetaram em cada larva do grupo 16 ng do fármaco. No grupo controle, injetou-se hemolinfa artificial. Logo após as administrações, as larvas foram submetidas à sensibilização térmica. Passados 150 min da

sensibilização, iniciou-se a medição da latência de saca-rolha, em intervalos de 10 min durante 90 min.

4.9. Estatística

4.9.1. Cálculo do n amostral

O cálculo do n amostral foi realizado utilizando os dados obtidos a partir da padronização da intensidade da radiação infravermelha (item 3.4).

Foi utilizada a fórmula (Sampaio, 1998):

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

onde, $Z_{\alpha/2}$ é 1,96 (valor tabelado referente a 95% de confiança);

Z_{β} é 0,84 (valor tabelado referente a 80% de poder do teste);

EPM é o erro padrão da média encontrado na intensidade de 95%;

E é o erro esperado do experimentador.

$$n = \frac{2 \cdot 1,27^2 (1,96 + 0,84)^2}{2^2}$$

$$n = 6,32$$

Logo, cada grupo de experimentação contou com 7 larvas de 3º estágio de *D. melanogaster*, aleatoriamente selecionadas do recipiente de vidro.

4.9.2. Análise dos resultados

A antinocicepção observada no pico de ação para cada dose dos fármacos e a sensibilização térmica induzida pelas diferentes intensidades da radiação infravermelha foram normalizadas como porcentagem do efeito máximo possível (EMP), definida pela equação adaptada de Le Bars et al., 2001:

$$EMP = \frac{L_t - L}{C_o - L} \times 100$$

onde, L_t é a latência de saca-rolha depois do tratamento;

L é a latência de saca-rolha do grupo controle;

C_o é o tempo de corte superior (32 s).

Após o registro da curva de incremento da temperatura da gota de água em relação ao tempo, foi realizada uma regressão polinomial de grau 2 para a intensidade de 95% da potência máxima do aparelho para gerar a seguinte equação:

$$y = -0,009728x^2 + 0,5384x + 25$$

onde, y é a temperatura da gota (°C);

x é tempo da latência de saca-rolha (s).

A equação foi utilizada com o intuito de definir a temperatura da gota de água no momento em que ocorreu a latência de saca-rolha (s) das larvas submetidas ao protocolo descrito no item 4.7.

As larvas de *Drosophila melanogaster* foram distribuídas aleatoriamente entre os grupos experimentais e controles. A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad Prism 5.00. Os resultados foram representados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M) de cada grupo de animais ($n = 7$ por grupo). As comparações estatísticas das diferenças das médias dos grupos foram feitas através da análise de variância (One-way ANOVA). Para verificar diferenças entre os grupos nos diversos tempos de medidas, foi utilizado Two-way ANOVA, com correção *post test* pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança a ser considerado para dados estatisticamente significativos foi de 95% (valor de $p < 0,05$).

5. Resultados

5.1. Padronização da intensidade do estímulo térmico por radiação infravermelha

A padronização da intensidade do estímulo térmico por radiação infravermelha foi conduzida sob diferentes intensidades relativas da lâmpada de radiação infravermelha (85, 90, 95 e 99% da potência máxima do aparelho) (n=20). Os resultados foram registrados como latência de saca-rolha (s).

As larvas submetidas à intensidade de 85% apresentaram a latência de saca-rolha em $12,6 \pm 3,0$ s. O grupo que recebeu a intensidade de 90% respondeu ao estímulo térmico em $12,3 \pm 2,7$ s. Na intensidade 95%, a latência de saca-rolha foi de $11,7 \pm 1,3$ s. Para a intensidade de 99%, observou-se em $9,8 \pm 2,6$ s a resposta média mensurada (Figura 15).

5.2. Avaliação da temperatura da gota de água submetida a diferentes intensidades da radiação infravermelha

A curva de incremento da temperatura na gota de 20 μ L na placa de Petri foi determinada para as intensidades mencionadas acima com o auxílio de um termopar (Figura 16). Na média da latência de saca-rolha para 95% observada na Figura 15, a gota de água era aproximadamente 30°C. Para as intensidades de 85%, 90% e 99% as temperaturas da gota estavam em torno de 29°C, 30°C e 29°C, respectivamente. A 90, 95 e 99%, os incrementos da temperatura foram semelhantes e a 85% foi menor.

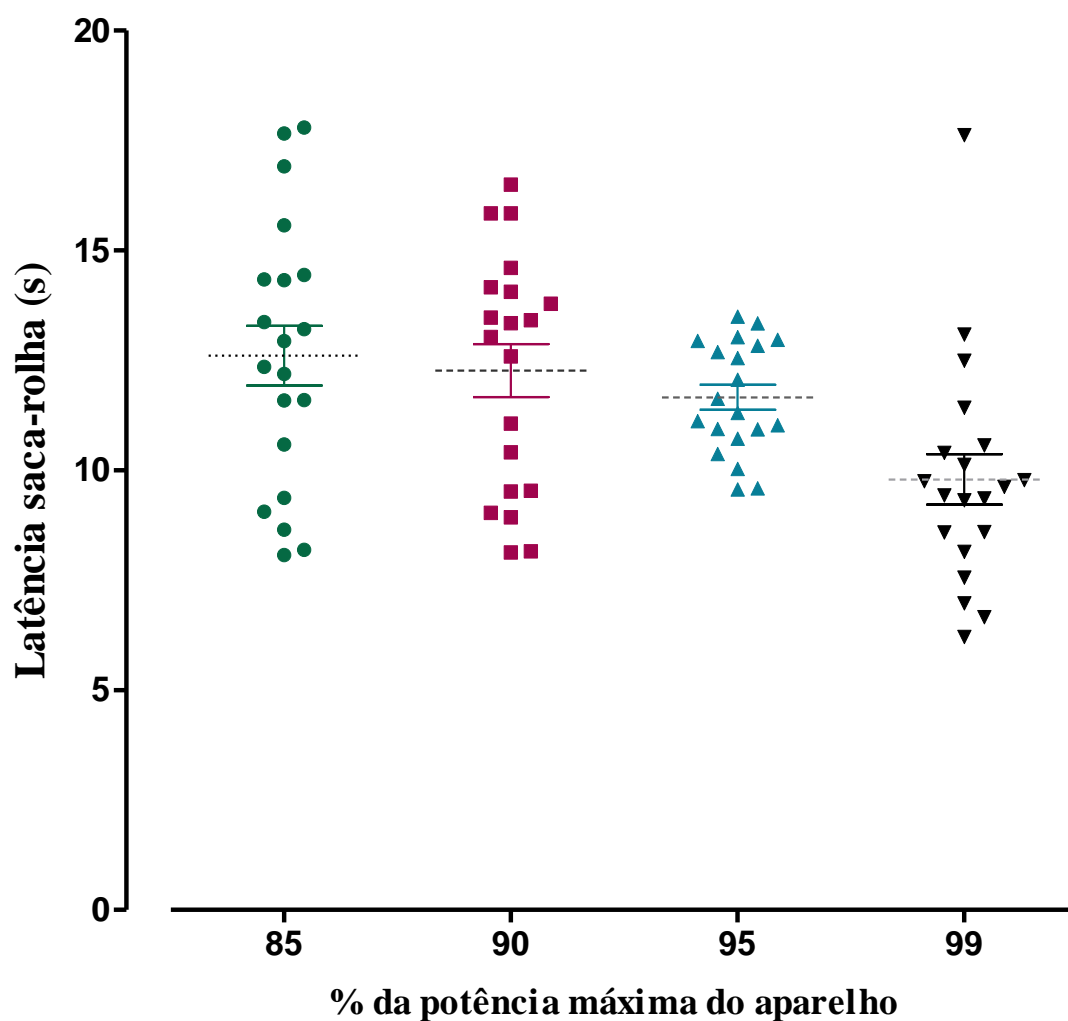


Figura 15. Padronização da intensidade do estímulo nocivo térmico por radiação infravermelha. Média da latência de saca-rolha (s) em larvas de 3º estágio submetidas a diferentes porcentagens da intensidade máxima lâmpada de radiação infravermelha. 85% = $12,6 \pm 3,0$ s; 90% = $12,3 \pm 2,7$ s; 95% = $11,7 \pm 1,3$ s; 99% = $9,8 \pm 2,6$ s (valores expressos em média \pm E.P.M; n = 20 para cada intensidade). Cada símbolo representa o valor individual de latência de saca-rolha para cada larva. A linha tracejada representa a média dos valores individuais.

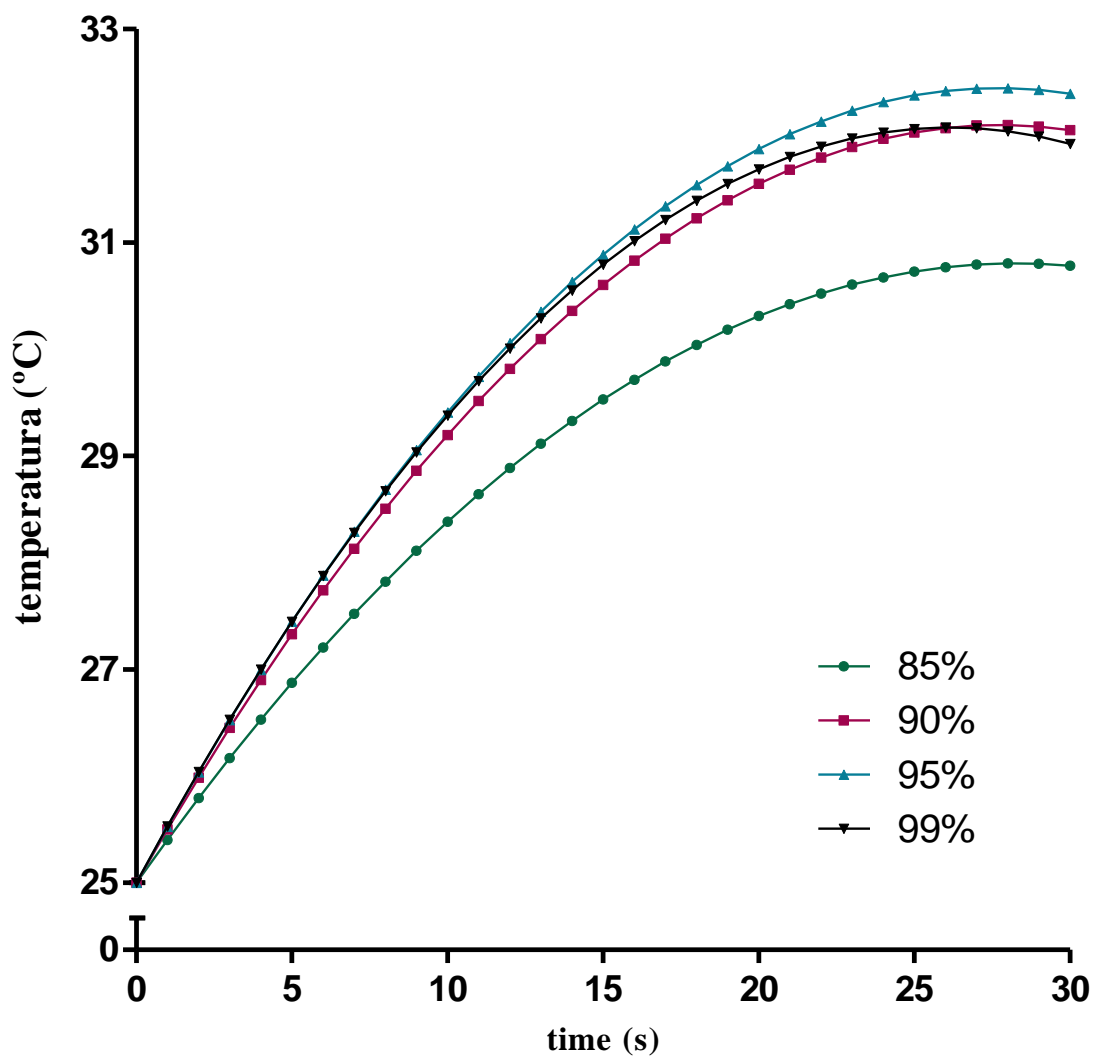


Figura 16. Curva de incremento da temperatura da gota pela incidência da radiação infravermelha em diferentes intensidades. A gota de água (20 μ L) foi colocada em uma placa de Petri sobre a fonte de radiação infravermelha com 85, 90, 95 e 99% da intensidade máxima do aparelho. As medidas de temperatura foram realizadas a cada 1 s. Valores determinados por um termopar.

5.3. Avaliação da ação antinociceptiva da morfina em larvas *D. melanogaster* na nocicepção térmica por radiação infravermelha

A fim de avaliar o efeito antinociceptivo da morfina no teste de nocicepção térmica foram utilizadas doses crescentes de 2, 4, 8 e 16 ng. A resposta de escape, latência de saca-rolha (s), foi avaliada nos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 e 120 min após a administração da morfina. O pico de ação para todas as doses aconteceu na primeira medida após a administração do fármaco, ou seja, logo em seguida da administração.

Foi observada antinocicepção dose-dependente, sendo que com a maior dose (16 ng) a resposta atingiu 91% do efeito máximo possível (EMP) e não retomou ao basal dentro do intervalo de observação (120 min). Com a dose de 8 ng, a antinocicepção intermediária de 57% quando comparada com a média do valor basal da latência de saca-rolha do grupo veículo no tempo 0 min. O efeito observado nesse grupo tratado permaneceu por 90 min. As doses de 2 e 4 ng também alteraram a latência de saca-rolha parcialmente, em 18 e 39% do EMP, respectivamente. Em relação ao tempo de duração, o efeito proporcionado por essas doses retomou ao basal após 10 e 20 min, respectivamente (Figura 17).

A partir desses resultados, foi avaliado o envolvimento dos receptores opioides na antinocicepção produzida pela morfina através do uso no antagonista não seletivo desses receptores, naloxona. A administração concomitante de 4 ng de naloxona reverteu completamente o efeito da maior dose de morfina (16 ng), enquanto que as doses de 2 e 1 ng exibiram antagonismo parcial. A naloxona 4 ng não teve qualquer efeito em comparação com o grupo veículo (Figura 18).

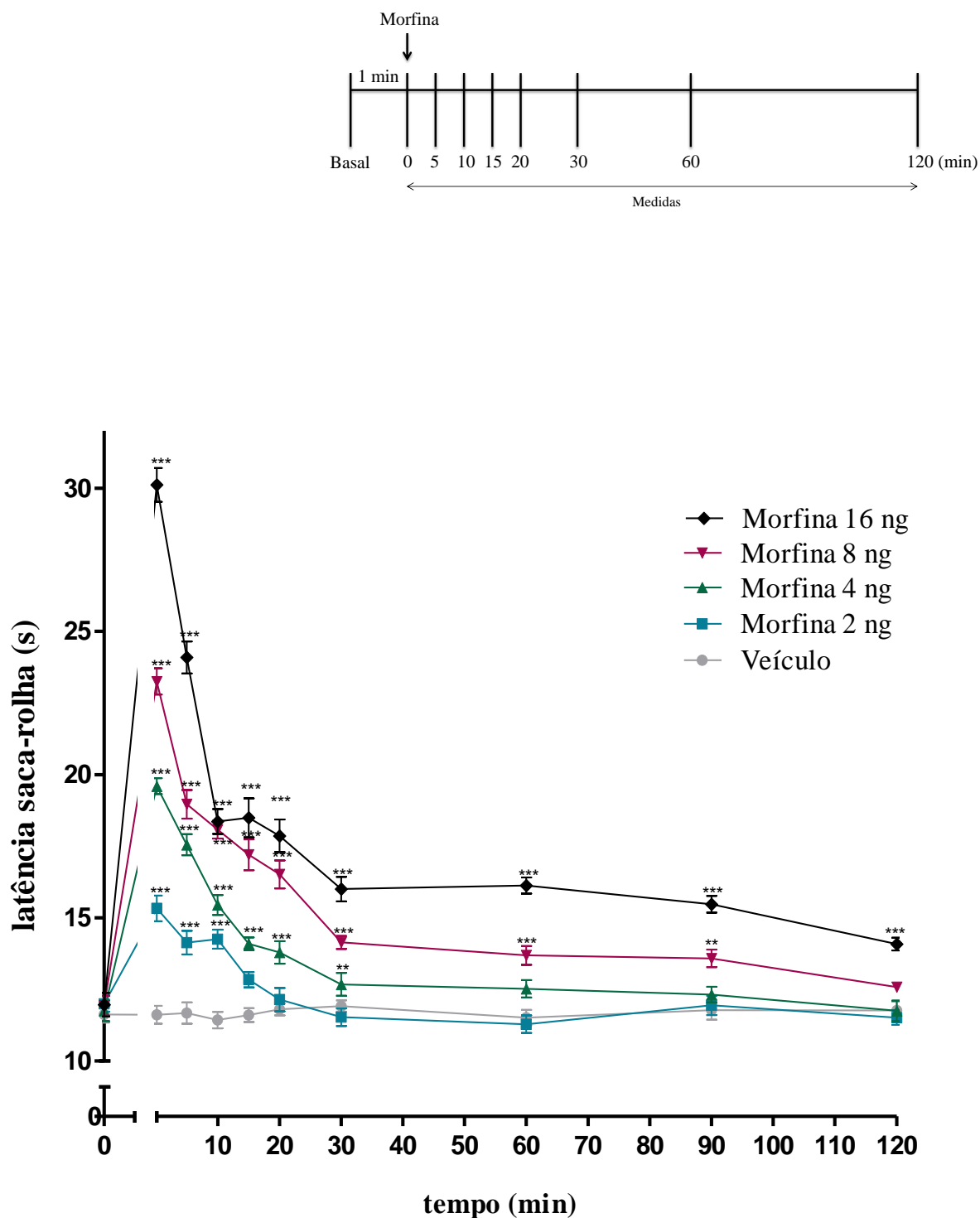


Figura 17. Efeito antinociceptivo dose-dependente da morfina em larvas de *D. melanogaster* no modelo de nocicepção térmica por radiação infravermelha. Valores expressos como média \pm E.P.M. ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$ comparando com veículo; Two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7$ por grupo. Veículo: hemolinfa artificial.

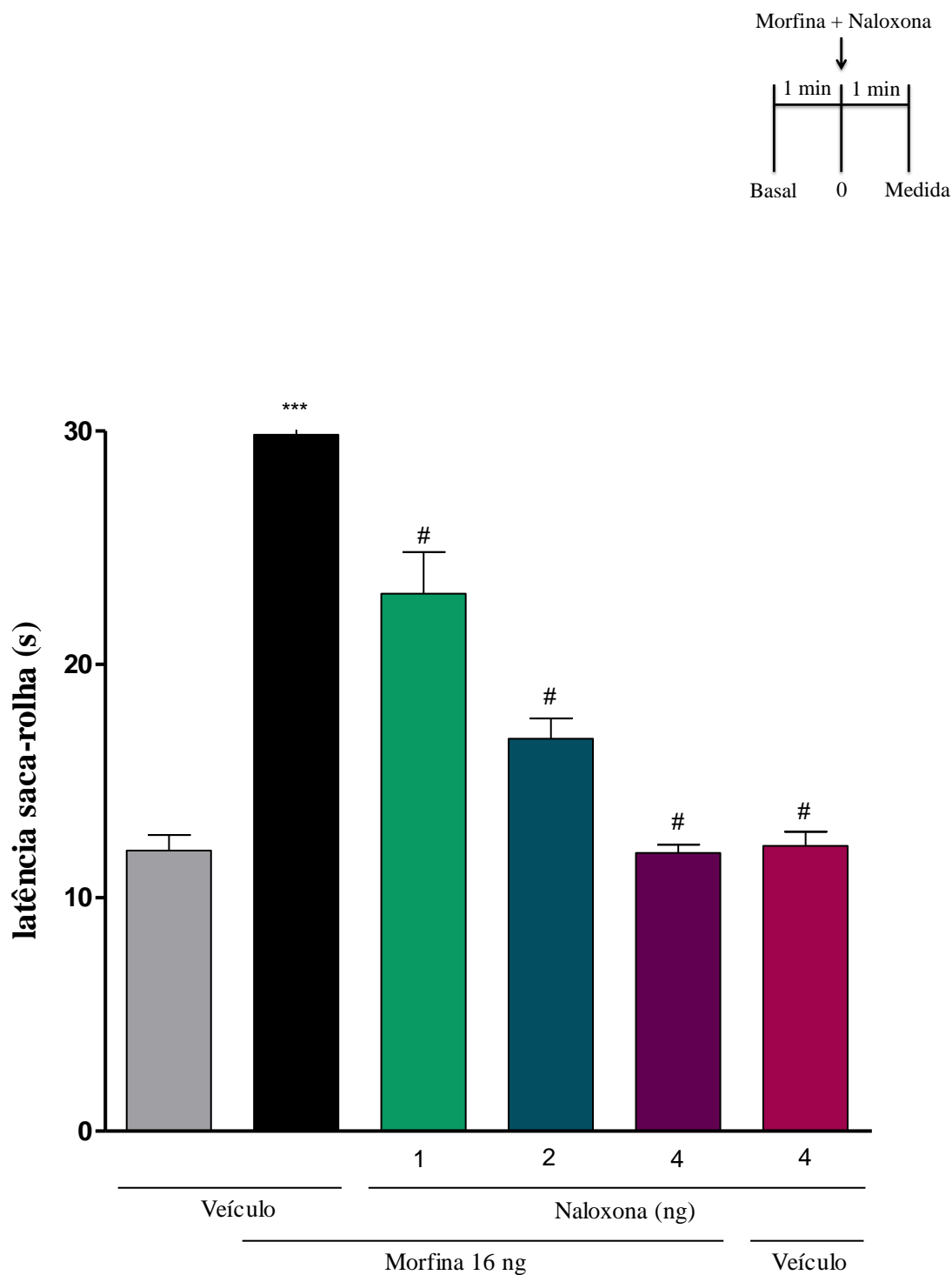


Figura 18. Naloxona reverte o efeito antinociceptivo máximo da morfina. Valores expressos como média \pm E.P.M. *** $p < 0.001$ comparando com veículo; # $p < 0.05$ comparado com o veículo + morfina 16 ng; Two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7$ por grupo. Veículo: hemolinfa artificial.

5.4. Avaliação da ação antinociceptiva da anandamida (AEA) em larvas de *D. melanogaster* na nocicepção térmica por radiação infravermelha

O teste de antinocicepção térmica da AEA foi realizado utilizando as doses de 8, 16 e 32 pg. A latência de saca-rolha foi mensurada nos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 30 e 60 min após a administração.

A dose de 8 pg apresentou antinocicepção estatisticamente significativa (27% do EMP) apenas no seu pico de ação, ou seja, em seguida a sua administração. O efeito máximo da dose de 16 pg (69%) ocorreu 5 min após a sua administração. Foi também observada diferença estatística quando comparado ao controle nos tempos de 10 e 20 min. A ação antinociceptiva da dose de 32 pg foi identificada em todos os intervalos de avaliação da latência de saca-rolha, exceto no tempo 20 min. O seu pico de ação ocorreu no tempo 0 min e exibiu EMP de 88% quando comparado ao grupo controle no mesmo intervalo (Figura 19).

A partir desses resultados, foi avaliado o envolvimento dos receptores canabinoides na antinocicepção produzida pela AEA através do uso dos antagonistas CB₁ e CB₂, AM251 e AM630, respectivamente. A administração concomitante de 80 ng de AM251 não reverteu o efeito da maior dose de AEA (32 pg) (Figura 20). O mesmo foi observado ao se administrar o AM630 na dose de 100 ng (Figura 21).

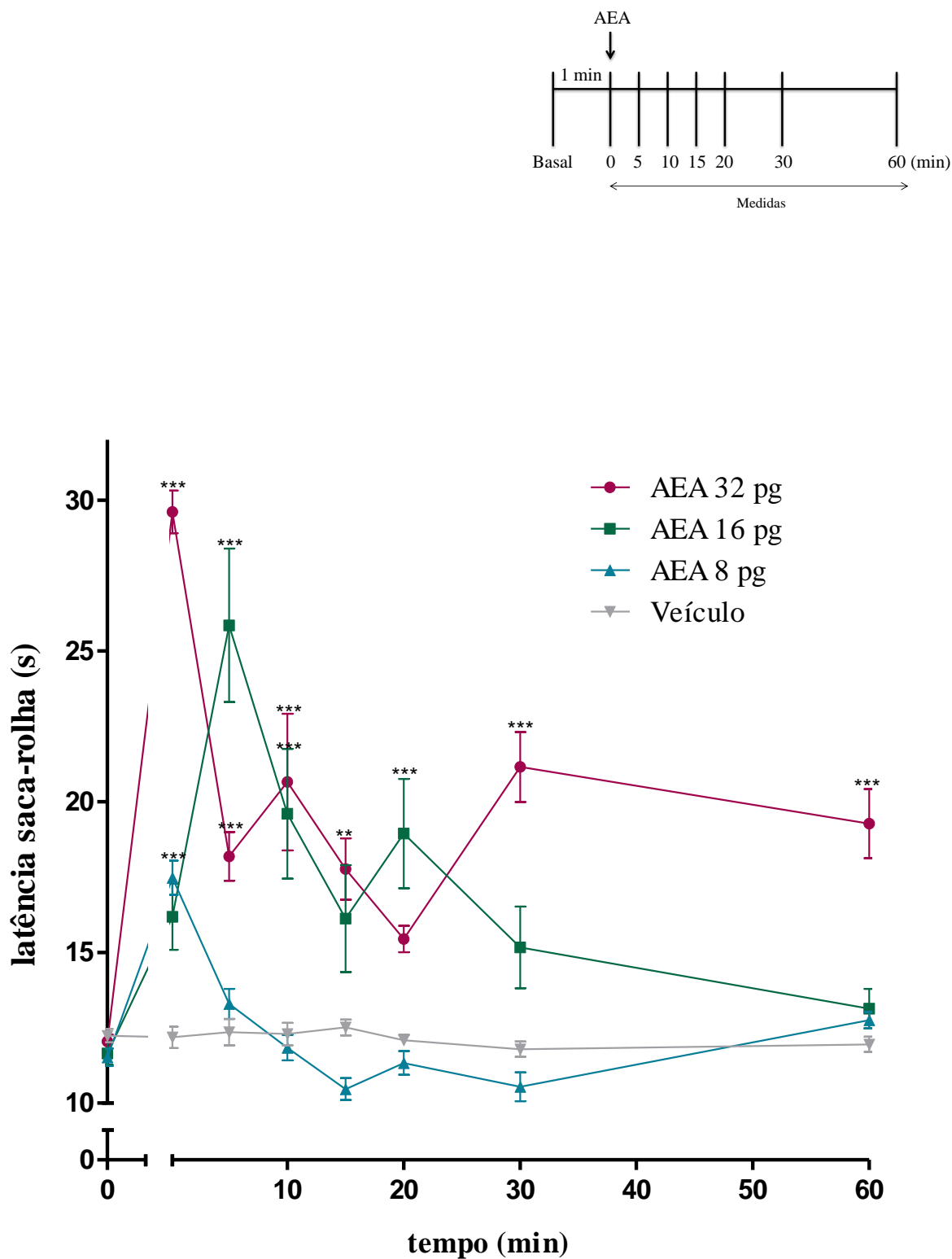


Figura 19. Efeito antinociceptivo dose-dependente da AEA em larvas de *D. melanogaster* no modelo de nociceção térmica por radiação infravermelha. Valores expressos como média \pm E.P.M. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparando com veículo; Two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7$ por grupo. Veículo: hemolinfa artificial e Tocrisolve 0,003%.

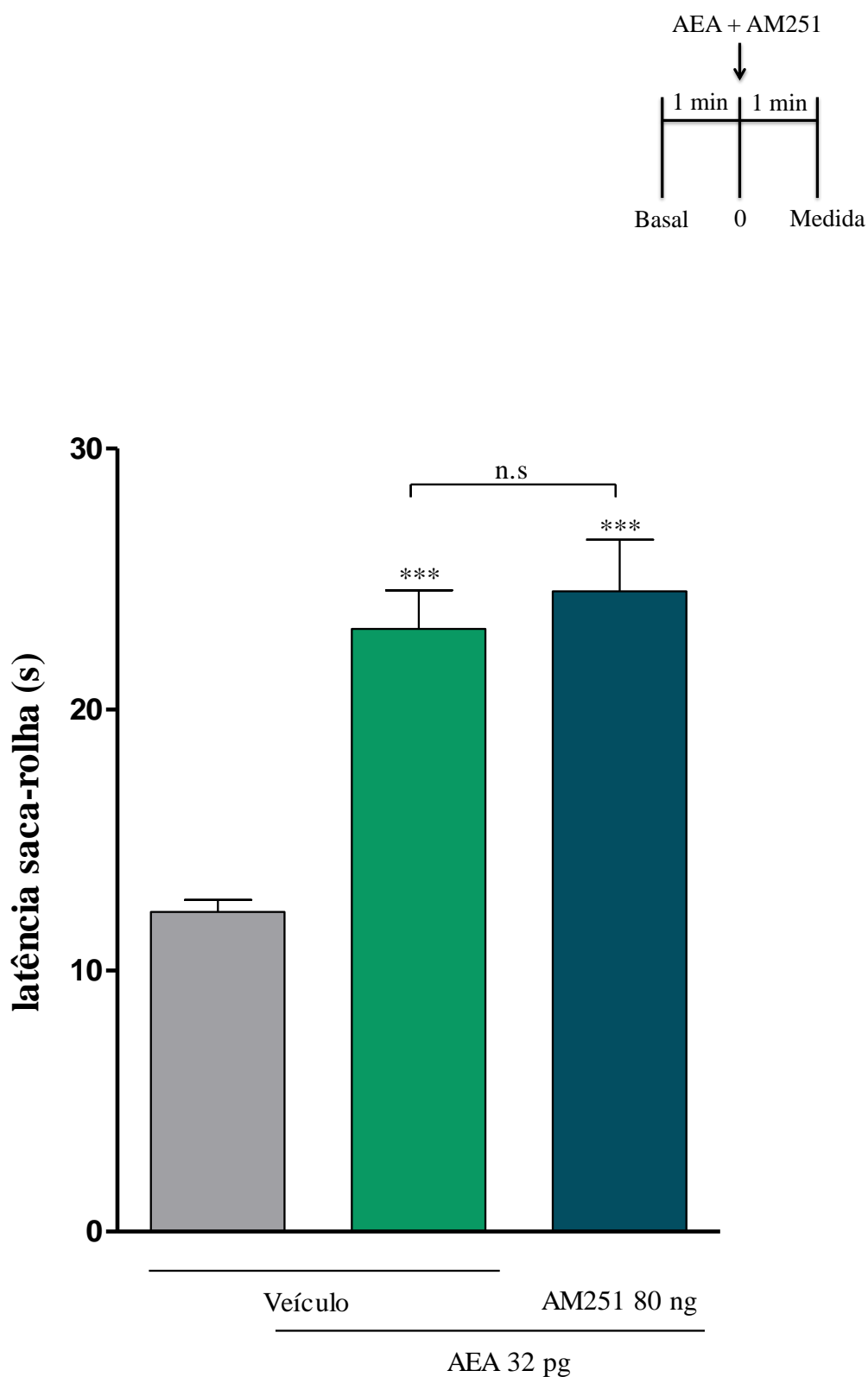


Figura 20. O antagonista dos receptores CB_1 , AM251, não reverte o efeito antinociceptivo máximo da AEA. Valores expressos como média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ comparando com veículo; n.s = não significativo. One-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7$ por grupo. Veículo: hemolinfa artificial, DMSO 2%, Tocrisolve 0,003%.

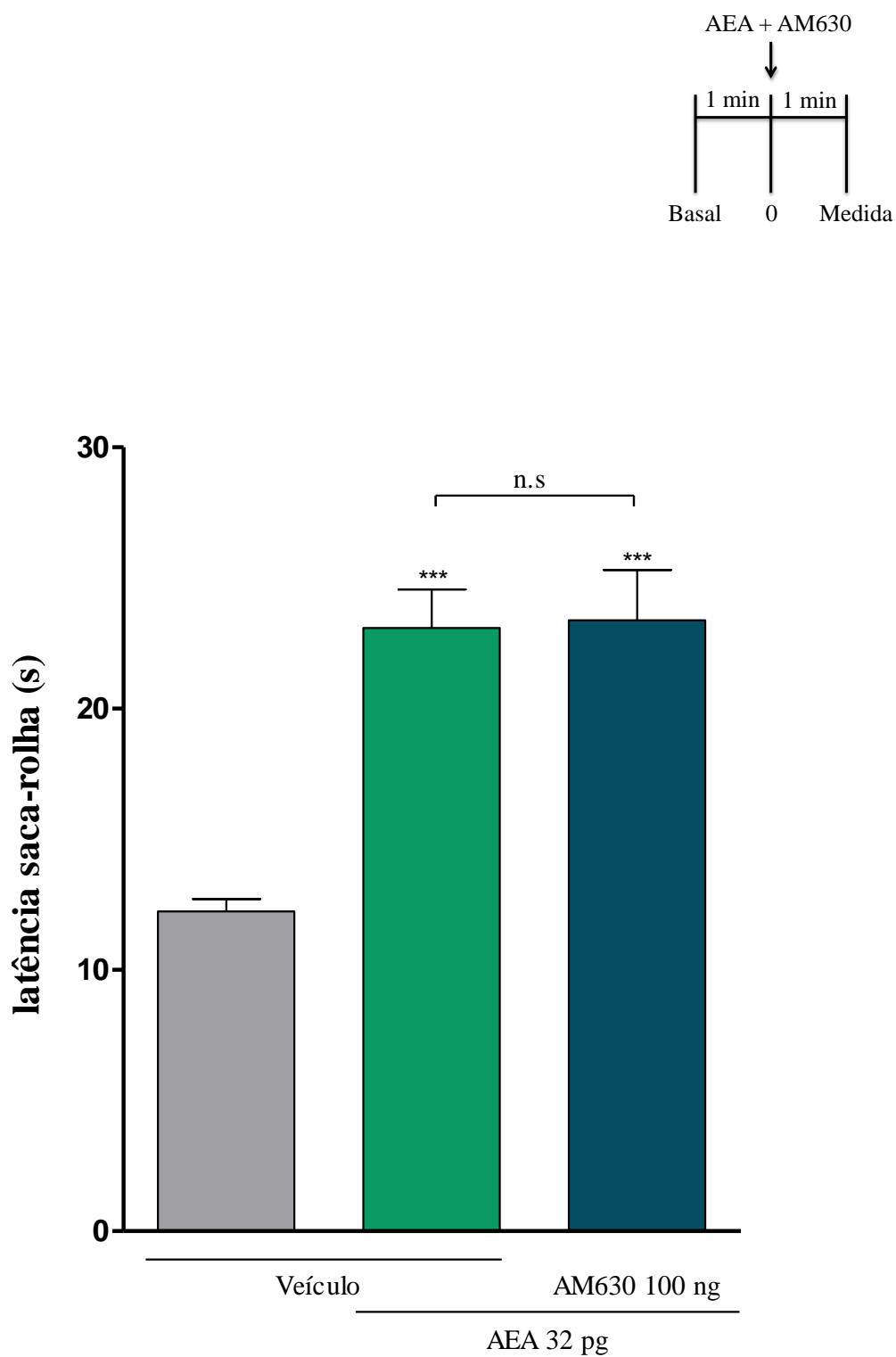


Figura 21. O antagonista dos receptores CB_2 , AM630, não reverte o efeito antinociceptivo máximo da AEA. Valores expressos como média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ comparando com veículo; n.s = não significativo. One-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7$ por grupo. Veículo: hemolinfa artificial, DMSO 2%, Tocrisolve 0,003%.

5.5. Avaliação da ação antinociceptiva da dipirona em larvas de *D. melanogaster* no modelo de nocicepção térmica por radiação infravermelha

O efeito antinociceptivo da dipirona foi avaliado no modelo utilizando-se doses crescentes do fármaco (32, 64 e 128 ng). Após a administração, os grupos tratados foram submetidos à radiação infravermelha e a latência de saca-rolha foi avaliada nos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 30 min. Para controle, foi utilizado a hemolinfa artificial.

A maior dose (128 ng) aumentou a resposta de escape em 71% quando comparado com a média dos valores da latência de saca-rolha do grupo veículo no tempo 0 min, momento em que ocorreu o pico de ação do fármaco nessa dose. A duração desse efeito foi de 10 min. O pico de ação das doses de 32 e 64 ng foi observado na primeira medida. As médias dos valores da latência de saca-rolha foram incrementadas em 23 e 47%, respectivamente, quando comparadas ao grupo veículo (Figura 22).

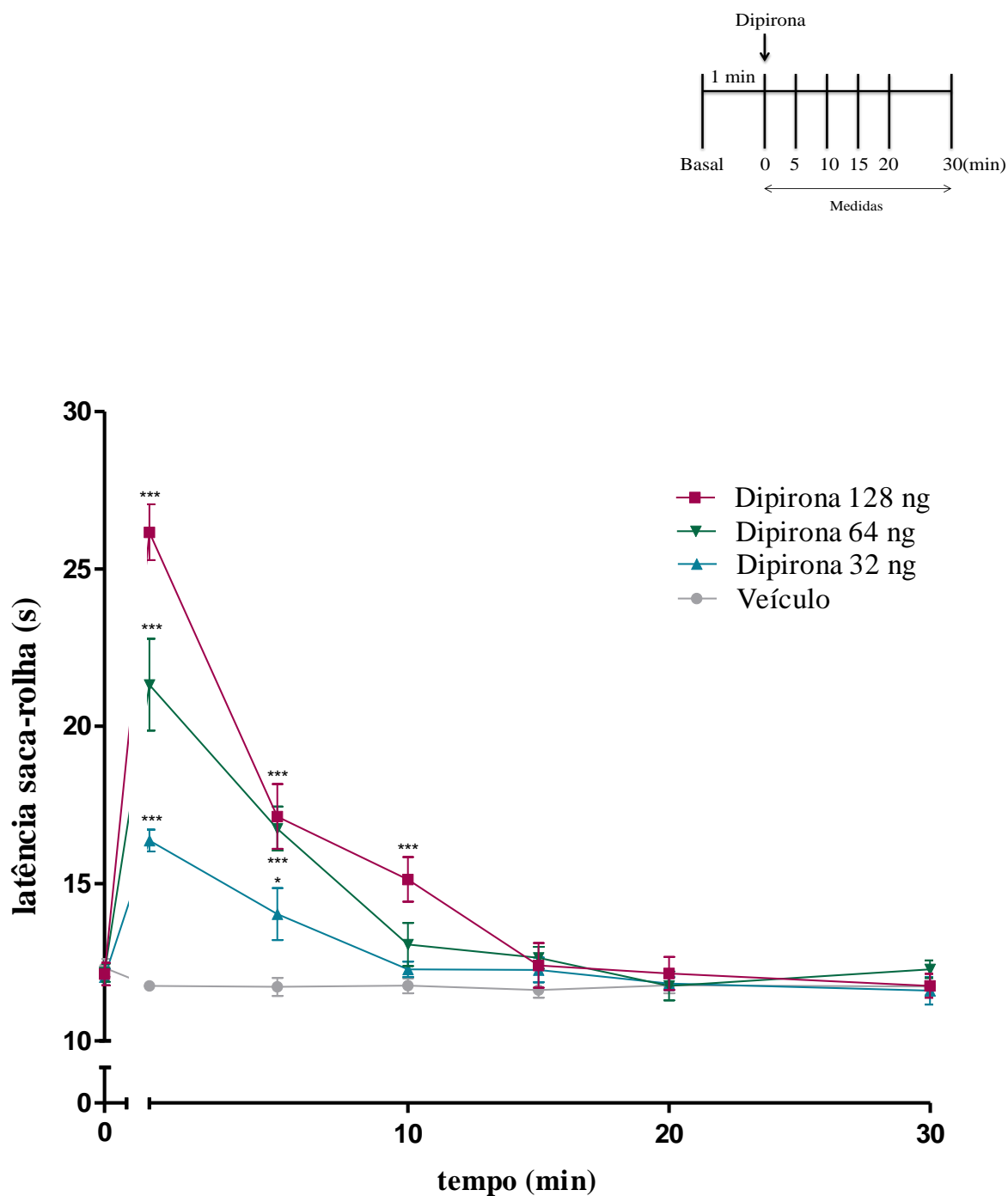


Figura 22. Efeito antinociceptivo dose-dependente da dipirona em larvas de *D. melanogaster* no modelo de nociceção térmica por radiação infravermelha. Valores expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparando com veículo; Two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7$ por grupo. Veículo: hemolinfa artificial.

5.6. Curva temporal da sensibilização térmica induzida por radiação infravermelha em larvas de *D. melanogaster*

Com a finalidade de avaliar o potencial do método em detectar antinocicepção de fármacos frente à nocicepção inflamatória, as larvas foram submetidas à sensibilização nociceptiva térmica sob diferentes intensidades relativas da lâmpada de radiação infravermelha (95, 97 e 99% da potência máxima do aparelho) sendo estimuladas por 32 segundos. No grupo SHAM, as larvas foram colocadas sobre o aparato durante o mesmo intervalo de tempo, entretanto, sem exposição à radiação infravermelha. O grupo NAIVE não sofreu a exposição prévia ao aparato. Em seguida a latência do saca-rolha foi avaliada de 30 em 30 min, até a 5ª hora, e de 1 em 1 hora, até a 9ª hora.

A intensidade de 95% da lâmpada gerou um pico de sensibilização na 7ª hora após a sua indução, com uma redução da latência de saca-rolha de 11,7 para 7,3 s. Quando previamente expostas a intensidade de 97%, as larvas responderam com pico de sensibilização na 3ª hora, sendo a média da latência de saca-rolha reduzida de 12,1 para 7,5 s. O grupo tratado com a intensidade 99% teve o seu pico de sensibilização identificado após 2 horas da exposição, com a diminuição da latência de saca-rolha de 12,5 para 7,3 s (Figura 23).

Valores da latência de saca-rolha abaixo dos basais foram identificados já 30 min antes do pico de sensibilização para as intensidades de 97 e 99% e 1 hora antes do pico para a intensidade de 95%. Não houve diferença estatística significativa para o grupo SHAM quando as medidas foram comparadas com o grupo NAIVE, ou seja, a exposição ao aparato não interferiu na resposta observada.

A intensidade de 97% foi selecionada para os demais protocolos relacionados ao processo de sensibilização térmica. Após os picos terem sido atingidos, os valores da latência de saca-rolha retomaram aos valores basais em 1 hora para as intensidades de 99 e 97% e em 2 horas para a intensidade de 95%.

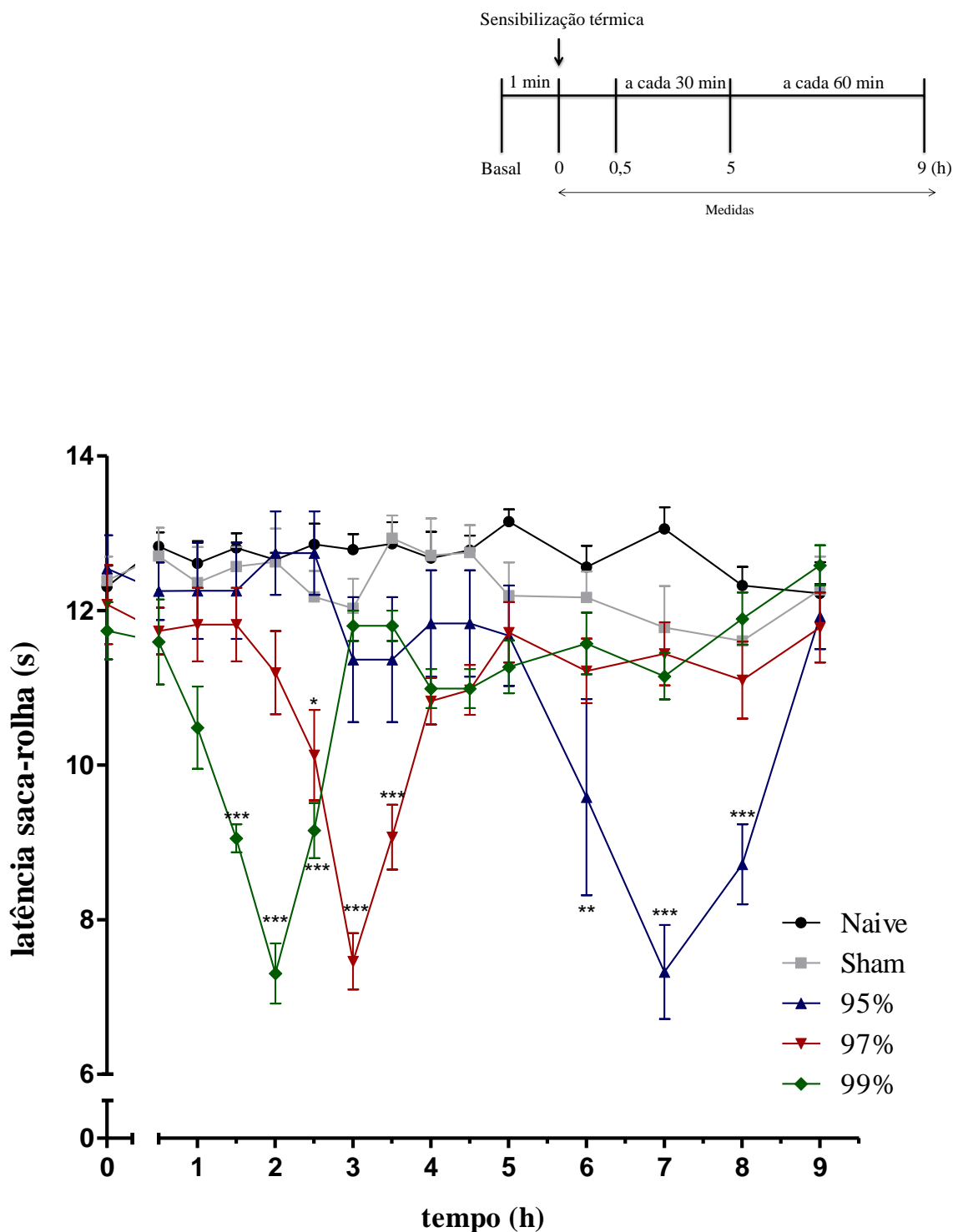


Figura 23. Sensibilização térmica após exposição à radiação infravermelha em diferentes intensidades. Os valores representam a média \pm E.P.M de latência(s) da resposta do saca-rolha. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparando com SHAM; Two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7$ por grupo. NAIVE: larvas sem exposição à radiação infravermelha. SHAM: larvas colocadas sobre o aparato por 32 s sem exposição à radiação infravermelha.

Para realizar a análise da temperatura da gota no pico de sensibilização nas diferentes intensidades, os valores de latência de saca-rolha foram relacionados às temperaturas (°C) através da equação de regressão polinomial de grau 2 descrita na seção 4.9.2.

Na medida basal, as larvas responderam quando a temperatura atingiu 30°C. Após a sensibilização térmica conduzida sobre as diferentes intensidades da radiação infravermelha (95, 97 e 99%), no pico da sensibilização as larvas responderam em torno de 28,4°C, sendo esse valor semelhante para todas as intensidades utilizadas na sensibilização (Figura 24). Sendo assim, a principal característica da sensibilização por radiação infravermelha por diferentes intensidades em larvas *D. melanogaster* foi a ocorrência de seu pico em tempos menores para intensidades maiores.

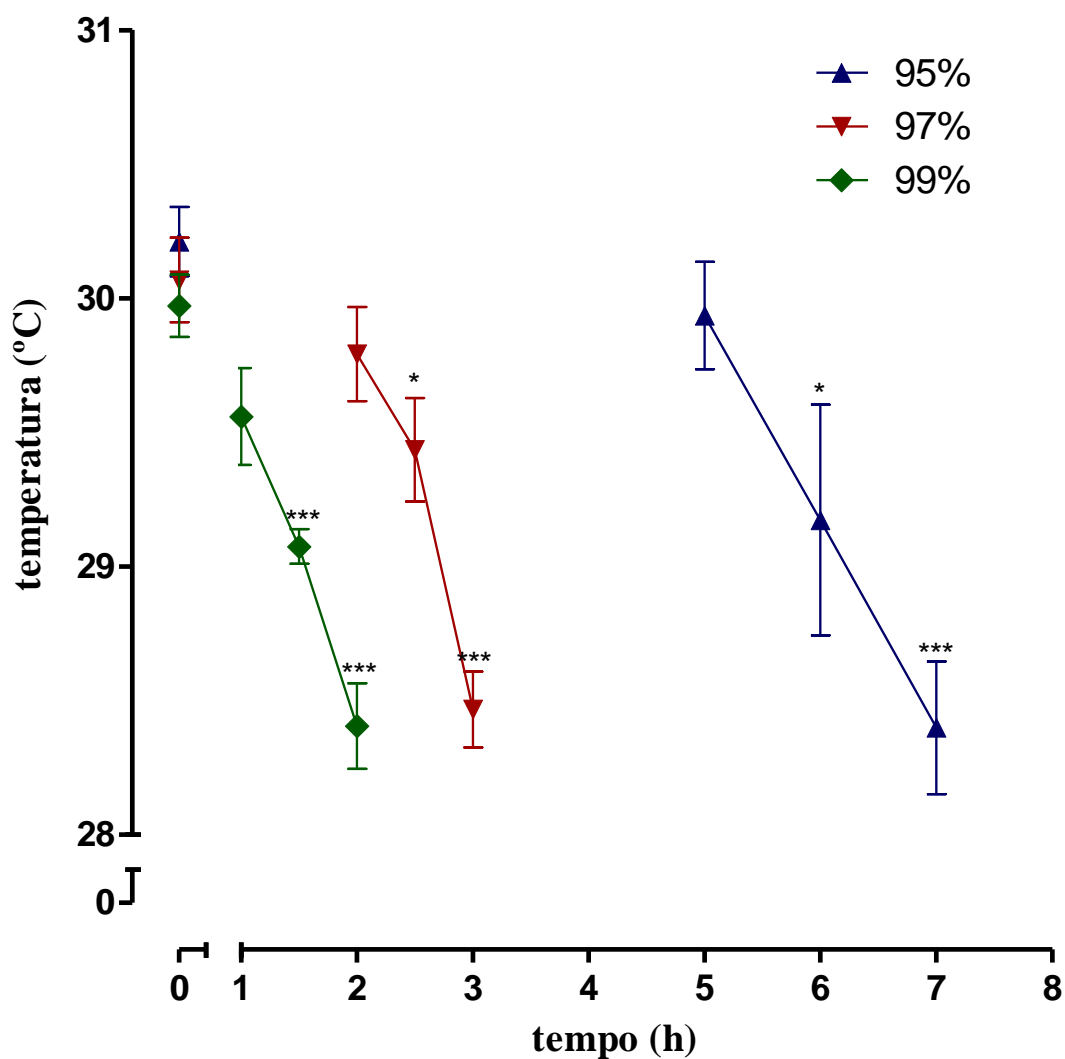


Figura 24. Temperatura da gota de água em relação à latência de saca-rolha da larva de *D. melanogaster* após a sensibilização térmica em diferentes intensidades. A latência de saca-rolha no basal aconteceu em $29,9 \pm 0,1$ °C para 95%; $30,1 \pm 0,2$ °C para 97%; $30,2 \pm 0,1$ °C para 99%. No pico da sensibilização: 95% = $28,4 \pm 0,3$ °C; 97% = $28,5 \pm 0,1$ °C; 99% = $28,4 \pm 0,2$ °C. One-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparando com basal. n = 7 por grupo.

5.7. Avaliação da atividade antinociceptiva do ácido acetilsalicílico (AAS) após sensibilização térmica induzida em larvas de *D. melanogaster*

Visto que os AINEs apresentam eficácia em condições de hipersensibilidade tecidual e, conseqüentemente, na dor inflamatória, o efeito do AAS foi avaliado no modelo de sensibilização térmica em larvas de *D. melanogaster*. As doses de 25, 50 e 100 ng foram administradas 150 min após estímulo de sensibilização dos nociceptores e exibiram perfil dose-dependente. A latência de saca-rolha foi avaliada de 10 em 10 min, durante 60 min (até 210 min após a sensibilização).

No grupo tratado com 100 ng de AAS, foi observada a reversão completa da sensibilização após 10 min da sua administração. O seu efeito apresentou diferença estatística dentro de todo o intervalo de observação. O grupo que recebeu a dose de 50 ng de AAS apresentou diferença estatística no intervalo de 150 a 190 min quando comparado ao grupo tratado com veículo, sendo que no tempo de 150 min a sensibilização foi revertida completamente. O pico observado ocorreu após 20 min da injeção do fármaco, e a sensibilização reverteu-se completamente quando comparada ao grupo tratado com veículo. Para o grupo tratado com a dose de 25 ng, a sensibilização não foi revertida completamente, com pico de efeito em 30 min (Figura 25).

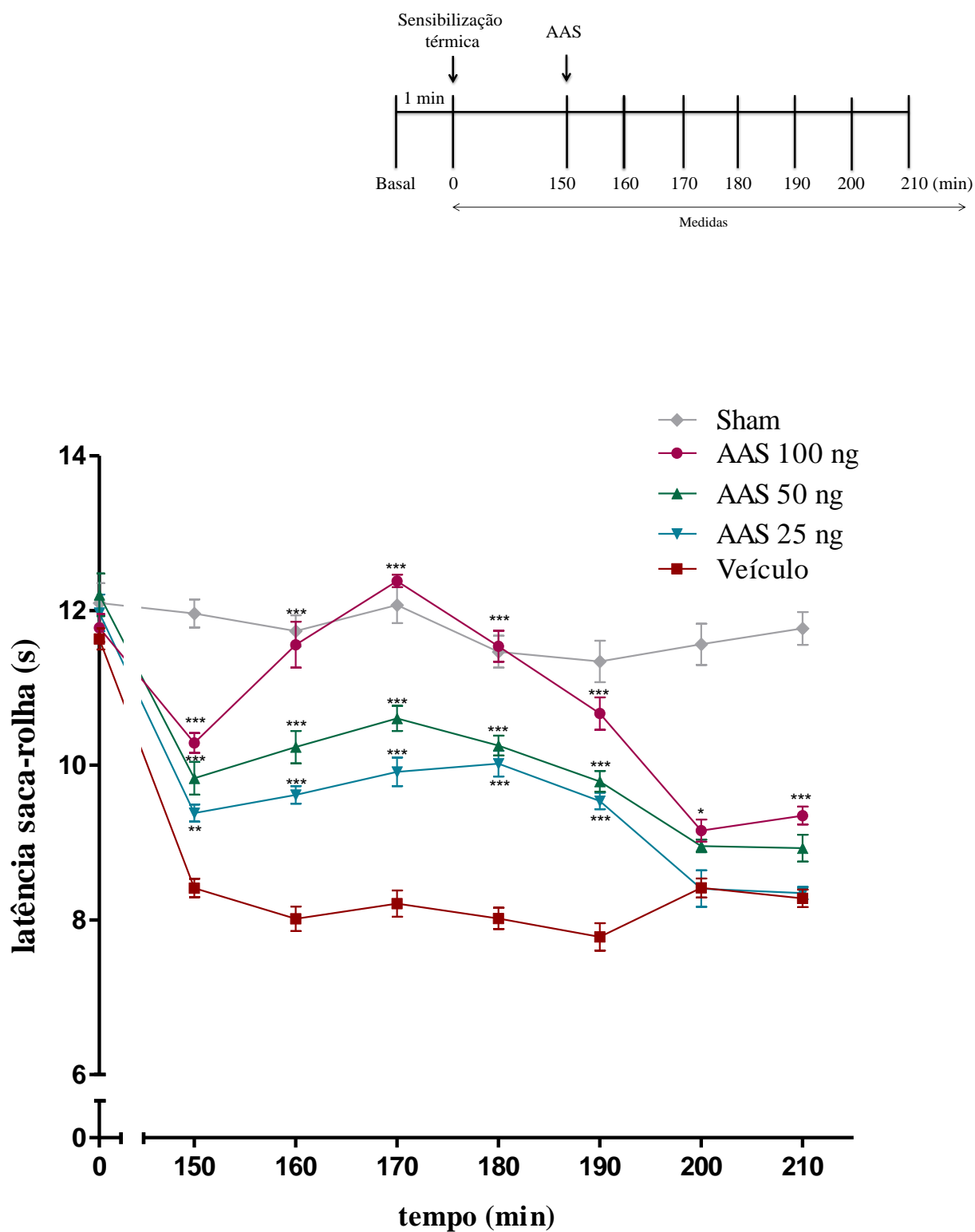


Figura 25. Antinociceção dose-dependente do AAS frente à sensibilização térmica induzida em larvas de *D. melanogaster*. Valores expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparando com veículo; Two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7$ por grupo. SHAM: larvas colocadas sobre o aparato por 32s sem exposição à radiação infravermelha. Veículo: hemolinfa artificial.

5.8. Avaliação da atividade antinociceptiva da dexametasona após sensibilização térmica induzida em larvas de *D. melanogaster*

As larvas de *D. melanogaster* expostas a condições de sensibilização térmica por radiação ultravioleta apresentam algumas proteínas semelhantes às presentes em mamíferos, tal como o homólogo do fator de necrose tumoral (TNF), Eiger (Babcock et al., 2009). A ação anti-inflamatória dos glicocorticoides está associada à regulação dos genes que codificam diversas proteínas envolvidas no processo inflamatório. Dessa forma, foi avaliado se as doses de 4, 8 e 16 ng de dexametasona, frente à sensibilização térmica, retomariam a latência de saca-rolha aos valores basais. As doses foram administradas 150 min após a sensibilização e apresentaram perfil dose dependente dentro do intervalo observado (150 a 240 min após a sensibilização térmica). A latência de saca-rolha foi avaliada de 10 em 10 min durante 90 min.

Após 10 min da administração, nos grupos tratados com as doses de 8 e 16 ng, observou-se que a sensibilização térmica foi revertida completamente, ou seja, a latência de saca-rolha retomou aos valores basais. Ambos os efeitos persistiram por 50 min, com pico de ação em 30 min. A dose de 4 ng teve ação após 20 min da sua administração, com pico em 40 min e duração total de 50 min (Figura 26).

Portanto, nas maiores doses (8 e 16 ng), o início do efeito e o pico de ação ocorreram antecipadamente quando comparados aos resultados da menor dose (4 ng). Não houve diferença no tempo de duração do efeito entre as doses investigadas. Devido ao fato dos picos terem sido observados mais rápidos do que o esperado, a antinocicepção foi considerada um efeito em curto prazo da dexametasona.

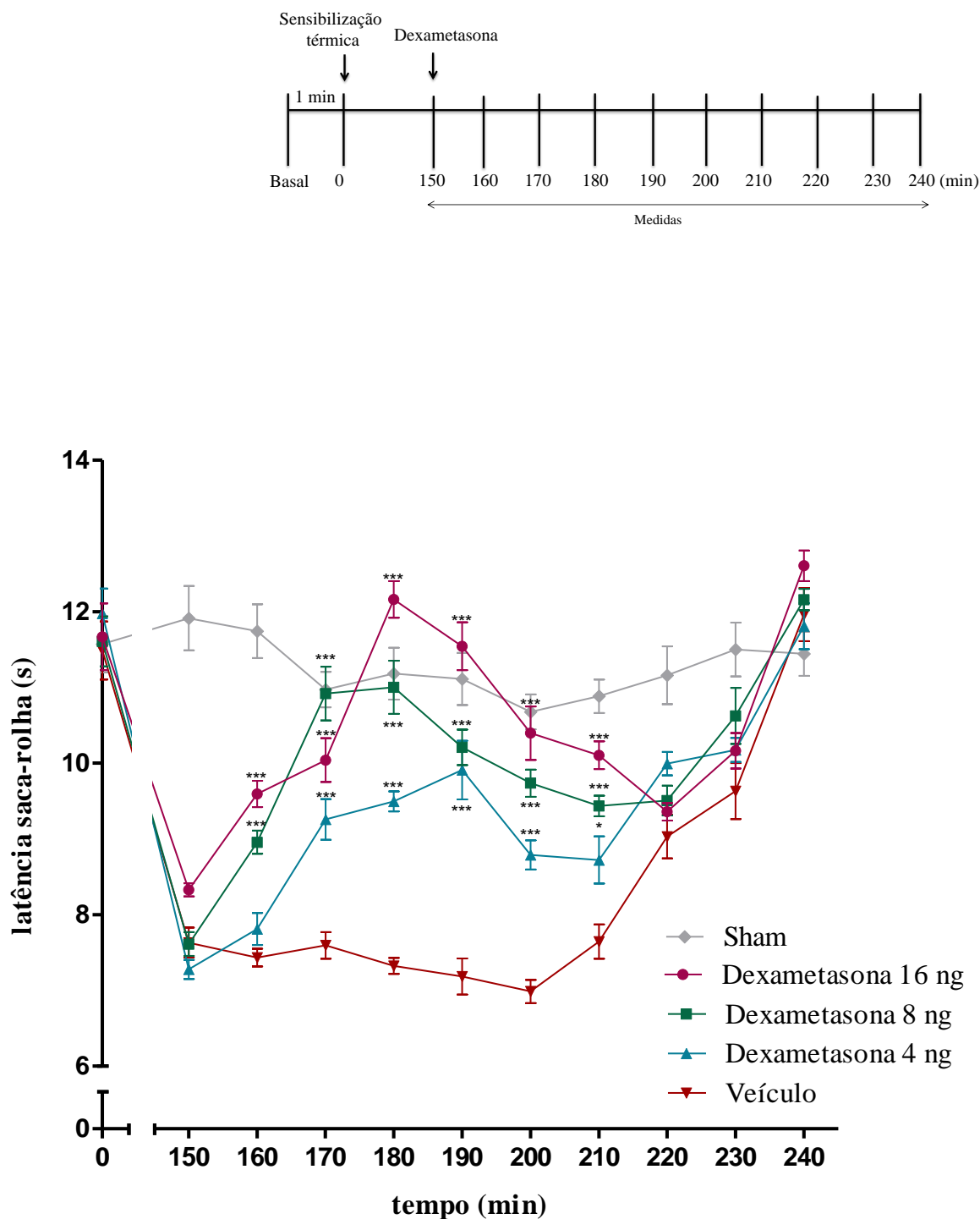


Figura 26. Antinociceção dose-dependente em curto prazo da dexametasona sobre a sensibilização térmica induzida em larvas de *D. melanogaster*. Valores expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparando com veículo; Two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7$ por grupo. SHAM: larvas colocadas sobre o aparato por 32s sem exposição à radiação infravermelha. Veículo: hemolinfa artificial.

O processo pelo qual os glicocorticoides regulam os genes envolvidos na inflamação acontece, classicamente, em varias etapas que demandam certo tempo. Sendo assim, foi investigado se o efeito em curto prazo (pico em 30 min), observado no protocolo anterior, poderia elevar a latência de saca-rolha, sem a exposição prévia a sensibilização. Para isso, foi realizado o teste de nocicepção térmica nas larvas com as doses crescentes de 4, 8 e 16 ng de dexametasona. A latência de saca-rolha foi avaliada nos tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 e 120 min após a administração.

As doses de 8 e 16 ng apresentaram efeito antinociceptivo 20 e 15 min após as administrações, respectivamente. Em ambos os grupos foi observado pico de ação após 30 min. A ação antinociceptiva em ambos os grupos tratados com dexametasona não foi mais observada após 60 min das administrações. A dose de 4 ng não teve efeito significativo estatisticamente quando comparado ao grupo veículo dentro de todo o intervalo de observação (0 a 120 min) (Figura 27).

Uma vez que nesse protocolo experimental não houve sensibilização térmica prévia, foi realizada a administração do AAS na dose de 100 ng, como controle negativo. O fármaco em questão é um AINE típico, ou seja, sem efeito antinociceptivo na ausência de estímulo inflamatório. Essa dose inibiu significativamente a sensibilização, conforme a Figura 25. Como esperado, a latência de saca-rolha avaliada nesse grupo não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo veículo dentro de todo o intervalo de observação (Figura 28).

Na tentativa de identificar o efeito em longo prazo da dexametasona, a dose de 16 ng foi administrada nas larvas e, em seguida, foi realizada a indução da sensibilização térmica. As medidas da latência de saca-rolha foram iniciadas 150 min após a sensibilização e foram realizadas de 10 em 10 min, durante 90 min. Logo na primeira medida, observou-se diferença estatística entre os valores de latência de saca-rolha do grupo tratado e grupo veículo. O efeito antinociceptivo pode ser notado durante 60 min, com pico de ação 190 min após a injeção do fármaco (Figura 29).

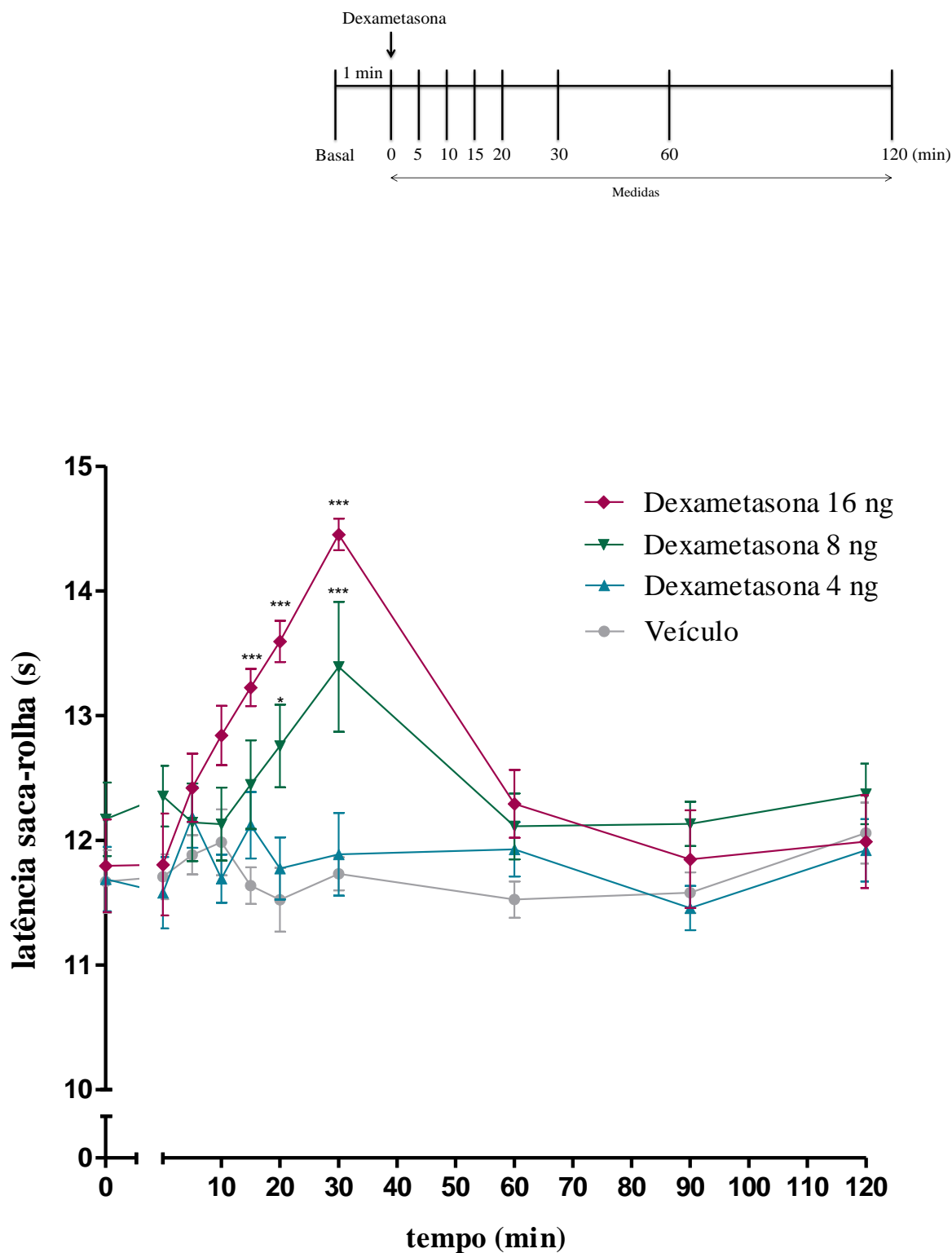


Figura 27. Efeito antinociceptivo dose-dependente da dexametasona em larvas de *D. melanogaster* no modelo de nociceção térmica por radiação infravermelha. Valores expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ comparando com veículo; Two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7$ por grupo. Veículo: hemolinfa artificial.

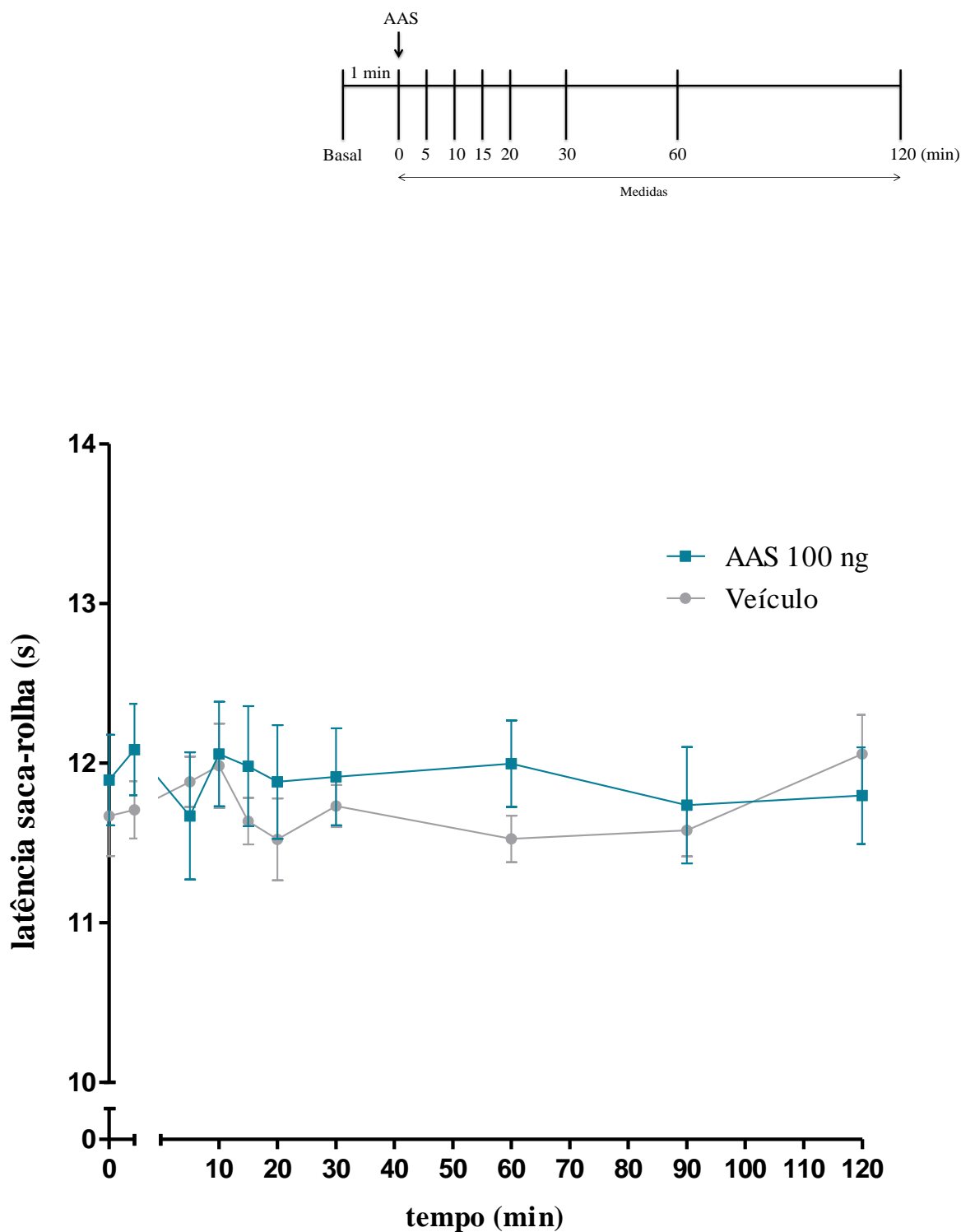


Figura 28. Perfil do fármaco AAS no modelo de nociceção térmica por radiação infravermelha em larvas de *D. melanogaster* não sensibilizadas. Valores expressos como média \pm E.P.M. Two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7$ por grupo. Veículo: hemolinfa artificial.

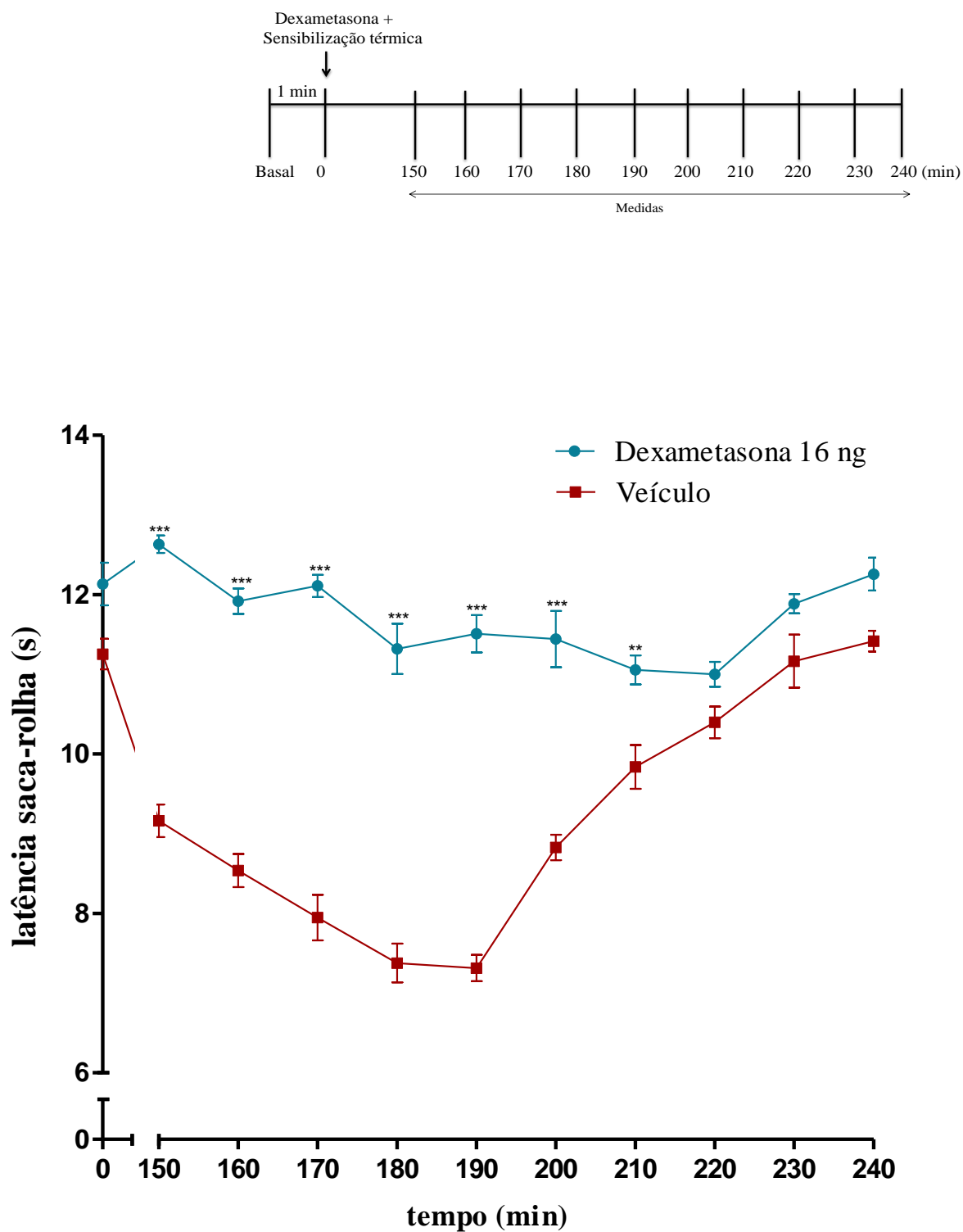


Figura 29. Antinociceção dose-dependente em longo prazo da dexametasona sobre a sensibilização térmica induzida em larvas de *D. melanogaster*. Valores expressos como média \pm EPM ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ comparando com veículo; Two-way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni; $n = 7$ por grupo). Veículo: hemolinfa artificial.

6. Discussão

O presente estudo demonstrou que as larvas de 3º estágio de *D. melanogaster* são susceptíveis a ação das substâncias analgésicas morfina, anandamida, dipirona e dexametasona frente à nociceção térmica por radiação infravermelha. Além disto, a sensibilização dos nociceptores induzida nas larvas através da exposição aguda à radiação infravermelha foi detectada pelo modelo proposto. A reversão da sensibilização após a administração do ácido acetilsalicílico e da dexametasona também foi visualizada. A análise do comportamento de escape das larvas iniciada pelo estímulo nociceptivo térmico abre perspectivas para a avaliação de fármacos analgésicos em modelos não murinos.

Embora o comportamento de escape, saca-rolha, possa ser induzido experimentalmente, esse foi primeiramente observado no ambiente natural do animal (Fleury et al., 2004). As larvas de *Drosophila* exibem essa resposta quando são atacadas por vespas parasitas, especialmente as da família Leptopilina. As vespas fêmeas depositam os seus ovos nas larvas de *Drosophila* através do seu ovopositor. Posteriormente, após se alimentarem da larva, um adulto eclode do pupário da *Drosophila*. No momento do ataque, as larvas de *Drosophila* se defendem movimentando a região anterior e/ou posterior ou exibem a resposta de saca-rolha desencadeada pela ativação somatosensorial (Robertson et al., 2013). A presença da vespa é identificada, inicialmente, por meio da ativação de neurônios cordotonais mecanosensoriais, devido à vibração emitida pela agitação de suas asas. No momento da deposição dos ovos, ocorre a ativação dos neurônios multidendríticos de classe IV (mdIV) através da alta pressão exercida sobre a cutícula da larva (Ohyama et al., 2015). A participação dos mdIV foi observada no estímulo mecânico pontual da vespa, entretanto, esses nociceptores são considerados como polimodais, uma vez que tanto a detecção do estímulo nocivo mecânico quanto térmico está presente (Tracey et al., 2003).

A confirmação da participação essencial desses neurônios na resposta de escape das larvas de *D. melanogaster* se deu através do método bioquímico Gal4/UAS, que possibilita a expressão de genes ou proteínas de interesse em células específicas, no caso, nos neurônios mdIV (Hwang et al., 2007). Gal4 é um fator de transcrição que ativa a transcrição de genes situados à jusante da sequência de ativação dos seus alvos, denominados de ativadores como por exemplo, o UAS. Gal4 e UAS não são encontrados nas *Drosophilas*, entretanto, podem ser expressas respectivamente à jusante e à montante de elementos regulatórios específicos da célula de interesse. Dessa forma, é possível a expressão do Gal4 apenas no tecido de escolha. A utilização do Gal4/UAS consiste no cruzamento de uma linhagem de *Drosophila*

expressando o Gal4 apenas na célula alvo com linhagens contendo o elemento UAS a montante do gene de expressão desejado. Após o cruzamento, a prole irá expressar a proteína em questão apenas na célula em que o Gal4 foi expresso (Duffy, 2002). Essa metodologia permite a ativação ou silenciamento dos mdIV através da expressão de genes ou proteínas específicas com essas finalidades.

Hwang e colaboradores (2007) silenciaram os mdIV das larvas de *D. melanogaster* através da expressão da cadeia leve da toxina tetânica. Essa toxina impede a liberação da vesícula sináptica através da clivagem da proteína sináptica vesicular, eliminando a exocitose dos neurotransmissores e, conseqüentemente, a transmissão sináptica neuronal dos mdIV (Sweeney et al., 1995). Ao se aplicar o estímulo mecânico pelo teste de Von Frey foi observado que a frequência da resposta de escape das larvas mutantes diminuiu para 20%, enquanto no grupo controle aproximadamente 90% das larvas responderam com o saca-rolha no primeiro segundo do estímulo. No mesmo estudo, foi aplicado o estímulo térmico pontual com 47°C nos segmentos A4, A5 ou A6 das larvas. O saca-rolha no grupo controle foi evidenciado em até 3 s após a estimulação. Nas larvas geneticamente modificadas, a latência da resposta foi comprometida, sendo essa observada na maioria das larvas após 10 s de aplicação do estímulo. Diversos estudos, utilizando estímulo térmico, mostram o envolvimento dos mdIV e de proteínas específicas na resposta comportamental nociceptiva das larvas de *D. melanogaster* (Chattopadhyay et al., 2012; revisto por Im & Galko, 2012; Oswald et al., 2011; Tracey et al., 2003)

O estímulo térmico pontual na larva dispara apenas um grupo específico de mdIV, os quais estariam em contato com a ponta aquecida. A latência de resposta das larvas é observada em aproximadamente 5 s com temperaturas variando de 48 a 52°C. Segundo Chattopadhyay e colaboradores (2012), essa metodologia possui algumas desvantagens em relação a variáveis induzidas pelo experimentador, como por exemplo, a pressão exercida, localização e angulo precisos durante a aplicação da ponta aquecida nas larvas.

Oswald e colaboradores (2011) aplicaram um estímulo térmico global nas larvas de *D. melanogaster*. As larvas foram imersas em uma gota de 30 µL de água em uma placa de Petri. A placa foi colocada sobre uma placa aquecedora com temperatura de corte de 70°C. Após aproximadamente 2 s, a larva movimentou a cabeça para ambos os lados e, em 5 s, quando a temperatura da gota estava entre 28°C e 29°C, foi observado o movimento de saca-rolha. Em um experimento semelhante, com a larva imersa em 80 µL de água, os mesmos

comportamentos foram observados quando a temperatura da gota atingiu 26,6°C (curvatura anterior e/ou posterior) e 28,7°C (saca-rolha). Com o aquecimento contínuo da gota, as larvas apresentavam movimento de chicote, tremores e paralisia (31,2°, 34,4° e 37,1°, respectivamente) (Chattopadhyay et al., 2012).

O presente trabalho também avaliou a nocicepção térmica em larvas de *D. melanogaster* através da aplicação do estímulo global. A metodologia foi baseada no ensaio amplamente utilizado em camundongos para avaliar a nocicepção térmica, o método de Hargreaves (revisto por Le Bars et al., 2001). Em roedores, o teste plantar se baseia na aplicação da radiação térmica de uma lâmpada de infravermelho na região plantar da pata traseira do animal, que elicitava o movimento de retirada da pata (Hargreaves et al., 1988). A fonte de estimulação nociva, calor radiante da lâmpada, constitui um estímulo relativamente seletivo para os nociceptores e tem uma vantagem sobre os outros modos de estimulação térmica, uma vez que não produz estímulo tátil (revisto por Le Bars et al., 2001). No aparato é possível ajustar o estímulo de infravermelho em relação à intensidade máxima da lâmpada, variando de 1 a 99% (Basile, 2013).

A modificação na metodologia, no presente trabalho, consistiu na aplicação do estímulo em larvas de terceira fase de *D. melanogaster* colocadas em 20 µL de água em uma placa de Petri e posteriormente posicionadas sobre a fonte de radiação infravermelha. Dessa forma, a larva ficou suspensa na gota, eliminando a estimulação tátil. Além disso, com essa metodologia, a energia emitida da lâmpada foi direcionada para a gota e para o corpo da larva, evitando a desvantagem observada na estimulação térmica local. As larvas eram mantidas em temperatura controlada de 25°C e a água utilizada para sua contenção na metodologia era mantida também na temperatura de 25°C, uma vez que a energia necessária para atingir o limiar nociceptivo depende da temperatura inicial da pele (Hardy, Goodell, & Wolff, 1951).

A partir desse método nociceptivo térmico modificado, foi conduzida a padronização da intensidade da radiação infravermelha nos valores de 85, 90, 95 e 99 % da potência máxima da lâmpada. As larvas exibiram a latência de saca-rolha em 12,6 s, 12,3 s, 11,7 s e 9,8 s, respectivamente. A intensidade de 95% foi escolhida para os demais procedimentos uma vez que possibilita a variação da latência de saca-rolha após a administração dos fármacos ou indução da sensibilização dos nociceptores (aumento ou diminuição da latência de saca-rolha). Além disso, a maior variação da latência de saca-rolha nas intensidades de 85 e 90% poderia dificultar a visualização do efeito antinociceptivo, uma vez que o tempo de corte do

aparato é de 32 s. Algumas larvas quando submetidas à intensidade de 99% não exibiram o comportamento estereotípico na sequência previamente descrita (balanço das regiões anterior e posterior, saca-rolha, chicote, tremor e paralisia). Essas iniciaram com movimentos de chicote e tremor, seguidos do movimento saca-rolha. Dessa forma, a intensidade de 99% não foi escolhida para os demais testes, uma vez que a visualização da resposta de escape poderia estar prejudicada pela alta intensidade da radiação. Além disso, a alta intensidade poderia danificar rapidamente os tecidos expostos (Buettner, 1951), não permitindo experimentos com repetições de medidas.

A radiação térmica transfere energia para o corpo em que ela está atingindo. No caso, a radiação da lâmpada de infravermelho é absorvida pelas moléculas de água, causando agitação dessas moléculas, logo, calor (Hardy et al., 1951). Essa cinética de movimentação das moléculas pode ser mensurada através da temperatura da água. Dessa forma, foi avaliado o incremento da temperatura da gota de 20 μ L de água nas intensidades de 85, 90, 95 e 99% durante 30 s. Na média da latência do saca-rolha para todas as intensidades, a temperatura da água se encontrava a aproximadamente 30°C, o que corrobora com os trabalhos em que a larva foi imersa na gota e estimulada termicamente a partir do método da placa quente (Chattopadhyay et al., 2012; Oswald et al., 2011)

Para a avaliação do efeito de fármacos sobre a *Drosophila*, uma possibilidade seria a adição ao meio em que as moscas são mantidas por períodos prolongados ou em soluções diluídas para exposições curtas. As concentrações adicionadas no meio, alimento, variam de 1 a 10 milimolar. Entretanto, as concentrações atingidas nas moscas, e, provavelmente, na larva, seriam bem menores (revisto por Pandey & Nichols, 2011). Assim, para definir as concentrações atingidas em moscas, é necessária a confirmação por cromatografia líquida ou espectrometria de massas (Kuklinski et al., 2010). Com o intuito de diminuir a variabilidade na dosagem entre as larvas, devido à quantidade de substância ingerida, optou-se pela injeção das substâncias via hemocele, conforme descrito por Bijelic e colaboradores (2005).

O hemocele das larvas é uma cavidade preenchida pelo fluido hemolinfa que banha os órgãos com oxigênio e nutrientes (revisto por Wyatt, 1961). A hemolinfa é composta por cátions e ânions, ácidos orgânicos, aminoácidos livres, proteínas e açúcares que mantêm a sua osmolaridade (Croghan & Lockwood, 1959). Considerando a complexidade da constituição e função da hemolinfa, foi necessária a preparação de uma solução artificial, a fim de reproduzir a hemolinfa, composta por sais inorgânicos, fosfatos, L-glutamina e glicose

(Bijelic et al., 2005). Essa foi utilizada como veículo dos fármacos e administrada em todas as larvas do grupo controle. Como esperado, a solução artificial não alterou a média da latência de saca-rolha nos grupos controles, confirmando que o efeito analgésico observado era devido à ação dos fármacos em estudo.

As soluções foram dispensadas no hemocele com o auxílio de uma seringa de 5 ml conectada a uma mangueira de polietileno e, finalmente, ao capilar de vidro. Após a injeção de pressão positiva, a solução era deslocada para dentro da larva. Durante esse procedimento, o pressionamento excessivo da seringa levava ao preenchimento da larva com bolhas de ar, o que por si só é considerado fator de erro pela presença de ar. Além disso, provavelmente a radiação infravermelha não é conduzida da mesma forma no líquido e ar. Portanto, as larvas com bolha de ar foram excluídas mesmo com a solução administrada, sendo isso considerado uma falha do método.

Inicialmente, observou-se o efeito analgésico da morfina no modelo proposto. A morfina é um opioide utilizado no tratamento da dor agindo através da interação com os receptores opioides μ , δ e κ , que estão presentes em nociceptores, medula espinhal e em algumas regiões do cérebro (Lipp, 1991). Os receptores opioides ativados acoplam-se a proteína G, que atua em diversas vias intracelulares, como a inibição da ação de segundos mensageiros e o aumento da hiperpolarização da membrana, impedindo a percepção da nocicepção pelo indivíduo (Singh et al., 1997). A morfina foi capaz de induzir o aumento da latência de saca-rolha das larvas de maneira dose-dependente. A antinocicepção observada na maior dose investigada (16 ng) atingiu 90% do efeito máximo possível e não retomou ao basal dentro do intervalo de observação (120 min).

A presença de peptídeos opioides semelhante aos dos mamíferos, como a β -endorfina e encefalina, no tecido nervoso das moscas *D. melanogaster*, levou a identificação de possíveis receptores opioides no animal por Santoro e colaboradores (1990). Através do ensaio de ligação em tecido de cabeça da mosca, foi observado que apenas os ligantes radioativos com estrutura alcaloide possuem alta afinidade de ligação para os receptores μ e κ opioides de forma seletiva. A adição da morfina no meio de crescimento das moscas alterou a pupação das larvas e reduziu significativamente a sobrevivência no estágio adulto. Esses achados indicaram a presença do sistema opioidérgico no invertebrado, com possível ação da morfina nos seus receptores. Em 1999, Birgül e colaboradores isolaram da *D. melanogaster* um novo receptor com semelhanças estruturais aos receptores de somatostatina, galanina e opioide dos

mamíferos. A partir de extratos da cabeça da mosca, purificou-se o seu ligante endógeno, um peptídeo da família da allostatina. Os receptores também foram descritos no estágio larval e de pupação, na cabeça e corpo da mosca.

O antagonista competitivo dos receptores opioides, naloxona, apresenta alta afinidade para o receptor μ -opioide, parcial para o δ -opioide, e baixa para o receptor κ , portanto, sendo considerado um antagonista não seletivo desses receptores (Wang et al., 2007). O envolvimento dos receptores opioides na antinociceção produzida pela morfina em larvas de *D. melanogaster* foi avaliado através do uso concomitante de naloxona e morfina. A administração de naloxona reverteu o efeito da maior dose de morfina, sendo esse efeito dose dependente. Como esperado, a naloxona administrada na ausência do agonista opioide não teve efeito nas larvas de *D. melanogaster*.

A participação do sistema endocanabinoide na antinociceção em modelos murinos tem sido descrita em diversos modelos de dor, como inflamatória e neuropática (revisto por Guindon & Hohmann, 2008). Os receptores canabinoides (CB_1 e CB_2) e os seus ligantes endógenos, como a N-aracdonoil-etanolamina (anandamida - AEA) e 2-araquidonoilglicerol (2-AG), estão distribuídos ao longo do sistema nervoso periférico e central dos mamíferos (revisto por Pertwee, 2001). A ativação dos receptores por meio dos endocanabinoides ou de agonistas exógenos induz o acoplamento do receptor à proteína G inibitória. Além disso, é possível modular o processamento da dor através da atividade de canais iônicos, como por exemplo, dos canais de potencial transiente e canais para potássio (revisto por Guindon & Hohmann, 2008).

AEA é um neurotransmissor de ácido graxo de cadeia longa, sendo a primeira amida dessa classe identificada nos cérebros de mamíferos (revisto por Pertwee, 2001). A quantificação de AEA na cabeça e tórax de *D. melanogaster* através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas confirmou a sua presença em ambas as regiões (100 ± 97 pmol.g⁻¹ e 19 ± 11 pmol.g⁻¹, respectivamente) (Jeffries et al., 2013). No presente estudo, a administração de AEA nas larvas de *D. melanogaster* apresentou antinociceção dose-dependente frente ao estímulo térmico de radiação infravermelha. Até o presente estudo, não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando AEA em *Drosophila*. Entretanto, a administração oral em moscas do CP55940, um agonista sintético dos canabinoides derivados da planta *Cannabis sativa*, prolongou a sobrevivência e a atividade locomotora das moscas

quando essas estavam intoxicadas com o Paraquat[®], sendo um mecanismo independente dos receptores CB₁ e CB₂ (Jimenez-Del-Rio et al., 2008).

Embora substâncias agonistas de receptores canabinoides apresentem efeitos em larvas e mosca *D. melanogaster*, a análise do genoma da mosca demonstrou que essa não contém ortólogos de CB₁ ou CB₂ (revisito por Elphick & Egertová, 2001). McPartland e colaboradores (2001) confirmaram a ausência dos receptores através de ensaios de ligação utilizando o agonista CP55940 e o antagonista para CB₁, SR141716A. Entretanto, Howlett e colaboradores (2000) observaram ligação específica do agonista nas *D. melanogaster*, que não foi deslocada pelos antagonistas específicos de CB₁ ou CB₂, SR141716A e SR144528, respectivamente. Dados da literatura corroboram com o nosso estudo, uma vez que o efeito antinociceptivo da anandamida na dose máxima investigada, não foi revertido pelo antagonista do receptor CB₁ ou CB₂, AM251 ou AM630 nas doses de 80 e 100 ng, respectivamente. A visualização do efeito inibitório dessas substâncias pode ter sido prejudicada uma vez que a solução com os antagonistas em hemolinfa artificial estava saturada. Os cristais presentes na solução ficaram retidos no capilar de vidro durante a injeção. Dessa forma, optou-se por não aumentar a dose do AM251 e AM630. A utilização da hemolinfa artificial preconizada no estudo interferiu na solubilização de alguns fármacos, sendo essa considerada uma limitação do método.

A ação da AEA na *Drosophila* pode ser mais complexa do que a esperada, uma vez que em mamíferos esse canabinoide modula diversos canais iônicos, tais como os receptores ionotrópicos de acetilcolina, canais para Ca²⁺ do tipo T, canais para K⁺ e receptor de potencial transiente vaniloide do tipo 1 (TRPV1) (Van Der Stelt & Di Marzo, 2005). O TRPV1 é um canal catiônico ativado por temperaturas elevadas que variam de 42 a 48°C. No genoma das larvas de *Drosophila*, foram identificados dois membros da família desses canais, o dTrpA1 e o *painless* (Rosenzweig et al., 2005; Tracey et al., 2003). Esses canais apresentam funções diferentes na larva, sendo o primeiro para regulação da termotaxia e o segundo relacionada à nocicepção em elevadas temperaturas (Rosenzweig et al., 2005). O gene *painless* recebeu esse nome devido ao fato de que a larva com deleção para o gene em questão não responde ao estímulo térmico local (Tracey et al., 2003). Quando as regiões dos genes que codificam os receptores dTrpA1 e *painless* na *Drosophila* foram utilizadas para fins de comparação, o homólogo de vertebrado mais próximo encontrado foi o gene humano para o receptor de

potencial transiente anquirina tipo 1 (TRPA1) e não aquele que codificaria o TRPV1 (Rosenzweig et al., 2005; Tracey et al., 2003).

A dipirona é um analgésico também utilizado como antipirético, sendo comum no uso humano ou veterinário (revisto por Jasiocka et al., 2014). O seu mecanismo de ação em mamíferos parece estar envolvido com a diminuição da produção de prostaglandinas a nível central e espinhal, através de inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX) e como resultado da diminuição dos mediadores inflamatórios, os nociceptores não seriam sensibilizados, proporcionando o efeito analgésico (Chandrasekharan et al., 2002). Embora seja um inibidor da COX, esse fármaco não pertence a classe dos anti-inflamatórios não esteroidais típicos, sendo classificado como um analgésico não opioide (Jasiocka et al., 2014). Acredita-se que a dipirona produza metabólitos de aracdonoilamidas, que apresentam afinidade para receptores canabinoides recombinantes de humanos (Rogosch et al., 2012). No modelo de nocicepção inflamatória por carragenina, a dipirona atua via endocanabinoides na substância cinzenta periaquedutal e na medula rostral ventromedial, diminuindo a atividade dos neurônios nociceptivos (Escobar et al., 2012). Nas larvas de *D. melanogaster*, a administração da dipirona também teve efeito antinociceptivo dose-dependente durante o estímulo nociceptivo térmico por radiação infravermelha. A antinocicepção observada abre perspectivas para a investigação do mecanismo de ação da dipirona, uma vez que esse animal pode ser facilmente manipulado geneticamente e utilizado em conjunto com ferramentas farmacológicas.

Os resultados até aqui descritos indicam que os fármacos analgésicos clássicos que atuam em mamíferos produzem efeitos semelhantes nas larvas de *D. melanogaster*. Esse efeito, associado à presença de alguns receptores semelhantes aos dos mamíferos, sugere que alguns mecanismos nociceptivos possam também estar presentes nas *Drosophilas* (revisto por Im & Galko, 2012). Dessa forma, foi investigado se a sensibilização dos nociceptores poderia ser induzida pela radiação infravermelha e detectada pelo método. A sensibilização periférica é caracterizada pelo incremento de responsividade do nociceptor, desencadeada por um limiar de disparo abaixo do normal, ou seja, ocorre uma redução do limiar de estimulação dos nociceptores periféricos gerando uma intensificação da reação aos estímulos nocivos (Bessou & Perl, 1969). A sensibilização dos nociceptores pode ser devido a uma lesão mecânica, química ou térmica nos tecidos periféricos. Na sensibilização térmica, considera-se a situação em que o tecido foi lesado ou danificado devido a uma queimadura, como por exemplo, na exposição prolongada ao sol (Meyer & Campbell, 1981). A sensibilização é dividida em dois

tipos que se diferem em relação à intensidade do estímulo aplicado: (i) alodínia, em que as respostas nociceptivas são observadas na presença de um estímulo que antes não causaria dor; (ii) hiperalgesia, em que a responsividade a estímulos normalmente nocivos é observada de forma intensificada (revisto por Gold & Gebhart, 2010).

No presente trabalho, a sensibilização dos nociceptores das larvas foi induzida através da sua exposição aguda ao estímulo térmico por radiação infravermelha. As larvas foram submetidas a diferentes intensidades da potência máxima da lâmpada de infravermelho (95, 97 e 99) durante 32 s. Em seguida, a latência de saca-rolha foi medida em relação ao estímulo térmico a 95%, em diferentes intervalos de tempo. O protocolo induziu a sensibilização dos nociceptores em todas as intensidades testadas com picos na sétima, terceira e segunda hora, respectivamente. A antecipação da condição do animal pode ser observada pelo deslocamento do pico de sensibilização da curva para a esquerda.

Antes da exposição aguda à radiação infravermelha, a média da latência de saca-rolha aconteceu quando a temperatura da gota de água atingiu aproximadamente 30°C. No entanto, os picos de sensibilização aconteceram em 28,4°C, sendo independente da intensidade utilizada. Portanto, o estímulo de 28,4°C não desencadeava a resposta nociceptiva antes da exposição à radiação infravermelha, mas após a lesão foi tão capaz quanto o estímulo de 30°C antes da lesão. Considerando todas essas características observadas, a sensibilização dos nociceptores das larvas de 3ª estágio de *D. melanogaster* levaria a alodínia térmica.

Babcock e colaboradores (2009) foram os primeiros a identificar a sensibilização dos nociceptores das larvas de 3º estágio de *D. melanogaster*. A sensibilização se deu através da exposição aguda à radiação ionizante de ultravioleta (UV), mimética a queimadura solar. A lesão causada nas células da epiderme da larva sensibilizou os nociceptores. Logo, ocorreu o aumento da magnitude da resposta de escape e redução do limiar nociceptivo frente ao estímulo nocivo térmico local. A exposição ao UV desenvolveu nas larvas hiperalgesia térmica, ou seja, foi observada uma maior porcentagem de larvas respondendo a temperaturas que antes já eram nocivas. Além disso, foi observada alodínia térmica em larvas tratadas com UV, uma vez que essas passaram a perceber como nocivos estímulos térmicos subliminares. No mesmo estudo, os autores demonstraram que a alodínia térmica é dependente de um homólogo do fator de necrose tumoral (TNF), Eiger, que é liberado de células epidérmicas apoptóticas, e age no seu receptor TNF, Wengen, expresso em neurônios mdIV.

A lesão causada por estímulo térmico sensibiliza os nociceptores através de mediadores provenientes de diversas células, como por exemplo, as células da imunidade inata. Diversos mediadores inflamatórios como as prostaglandinas são liberados no local e desempenham um papel importante durante os processos inflamatórios e, conseqüentemente, na sensibilização dos nociceptores e hiperalgesia primária (revisito por Gold & Gebhart, 2010). As prostaglandinas são derivadas do ácido araquidônico, pertencente à classe dos eicosanoides e atuam como vasodilatadores, inibidores da agregação plaquetária e estão envolvidas na patogenia da dor e da febre. As prostaglandinas são sintetizadas pela enzima constitutiva ciclo-oxigenase 1 (COX1) ou pela enzima indutiva ciclo-oxigenase 2 (COX2), a qual é responsável pela síntese de prostaglandinas nos estados inflamatórios. Os eicosanoides aumentam a resposta à dor frente ao estímulo nocivo ou inócuo por reduzirem o limiar de disparo. Além disso, aumentam a excitabilidade dos nociceptores, mas não os ativam diretamente (Ferreira, 1972).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são amplamente utilizados no tratamento da dor inflamatória e da hiperalgesia (Patrono & Rocca, 2009). O ácido acetilsalicílico (AAS), comercializado como aspirina[®], é um AINE que atua inibindo irreversivelmente a enzima COX por adicionarem um grupo acetil em um resíduo de aminoácido específico no sítio ativo da enzima. Esta acetilação resulta na diminuição da biossíntese de prostaglandinas no sítio inflamatório, ocasionando a analgesia e efeito anti-inflamatório (Roth & Majerus, 1975).

Com o intuito de investigar se a sensibilização térmica observada nas larvas foi devido ao processo inflamatório local, foram administradas nas larvas sensibilizadas doses crescentes de AAS. O fármaco apresentou efeito antinociceptivo dose-dependente na condição de hipersensibilidade tecidual das larvas, portanto, o modelo também foi capaz de detectar a ação do AAS. Entretanto, foi observado que o efeito do AAS é atenuado com o tempo, ou seja, a inibição da sensibilização é reduzida e não persistiu ao longo do intervalo de observação após o seu pico de ação. Uma vez que o fármaco inibe irreversivelmente a COX, acredita-se que outros mediadores inflamatórios possam estar presentes no decorrer do desenvolvimento dessa condição.

Os AINEs não apresentam efeito em limiares nociceptivos normais, ou seja, com a ação apenas nas respostas de nocicepção associadas a condições inflamatórias. Como esperado, ao administrar o AAS nas larvas que não foram expostas ao protocolo de

sensibilização dos nociceptores, a latência de saca-rolha nesse grupo não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo veículo dentro de todo o intervalo de observação.

Em 1986, Pagés e colaboradores determinaram a existência da atividade enzimática tipo COX em moscas *D. melanogaster*. Após a incubação de extratos de moscas com ácido araquidônico, os extratos apresentaram imunorreativos para prostaglandina E2 endógena, identificada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Esses resultados sugerem a presença de uma enzima semelhante a COX nas moscas. Atualmente, o candidato ao homólogo da COX em *Drosophilas* é o Pxt (semelhante à peroxinictina), que possui resíduos catalíticos e de atividade proteásica conservados da COX. Entretanto, o resíduo onde o AAS acetila a COX em mamíferos não está claramente conservado (Tootle & Spradling, 2008).

Os fármacos anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) ou corticosteroides são análogos sintéticos dos glicocorticoides (revisto por Smoak & Cidlowski, 2004). Os efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticoides foram descritos em 1940 por Philip Hench, Edward Kendall e Tadeus Reichstein. Sabe-se que os glicocorticoides exógenos inibem o rubor, calor, edema, reações proliferativas, tais manifestações típicas de reações inflamatórias causadas por lesões químicas ou físicas e por patógenos (revisto por Jiang et al., 2015). As ações dos glicocorticoides acontecem através da ligação aos seus receptores específicos. O mecanismo mais conhecido se dá pela entrada dos fármacos (G) através da membrana celular, ligação aos seus receptores (R) situados no citosol formando um complexo (GR). Em seguida, os GRs são translocados para o núcleo e ativam ou inibem eventos transducionais importantes ao se ligarem aos elementos de resposta aos glicocorticoides (ERGs) na sequência de DNA (revisto por Smoak & Cidlowski, 2004).

Diversos receptores órfãos da superfamília dos esteroides foram identificados em *Drosophilas*, sendo o principal o receptor de ecdisona. Atualmente, não existem estudos do papel desses receptores no processo inflamatório nas *Drosophilas*. Sabe-se que estão envolvidos nos processos de diferenciação celular do animal, bem como no desenvolvimento embrionário e larval. O seu ligante endógeno, a ecdisona, regula a muda e metamorfose das larvas e pupas de *D. melanogaster* (Carney & Bender, 2000).

No caso da condição inflamatória em mamíferos, o fator mais importante a ser bloqueado pelo complexo GR é o fator nuclear kappa B (NFκB). No processo inflamatório, o NFκB é ativado por lipopolissacarídeos ou por citocinas. Em consequência, há o aumento da

produção de ciclooxigenase (COX), de algumas interleucinas, TNF, interferon γ , entre outras responsáveis pela resposta inflamatória. Os genes que regulam produtos com papel na resolução da inflamação também são ativados pelos GRs. O principal é lipocortina, também conhecida como anexina 1, que inibe a fosfolipase A, que sintetiza o ácido araquidônico, precursor das prostaglandinas (revisto por Smoak & Cidlowski, 2004). Duas novas anexinas com possível modulação celular foram caracterizadas na *D. melanogaster*. No entanto, as propriedades bioquímicas ainda não foram elucidadas (Johnston et al., 1990).

Os AIEs também exercem seus efeitos através de mecanismos rápidos, não genômicos, que envolvem interações mediadas por receptores glicocorticoides ligados à membrana celular (revisto por Stahn & Buttgerit, 2008). Os AIEs também podem diminuir a degranulação dos neutrófilos, independentemente dos receptores glicocorticoides (Liu et al., 2005). Algumas evidências mostram que os receptores de glicocorticoides não estão presentes apenas nas células imunes ou ativando células da glia, mas também estão expressos nas membranas celulares de fibras nervosas e corpos neuronais nociceptivos e são alvos potenciais para o controle da dor inflamatória induzida por formalina em camundongos (Shaqura et al., 2016).

No presente estudo, a administração da dexametasona, um típico glicocorticoide, em larvas de 3º estágio *D. melanogaster* sensibilizadas teve efeito antinociceptivo com pico de ação 20 min após a administração do fármaco. No entanto, o processo pelo qual os glicocorticoides regulam os genes envolvidos na inflamação acontece, classicamente, em varias etapas que demandam certo tempo (revisto por Jiang et al., 2015). Sendo assim, foi investigado se o efeito com pico em 30 min, observado no protocolo, poderia elevar a latência de saca-rolha, sem a exposição prévia a sensibilização térmica. As doses investigadas apresentaram efeito antinociceptivo 15 ou 20 min após as administrações, sendo assim, um efeito em curto prazo da dexametasona. Na tentativa de identificar o efeito anti-inflamatório clássico da dexametasona, a dose de 16 ng foi administrada nas larvas e, em seguida, foi realizado a sensibilização térmica. O efeito antinociceptivo pode ser notado por 60 min, com pico de ação 150 min após a injeção do fármaco, caracterizando um efeito em longo prazo da dexametasona.

A literatura apresenta a possibilidade de outros grupos farmacológicos serem ativos frente à ação analgésica detectada em modelo de *D. melanogaster*. O agonista dos receptores metabotrópicos GABA_B, 3-AMPA, mostrou efeito antinociceptivo frente ao estímulo nocivo

térmica aplicado no animal. As moscas em estudo eram colocadas frente a um túnel aquecido a 42°C. Enquanto que 30% das moscas do grupo controle passaram pelo túnel a 42°C, o tratamento com 2 pico molar (pmol) do agonista aumentou essa porcentagem para 60% (Dzitoyeva et al., 2003).

De fato, as substâncias ativas como analgésicos em mamíferos produzem efeitos semelhantes em moscas e larvas de 3ª estágio *D. melanogaster* quando essas são expostas a estímulos nocivos. A caracterização da resposta comportamental de escape, a modulação da nocicepção e o efeito dos analgésicos sugerem que o animal possa ser usado na pesquisa farmacológica da dor e no campo da biologia nociceptiva. Embora existam diferenças entre as proteínas de *Drosophila* com as de mamíferos, as vantagens de usar *Drosophila* incluem a fácil manipulação genética que pode ser aplicada em conjunto com ferramentas farmacológicas e a possibilidade de efetuar uma varredura de novas substâncias para, posteriormente, serem utilizadas em mamíferos. Além disso, a inserção da *Drosophila* em pesquisas experimentais fisiológicas e farmacológicas da dor possivelmente reduzirá a necessidade de experimentação nociceptiva em mamíferos, como um dos pilares do princípio ético em experimentação animal.

7. Referências Bibliográficas

- Adams, M. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287, 1507–1516.
- Babcock, D. T., Landry, C., & Galko, M. J. (2009). Cytokine Signaling Mediates UV-Induced Nociceptive Sensitization in *Drosophila* Larvae. *Current Biology*, 19(10), 799–806.
- Basile, U. (2013). *Instruction Manual - Plantar Test (Hargreaves Apparatus)*.
- Bessou, P., & Perl, E. R. (1969). Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *Journal of Neurophysiology*, 32(6), 1025–1043.
- Bijelic, G., Kim, N. R., & O'Donnell, M. J. (2005). Effects of dietary or injected organic cations on larval *Drosophila melanogaster*: Mortality and elimination of tetraethylammonium from the hemolymph. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 60(2), 93–103.
- Birgül, N., Weise, C., Kreienkamp, H. J., & Richter, D. (1999). Reverse physiology in *Drosophila*: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin / galanin / opioid receptor family. *The EMBO Journal*, 18(21), 5892–5900.
- Buettner, K. (1951). Effects of extreme heat and cold on human skin. II. Surface temperature, pain and heat conductivity in experiments with radiant heat. *Journal of Applied Physiology*, 3(12), 703–713.
- Burgos, A., Honjo, K., Ohyama, T., Qian, C. S., Shin, G. J., Gohl, D. M., ... Grueber, W. B. (2018). Nociceptive interneurons control modular motor pathways to promote escape behavior in *Drosophila*. *ELife*, 7, e26016.
- Carney, G. E., & Bender, M. (2000). The *Drosophila* ecdysone receptor (EcR) Gene Is Required Maternally for Normal Oogenesis. *Genetics*, 154, 1203–1211.
- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., & Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13926–13931.
- Chapman, C. R. (2003). Pain perception and assessment. *Minerva Anesthesiology*, 71, 413 - 417.
- Chattopadhyay, A., Gilstrap, A. V., & Galko, M. J. (2012). Local and Global Methods of Assessing Thermal Nociception in *Drosophila* Larvae. *Journal of Visualized Experiments*, (63), 1–10.
- Chen, J. (2011). History of pain theories. *Neuroscience Bulletin*, 27(5), 343–350.

- Clark, M. Q., Zarin, A. A., Carreira-Rosario, A., & Doe, C. Q. (2018). Neural circuits driving larval locomotion in *Drosophila*. *Neural Development*, *13*(1), 1–10.
- Costigan, M., Scholz, J., & Woolf, C. J. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual Review of Neuroscience*, *(32)*, 1–32.
- Croghan, B. Y. P. C., & Lockwood, A. P. M. (1959). The composition of the haemolymph of the larva of *Drosophila melanogaster*. *Haemolymph of the Larva of Drosophila Melanogaster*, 339–343.
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*, *34*(1–2), 1–15.
- Dzitoyeva, S., Dimitrijevic, N., & Manev, H. (2003). Aminobutyric acid B receptor 1 mediates behavior-impairing actions of alcohol in *Drosophila*: Adult RNA interference and pharmacological evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(9), 5485–5490.
- Escobar, W., Ramirez, K., Avila, C., Limongi, R., Vanegas, H., Vazques, E. (2012). Metamizol, a non-opioid analgesic, acts via endocannabinoids in the PAG-RVM axis during inflammation in rats. *European Journal of Pain*, *16*(5), 676–689.
- Elphick, M. R., & Egertová, M. (2001). The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *356*(1407), 381–408.
- Elwood, R. W. (2011). Pain and suffering in Invertebrates. *ILAR*, *52*(2), 175–184.
- Ferreira, S. (1972). Prostaglandins, Aspirin-like Drugs and Analgesia. *Nature*, *240*(102), 200–203.
- Flagg, R. O. (1979). *Carolina Drosophila Manual*. Carolina Biological Supply Company.
- Fleury, F., Ris, N., Allemand, R., Fouillet, P., Carton, Y., & Boulétreau, M. (2004). Ecological and genetic interactions in *Drosophila*-parasitoids communities: A case study with *D. melanogaster*, *D. simulans* and their common *Leptopilina* parasitoids in south-eastern France. *Genetica*, *120*(1–3), 181–194.
- Gold, M. S., & Gebhart, G. F. (2010). Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature Medicine*, *16*(11), 1248–1257.
- Grueber, W. B., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2002). Tiling of the *Drosophila* epidermis by multidendritic sensory neurons. *Development (Cambridge, England)*, *129*(12), 2867–2878.
- Grueber, W. B., Ye, B., Yang, C.-H., Younger, S., Borden, K., Jan, L. Y., & Jan, Y.-N. (2007).

- Projections of *Drosophila* multidendritic neurons in the central nervous system: links with peripheral dendrite morphology. *Development*, *134*(1), 55–64.
- Guindon, J., & Hohmann, A. G. (2008). Cannabinoid CB 2 receptors : a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *British Journal of Pharmacology*, *153*, 319–334.
- Hardy, J. D., Goodell, H., & Wolff, H. G. (1951). The Influence of Skin Temperature upon the Pain Threshold as Evoked by Thermal Radiation1. *Science*, *114*(1946), 591–601.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., & Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception. *Pain*, *32*, 77–88.
- Hwang, R. Y., Zhong, L., Xu, Y., Johnson, T., Zhang, F., & Tracey, W. D. (2007). Nociceptive neurons protect *Drosophila* larvae from parasitoid wasps. *Current Biology*, *17*(24), 2105–2116.
- IASP. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms prepared by the International Association for the Study of Pain. 2nd ed. Seattle: IASP Press. (1994). Disponível em <http://www.iasp-pain.org/terminology?navItemNumber=576>. Acesso em 17 de outubro de 2018.
- Im, S. H., & Galko, M. J. (2012). Pokes, Sunburn, and Hot Sauce: *Drosophila* as an Emerging Model for the Biology of Nociception. *Developmental Dynamics*, *241*(1), 16–26.
- Jasiecka, A., Mašlanka, T., & Jaroszewski, J. J. (2014). Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *17*(1), 207–214.
- Jeffries, K. A., Dempsey, D. R., Behari, A. L., Anderson, R. L., & J.Merkler, D. (2013). Long-chain, *Drosophila melanogaster* as a model system to study metabolism, fatty acid amide. *FEBS Letters*, *6*(8), 1596–1602.
- Jiang, C., Liu, L., Li, Z., & Buttgerit, F. (2015). The novel strategy of glucocorticoid drug development via targeting nongenomic mechanisms. *Steroids*, *102*, 27–31.
- Jimenez-Del-Rio, M., Daza-Restrepo, A., & Velez-Pardo, C. (2008). The cannabinoid CP55,940 prolongs survival and improves locomotor activity in *Drosophila melanogaster* against paraquat: Implications in Parkinson's disease. *Neuroscience Research*, *61*(4), 404–411.
- Johnston, P. A., Q, T. C. S., & Reynoldsli, A. (1990). Two Novel Annexins from *Drosophila*. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(19), 11382–11388.
- Kohsaka, H., Guertin, P. A., & Nose, A. (2017). Neural Circuits Underlying Fly Larval Locomotion.

- Current Pharmaceutical Design*, 23(12), 1722–1733.
- Kohsaka, H., Takasu, E., Morimoto, T., & Nose, A. (2014). A group of segmental premotor interneurons regulates the speed of axial locomotion in drosophila larvae. *Current Biology*, 24(22), 2632–2642.
- Kuklinski, N. J., Berglund, E. C., & Ewing, A. G. (2010). Micellar capillary electrophoresis - Electrochemical detection of neurochemicals from Drosophila. *Journal of Separation Science*, 33(3), 388–393.
- Le Bars, D., Gozariu, M., & Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, 53(4), 597–652.
- Lipp, J. (1991). Possible Mechanisms of Morphine Analgesia. *Clinical Neuropharmacology*, 14(2), 131–147.
- Liu, L., Wang, Y. X., Zhou, J., Long, F., Sun, H. W., Liu, Y., ... Jiang, C. L. (2005). Rapid non-genomic inhibitory effects of glucocorticoids on human neutrophil degranulation. *Inflammation Research*, 54, 37–41.
- McPartland, J., Marzo, V. Di, De Petrocellis, L., Mercer, A., & Glass, M. (2001). Cannabinoid receptors are absent in insects. *Journal of Comparative Neurology*, 436(4), 423–429.
- Meyer, R., & Campbell, J. (1981). Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. *Science*, 213(September), 1527–1529.
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: An integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1), 1–164.
- Moayed, M., & Davis, K. D. (2013). Theories of pain: from specificity to gate control. *Journal of Neurophysiology*, 109(1), 5–12.
- Ohyama, T., Schneider-Mizell, C. M., Fetter, R. D., Aleman, J. V., Franconville, R., Rivera-Alba, M., ... Zlatic, M. (2015). A multilevel multimodal circuit enhances action selection in Drosophila. *Nature*, 520(7549), 633–639.
- Orgogozo, V., & Grueber, W. B. (2005). FlyPNS, a database of the Drosophila embryonic and larval peripheral nervous system. *BMC Developmental Biology*, 5, 2–7.
- Oswald, M., Rymarczyk, B., Chatters, A., & Sweeney, S. T. (2011). A novel thermosensitive escape behavior in drosophila larvae. *Fly*, 5(4), 304–306.

- Pagés, M., Roselló, J., Casa, J., Gelpí, E., Gualde, N., & Rigaud, M. (1986). Cyclooxygenase and lipoxygenase-like activity in *Drosophila melanogaster*. *Prostaglandins*, *32*(5), 729–740.
- Pandey, U. B., & Nichols, C. D. (2011). Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Drug Delivery*, *63*(2), 411–436.
- Patrono, C., & Rocca, B. (2009). Nonsteroidal antiinflammatory drugs: past, present and future, *59*, 285–289. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.01.011>
- Pertwee, R. G. (2001). Cannabinoid receptors and pain. *Progress in Neurobiology*, *63*, 569–611.
- Picao-Osorio, J., Johnston, J., Landgraf, M., Berni, J., & Alonso, C. R. (2015). MicroRNA-encoded behavior in *Drosophila*. *Scienceexpress*, *11*(5), 329–338.
- Robertson, J. L., Tsubouchi, A., & Tracey, W. D. (2013). Larval Defense against Attack from Parasitoid Wasps Requires Nociceptive Neurons. *PLoS ONE*, *8*(10), 1–9.
- Rogosch, T., Sinning, C., Podlewski, A., Watzer, B., Schlosburg, J., Lichtman, A. H., ... Imming, P. (2012). Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol). *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *20*(1), 101–107.
- Rose, J. D., Arlinghaus, R., Cooke, S. J., Diggles, B. K., Sawynok, W., Stevens, E. D., & Wynne, C. D. L. (2014). Can fish really feel pain? *Fish and Fisheries*, *15*(1), 97–133.
- Rosenzweig, M., Brennan, K. M., Tayler, T. D., Phelps, P. O., Patapoutian, A., & Garrity, P. A. (2005). The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis. *Genes and Development*, *19*(4), 419–424.
- Roth, G. J., & Majerus, P. W. (1975). The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *Journal of Clinical Investigation*, *56*(3), 624–632.
- Santoro, C., Hall, L. M., & Zukin, R. S. (1990). Characterization of Two Classes of Opioid Binding Sites in *Drosophila melanogaster* Head Membranes. *Journal of Neurochemistry*, *54*, 164–170.
- Scholz, J., & Woolf, C. J. (2002). Can we conquer pain? *Nature Neuroscience*, *5*(11s), 1062–1067.
- Shaqura, M., Li, X., Al-khrasani, M., Shakibaei, M., Tafelski, S., Fürst, S., ... Sch, M. (2016). Membrane-bound glucocorticoid receptors on distinct nociceptive neurons as potential targets for pain control through rapid non-genomic effects. *Neuropharmacology*, *111*, 1–13.
- Silva, L. C. R., Castor, M. G. M. E., Navarro, L. C., Romero, T. R. L., & Duarte, I. D. G. (2016). κ -Opioid receptor participates of NSAIDs peripheral antinociception. *Neuroscience Letters*, *622*,

6–9.

- Silva, L. C. R., Romero, T. R. L., Guzzo, L. S., & Duarte, I. D. G. (2012). Participation of cannabinoid receptors in peripheral nociception induced by some NSAIDs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *45*(12), 1240-1243.
- Singh, V. ., Bajpai, K., Biswas, S., Haq, W., Khan, M. ., & Mathur, K. . (1997). Molecular Biology of Opioid Receptors: Recent Advances. *Neuroimmunomodulation*, *4*, 285–297.
- Singhania, A., & Grueber, W. B. (2015). Development of the embryonic and larval peripheral nervous system of *Drosophila*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *3*(3), 193–210.
- Smith, E. S. J., & Lewin, G. R. (2009). Nociceptors: a phylogenetic view. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *195*(12), 1089–1106.
- Smoak, K. A., & Cidlowski, J. A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mechanisms of Ageing and Development*, *125*, 697–706.
- Stahn, C., & Buttgerit, F. (2008). Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, *4*(10), 525–533.
- Sweeney, S. T., Broadie, K., Keane, J., Niemann, H., & Kane, C. J. O. (1995). Targeted Expression of Tetanus Toxin Light Chain in *Drosophila* Specifically Eliminates Synaptic Transmission and Causes Behavioral Defects. *Neuron*, *14*, 341–351.
- Tootle, T. L., & Spradling, A. C. (2008). *Drosophila* Pxt: a cyclooxygenase-like facilitator of follicle maturation. *Development*, *135*(5), 839-858.
- Tracey, W. D., Wilson, R. I., Laurent, G., & Benzer, S. (2003). *painless*, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell*, *113*(2), 261–273.
- Tyler, M. S. (2000). Developmental Biology, A Guide for Experimental Study. *Developmental Biology, A Guide for Experimental Study*, 85–106.
- Van Der Stelt, M., & Di Marzo, V. (2005). Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, *77*(1–4 SPEC. ISS.), 111–122.
- Vandal, N. B., & Shivanna, N. (2007). Effect of larval size and weight on pupation site preference in different species of *Drosophila*. *Drosophila Information Service*, *90*, 1991–1994.
- Wang, D., Sun, X., & Sadee, W. (2007). Different Effects of Opioid Antagonists on mu, delta e kappa

Opioid Receptors with and without Agonist Pretreatment. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321(2), 544–552.

Woolf, C. J. (2010). What is this thing called pain? *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 10–12.

Wyatt, G. R. (1961). The Biochemistry of Insect Hemolymph. *Annual Review of Entomology*, 6(1), 75–102.

Yoshino, J., Morikawa, R. K., Hasegawa, E., & Emoto, K. (2017). Neural Circuitry that Evokes Escape Behavior upon Activation of Nociceptive Sensory Neurons in *Drosophila* Larvae. *Current Biology*, 27(16), 2499–2504.