

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

TESE DE DOUTORADO

TNF- α , CXCL-1 e IL-1 β COMO ATIVADORES DO SISTEMA OPIOIDE DE
CONTROLE ANALGÉSICO PERIFÉRICO EM CAMUNDONGOS

Aluna: Jayane Laís Dias Quintão
Orientador: Dr. Igor Dimitri Gama Duarte
Co-orientador: Dr. Thiago Roberto Lima Romero

BELO HORIZONTE

2017

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós Graduação Fisiologia e Farmacologia

TNF- α , CXCL-1 e IL-1 β COMO ATIVADORES DO SISTEMA OPIOIDE DE
CONTROLE ANALGÉSICO PERIFÉRICO EM CAMUNDONGOS

Jayane Laís Dias Quintão

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Ciências Biológicas Fisiologia/Farmacologia do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito para
obtenção de título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte

Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Romero

BELO HORIZONTE

2017

Este trabalho foi realizado no laboratório de Dor e Analgesia, do Departamento de Farmacologia e no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, do Departamento de Fisiologia, ambos localizados no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: CAPES, CNPQ e FAPEMIG

O que conhecemos é finito,
o desconhecido é infinito;
intelectualmente estamos parados numa ilha
no meio de um oceano ilimitado da inexplicabilidade.

Nosso objetivo a cada geração é conquistar
um pouco mais terra.

Thomas Huxley

DEDICATÓRIA:

Dedico esse trabalho á minha família, em especial minha mãe e ao Gabriel, meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por me dar forças e por permitir que mais um grande sonho se tornasse realidade.

Aos meus pais, em especial minha mãe, pelo amor incondicional, por acreditar em mim e estar sempre ao meu lado, me incentivando e me apoiando nos momentos difíceis. Por ser um exemplo de pessoa, mulher e mãe.

Ao Gabriel, meu esposo, verdadeiro companheiro, confidente, pelo carinho e amor que sempre teve comigo, principalmente nos momentos mais difíceis, por me incentivar ao longo da execução deste trabalho, amor que me motiva sempre a buscar o melhor.

As minhas amadas sobrinhas, Gabrielle, Mariana e Giovanna, pelos momentos de distração e alegria.

Ao meu orientador Igor Dimitri Gama Duarte, que me deu a oportunidade de desenvolver este trabalho, por trilhar esse caminho comigo, por me ensinar a arte da pesquisa. Obrigada pelos conselhos científicos e de vida e pelo agradável convívio durante estes quatro anos de doutorado. Tenho por você uma grande admiração.

Ao meu co-orientador Thiago Romero, por sempre estar disponível em ajudar, pelo apoio a realização do trabalho, contribuindo para o enriquecimento da minha formação docente.

Ao Professor André Klein, pela excelente convivência e pela enorme contribuição durante a minha pós-graduação e avaliação na banca de qualificação.

Aos colegas do laboratório de Dor e Analgesia, pela companhia durante esses anos, pela ajuda com os experimentos, pelas discussões científicas e por proporcionarem bons momentos de convivência. Vocês tornaram essa jornada mais suave.

A uma grande colega, Josiane Fernandes, por ter me dado todo suporte para realização da Técnica de Western Blot e pela amizade construída ao logo destes meses de colaboração e a professora Virgínia por generosamente ter aberto seu laboratório.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em participar desta importante etapa de avaliação do nosso trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

A todos os amigos, que, de alguma forma, me ajudaram nesta conquista. Foi difícil chegar até aqui, mas a caminhada tornou-se mais amena quando os tive ao meu lado. O meu muito obrigado a todos que fizeram parte deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA.....	32
LISTA DE ABREVIATURAS	37
RESUMO	40
ABSTRACT	42
1 – INTRODUÇÃO	24
1.1 - Considerações sobre a dor	24
1.2 – Mecanismo de transmissão ascendente da dor	25
1.3 – Mecanismos de modulação da dor	27
1.4 – Tipos de Dor.....	28
1.4.1 - Dor Nociceptiva	29
1.4.2 - Dor Inflamatória.....	30
1.4.3 - Dor Neuropática.....	36
1.4.4 - Dor Disfuncional.....	36
1.5 - Sistema Opioide	36
1.6 - Justificativa	41
2 - OBJETIVO	43
2.1 - Objetivo Geral.....	43
2.2 - Objetivos Específicos.....	43
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 - Animais	46
3.2 - Drogas	46
3.2.1- Agentes hiperalgésicos.....	46

3.2.2- Fármacos para avaliação da via opióidérgica	47
3.3 - Teste algesimétrico de mensuração da hiperalgesia da pata de camundongos	48
3.4- Administração	51
3.5 - Procedimento experimental	52
3.6 - Determinação da expressão proteica dos receptores μ , δ e κ opioides, através da técnica de Western blot.	53
3.7 - Análise estatística.....	54
4 - RESULTADOS	57
4.1- Caracterização da hiperalgesia periférica induzida pela carragenina, TNF- α , CXCL-1, IL-1 β , NA e PGE2 em camundongos.....	57
4.2- Estudo sobre o possível envolvimento de opioides endógenos e dos receptores μ , δ e κ opioides na modulação periférica da dor inflamatória em camundongos frente aos diferentes estímulos inflamatórios.	69
4.3 - Determinação da expressão proteica dos receptores μ , δ e κ opioides, em tecido de pata, através da técnica de Western Blot.	109
5) DISCUSSÃO.....	116
6 - CONCLUSÃO.....	130
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de fibras sensitivas (extraída de Julius & Basbaum, 2001).....	26
Figura 2 - Classificação dos tipos de dor (figura adaptada de Clifford & Woolf, 2004).....	29
Figura 3 - Liberação de mediadores periféricos de transdução da dor após a lesão tecidual.	31
Figura 4 - Cascata de liberação de diferentes mediadores inflamatórios após o estímulo por carragenina	32
Figura 5 - A dor inflamatória periférica pode ser reduzida em parte pelo recrutamento de células do sistema imune contendo peptídeos opioides em seu interior	34
Figura 6 - Avaliação do limiar nociceptivo em camundongos	48
Figura 7 - Proposta de esquema dos fármacos que interferem no sistema opioidérgico e suas ações.	51
Figura 8 - Administração de drogas via intraplantar na pata de camundongos.	52
Figura 9 - Esquema do procedimento experimental utilizado para avaliar o envolvimento de opioides na modulação periférica da dor inflamatória em camundongos frente aos diferentes estímulos inflamatórios.	53
Figura 10 - Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de carragenina.....	58
Figura 11 - Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses de TNF- α	60
Figura 12 - Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses de CXCL-1	62
Figura 13 - Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses de IL-1 β	64
Figura 14 - Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses de noradrenalina (NA).....	66
Figura 15 - Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses de prostaglandina.....	68
Figura 16 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de naloxona (NX) sobre o efeito hiperalgésico induzido por carragenina (Cg).	71
Figura 17 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de clocinnamox (Cloc) sobre o efeito hiperalgésico induzido por carragenina.....	73

Figura 18 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de nor-binaltorfimina (Nor BNI; 100 µg) sobre o efeito hiperalgésico induzido por carragenina posterior esquerda (PE) 30 minutos antes da 3ª hora. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.....	75
Figura 19 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (µg) de naltrindole (NTD) sobre o efeito hiperalgésico induzido por carragenina.....	77
Figura 20 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (µg) de bestatina (Bes) sobre o efeito hiperalgésico induzido por carragenina	78
Figura 21 -Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (µg) de naloxona (NLX) sobre o efeito hiperalgésico induzido por TNF-α.....	81
Figura 22 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (µg) de Clocinnamox (Cloc) sobre o efeito hiperalgésico induzido por TNF-α	83
Figura 23 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (µg) de Norbinaltorfimina (Nor BNI) sobre o efeito hiperalgésico induzido por TNF-α.....	84
Figura 24 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (µg) de Naltrindole (Nalt) sobre o efeito hiperalgésico induzido por TNF-α	86
Figura 25 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (µg) de Bestatina (Best) sobre o efeito hiperalgésico induzido por TNF-α.....	88
Figura 26 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (µg) de naloxona (NLX) sobre o efeito hiperalgésico induzido por CXCL-1.....	92
Figura 27 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (µg) de Clocinnamox (Cloc) sobre o efeito hiperalgésico induzido por CXCL-1	94
Figura 28 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (µg) de Norbinaltorfimina (Nor BNI) sobre o efeito hiperalgésico induzido por CXCL-1.....	96

Figura 29 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de Naltrindole (Nalt) sobre o efeito hiperalgésico induzido por CXCL-1	97
Figura 30 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de Bestatina (Best) sobre o efeito hiperalgésico induzido por CXCL-1	98
Figura 31 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de naloxona (NLX) sobre o efeito hiperalgésico induzido por IL1- β	100
Figura 32 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de Clocinnamox (Cloc) sobre o efeito hiperalgésico induzido por IL1- β	101
Figura 33 - (Primeira) Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de Norbinaltorfimina (Nor BNI) sobre o efeito hiperalgésico induzido por IL1- β	102
Figura 34 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de Naltrindole (Nalt) sobre o efeito hiperalgésico induzido por IL1- β	104
Figura 35 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de Bestatina (Best) sobre o efeito hiperalgésico induzido por IL1- β	105
Figura 36 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de Naloxona (NLX 100 μg) sobre o efeito hiperalgésico induzido por PGE ₂	107
Figura 37 - Efeito da administração intraplantar de naloxona (NX, 100 μg) sobre a hiperalgesia induzida pela noradrenalina	108
Figura 38 - Avaliação da expressão de receptores μ opioides frente ao estímulo inflamatório induzido por carragenina e prostaglandina em diferentes tempos	111
Figura 39 - Avaliação da expressão de receptores δ opioides frente ao estímulo inflamatório induzido por carragenina e prostaglandina em diferentes tempos	112
Figura 40 - Avaliação da expressão de receptores κ opioides frente ao estímulo inflamatório induzido por carragenina e prostaglandina em diferentes tempos	113

Figura 41 - Hipótese sobre a participação do sistema opioidérgico no mecanismo antinociceptivo de controle periférico endógeno da dor inflamatória aguda. 131

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Receptores opioides e seus ligantes (tabela adaptada de Stein & Machelska, 2011).....	40
TABELA 2 – Divisão dos grupos experimentais.	109
TABELA 3 – Resumo dos dados obtidos na avaliação da expressão de receptores opioides em tecido de pata de animais submetidos à sensibilização induzida por Carragenina (Cg) e prostaglandina E ₂ (PGE ₂).	114

LISTA DE ABREVIATURAS

AEA - Araquidonil etanolamina (anandamida)

AIE - Anti-inflamatório esteroidal

AINE - Anti-inflamatório não esteroidal

ANOVA - Análise de variância (do inglês *analysis of variance*)

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

Ca²⁺ - Cálcio

CB₁ - Receptor canabinóide do tipo 1

CB₂ - Receptor canabinóide do tipo 2

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEBIO - Centro de Bioterismo

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Cg - Carragenina

cm - Centímetro

CMC - Carboximetilcelulose

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COX - Ciclo-oxigenase

CXCL8 - Ligante de CXC8 (do inglês *chemokine C-X-C motif ligand 8*)

DAG – Diacilglicerol

DI50 - Dose inibitória de 50%

DMSO – Dimetilsulfóxido

DOR – Receptor opioide delta (*Delta opioid receptor*)

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

EPM - Erro padrão da média

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

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

g - Gramas

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

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

ICAM - Molécula de adesão intercelular

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

ICEX - Instituto de Ciências Exatas

IL - Interleucina

i.pl. - Intraplantar

i.t. - Intratorácica

KOR – Receptor opioide Kappa (*Kappa opioid receptor*)

LFA - Antígeno associado à função leucocitária

MAGL - Monoacilglicerol lipase

MOR – Receptor opioide mu (*Mu opioid receptor*)

mm - Milímetro (10⁻³ m) **n** - número de animais experimentais

NADA - N-araquidonoil dopamina

NAPE - N-araquidonoil fosfatidiletanolamina

NF-κB - Fator nuclear-Kappa B

NMDA - N-metil-D-aspartato

NP/PEG - Difetilboriloxietilamina/polietilenoglicol

OEA - Oleiletanolamida

PAG - Substância cinzenta periaquedutal (do inglês *periaqueductal gray*)

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

PD - Pata posterior direita

PE - Pata posterior esquerda

PG - Prostaglandina

p.o. - Via oral (do latim *per os*)

RMN - Ressonância magnética nuclear

RVM - Medula rostroventromedial (do inglês *rostral ventromedial medulla*)

s.c. - Subcutânea

SCP - Substância cinzenta periaquedutal

SNC - Sistema nervoso central

THC - Tetrahydrocannabinol

TNF - Fator de necrose tumoral

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VCAM - Molécula de adesão celular vascular

2-AG - 2-araquidonoil glicerol

oC - Graus Celsius ou centígrados

% (p/v) - Percentual peso por volume

% (v/v) - Percentual volume por volume

µg - Micrograma (10⁻⁶ g)

µl - Microlitro (10⁻⁶ l)

µm - Micrometro (10⁻⁶ m)

Δ - Delta

RESUMO

Os peptídeos opioides endógenos possuem efeitos que são mediados por uma classe de receptores acoplados a proteína G, conhecidos como receptores do tipo μ , δ e κ opioides. Dentre os principais efeitos descritos, está a capacidade de induzir analgesia, uma vez que, estes peptídeos possuem a capacidade de alterar a resposta neuronal através de estímulos nociceptivos. Os dados obtidos neste trabalho corroboram a hipótese de que a inflamação causa, além da hiperalgesia, a liberação de substâncias endógenas como peptídeos opioides que por sua vez, estariam exercendo um controle endógeno sobre a dor inflamatória periférica. Desta maneira, o trabalho teve como objetivo investigar quais mediadores inflamatórios poderiam estar envolvidos na deflagração da modulação endógena da dor inflamatória pela ativação do sistema opioide em camundongos. Para o estudo da antinocicepção endógena mediada periféricamente foi utilizado o modelo de hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 μg), TNF- α (100 pg), CXCL-1 (10 pg), IL1- β (0,1 pg), prostaglandina E₂ (1 μg), e noradrenalina (62,5 ng), na pata de camundongos Swiss (n=4), com avaliação pelo método de retirada de pata pelo estímulo nociceptivo mecânico. Os resultados encontrados frente à indução da hiperalgesia por carragenina foram compatíveis aos previamente encontrados em ratos. Foi observado que nos camundongos as injeções dos antagonistas inespecíficos para receptor opioide, Naloxona (12.5, 25 e 50 μg), bem como as injeções dos antagonistas específicos para receptores μ -opioides Clocinamox (10, 20 e 40 μg), receptores δ -opioides Naltrindole (15, 30 e 60 μg) e receptores κ -opioides Nor BNI (50, 100 e 200 μg) induziram um aumento da hiperalgesia. Já nos animais que receberam o inibidor da degradação de opioide Bestatina (100, 200 e 400 μg), foi observado efeito antinociceptivo. Quando utilizamos o primeiro mediador inflamatório, da cascata de liberação induzida por carragenina, TNF- α e posteriormente os antagonistas inespecíficos e específicos para os receptores opioides, observamos a intensificação da hiperalgesia.

Enquanto que a administração de Bestatina induziu a redução da hiperalgesia (Δ do limiar nociceptivo). Os resultados encontrados frente à indução da hiperalgesia por CXCL-1 e IL1- β foram compatíveis aos encontrados previamente com carragenina e TNF- α . Foi observado que nesses animais as injeções de Naloxona (25 e 50 μ g), induziram um aumento da hiperalgesia. Administração intraplantar de clocinnamox (20 e 40 μ g), Nor BNI (100 e 200 μ g) e naltrindole (30 e 60 μ g), intensificou o efeito hiperalgésico do CXCL-1 e IL1- β . Já a administração do inibidor de aminopeptidases, bestatina (200 e 400 μ g) induziu uma redução significativa do Δ do limiar nociceptivo em relação ao grupo salina, para os dois mediadores inflamatórios estudados. Entretanto, quando avaliamos a hiperalgesia induzida pelos mediadores inflamatórios estudados, a naloxona no mesmo protocolo de tempo e mesmo utilizando o dobro da dose (100 μ g) que exacerbou a hiperalgesia induzida pelos mediadores anteriormente citados, não foi capaz de alterar o efeito hiperalgésico induzido pela PGE₂ e Noradrenalina na pata de camundongos. Os experimentos de quantificação de expressão de receptores opioides no coxim plantar dos camundongos tratados com carragenina na 3^a hora, realizado pela técnica de western blot, demonstraram que há diferença significativa na expressão de receptores δ opioides, enquanto que os receptores μ e κ nos diferentes grupos de tratamento, não apresentaram aumento significativo. Para a PGE₂ não houve aumento de expressão dos receptores avaliados.

Diante dos resultados apresentados, podemos sugerir que a modulação antinociceptiva endógena periférica por estímulos inflamatórios pela Carragenina, TNF- α , CXCL-1 e IL1- β parece ser mediada pela sinalização opioidérgica, tendo a participação dos receptores μ , δ e κ envolvidos no mecanismo antinociceptivo e com o aumento da expressão dos receptores δ opioides no tecido periférico.

Palavras-chave: Dor inflamatória, Modulação Periférica da dor, Antinocicepção, Sistema Opioide e citocinas.

ABSTRACT

Endogenous opioid peptides have effects that are mediated by a class of G-protein coupled receptors known as μ , δ and κ opioid receptors. Among the main effects described are the ability to induce analgesia, since these peptides have the capacity to alter the neuronal response through nociceptive stimuli. The data obtained in this work corroborate the hypothesis that inflammation causes, in addition to hyperalgesia, the release of endogenous substances such as opioid peptides, which in turn are exerting endogenous control over peripheral inflammatory pain. In this way, the objective of the work was to track which inflammatory mediators could be involved in the deflagration of the endogenous modulation of inflammatory pain by the activation of the opioid system in mice. (100 μg), TNF- α (100 μg), CXCL-1 (10 μg), IL- β (0.1 μg) and IL- β (0.1 μg) were used to study the peripheral-mediated endogenous antinociception. The model of hyperalgesia induced by intraplantar injection of carrageenan, Prostaglandin E2 (1 μg), and noradrenaline (62.5 ng), in the paw of Swiss mice (n = 4), with evaluation by the paw withdrawal method by the mechanical nociceptive stimulus. The results found against the induction of carrageenan hyperalgesia were compatible with those previously found in rats. Injections of nonspecific opioid receptor antagonists, Naloxone (12.5, 25, and 50 μg), as well as injections of specific opioid receptor antagonists Clocinamox (10, 20 and 40 μg), δ -opioid receptors Naltrindole (15, 30 and 60 μg) and Nor BNI (50, 100 and 200 μg) κ -opioid receptors induced an increase in hyperalgesia. In the animals that received the Bestatin opioid degradation inhibitor (100, 200 and 400 μg), the effect of antinociception was observed. When we used the first inflammatory mediator, carrageenan-induced release cascade, TNF- α and later non-specific opioid receptor-specific antagonists, we observed an increase in hyperalgesia. While Bestatin administration induced reduction of hyperalgesia (Δ nociceptive threshold). The results found against the induction of hyperalgesia by CXCL-1 and IL1- β were compatible with those previously found with

carrageenan and TNF- α . It was observed that in these animals injections of Naloxone (25 and 50 μ g), induced an increase of the hyperalgesia. Intraplant administration of clocinnamox (20 and 40 μ g), Nor BNI (100 and 200 μ g) and naltrindole (30 and 60 μ g) intensified the hyperalgesic effect of CXCL-1 and IL1- β . On the other hand, administration of the aminopeptidase inhibitor, bestatin (200 and 400 μ g) induced a significant reduction of the Δ nociceptive threshold in relation to the saline group, for the two inflammatory mediators studied. However, when we evaluated the hyperalgesia induced by the inflammatory mediators studied naloxone in the same time protocol and even using twice the dose (100 μ g) that exacerbated the hyperalgesia induced by the aforementioned mediators, it was not able to alter the hyperalgesic effect induced by PGE2 And Noradrenaline in the paw of mice. The experiments of quantification of opioid receptor expression in the plantar cushion of mice treated with carrageenan at the 3rd hour, performed by the western blot technique, demonstrated that there is significant difference in the expression of δ opioid receptors, while the μ and κ receptors in the different groups Did not show a significant increase. For PGE2 there was no increase in expression of the evaluated receptors.

Considering the results presented, we can suggest that peripheral endogenous antinociceptive modulation by inflammatory stimuli by Carrageenan, TNF- α , CXCL-1 and IL- β seems to be mediated by opioidergic signaling, with the participation of μ , δ and κ receptors involved in the mechanism Antinociceptive and with increased expression of δ opioid receptors in the peripheral tissue.

Key words: Inflammatory Pain, Peripheral Modulation of pain, Antinociception, Opioid System and Cytokines.

INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações sobre a dor

A dor é uma experiência complexa que inclui diversas dimensões. Segundo a IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) do inglês *International Association for the Study of Pain*, a dor pode ser entendida como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Dentre as funções cognitivas, a dor assume prioridade por ter importante papel na sinalização de lesão, indicando ao indivíduo a necessidade de investigação e tentativa de interrupção do dano (revisto por Freitas *et al.*, 2009).

A dor vem sendo estudada ao longo dos séculos, e no processo sofreu alterações consideráveis no seu nível de compreensão. Uma das primeiras teorias descritas sobre estudos anatômicos e fisiológicos, foi a teoria de Descartes (1596 – 1650), que descreveu pioneiramente a existência de vias específicas que conduziam a dor desde a periferia até o cérebro. Descartes acreditava que além da existência de um sistema de transmissão direto deveria haver uma associação causal entre o grau de dano tecidual e a intensidade da dor gerada (Schneider & Karoly, 1983).

Embora exista relação entre a percepção de dor e a agressão tecidual, não é incomum que ambos os eventos possam ser dissociados, como por exemplo, em situações de ansiedade (Chatuverdi, 1987), (Rhudy & Megler, 2000), medo e estresse (Wall, 1979) ou ainda em áreas amputadas do corpo (Melzack, 1973), no caso da dor do membro fantasma, situações em que a dor independe do dano tecidual gerado.

Em 1965, Melzack e Wall verificaram que a transmissão ascendente da dor poderia ser modulada por estímulos táteis no nível da medula espinal, sistematizando o que foi chamado “teoria do portão da dor”. Além disso, a existência de um sistema supra-espinal descendente,

contribuindo para a inibição da via nociceptiva, foi fortemente sustentada pelo trabalho de Reynolds (1969) e posteriormente por diversos outros (Basbaum e cols., 1976; Fields e cols., 1977; Watkins e Mayer, 1982; Carstens e cols., 1987; Proudfit, 1988; Haws e cols., 1990; Lichtman e cols., 1996; Sandküler, 1996; Ko 1997; Fürst, 1999; Millan, 2002).

1.2 – Mecanismo de transmissão ascendente da dor

Sherrington, em 1906, propôs o termo nociceptor, que se refere a um conjunto de terminações nervosas cujos corpos celulares encontram-se localizados no gânglio da raiz dorsal dos nervos espinhais e no gânglio trigeminal (Rang *et al.* (1991), cuja função é a percepção de um estímulo potencialmente lesivo ao organismo (McMahon & Koltzenburg, 1990). Diferente dos outros tipos de receptores sensoriais, os nociceptores possuem um alto limiar de ativação, só respondendo aos estímulos sensoriais mais intensos (revisto por Woolf & Ma, 2007).

Segundo Julius e Basbaum (2001) características como diâmetro, estrutura e velocidade de condução são utilizadas para classificar as fibras aferentes periféricas em três diferentes tipos: (1) fibras A β e A α , mielinizadas e condutoras rápidas; (2) fibras A δ , finamente mielinizadas e condutoras de velocidade intermediária; (3) fibras C, amielinizadas e portanto condutoras mais lentas (revisto por Fein, 2012) (Figura 1).



Figura 1 - Tipos de fibras aferentes primárias (extraída de Julius & Basbaum, 2001).

Os nociceptores são fibras nervosas livres do tipo A δ e C, provenientes da pele ou de órgãos internos, que se direcionam ao corno dorsal da medula espinhal, atingindo preferencialmente suas lâminas superficiais. As fibras do tipo A δ geram uma sensação dolorosa bem localizada e específica e são responsivas a estímulos mecânicos e térmicos. Enquanto que as fibras do tipo C, ou também conhecidas como polimodais, respondem tanto a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica ou química, geram uma resposta dolorosa mais difusa e inespecífica (revisado por Vanderah, 2007). Alguns tipos de fibras C, que são responsivas a estímulos térmicos e insensíveis a estímulos mecânicos podem ser chamadas de nociceptores “silenciosos” (*silent nociceptors*), por não responderem a estímulo nocivo em condições normais, sendo responsivas apenas após a ocorrência de uma sensibilização prévia (Schmidt *et al.*, 1995).

No processo de transmissão ascendente da dor, as fibras aferentes primárias, provenientes da pele ou órgãos internos, projetam-se para o corno dorsal da medula espinhal, formando conexões sinápticas com neurônios de segunda ordem, evento mediado por liberação de transmissores como substância P, glutamato, dentre outros. Esses neurônios cruzam para o lado contralateral da medula até o tálamo, principal região caracterizada por integrar os impulsos da dor. No tálamo, os neurônios aferentes de terceira ordem conduzem a informação nociceptiva até o córtex cerebral, onde serão processados e interpretados em nível de consciência (revisto por Fürst, 1999).

1.3 – Mecanismos de modulação da dor

Pela primeira vez em 1965, Melzack e Wall propuseram a existência de mecanismo de modulação da transmissão ascendente da dor, que ficou posteriormente conhecido como “teoria do portão da dor”, segunda a qual, o impulso aferente sofre uma regulação de sistemas moduladores antes que o estímulo doloroso termine de ser evocado, reduzindo assim a percepção dolorosa. Essa teoria sustenta que a substância gelatinosa, também conhecida como lâmina II, é constituída de interneurônios inibitórios que, quando estimulados por fibras táteis, resultam em inibir a transmissão nociceptiva e já a estimulação por fibras nociceptivas inibem os interneurônios, culminando em facilitar a ascensão do estímulo doloroso. Dessa forma, o estímulo nociceptivo é o resultado entre a atividade das fibras aferentes não-nociceptivas (táteis) e nociceptivas no corno dorsal da medula.

Reynolds em 1969 sustentava a hipótese de que um sistema descendente contribuía para a inibição da via nociceptiva, seu trabalho demonstrou que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (SCP) era capaz de induzir processos analgésicos em ratos e ao mesmo tempo manter respostas motoras inalteradas. A partir disso, outros sítios antinociceptivos que originam vias descendente para o corno dorsal da medula foram

identificadas, tais como o núcleo magno da rafe (NMR), núcleo reticular paragigantocelular, locus coeruleus, dentre outros (Millan, 2002).

A partir destes achados experimentais, diversos mediadores que modulavam esse controle de supressão na via descendente passaram a ser estudados. Com isso, uma importante descoberta foi feita, a identificação de peptídeos opioides endógenos, com capacidade de modulação no sistema nervoso central e com ação similar a exercida pela morfina (Miller 1981). Desde então, muitos outros peptídeos opioides endógenos têm sido caracterizados, tais como, β -endorfinas, dinorfinas e encefalinas, suas funções parecem ser mediadas por ativação dos diferentes tipos de receptores opioides (Millan, 2002).

O trabalho de Watkins & Mayer (1982) demonstrou que a administração de naloxona, antagonista não seletivo para receptores opioides, foi capaz de reduzir a analgesia induzida por estimulação elétrica em áreas centrais de modulação, bem como analgesia induzida por estresse em animais e analgesia induzida por administração de placebo em humanos com dor pós-operatória, confirmando a importância da participação de peptídeos opioides na modulação da dor. Desde então, houve um avanço expressivo na tentativa de compreender a participação de possíveis outros sistemas endógenos na modulação nociceptiva, como o noradrenérgico (Carstens & cols., 1987; Proudfit, 1988; Haws & cols., 1990), serotoninérgico (Chitour e cols., 1982 ; Carstens & cols., 1987) e canabinoidérgico (Lichtman & cols., 1996; Sandkuler 1996).

1.4 – Tipos de Dor

A capacidade de perceber estímulos nocivos é fundamental para manter a integridade e o bom funcionamento do organismo, uma vez que a sensação dolorosa nos alerta a um potencial dano e ativa respostas comportamentais adequadas (Julius & Basbaum, 2001). Tendo em vista a complexidade e as variáveis para o estudo da dor, bem como o estímulo

desencadeante e as fibras nociceptivas que medeiam este evento, ela pode ser dividida em 4 (quatro) principais tipos: (I) dor nociceptiva ou neurogênica, (II) dor inflamatória, (III) dor neuropática e (IV) dor disfuncional ou idiopática. Ver figura 2.

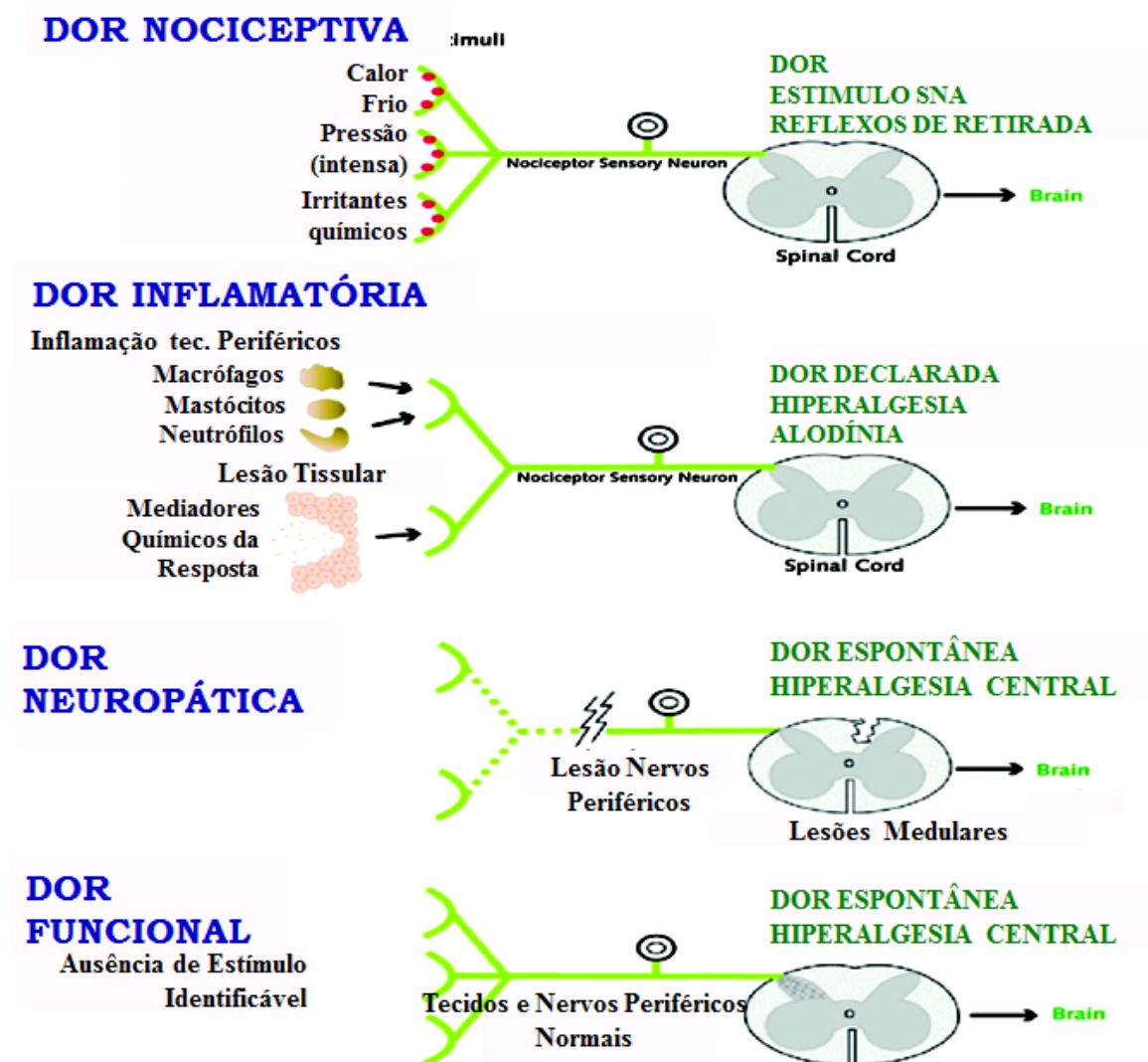


Figura 2- Classificação dos tipos de dor (figura adaptada de Clifford & Woolf, 2004).

1.4.1 - Dor Nociceptiva

É desencadeada mediante um intenso estímulo nocivo e mantém-se ativa enquanto ele estiver presente, funciona como um alerta a estímulos externos, como picadas ou queimaduras, e internos, como infarto do miocárdio (revisado por Costigan *et al.*, 2009); O

fenômeno da nocicepção é tão importante que situações nas quais ele se torna ausente, como em mutações do gene SCN9A, localizado no braço longo do par cromossômico 2, que expressa os canais para sódio sensíveis à voltagem NaV1.7 (Manfredi *et al.*, 1981), pode levar à repetidas lesões e à uma automutilação inconsciente (Woolf, 2010), levando o indivíduo a uma redução na qualidade e na expectativa de vida.

1.4.2 - Dor Inflamatória

A inflamação é um evento caracterizado por uma série de sinais e sintomas como rubor, calor, tumor, dor e perda de função (ver Levine & Taiwo, 1994), sendo uma resposta de um tecido vivo a um agente de natureza diversa e tem como objetivo alertar e prevenir traumas futuros ao tecido lesado (Riedel & Neeck, 2001).

Pronunciadas mudanças no fenômeno nociceptivo podem ocorrer, após uma agressão, além dos processos vasculares como dilatação dos vasos que aumenta o fluxo sanguíneo local, aumento da permeabilidade vascular que resulta no extravasamento de leucócitos, proteínas e fluidos para a região inflamada levando à formação de edema. (Iwalewa *et al.*, 2007; Lapa *et al.*, 2008). Esses sinais e sintomas podem ser explicados em parte, porque o estímulo lesivo induz a liberação de vários mediadores que sensibilizam ou excitam as terminações nervosas periféricas, causando dor inflamatória, além de vasodilatação e aumento de permeabilidade. Esses mediadores têm várias origens, como plasmática, liberados das células inflamatórias locais e provenientes dos terminais periféricos das próprias fibras aferentes primárias (Sorkin & Wallace, 1999), (Ver figura 3).

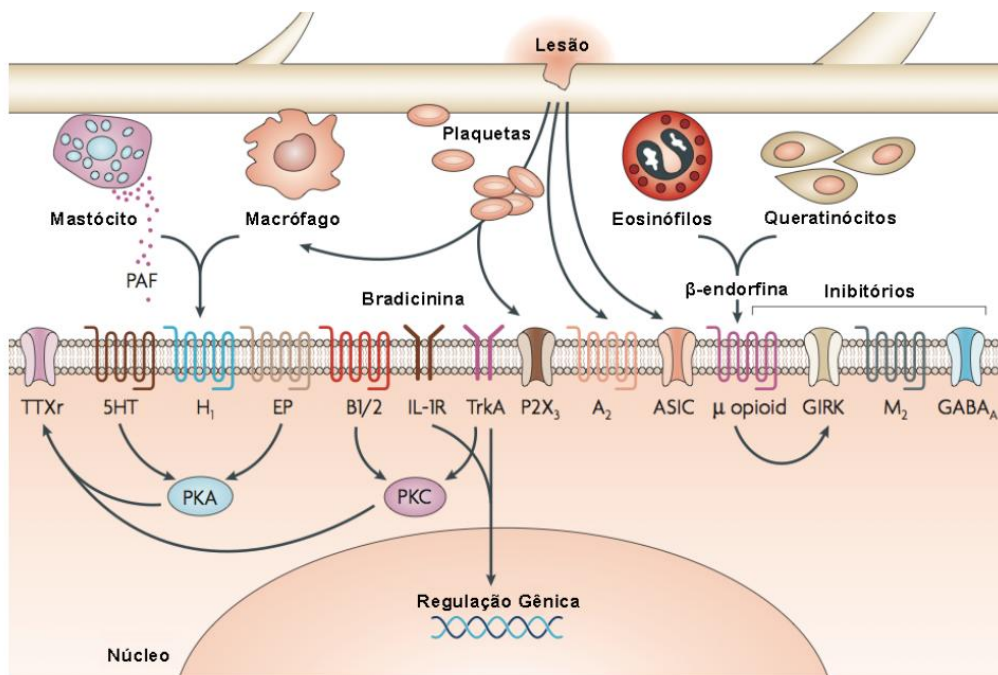


Figura 3- Liberação de mediadores periféricos de transdução da dor após a lesão tecidual (figura adaptada de Woodcock, Witter, Dionne, 2007).

Tanto em ratos (Poole *et al.*, 1999) quanto em camundongos (Cunha *et al.*, 2005), a liberação de prostaglandinas e aminas simpáticas são responsáveis pela hiperalgesia induzida por carragenina, mas esta participação é precedida pela liberação de uma complexa cascata de citocinas pró-inflamatórias, descrita a seguir.

A carragenina, em ratos, estimula em sequência, a formação do mediador inflamatório bradicinina, que através de receptores específicos (B_2), estimula a liberação do fator de necrose tumoral α (TNF- α), que por sua vez estimula a produção de IL-1 β e interleucina-6 (IL-6), as quais induzem a produção dos eicosanóides (Ferreira *et al.*, 1988; Cunha *et al.*, 1992). Em outro lado da cascata, a partir do TNF- α há a liberação direta da CINC-1 (interleucina-8 em humanos e CXCL1 em camundongos), que estimula a produção das aminas simpaticomiméticas, SA (Cunha *et al.*, 1992). Já em camundongos, a carragenina estimularia diretamente em cascatas paralelas o TNF- α e a CXCL1; o TNF- α liberaria a IL-

1 β com conseqüente liberação de eicosanóides, já CXCL1 estimularia, de forma direta, a produção das aminas simpaticomiméticas como na cascata em ratos, mas também estimularia de forma indireta a liberação de eicosanóides através da indução via IL-1 β (Cunha *et al.*, 2005), figura 4.

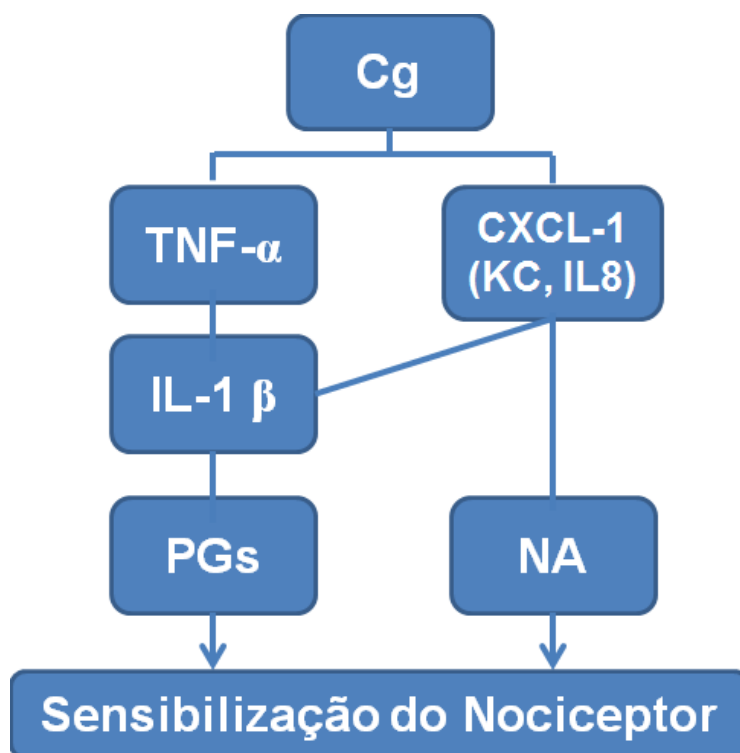


Figura 4- Cascata de liberação de diferentes mediadores inflamatórios após o estímulo por carragenina (figura adaptada de Cunha, *et al.*, 2005).

Esta cascata de eventos via seus mediadores finais culmina por ativar canais inicos ou o sistema de segundos mensageiros intracelulares (Dray, 1995) promovendo a sensibilização dos nociceptores, descrita também como hiperalgesia primária, caracterizada pela diminuição do limiar a estímulos nocivos na área lesada (Woolf, 1991), iniciando assim a transmissão ascendente da dor.

Nos últimos anos, várias evidências têm demonstrado que, em adição aos mecanismos que ocorrem no sistema nervoso central, uma modulação da nocicepção pode ocorrer nos

terminais periféricos dos neurônios aferentes durante o processo inflamatório (Stein, 1995). Stein e cols.(1989) demonstraram que a administração periférica de agonistas de receptores μ , δ e κ opioides produzia efeito analgésico em tecidos inflamados, mas não em tecidos não inflamados, sugerindo que o processo inflamatório culmina por aumentar a eficiência na ativação de receptores opioides.

Sendo assim, além do efeito final hiperalgésico, os mediadores inflamatórios promovem o recrutamento de células imunes (Stein e cols., 1990), principalmente leucócitos polimorfonucleares, que secretam peptídeos opioides que se ligam a terminais sensoriais que expressam receptores opioides induzem antinocicepção periférica (Stein e cols., 2003). Machelska e cols. (1998) verificaram que na ausência do processo inflamatório, estas células não são detectadas em tecidos periféricos. E de forma semelhante, Mousa e cols. (2002) verificaram uma escassez da expressão de receptores opioides nos neurônios sensoriais periféricos na ausência de inflamação. Além disso, Rittner e cols (2001) demonstraram que durante a inflamação ocorre um progressivo aumento de leucócitos contendo opioides, do conteúdo de peptídeos opioides e da intensidade da analgesia periférica por receptores opioides.

Além do contexto celular, o processo inflamatório parece regular um aumento do número de receptores μ opioides no gânglio da raiz dorsal (Zöllner e cols., 2003), um aumento no transporte de receptores opioides do gânglio da raiz dorsal através do nervo ciático (Hassan e cols., 1993), um aumento no número de neurônios sensoriais periféricos imunoreativos a receptores opioides (Mousa e cols., 2001) e um aumento na antinocicepção provocada por ligantes de receptores opioides (Schäfer e cols., 1995), (ver figura 5). Por outro lado, Brack e cols. (2004) sugeriram que a antinocicepção periférica mediada por opioides durante a inflamação aparentemente não é determinada pelo número de leucócitos contendo

opioides, mas provavelmente pela expressão e eficácia de acoplamento de receptores opioides nos neurônios sensoriais periféricos.

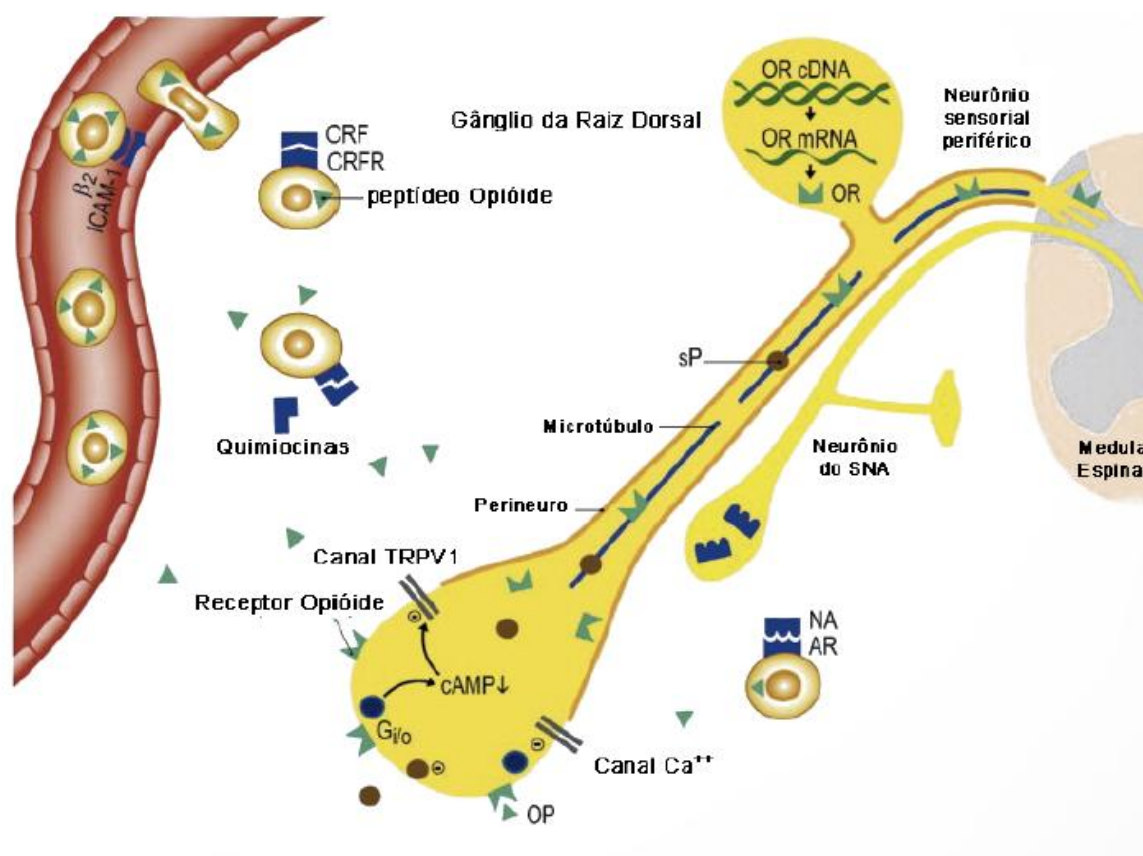


Figura 5 - A dor inflamatória periférica pode ser reduzida em parte pelo recrutamento de células do sistema imune contendo peptídeos opioides em seu interior (figura adaptada de Machelska, 2007).

Em nosso laboratório, estudos sugerem a existência da modulação endógena local, liberando, durante o processo inflamatório, peptídeos opioides endógenos (Alves e cols., 2012) e endocanabinóides (Savernini e Duarte; Romero). Embora a modulação periférica da dor inflamatória seja uma realidade, sabe-se pouco sobre os possíveis “responsáveis fisiológicos” que poderiam desencadear esta regulação intrínseca e a participação dos receptores opioides neste contexto.

Observando dados anteriores que verificaram que uma única injeção de IL-1 β poderia aumentar o transporte axonal dos receptores κ -opioides (Jeanjean e cols., 1995), Puehler e cols. (2006) demonstraram que durante o processo inflamatório induzido pela injeção de completo adjuvante de Freud, na porção subcutânea da pata de ratos, foi encontrado um aumento na concentração dos receptores κ -opioides. No mesmo trabalho, a injeção de IL-1 β foi capaz de induzir um aumento destes, 12 horas depois do início da inflamação, levando os autores a proporem que o responsável pelo aumento dos receptores κ -opioides seria a IL-1 β .

Em outra abordagem experimental, foi demonstrado que a IL-6 induziria o aumento da concentração dos receptores μ -opioides em células de neuroblastoma humano, mas não dos receptores δ -opioide (Börner e cols., 2004).

Já Mousa e col. (2007) propuseram que o fator de crescimento neuronal modularia as concentrações e a eficácia dos receptores μ -opioides durante o processo inflamatório.

Em outro estudo, o segundo mensageiro óxido nítrico, derivado do aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase durante o processo inflamatório, seria o responsável pelo aumento da transcrição gênica de receptores μ -opioides durante o desenvolvimento de inflamação intestinal (Pol e cols., 2005).

Desta forma, o que se tem é uma complexa relação entre dois fenômenos antagônicos, nocicepção e antinocicepção, que tem suas atuações concomitantes utilizando maquinaria própria, mas comumente ativada, possivelmente pelos mesmos mediadores do processo inflamatório.

Em vista do contexto da modulação endógena da dor periférica através da liberação de opioides, com seus vários mediadores e receptores putativos, restam questões importantes a serem respondidas como qual o componente fisiológico contribui para a modulação endógena da dor periférica, assim como os receptores que medeiam essa modulação. Esse entendimento

pode oferecer alternativas terapêuticas não só da dor inflamatória, mas para vários outros tipos de dor refratários aos tratamentos convencionais.

1.4.3 - Dor Neuropática

Resulta de uma lesão neuronal que pode ser desencadeada por alterações como, inflamação, tumores, compressão, traumas, doenças autoimunes e metabólicas e desordens degenerativas, envolvem múltiplas alterações patofisiológicas, tanto no nível periférico como central (Woolf & Mannion, 1999). A sintomatologia associada a dor neuropática pode incluir, alodínia (dor espontânea em resposta a estímulos não-nocivos) e hiperalgesia (resposta aumentada a estímulos nocivos). A dor neuropática é geralmente crônica, incapacitante e na maior parte das vezes menos responsiva aos tratamentos convencionais, como a terapia com AINES e opioides (Dworkin *et al.*, 2003; Attal *et al.*, 2010).

1.4.4 - Dor Disfuncional

É uma síndrome dolorosa na qual não há, aparentemente, estímulo ou lesão no sistema nervoso que justifique a alteração. Hipotetiza-se que essa condição dolorosa seja desencadeada por uma alteração fisiológica e bioquímica do sistema somatosensorial, sendo considerada, portanto uma doença. Além disso, em sua maioria, é difícil estabelecer a relação do agente causador da manifestação e a manutenção da dor disfuncional (Costigan *et al.*, 2009).

1.5 - Sistema Opioide

Desde a descoberta do ópio e seus derivados, o sistema opioide vem sendo amplamente associado com a modulação da dor (Gomes *et al.*, 2014). Os efeitos biológicos mediados pelos opioides representam uma grande variedade, uma vez que eles são

amplamente distribuídos em diferentes tecidos, bem como, podem desencadear respostas variadas pela ativação pontual dos seus diferentes receptores (Pert & Snyder, 1973; Taylor *et al.*, 2015). Os receptores opioides são receptores acoplados a proteína G (Gi/o) e produzem um efeito inibitório na célula alvo (Pradhan *et al.*, 2012).

A síntese destes receptores ocorre nos cariossomos dos neurônios sensitivos localizados nos gânglios da raiz dorsal e migram para a periferia de maneira antidrômica, enquanto que para o sistema nervoso central, migram de maneira ortodrômica ao longo de suas fibras (Fields *et al.*, 1980; Coggeshall *et al.*, 1997). Já na periferia, durante a inflamação, além da produção dos peptídeos opioides endógenos a partir das células do sistema imune, observa-se aumento da transcrição de RNAm, transporte dos receptores opioides a partir dos microtúbulos e aumento das concentrações dos mesmos no gânglio da raiz dorsal (Truong *et al.*, 2003).

Com o avanço das pesquisas na área de biologia molecular e conseqüentemente maior domínio das técnicas de clonagem, foi possível a caracterização da estrutura e função dos receptores opioides. As pesquisas iniciais realizadas a partir de íleo de roedores permitiram a caracterização de três diferentes receptores opioides, que foram nomeados posteriormente pelas iniciais em grego das substâncias responsáveis pela ativação desses receptores. Dessa forma ficaram conhecidos como receptores do tipo mu opioides (μ), ativados por morfina, receptores do tipo kappa opioides (κ), ativados por cetociclazocina e receptores do tipo sigma opioides (σ), ativado pela substância SKF 10047. Este último, pela falha de estudo posteriores em comprovar a presença deste receptor, logo foi retirado da classe de opioides. Contudo em 1980, a classe de receptores opioides voltou a ser composta por três diferentes receptores após a caracterização do receptor do tipo Delta (δ), ativado pela deltorfina (encefalina), (Pert e Snyder, 1973; kosterlitz *et al.*, 1980). A partir do ano 2000, passou-se a falar em um quarto

receptor, não clássico, denominado de nociceptina, cujo agonista natural é a nociceptina (Barlocco *et al.*, 2000).

Dentre os receptores que compõe a classe de opioides, o receptor delta foi o primeiro a ser isolado em laboratório. Possui baixa afinidade, mas alta seletividade pela deltorfina (encefalina), seu principal agonista e é antagonizado pelo naltrindole, derivado da naltrexona. (kosterlitz *et al.*, 1980). Já os receptores kappa são ativados por cetociclazocina e antagonizados por uma substância de potente ação, nor-binaltorfimina. Enquanto que os receptores mu possuem a morfina como principal agonista e a naloxona como o principal antagonista. (Emmerson *et al.*, 1994).

Após a nomenclatura estabelecida pelos farmacologistas, um grupo de pesquisadores da área de biologia molecular propôs a troca das respectivas letras gregas μ , δ e κ por siglas em inglês como, MOR (receptor opioide mu), DOR (receptor opioide delta) e KOR (receptor opioide kappa), contudo a nomenclatura continuou sendo alvo de críticas. Então, em meados da década de 90, a IUPHAR (International Union of Pharmacologists) renomeou os receptores opioides de acordo com a sequência de clonagem dos mesmos. Sendo assim, ficou estabelecida para os receptores DOP (DOR) a classificação como OP1, KOP (KOR) a descrição como OP2 e para MOP (MOR) a descrição OP3 (Dhawan *et al.*, 1996).

Os genes responsáveis pela codificação da transcrição dos receptores opioides, em humanos, estão localizados no cromossomo 1 para receptores delta, no cromossomo 8 para receptores kappa e por fim no cromossomo 3 para receptores mu (Dhawan *et al.*, 1996). Os receptores são do tipo metabotrópico, acoplados a proteína G e seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da adenilciclase e redução cAMP e concomitantemente com a redução da concentração de cálcio livre, diminuindo assim a atividade neuronal. Quando ativados os receptores do tipo mu promovem hiperpolarização dos neurônios, uma vez que aumentam a condutância do potássio. Já a ativação dos receptores do tipo delta e kappa promovem

fechamento dos canais para cálcio, inibindo a liberação de neurotransmissores (Dhawan et al., 1996).

Os receptores opioides estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central, assim como no sistema nervoso periférico e seus efeitos estão diretamente relacionados à condição fisiológica do organismo, bem como a natureza da dor (Junien e Wettstein, 1992).

No sistema nervoso central pode ser observada a presença destes receptores em locais como a medula espinhal, substância cinzenta periaquedutal, córtex cerebral, tálamo, dentre outras. Além disso, é possível encontrar variações na distribuição dos receptores em diferentes regiões das estruturas acima citadas. Por exemplo, na região cortical cerebral pode ser observada uma distribuição preferencial para receptores mu nas camadas I, V e VI, enquanto que para os receptores delta essa localização encontra-se mais difusa, estando presentes nas camadas II, III, IV e V, já os receptores kappa podem ser observados em III, V e VI (Lewis, *et al*, 1987).

Os receptores opioides podem ser expressos na periferia tanto de maneira constitutiva, ou seja, produzido normalmente para suprir a demanda fisiológica, como por exemplo no sistema digestório, ou expressos em decorrência de um processo inflamatório causado por uma injúria tecidual, em estruturas como pele e articulações (Stonski e cullen, 2007). Além disso, podemos encontrá-los em diversos órgãos como, coração, testículos, ovários, útero, glândulas adrenais, rins, dentre outros (Bodnar e Klein, 2005).

A ação periférica dos opioides foi descrita pela primeira vez no trabalho de Ferreira & Nakamura, 1979, no qual foi demonstrado que administração de agonistas opioides, morfina e encefalina, na pata de ratos, causavam antinocicepção, ou seja, aumentava o limiar de dor, frente ao estímulo inflamatório induzido por prostaglandina E₂. A partir daí, outros trabalhos confirmaram a ação periférica mediada por opioides, como Bentley *et al.*, (1981), (Smith *et*

al., 1982) e Nakamura & Lico (1988). Para melhor entendimento sobre os agonistas, antagonistas e ações associadas aos receptores opioides, vide tabela 1.

TABELA 1 – Receptores opioides e seus ligantes (tabela adaptada de Stein & Machelska, 2011).

RECEPTOR	LOCAL DE AÇÃO	EFEITOS	AGONISTAS	ANTAGONISTAS
Mu	Sistêmico	Analgesia, euforia, constipação e depressão respiratória	DAMGO, morfina, fentanil, endomorfina, beta-endorfinas	CTOP, naloxona
	Periférico	Analgesia, constipação e redução da inflamação	Loperamida, DiPOA, HS731/AS006	Alvimopan, naloxona, cloccinamox
Delta	Sistêmico	Analgesia, convulsões e efeito ansiolítico	DPDPE, SNC80, fentanil, encefalinas, endomorfina, beta-endorfinas	Naltrindole, CTOP, naloxona
	Periférico	Analgesia e constipação	DiPOA, HS731/AS006	Alvimopan, naloxona, Naltrindole
Kappa	Sistêmico	Analgesia, diurese e disforia	DPDPE, SNC80, fentanil, endomorfina, beta-endorfinas	CTOP, naloxona, Norbinaltrofimina
	Periférico	Analgesia e redução da inflamação	DiPOA, HS731/AS006	Naloxona, norbinaltrofimina

1.6 - Justificativa

Considerando que o tratamento da dor através das terapias tradicionais disponíveis induz elevado índice de efeitos adversos, compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dor pode auxiliar no desenvolvimento de novas terapias para o seu tratamento. A possibilidade de ativação de sistemas de controle periféricos da dor inflamatória nos incita a perguntar sobre quais seriam os deflagradores fisiológicos dessa alteração. Diante deste contexto, entender a participação dos múltiplos mecanismos envolvidos na indução e controle da dor é essencial para o avanço no seu entendimento, bem como a participação de peptídeos opioides justificada pela sua diversidade de atividades biológicas e importantes propriedades farmacológicas.

OBJETIVOS

2 - OBJETIVO

2.1 - Objetivo Geral

Investigar quais mediadores inflamatórios podem estar envolvidos na deflagração da modulação endógena periférica da dor inflamatória pela ativação dos receptores opioides em camundongos.

2.2 - Objetivos Específicos

- I. Caracterizar a hiperalgesia periférica induzida pela carragenina e pelos mediadores inflamatórios em camundongos.
 - Curva dose-resposta ao longo do tempo da hiperalgesia periférica induzida por carragenina, prostaglandina E₂, noradrenalina, TNF- α , IL-1 β e CXCL1 em camundongos.

- II. Avaliar a capacidade de cada um dos estímulos (carragenina, prostaglandina E₂, noradrenalina, TNF- α , IL-1 β e CXCL1) em ativar o sistema opioide periférico e seus receptores a partir do uso de antagonistas opioide não seletivo, naloxona, e seletivos μ (Clocinnamox), δ (Naltrindole) e κ (Norbinaltrofimina) em camundongos.
 - Avaliar o efeito do inibidor de encefalinase Bestatina sobre a hiperalgesia periférica induzida pela carragenina, prostaglandina E₂, noradrenalina, TNF- α , IL-1 β e CXCL1 em camundongos.

III. Avaliar a possível alteração da expressão de receptores opioides μ , δ e κ pelos agentes inflamatórios carragenina e prostaglandina E_2 em tecido de pata de camundongos, pela técnica de western blot.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, machos, entre 10 e 11 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo da UFMG (Cebio/UFMG). Esses animais foram colocados em caixas plásticas com forragem, tendo livre acesso à ração e água. Dois dias antes da realização dos experimentos, os animais foram mantidos em sala controlada termicamente (22 a 24°C) e com ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas, para ambientalização. Todos os experimentos foram executados entre as 8:00 e 16 horas, na fase clara do dia.

Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo CETEA-UFMG (Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais), 50 / 2013.

3.2 - Drogas

3.2.1- Agentes hiperalgésicos

- Carragenina Lambda (Sigma, EUA) - Dissolvida em salina e homogeneizada até a formação de uma solução coloidal.
- Prostaglandina E₂ (Sigma) - dissolvida em etanol 2%.
- Noradrenalina (Sigma) - dissolvida em salina.
- TNF- α (Sigma) - dissolvido em Tris (pH 7,4).
- IL-1 β (Sigma) - dissolvida em solução salina.
- CXCL1 (Sigma) - dissolvido em solução salina.

3.2.2- Fármacos utilizados para a avaliação da via opióide

- Naloxona (Sigma, EUA), antagonista não seletivo dos receptores μ , δ e κ opioides - Diluído em salina fisiológica, na concentração de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e mantido no *freezer* em solução estoque.
- Cloccinamox (Tocris, EUA), antagonista irreversível do receptor μ (mu) opioide - Diluído em salina fisiológica, na concentração de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e mantido no *freezer* em solução estoque.
- Nor BNI (Nor-binaltorfimina- Tocris) antagonista seletivo do receptor κ (kappa) opioide - Dissolvido em salina fisiológica, na concentração de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e mantido no *freezer* em solução estoque.
- Naltrindole (Tocris), antagonista seletivo do receptor δ (delta) opioide - Diluído em salina fisiológica, na concentração de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e mantido no *freezer* em solução estoque.
- Bestatina (Tocris). Inibidor da enzima aminopeptidase N, enzima que degrada peptídeos opioides endógenos. Mantida no *freezer* em solução-estoque, dissolvida em solução salina.

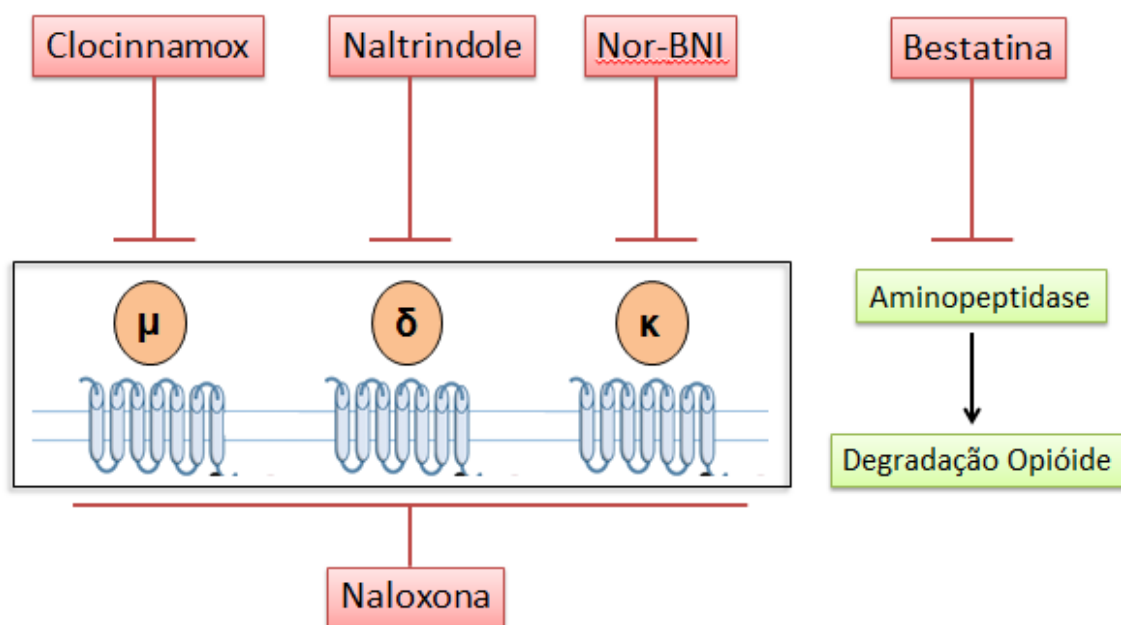


Figura 6 - Proposta de esquema dos fármacos que interferem no sistema opioidérgico.

3.3 - Teste algométrico de mensuração da hiperalgesia da pata de camundongos

O método de retirada da pata submetida à compressão, descrito originalmente por Randall e Selitto (1957) e posteriormente adaptado para camundongos por Kawabata et al. (1992), foi utilizado para a mensuração da hiperalgesia periférica em camundongos. Esses autores desenvolveram uma técnica capaz de medir a atividade antinociceptiva, baseada no princípio de que a inflamação aumenta a sensibilidade ao estímulo doloroso (hiperalgesia) e que essa sensibilidade aumentada é susceptível de ser modificada por fármacos específicos.

Medida do limiar nociceptivo, hiperalgesia e antinocicepção

O limiar nociceptivo é definido como a pressão, aplicada à pata, em que o animal apresenta o reflexo de retirada da pata submetida à compressão mecânica exercida pelo algômetro. Na maioria dos experimentos realizados, foi feito o acompanhamento temporal

do limiar nociceptivo dos animais sob a ação de diferentes drogas, frente ao efeito hiperalgésico induzido pela carragenina, prostaglandina E₂, noradrenalina, TNF- α , IL-1 β e CXCL1 em camundongos. O limiar basal de cada animal foi determinado antes da administração dos fármacos. Os limiares foram sempre medidos três vezes, observando um intervalo mínimo de 15 segundos entre cada medida, sendo o resultado final a média dessas medidas. Foi considerada hiperalgesia como a diminuição do limiar nociceptivo e sua intensidade avaliada pela diferença (Δ) do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de carragenina, prostaglandina E₂, TNF- α , IL-1 β e CXCL1 ou 5 minutos após injeção de noradrenalina (tempo que se observa efeito máximo) em relação ao valor obtido pela resposta basal (início do experimento), antes da administração de qualquer substância ou fármaco. Já a antinociceção foi considerada quando houve redução da hiperalgesia, ou seja, restauração do Δ do limiar nociceptivo a valores próximos àqueles obtidos no basal. Se antes ou durante o desenvolvimento da hiperalgesia induzida pela carragenina e demais mediadores for administrado um fármaco com ação antinociceptiva, será verificada uma redução da intensidade de hiperalgesia, ou seja, uma diminuição do Δ do limiar nociceptivo. Do mesmo modo, fármacos com capacidade de interferir na ação desses agentes antinociceptivos tendem a reverter esse efeito, ou seja, restaurar o Δ a valores próximos àqueles obtidos quando se administra somente o agente hiperalgésico.

Descrição do teste

No teste, o animal é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a pata sob teste é submetida, por sua superfície plantar, à parte compressora do aparelho (figura 7). O aparelho consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se coloca a pata do animal, e outra cônica, com uma área de 1,75 mm² na extremidade, por meio da qual é aplicada uma pressão na superfície

plantar da pata do animal. A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 16 g/cm, para camundongos, mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador.

Ao observar a resposta nociceptiva do animal, o reflexo de retirada da pata, o experimentador desaciona o pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta à pata, sendo que o último valor, que corresponde ao limiar nociceptivo, fica indicado na escala do aparelho e expresso em gramas (g).

É importante ressaltar que o animal é ambientalizado ao aparelho no dia que antecede o teste. Essa ambientalização consiste em submeter o animal à mesma situação que será vivenciada no dia do experimento. A pata do animal é submetida ao aparelho três vezes, até que o mesmo não manifeste mais uma reação de fuga. Esse procedimento é importante para permitir uma melhor observação da resposta nociceptiva do animal, que durante o teste deve permanecer quieto, evitando que desenvolva uma reação aversiva simplesmente devido à situação estranha imposta a ele. Para assegurar que a resposta nociceptiva seja percebida o experimentador passa por um treinamento a fim de identificar essa reação e consequente medida do limiar nociceptivo.

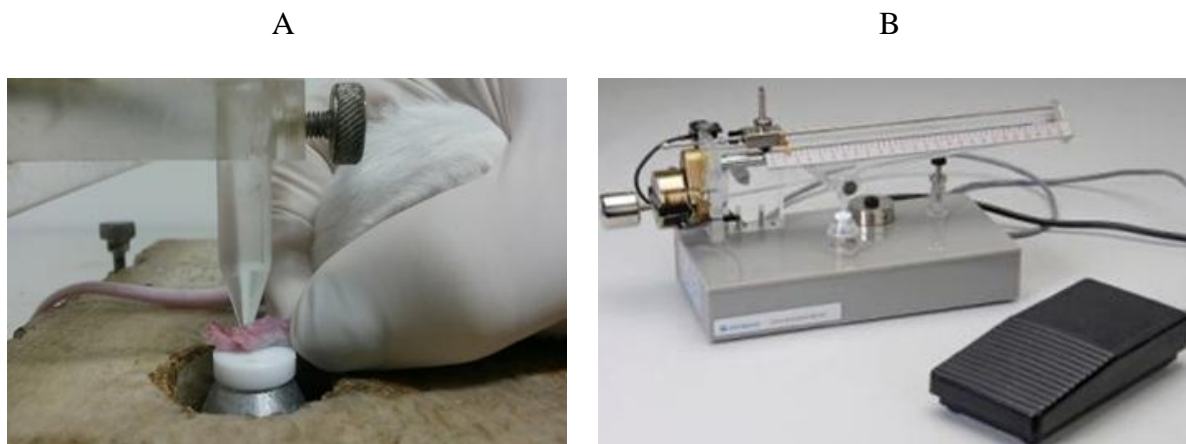


Figura 7 - Avaliação do limiar nociceptivo em camundongos (A) pela aplicação do estímulo mecânico utilizando o algesímetro da Ugo Basile (B)

3.4- Administração

As drogas foram administradas por via subcutânea na superfície plantar da pata posterior dos camundongos, num volume de 20 μ l para todas as drogas, utilizando-se uma agulha com dimensões de 8,0 x 0,3 mm (figura 8). Em todos os experimentos, utilizou-se a pata posterior direita dos animais, com exceção do protocolo utilizado para excluir a possibilidade de um efeito sistêmico das drogas administradas, para o qual ambas as patas foram utilizadas.



Figura 8- Administração de drogas por via intraplantar na pata de camundongos.

3.5 - Procedimento experimental

O limiar nociceptivo de cada animal foi determinado antes da administração dos agentes hiperalgésicos, e novamente no pico máximo de ação destes agentes avaliados em nosso modelo. O limiar é sempre medido três vezes, sendo o resultado final a média dessas medidas. Para exclusão de um possível efeito não local do antagonista seletivo, não seletivo e inibidor de encefalinases foi realizado o acompanhamento temporal do limiar nociceptivo dos animais, em função da ação dos mediadores estudados, como esquematizado na figura 9. As doses e os tempos de injeção das drogas utilizadas foram baseados em experimentos preliminares (pilotos) e em dados da literatura e estão citados nas legendas de todos os gráficos.

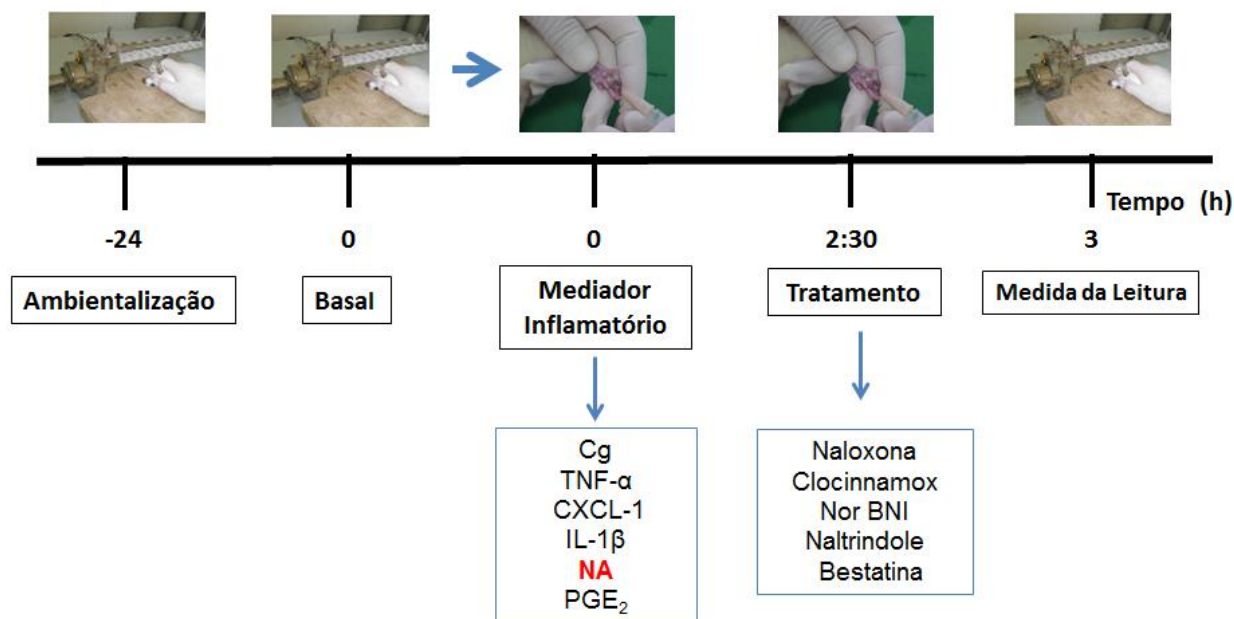


Figura 9- Esquema do procedimento experimental utilizado para avaliar o envolvimento de opioides na modulação periférica da dor inflamatória em camundongos frente aos diferentes estímulos inflamatórios.

3.6 - Determinação da expressão proteica dos receptores μ , δ e κ opioides, através da técnica de Western blot.

Os coxins plantares das duas patas foram retirados e congelados a -80°C e, posteriormente, homogeneizados com um homogeneizador de tecidos tipo turrax (Marconi®, Brasil) em presença de tampão de lise RIPA Lysis Buffer, (0,05M Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,25% deoxycholic acid, 1% NP-40, 10mM EDTA) acrescido de 0,3 % de Triton X-100, 0,5% de SDS e de coquetel de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma). Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 3600 G por 8 minutos. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método de Bradford. As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS pH=6,8, 3% Glicerol, 1% SDS, 0,6% β -mercaptoetanol, 0,1% Azul de Bromofenol) e aquecidas a 98°C por 5 minutos. Para separação, foram aplicados 50 μg de proteína em gel de 12% SDS-PAGE. Após serem

separadas no gel de poliacrilamida, pelo método de eletroforese. Logo em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore®, USA) com poro de 0,45µm. Após o bloqueio (2h em TBS-Tween 0,1% mais 3% de albumina), a membrana foi incubada *overnight* em câmara fria (6-8 °C), com o anticorpo primário específico diluído em 1,5% de albumina em TBS-Tween 0,1%. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-MOR-1 (H-80), um anticorpo policlonal feito em coelho; diluição de 1:500, anti-DOR-1 (H-20), um anticorpo policlonal feito em camundongo; diluição de 1:500, anti- KOR-1 (H -70), um anticorpo policlonal feito em coelho; diluição de 1:500 e antiβ-actina (monoclonal feito em camundongo; diluição de 1:3000). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP), anti-IgG de camundongo (diluição de 1:15000 em TBS-Tween com 2% de albumina) ou anti-IgG de coelho (diluição de 1:20000 em TBS-Tween com 2% de albumina). Após o período de incubação, a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas proteicas foram detectadas por uma reação de quimiluminescência (*kit* ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageQuant 1.48 (Silva *et al.*, 2016). Esta técnica foi realizada em parceria com o Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, do Departamento de Fisiologia, localizado no instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.7 - Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média ± EPM das medidas e a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni, utilizado para verificar a significância

das diferenças entre as médias (comparações múltiplas), sendo consideradas significantes quando os valores de p forem menores que 0,05.

Os dados de Western blot foram expressos como média \pm EPM dos valores obtidos para cada amostra, normalizados pelos resultados de β - actina de cada amostra. Os gráficos e cálculos foram feitos com o auxílio do *software* GraphPad Prism 5.

RESULTADOS

4 - RESULTADOS

Inicialmente foi padronizada a dose e avaliado o pico de ação de cada mediador estudado, como pode ser observado a seguir:

4.1- Caracterização da hiperalgesia periférica induzida pela carragenina, TNF- α , CXCL-1, IL-1 β , NA e PGE2 em camundongos.

A- Desenvolvimento temporal da hiperalgesia periférica induzida por diferentes doses de carragenina em camundongos.

A administração de carragenina em camundongos leva a um quadro de hiperalgesia, caracterizado pela redução do limiar nociceptivo de forma dose e tempo dependentes. Como pode ser observado na figura 10, a carragenina foi injetada via plantar em diferentes doses e sua cinética de ação foi registrada. As doses de 25 e 50 $\mu\text{g/pata}$ não tiveram diferença estatística quando comparadas ao grupo controle (salina). Analisando a dose de 100 $\mu\text{g/pata}$ pode-se perceber que houve redução em 50% na medida do limiar nociceptivo, enquanto que seu pico de ação ocorreu na 3^o hora. Já a dose de 200 $\mu\text{g/pata}$ induziu um quadro de hiperalgesia mais significativo quando comparado à dose anterior. Na 4^o, 5^o e 6^o hora esses valores são progressivamente normalizados até atingirem o valor do grupo controle. Dessa forma, ficou padronizada a dose de 100 $\mu\text{g/pata}$ e 3^o hora para realização de experimentos subsequentes.

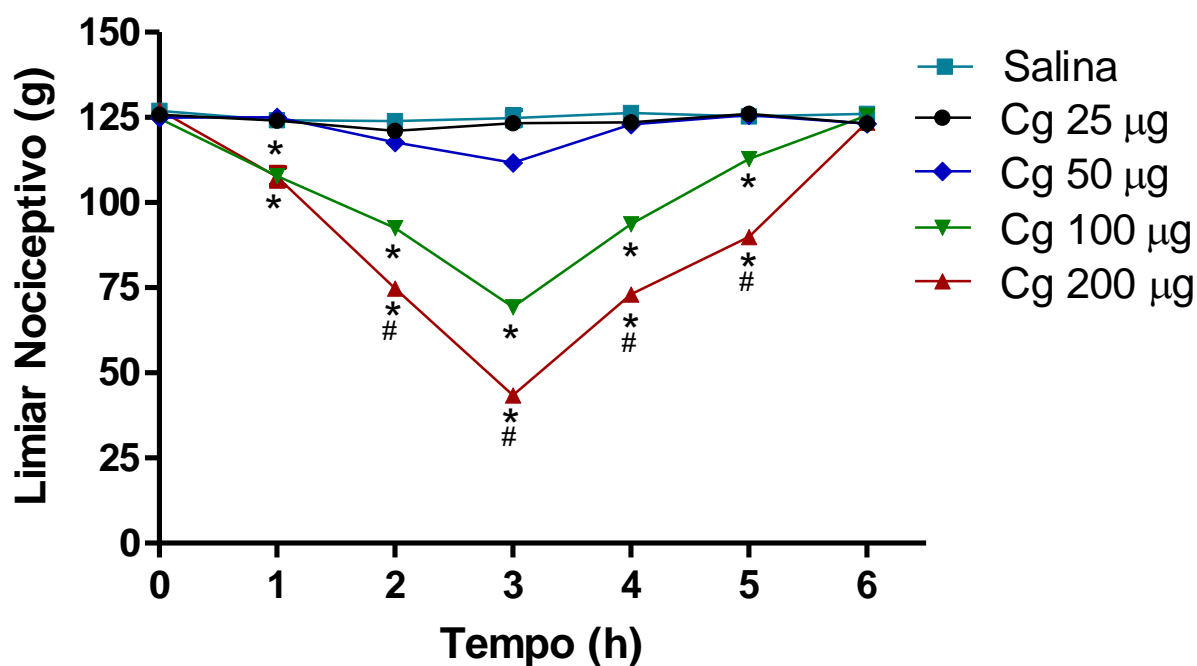


Figura 10 - Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de carragenina (Cg). A carragenina foi administrada no tempo 0 (zero). As medidas do limiar nociceptivo foram registradas a cada uma hora até a sexta hora. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle salina. # Indica significância estatística ($P < 0,001$) em relação aos grupos carragenina 100 e 200 μg .

B- Desenvolvimento temporal da hiperalgesia periférica induzida por TNF- α em camundongos.

A administração de TNF- α , mediador inflamatório, apresentou importante redução do limiar nociceptivo em camundongos, como pode ser observado na figura 11. As três doses desse mediador (100 pg, 1ng e 10 ng/pata) quando administradas via plantar possuem significativa redução do limiar nociceptivo com o pico de ação na 3^o hora. Ficou definida a dose de 100 pg/pata para realização dos experimentos futuros, uma vez que é a menor dose com significativa redução do limiar.

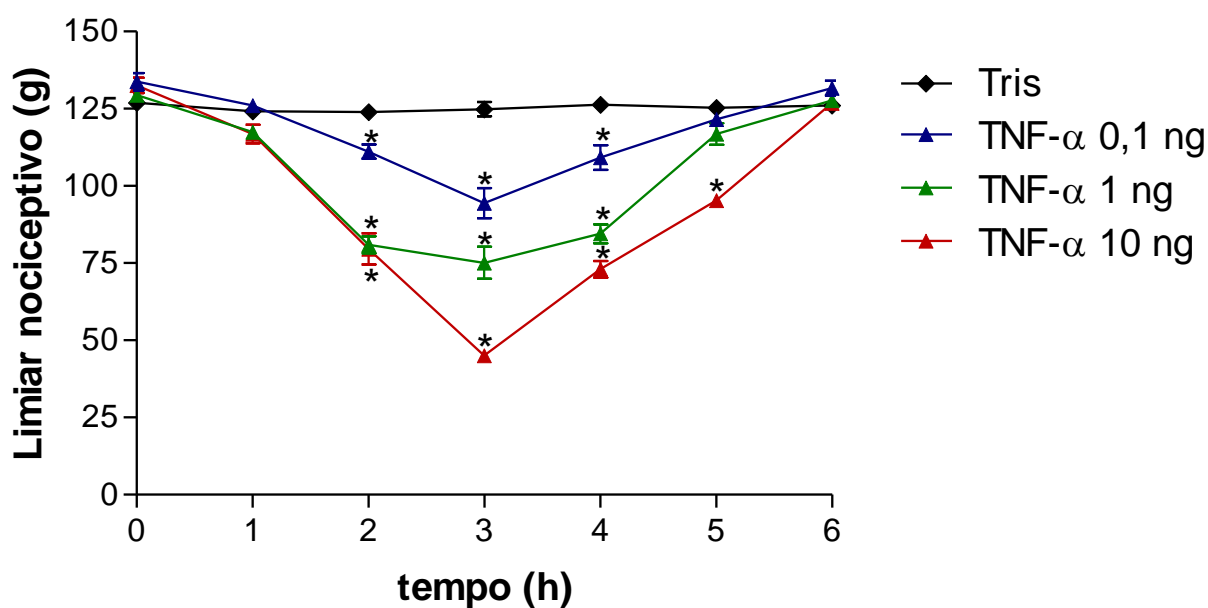


Figura 11 - Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses de TNF- α . O TNF- α foi administrado no tempo 0 (zero). As medidas do limiar nociceptivo foram registradas a cada uma hora até a sexta hora. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle tris.

C- Desenvolvimento temporal da hiperalgesia periférica induzida por CXCL-1 em camundongos.

Outro mediador liberado após estímulo a carragenina no tecido é o CXCL-1. A Figura 12 representa a avaliação desse mediador injetado na pata de camundongos em diferentes doses e tempos. A dose de CXCL-1 (1 pg) não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle (salina), em contrapartida as outras doses testadas (0,01 ng, 0,1 ng, 1 ng e 10 ng) apresentaram diferença considerável na redução do limiar. Sendo assim ficou definida a dose de 0,01 pg, uma vez que é a menor dose com redução estatística do limiar, para realização de experimentos subsequentes.

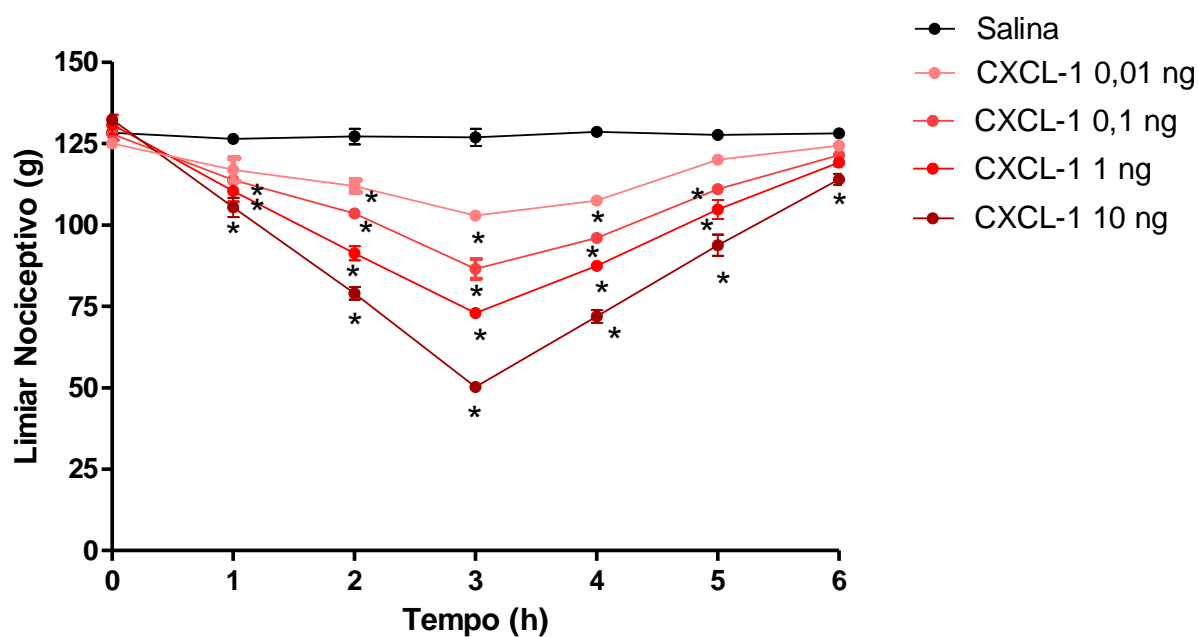


Figura 12 - Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses de CXCL-1. O CXCL-1 foi administrado no tempo 0 (zero). As medidas do limiar nociceptivo foram registradas a cada uma hora até a sexta hora. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle salina.

D- Desenvolvimento temporal da hiperalgesia periférica induzida por IL-1 β em camundongos.

As diferentes doses administradas de IL-1 β e seus efeitos ao longo de seis horas são apresentados na figura 13. Como pode ser observado, a injeção intraplantar deste mediador induz um quadro de hiperalgesia, medido pela redução do limiar nociceptivo. As doses (0,1, 1, 10, e 100), promoveram efeitos pronunciados na redução do limiar. Pode-se observar na mesma figura que além da redução do limiar observa-se que o pico de ação das doses ocorreram na 3^o hora. Dessa maneira, ficou estabelecido que, para experimentos subsequentes, a dose utilizada de IL-1 β foi de 0,1 pg.

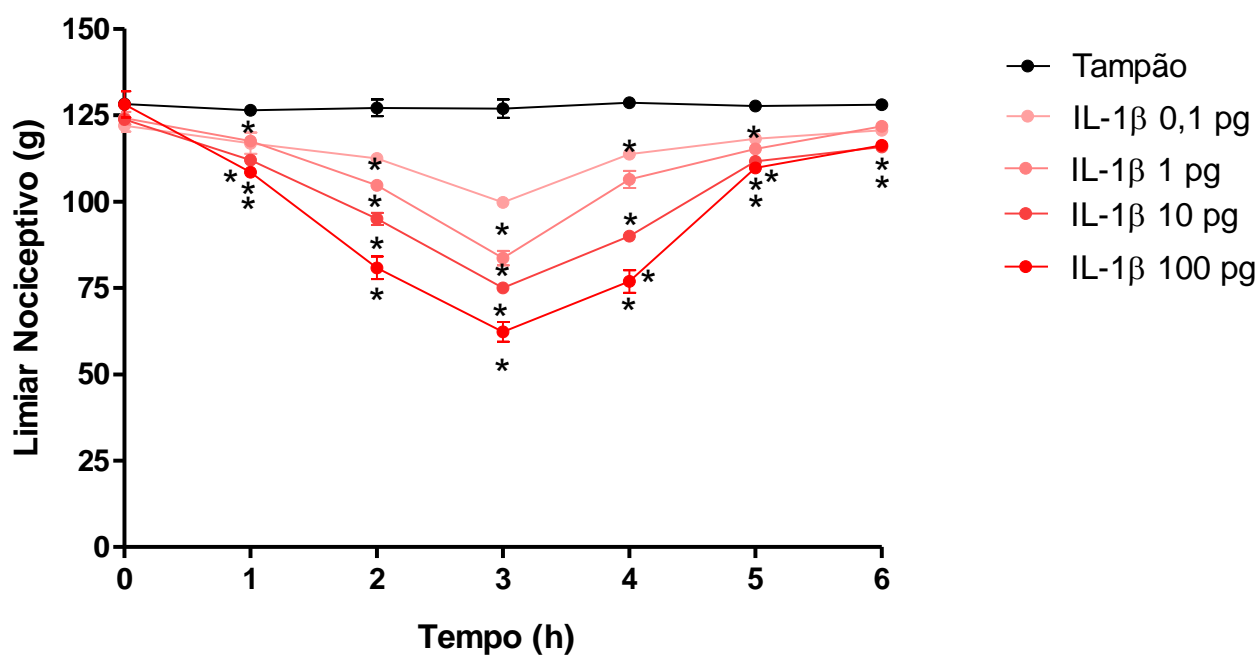


Figura 13 - Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses de IL-1 β . O IL-1 β foi administrado no tempo 0 (zero). As medidas do limiar nociceptivo foram registradas a cada uma hora até a sexta hora. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle tampão.

E- Desenvolvimento temporal da hiperalgesia periférica induzida por NA em camundongos.

A noradrenalina (NA) é um neurotransmissor que assim como os mediadores citados anteriormente faz parte da cascata da liberação induzida pela carragenina no tecido. Esse neurotransmissor foi injetado em diferentes doses e analisado em diferentes tempos, como apresentado pela figura 14. Pode-se perceber que as diferentes doses da NA (62,5, 125, 250 e 500 ng) apresentaram significativa redução do limiar nociceptivo. Diferentemente de todas as drogas anterior a NA apresentou pico de ação em 5 mim. Ficou estabelecido que, para experimentos subsequentes, a dose utilizada de NA foi de 62,5 ng.

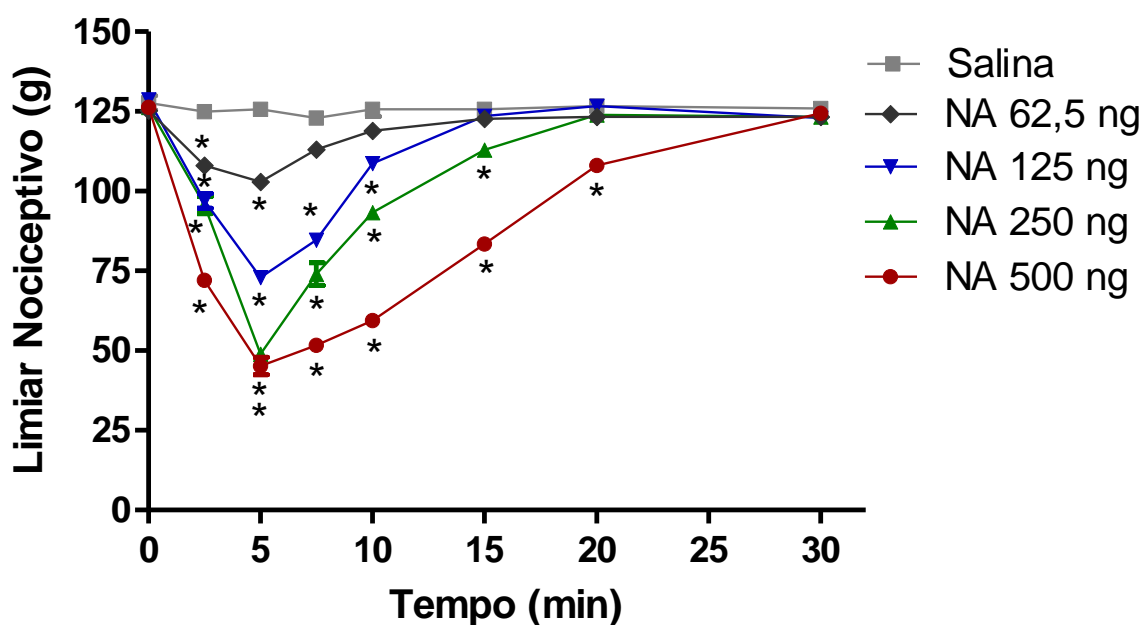


Figura 14 - Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses de noradrenalina (NA). A NA foi administrada no tempo 0 (zero). As medidas do limiar nociceptivo foram registradas a cada cinco minutos até trinta minutos. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle salina.

F- Desenvolvimento temporal da hiperalgesia periférica induzida por PGE₂ em camundongos.

A Prostaglandina (PGE₂) é um importante prostanóide que faz parte da cascata final induzida pela carragenina. A administração de PGE₂ em camundongos leva a um quadro de hiperalgesia, caracterizado pela redução do limiar nociceptivo de forma dose-e-tempo dependente. Como pode ser observada na figura 15, a PGE₂ foi injetada via plantar em diferentes doses e sua cinética de ação foi avaliada. Observa-se que as doses administradas (1, 2 µg/pata) apresentaram diferença estatística quando comparado ao grupo controle (salina). O pico de ação de ambas as doses ocorreram na 3^o hora. Em contrapartida, a dose de 0,5 µg não apresentou significância. Dessa forma, ficou padronizada a dose de 1µg/pata, para realização de experimentos subsequentes.

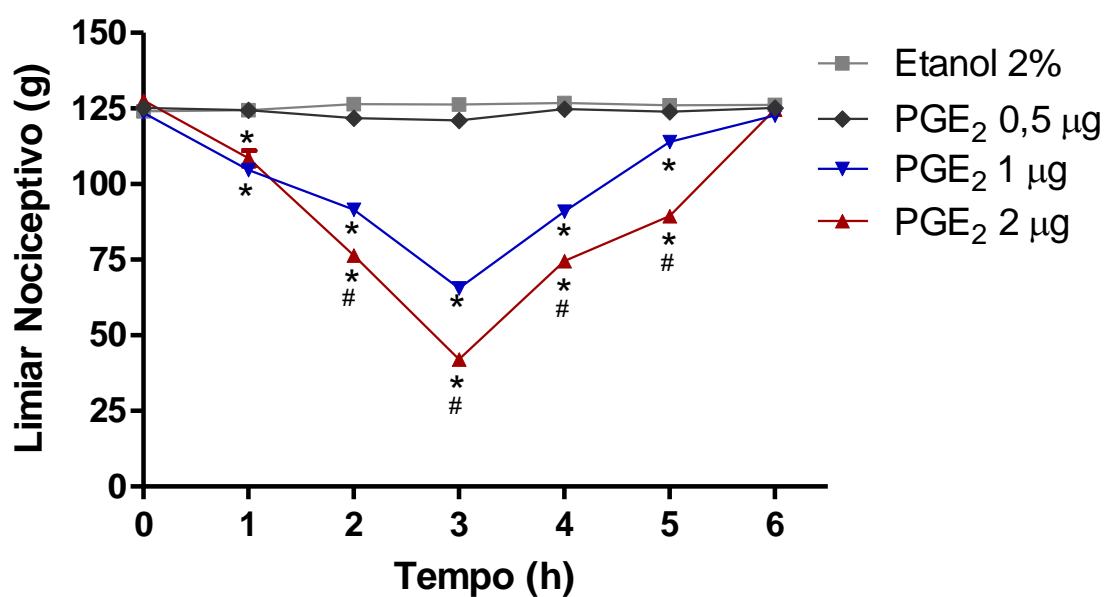


Figura 15 - Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses de prostaglandina (PGE₂). A PGE₂ foi administrada no tempo 0 (zero). As medidas do limiar nociceptivo foram registradas a cada hora até a sexta hora. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais. * indica significância estatística (P < 0,01) em relação ao grupo controle etanol a 2% em salina. # Indica significância estatística (P < 0,001) em relação aos grupos prostaglandinas E₂ 1 e 2 µg.

4.2- Estudo sobre o possível envolvimento de opioides endógenos e dos receptores μ , δ e κ opioides na modulação periférica da dor inflamatória em camundongos produzido pelos diferentes estímulos inflamatórios.

A- Estudo sobre a influência do antagonismo de receptores opioides e da inibição da aminopeptidase, frente à hiperalgesia induzida por carragenina.

Após a administração da naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opioides, nas doses de 25 e 50 $\mu\text{g/pata}$ 2 horas e 30 minutos depois da administração de carragenina (100 $\mu\text{g/pata}$), foi verificada uma intensificação do efeito hiperalgésico da carragenina demonstrado por um aumento do Δ do limiar nociceptivo dos animais, de forma significativa, observado na 3^a hora. Por outro lado, a dose de 12,5 $\mu\text{g/pata}$ de naloxona não apresentou diferença estatística em comparação com o grupo controle. A administração intraplantar da maior dose de naloxona não induziu efeito hiperalgésico por si só (Figura 16, A). Para a exclusão de um efeito sistêmico da naloxona, a carragenina (100 μg) foi administrada na pata posterior direita (PD) e esquerda (PE) dos animais, enquanto a naloxona (50 μg) ou seu veículo foram administradas apenas na PE. A avaliação do limiar nociceptivo na PD demonstrou que, nesta dose, a naloxona não provocou nenhum efeito significativo sobre a hiperalgesia induzida por carragenina, sugerindo que sua ação é local (Figura 16, B).

A administração intraplantar de clocinnamox, nas doses de 10, 20 e 40 μg , (Figura 17 A) ou naltrindole, nas doses de 15, 30 e 60 μg , (Figura 19 A), antagonistas seletivos dos receptores μ e δ opioides, respectivamente, 2 horas e 30 minutos depois da administração de carragenina (100 $\mu\text{g/pata}$), intensificou o efeito hiperalgésico da carragenina demonstrado por um aumento do Δ do limiar nociceptivo dos animais, de forma significativa e dose-dependente, observado na 3^a hora. A administração intraplantar da maior dose de ambos os agentes não induziu efeito hiperalgésico por si só. O mesmo protocolo para a exclusão de um

possível efeito sistêmico da naloxona foi utilizado também para os antagonistas seletivos, sendo verificado que nas maiores doses utilizadas, tanto clocinnamox (40 μ g) quanto naltrindole (60 μ g), induzem seus efeitos a nível local (Figura 17 e 19 B respectivamente).

De maneira similar, a administração intraplantar do antagonista seletivo dos receptores κ opioides, nor-binaltorfimina (NOR BNI), no mesmo protocolo de tempo e na dose de 200 μ g/pata, foi capaz de alterar o efeito hiperalgésico induzido pela carragenina 100 μ g/pata (Figura 18 A). Para as doses menores (50 e 100 μ g/pata) o NOR BNI não foi capaz de causar hiperalgesia.

A figura 20 mostra que a administração do inibidor de aminopeptidases, bestatina, em diferentes doses (100, 200 e 400 μ g/pata) administradas 30 minutos antes da 3ª hora induziu uma redução significativa do Δ do limiar nociceptivo em relação ao grupo carragenina (200 μ g/pata) de forma dose-dependente indicando um efeito antinociceptivo. A bestatina, administrada isoladamente na ausência de inflamação, não induziu alteração no limiar nociceptivo dos animais (mesma figura). Bestatina (400 μ g) ou seu veículo na pata posterior esquerda dos animais não alterou de forma significativa o limiar nociceptivo em resposta à administração de carragenina 200 μ g na pata direita, sugerindo que nesta dose, a redução do Δ do limiar nociceptivo induzido pela bestatina envolve mecanismos locais (Figura 20 B).

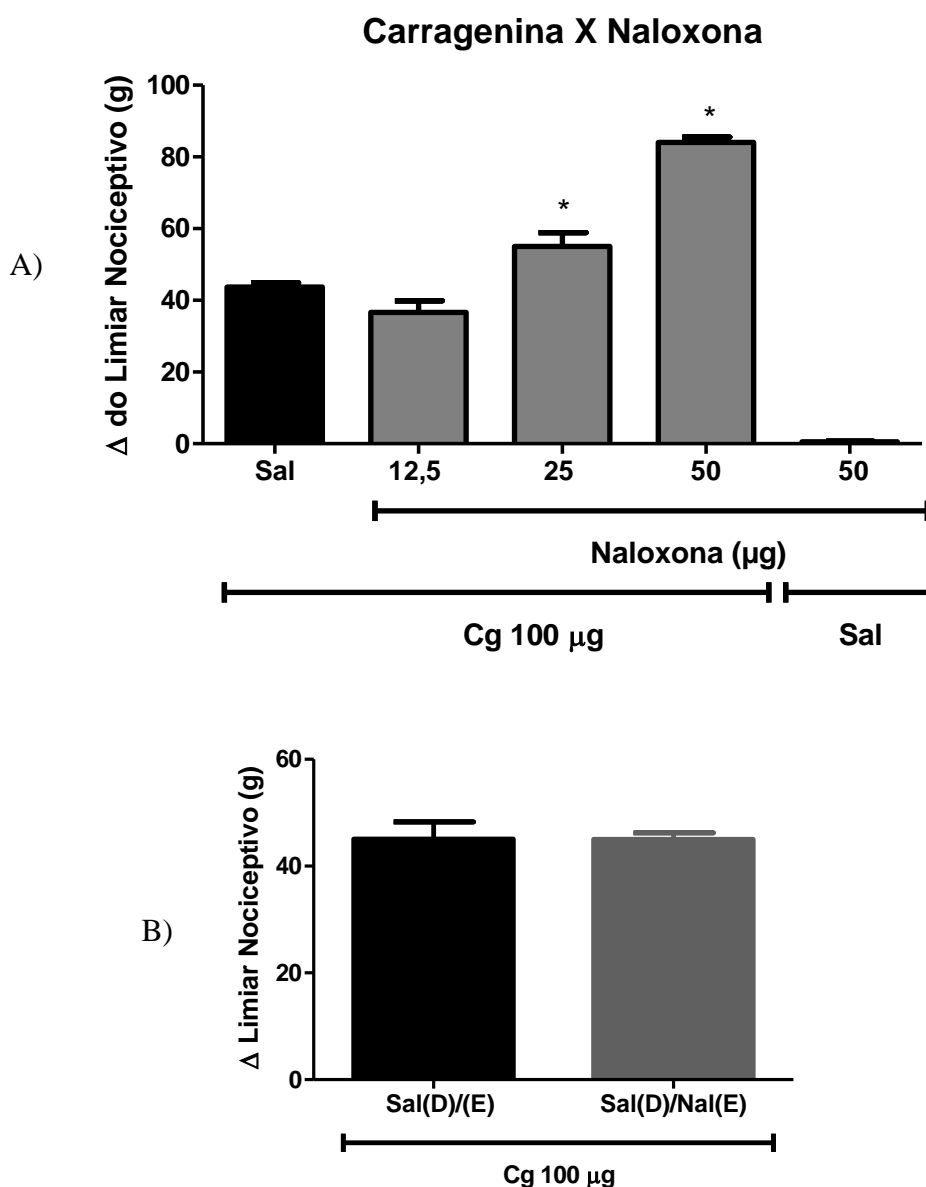


Figura 16 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de naloxona (Nal) sobre a hiperalgesia induzida por carragenina (Cg). A naloxona foi administrada 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle carragenina 100 μg + Salina (Cg 100 μg +Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pela naloxona (Nal; 50 μg /pata). A naloxona ou salina (Sal) foram injetadas respectivamente nas patas posteriores esquerda (PE) ou direita (PD) 30 minutos antes da 3^a hora e a medida realizada na pata direita. Cada

barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

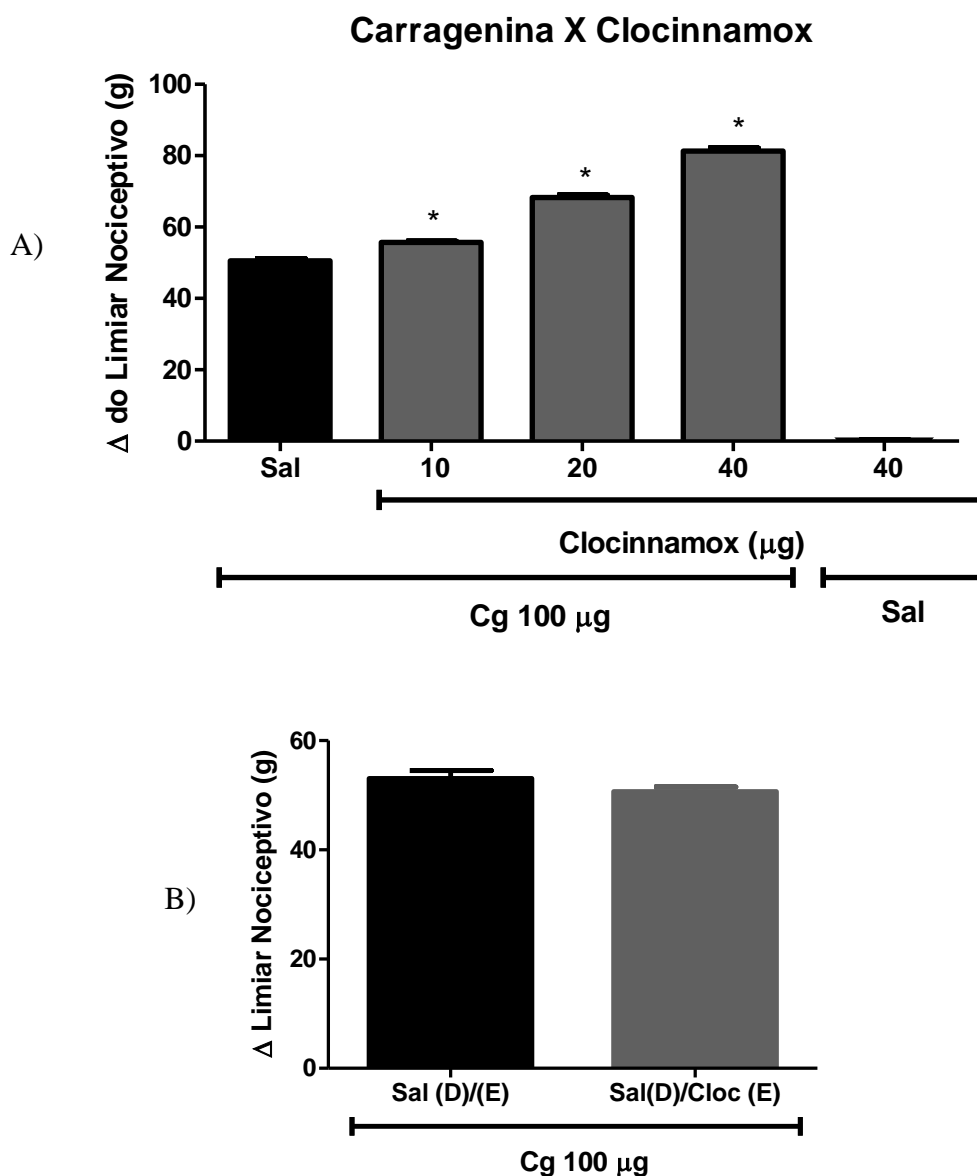


Figura 17 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de clocinnamox (Cloc) sobre a hiperalgesia induzida por carragenina (Cg). O clocinnamox foi administrado 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle carragenina 100 μg + Salina (Cg 100 μg +Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pelo clocinnamox (Cloc; 40 μg /pata). O clocinnamox ou salina (Sal) foram injetadas respectivamente nas patas posteriores esquerda (PE) ou direita (PD) 30 minutos antes da 3^a hora e a medida realizada na

pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

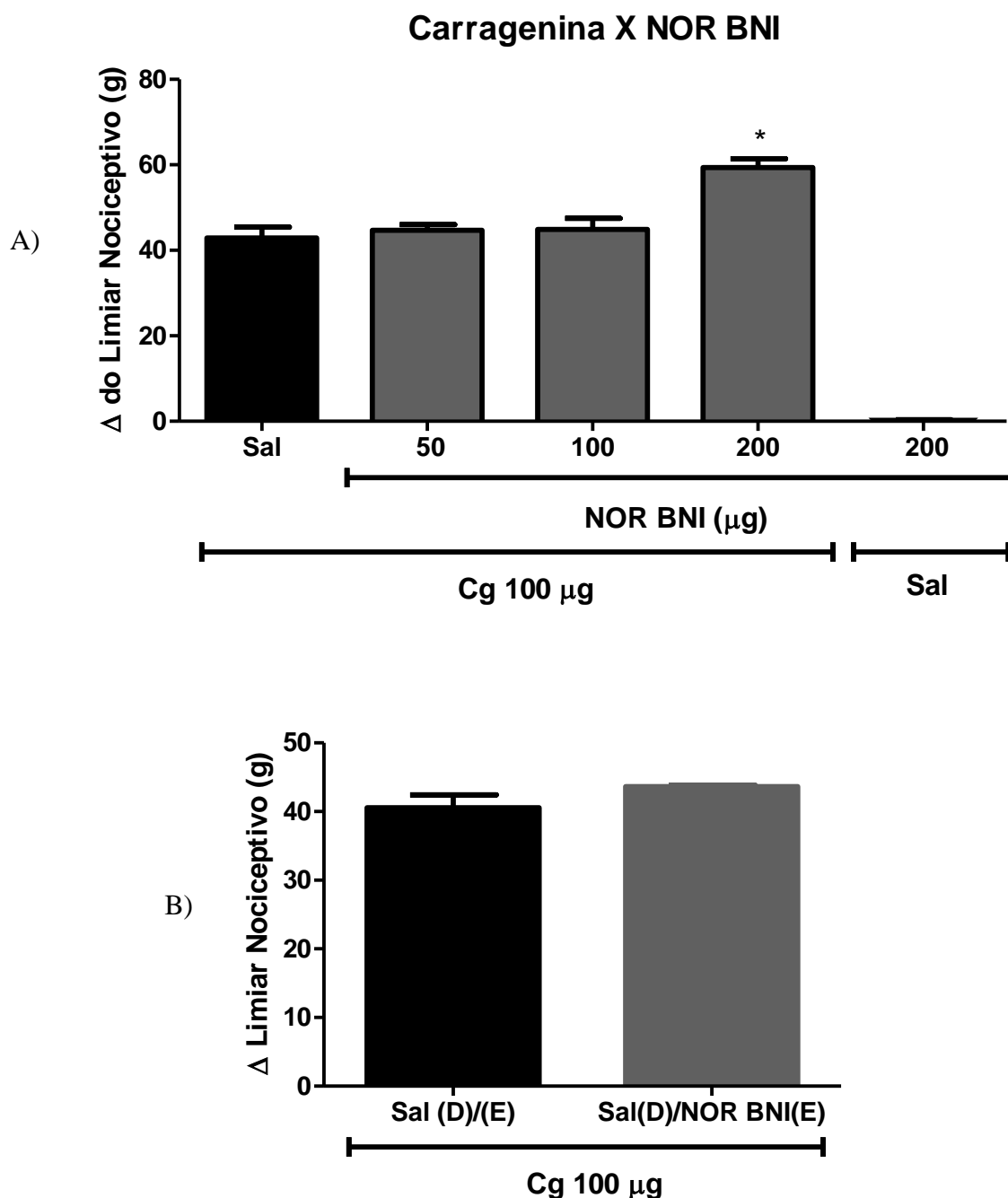


Figura 18 - (A) Efeito induzido da injeção intraplantar de nor-binaltorfimina (Nor BNI; 100 μ g) sobre a hiperalgesia induzida por carragenina (Cg). O Nor BNI foi administrado 30 min antes da 3ª hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle carragenina 100 μ g + Salina (Cg 100 μ g+Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pelo nor-binaltorfimina (Nor BNI; 200 μ g/pata). O Nor BNI ou salina (Sal) foram injetados

respectivamente nas patas posterior esquerda (PE) ou (PD) 30 minutos antes da 3ª hora e a medida realizada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

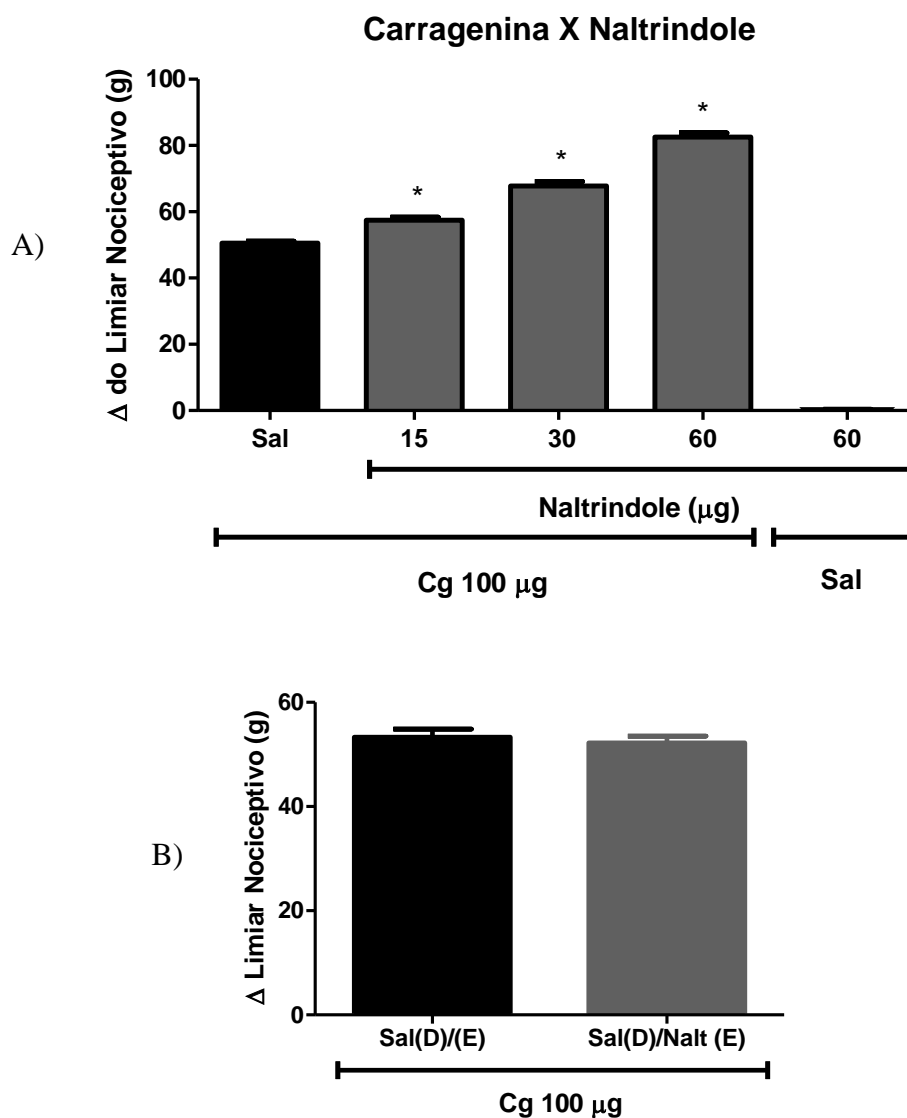


Figura 19 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de naltrindole (Nalt) sobre a hiperalgesia induzida por carragenina (Cg). O naltrindole foi administrado 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle carragenina 100 μg + Salina (Cg 100 μg +Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pelo naltrindole (Nalt; 60 μg /pata). O naltrindole ou salina (Sal) foram injetados respectivamente nas patas posterior esquerda (PE) ou (PD) 30 minutos antes da 3^a hora e a medida realizada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

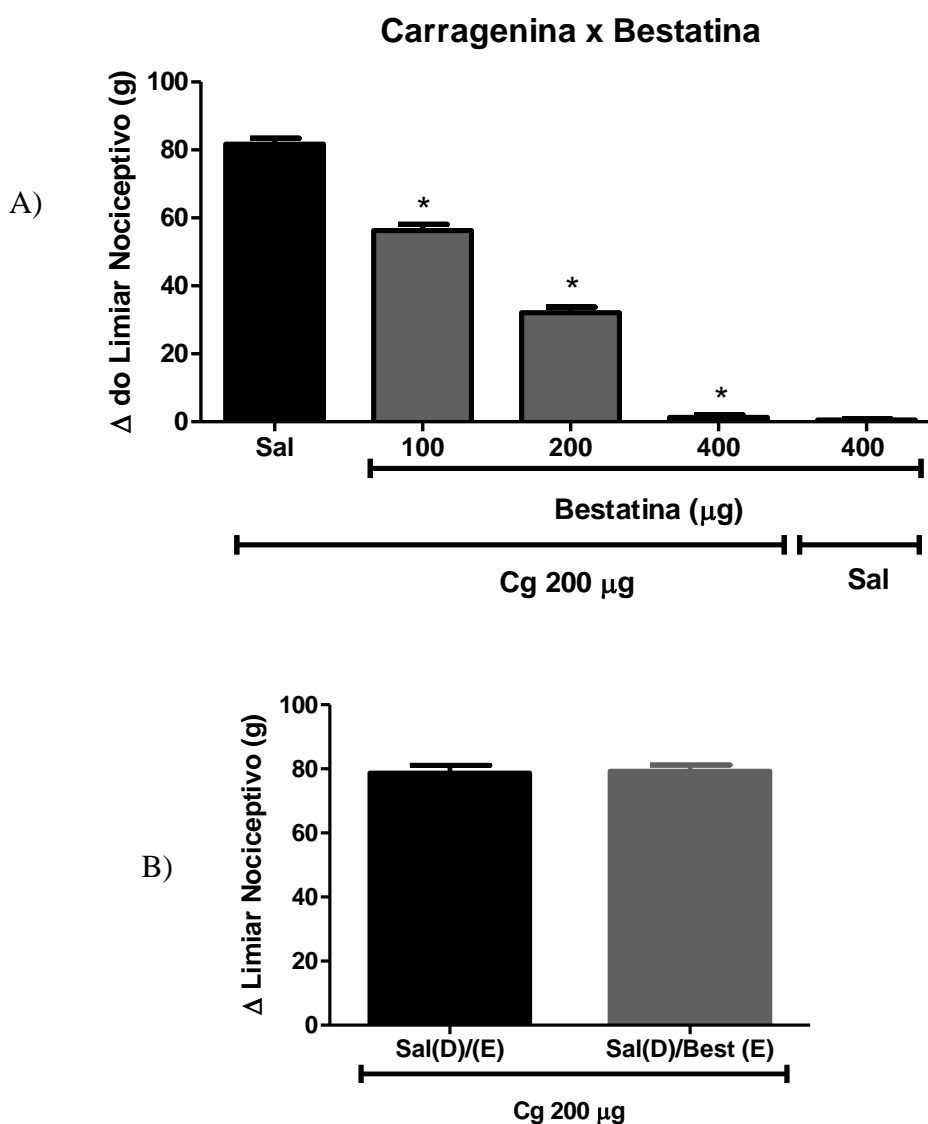


Figura 20 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de bestatina (Best) sobre a hiperalgesia induzida por carragenina (Cg; $200 \mu\text{g/pata}$). A bestatina foi administrada 30 min antes da 3ª hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em grammas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,001$) em relação ao grupo controle carragenina $200 \mu\text{g} + \text{Salina}$ (Cg $200\mu\text{g} + \text{Sal}$). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pela bestatina (Best; $400 \mu\text{g/pata}$). A bestatina ou salina (Sal) foram injetadas respectivamente nas patas posterior esquerda (PE) ou (PD) 30 minutos antes da 3ª hora e a medida registrada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em grammas (g), referente a 4 animais.

B- Estudo sobre a influência do antagonismo de receptores opioides e aminopeptidases, frente a hiperalgesia induzida por TNF- α .

A naloxona, nas doses de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/pata}$ 2 horas e 30 minutos depois da administração de TNF- α (100 pg/pata) intensificou o efeito hiperalgésico demonstrado por um aumento do Δ do limiar nociceptivo dos animais, de forma significativa, observado na 3ª hora. Já, a dose de 12,5 $\mu\text{g/pata}$ de naloxona não apresentou diferença estatística em comparação com o grupo controle (Figura 21 A). Para a exclusão de um efeito sistêmico da naloxona, o TNF- α (100 pg) foi administrado na pata posterior direita (PD) e esquerda (PE) dos animais, enquanto a naloxona (50 μg) e seu veículo foram administradas respectivamente na PE e PD. A avaliação do limiar nociceptivo na PD demonstrou que, nesta dose, a naloxona não provocou nenhum efeito significativo sobre a hiperalgesia induzida por TNF- α , sugerindo que sua ação é local (Figura 21 B).

A administração intraplantar de clocinnamox (20 e 40 μg), Nor BNI (200 μg) e naltrindole (60 μg), antagonistas seletivos dos receptores μ , κ e δ opioides respectivamente, 2 horas e 30 minutos depois da administração de TNF- α (100 pg/pata), intensificou o efeito hiperalgésico do TNF- α demonstrado por um aumento do Δ do limiar nociceptivo dos animais, de forma significativa, observado na 3ª hora. O protocolo para a exclusão de um possível efeito sistêmico da droga foi utilizado também para os antagonistas seletivos, sendo verificado que na maior dose utilizada, tanto clocinnamox, Nor BNI quanto naltrindole, induzem seus efeitos a nível local (Figuras 22, 23 e 24, respectivamente).

A figura 25 mostra que a administração do inibidor de aminopeptidases, bestatina, na dose de 400 $\mu\text{g/pata}$ administrada 30 minutos antes da 3ª hora induziu uma redução significativa do Δ do limiar nociceptivo em relação ao grupo controle (TNF- α + salina). Bestatina (400 μg) ou seu veículo na pata posterior esquerda dos animais não alterou de forma significativa o limiar nociceptivo em resposta à administração de TNF- α 100 pg na pata

direita, sugerindo que nesta dose, a redução do Δ do limiar nociceptivo induzido pela bestatina envolve mecanismos locais (Figura 25 B).

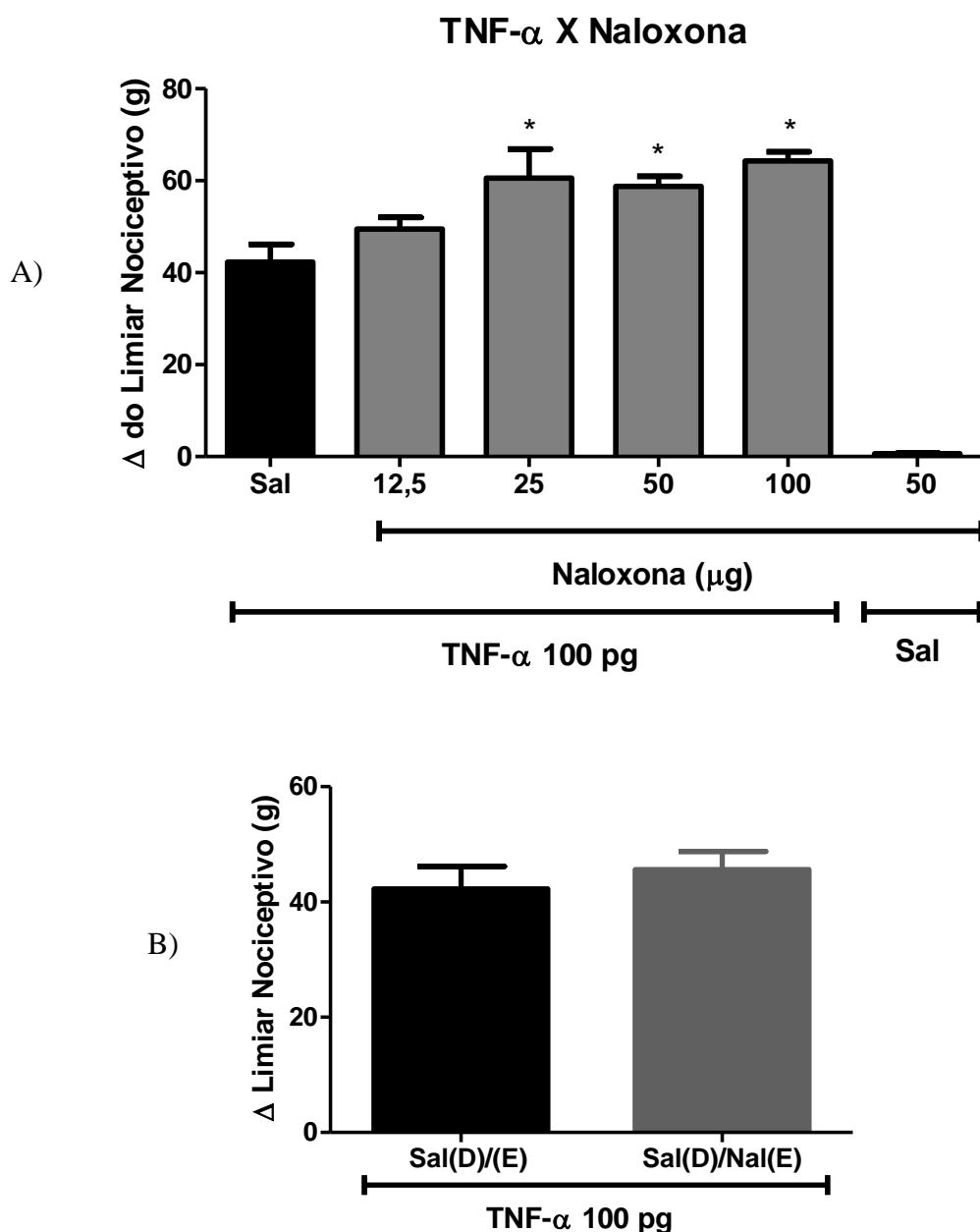


Figura 21 - (A) Efeito induzido da injeção intraplantar de diferentes doses (μ g) de naloxona (Nal) sobre a hiperalgesia induzida por TNF- α (100 pg). A naloxona foi administrada 30 min antes da 3ª hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle Salina (TNF- α 100 pg + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pela naloxona (Nal; 50 μ g/pata). A naloxona ou salina (Sal) foram injetadas respectivamente nas patas posterior esquerda

(PE) ou (PD) 30 minutos antes da 3ª hora e a medida realizada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

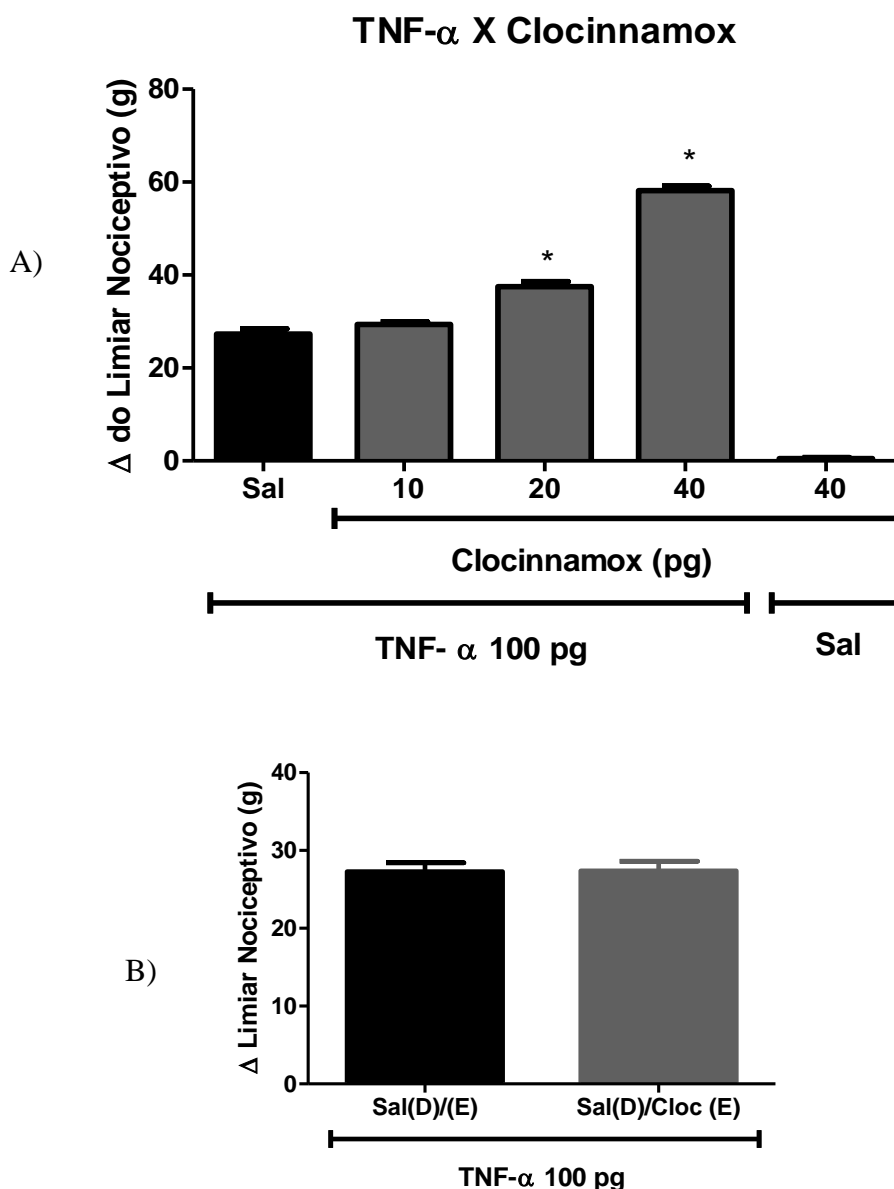


Figura 22 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μ g) de Clocinnamox (Cloc) sobre a hiperalgesia induzida por TNF- α (100 pg). O clocinnamox foi administrado 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo Salina (TNF- α 100 pg + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pelo clocinnamox (Cloc; 40 μ g/pata). O clocinnamox ou salina (Sal) foram injetadas nas patas posterior esquerda (PE) ou (PD) 30 minutos antes da 3^a hora e a medida realizada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

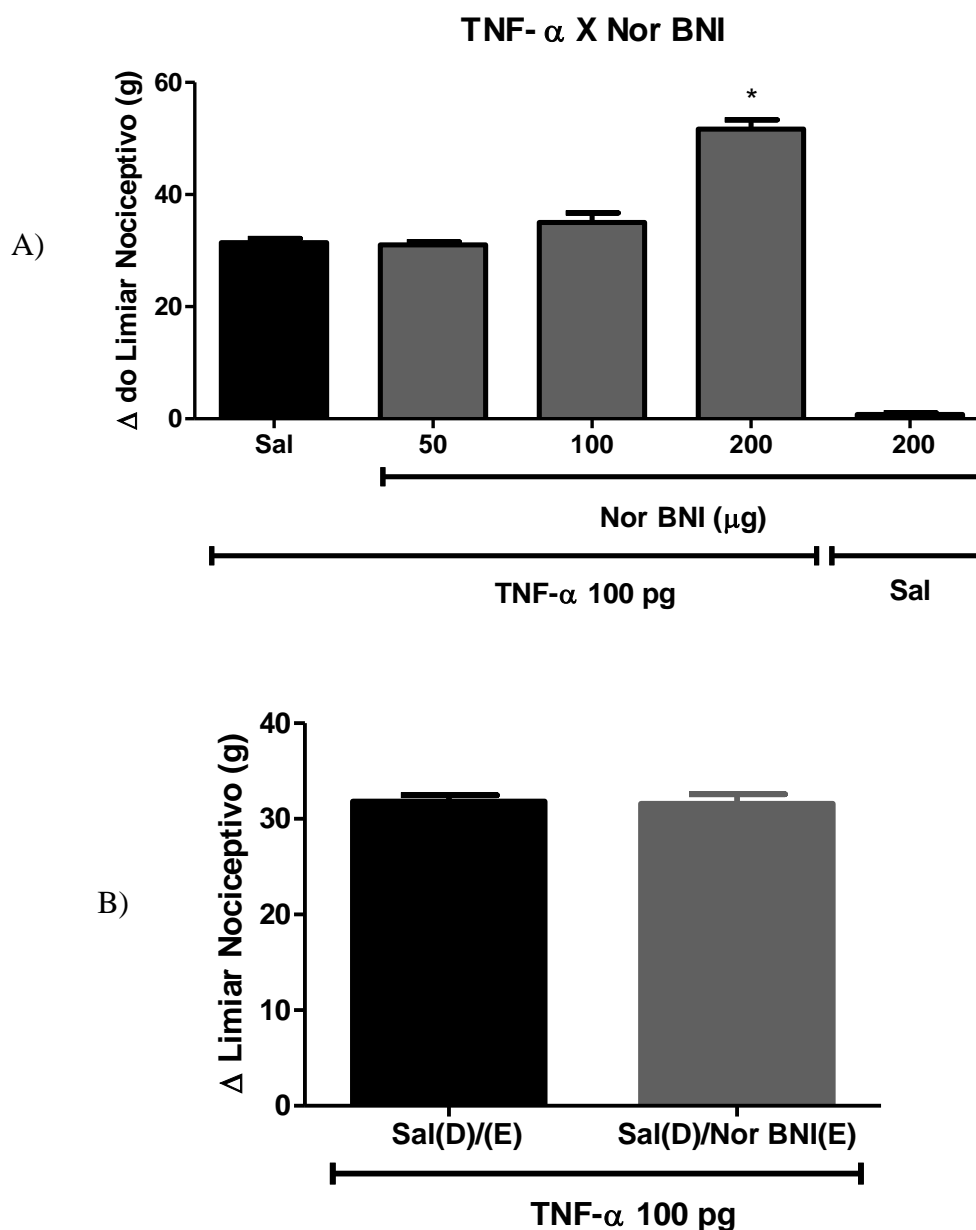


Figura 23 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μ g) de Norbinaltorfimina (Nor BNI) sobre a hiperalgesia induzida por TNF- α (100 pg). O Nor BNI foi administrado 30 min antes da 3ª hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle Salina (TNF- α 100 pg + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pelo Nor BNI (200 μ g/pata). O Nor BNI ou salina (Sal) foram injetados respectivamente nas patas posterior esquerda (PE)

ou direita (PD) 30 minutos antes da 3ª hora e a medida realizada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

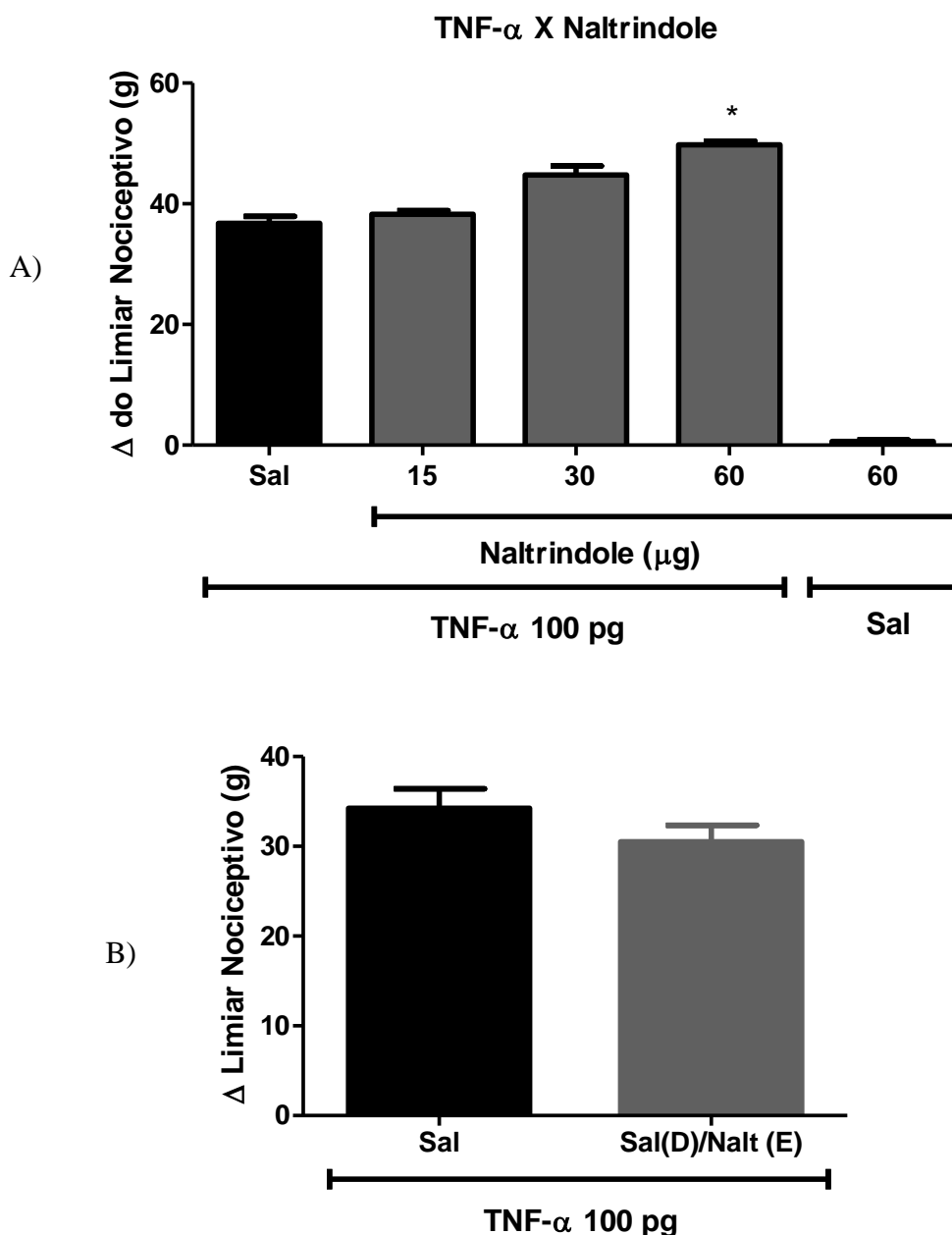


Figura 24 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μ g) de Naltrindole (Nalt) sobre a hiperalgesia induzida por TNF- α (100 pg). O Naltrindole foi administrado 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle Salina (TNF- α 100 pg + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pelo Naltrindole (60 μ g/pata). O Naltrindole ou salina (Sal) foram injetadas respectivamente nas patas posterior esquerda (PE) ou

direita (PD) 30 minutos antes da 3^a hora e a leitura realizada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

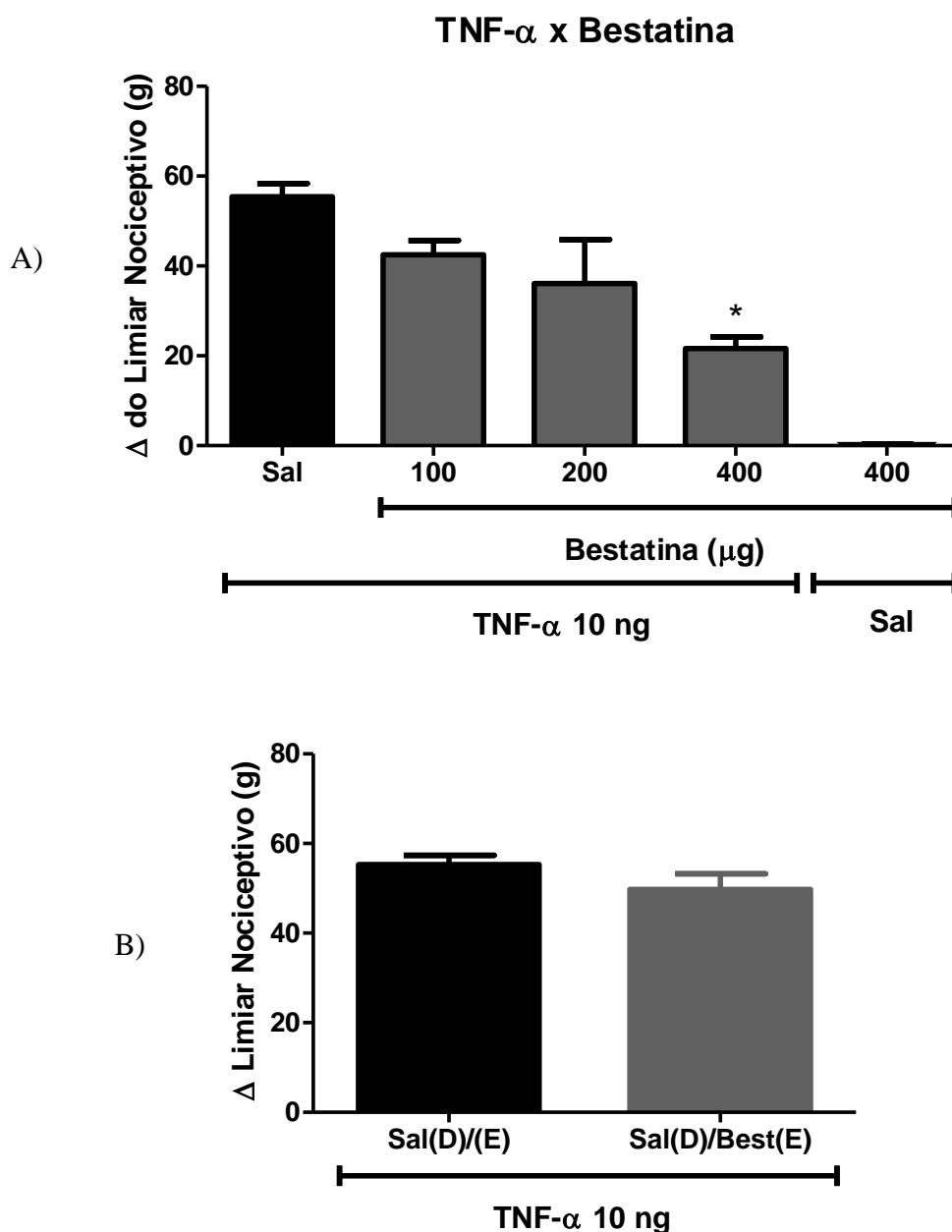


Figura 25 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μ g) de Bestatina (Best) sobre a hiperalgesia induzida por TNF- α (10 ng). A bestatina foi administrada 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle Salina (TNF- α 10 pg + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pela bestatina (400 μ g/pata). A bestatina ou salina (Sal) foram injetadas respectivamente nas patas posterior esquerda (PE) ou direita

(PD) 30 minutos antes da 3^a hora e a medida realizada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

C- Estudo sobre a influência do antagonismo de receptores opioides e aminopeptidases, frente a hiperalgesia induzida por CXCL-1.

Quando administrada a naloxona, nas doses de 25 e 50 µg/pata 2 horas e 30 minutos depois da administração de CXCL-1 (10 pg/pata) verificou-se um aumento do efeito hiperalgésico deste mediador inflamatório, demonstrado por um aumento do Δ do limiar nociceptivo dos animais, de forma significativa, observado na 3ª hora. Entretanto, a dose de 12,5 µg/pata de naloxona não apresentou diferença estatística em comparação com o grupo controle (Figura 26 A). Para a exclusão de um efeito sistêmico da naloxona, o CXCL-1 (10 pg) foi administrado na pata posterior direita (PD) e esquerda (PE) dos animais, já a naloxona (50 µg) ou seu veículo foram administradas respectivamente nas patas posteriores esquerda (PE) ou direita (PD). A avaliação do limiar nociceptivo na PD demonstrou que, nesta dose, a naloxona não provocou nenhum efeito significativo sobre a hiperalgesia induzida por carragenina, sugerindo que sua ação seja periférica (Figura 26 B).

Semelhante, a administração intraplantar de clocinnamox (20 e 40 µg), Nor BNI (100 e 200 µg) e naltrindole (30 e 60 µg), antagonistas seletivos dos receptores μ , κ e δ opioides respectivamente, 2 horas e 30 minutos depois da administração de CXCL-1 (10 pg/pata), intensificou o efeito hiperalgésico do CXCL-1 demonstrado por um aumento do Δ do limiar nociceptivo dos animais, de forma significativa, observado na 3ª hora. O protocolo para a exclusão de um possível efeito sistêmico da droga foi utilizado também para os antagonistas seletivos, sendo verificado que na maior dose utilizada, todos induzem seus efeitos a nível local (Figuras 27, 28 e 29 B, respectivamente).

Já a figura 30 (A) mostra que a administração do inibidor de aminopeptidases bestatina (200 e 400 µg/pata) administradas, 30 minutos antes da 3ª hora, induziu uma redução significativa do Δ do limiar nociceptivo em relação ao grupo salina. Bestatina (400 µg) ou seu veículo na pata posterior esquerda dos animais não alterou de forma significativa o

limiar nociceptivo em resposta à administração de CXCL-1 (10 pg), na pata direita, sugerindo que nesta dose, a redução do Δ do limiar nociceptivo induzido pela bestatina envolve mecanismos periféricos (Figura 30 B).

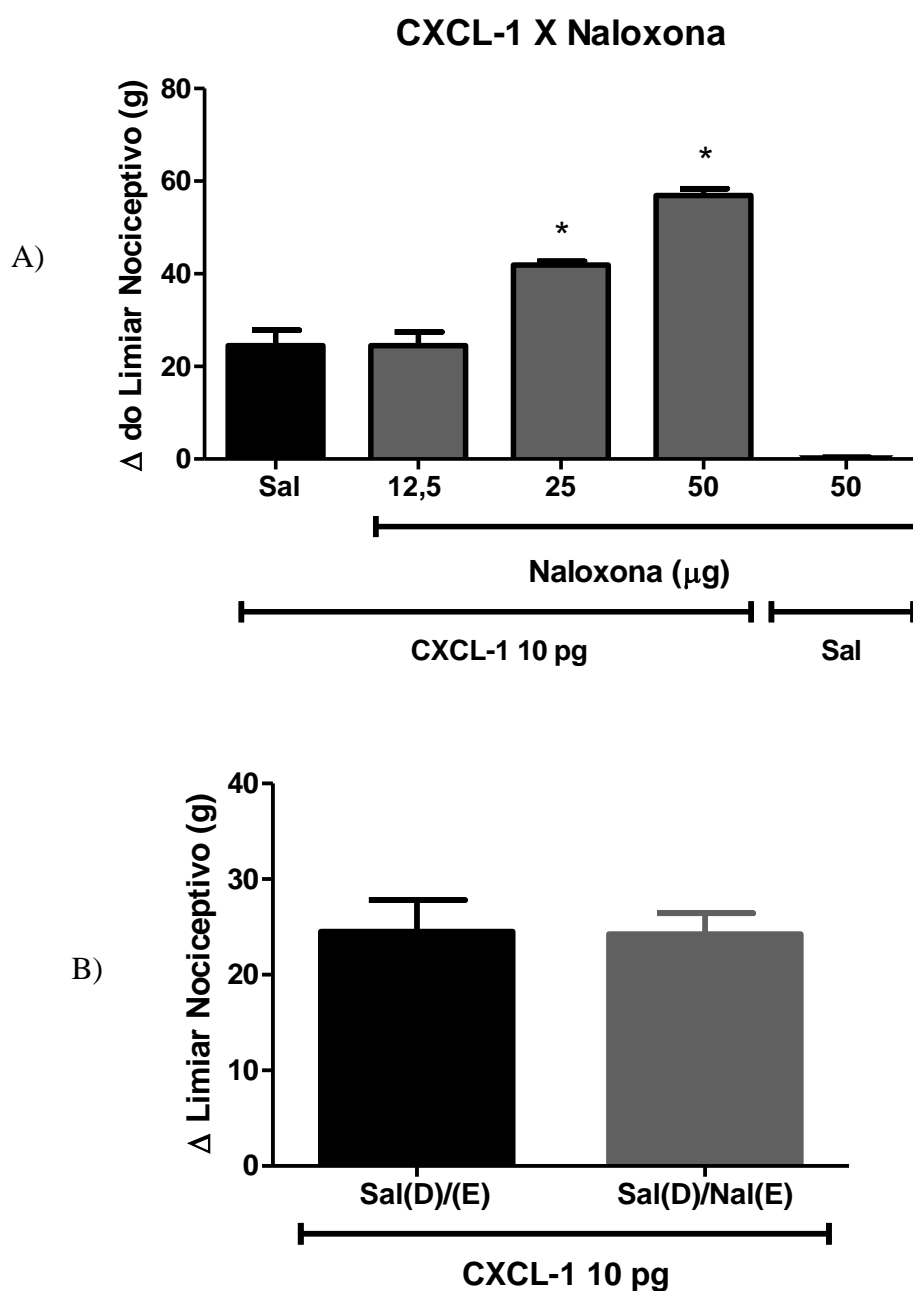


Figura 26 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de naloxona (Nal) sobre a hiperalgesia induzida por CXCL-1 (10 pg). A naloxona foi administrada 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle Salina (CXCL-1 10 pg + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pela naloxona (Nal; 50 μg /pata). A naloxona ou salina (Sal) foram injetadas nas patas posteriores esquerda (PE) ou direita (PD) 30

minutos antes da 3ª hora e a medida realizada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

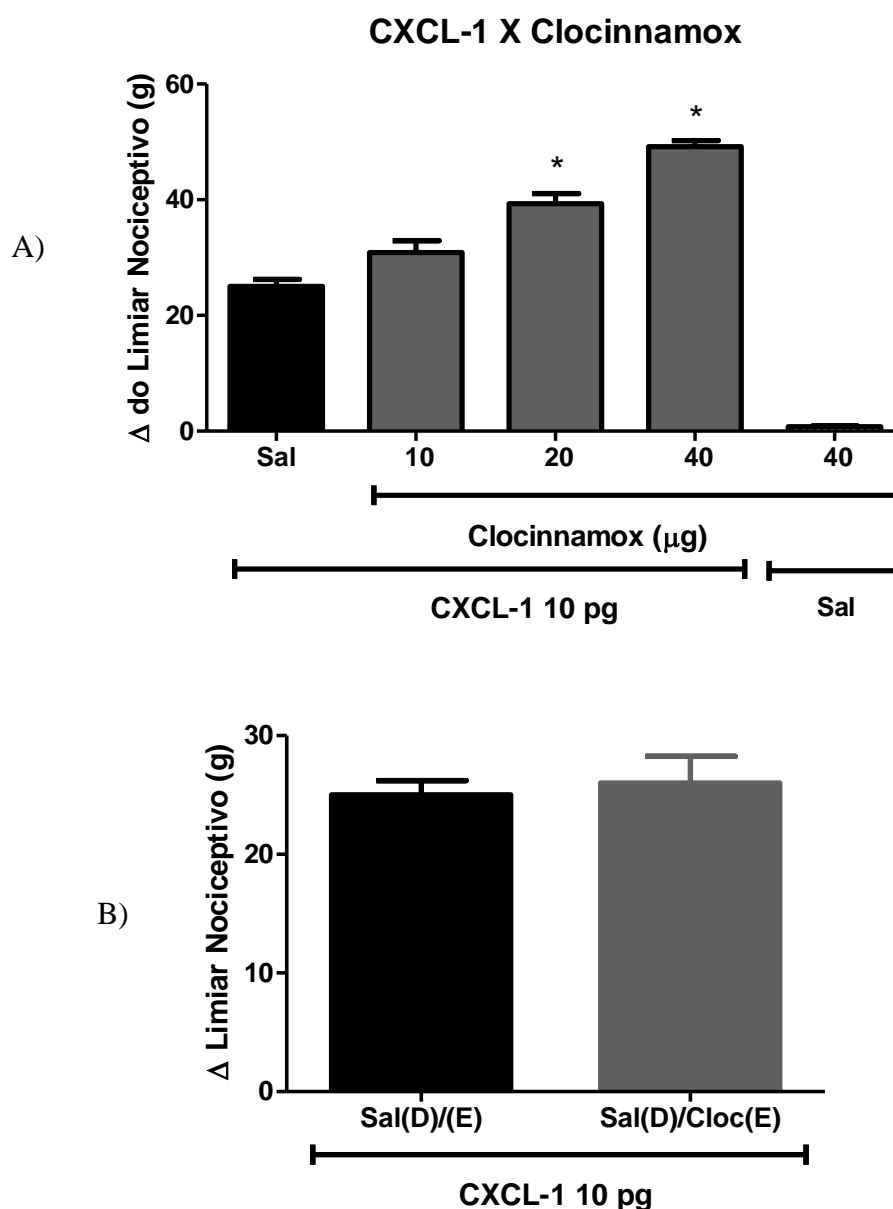


Figura 27 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de Clocinnamox (Cloc) sobre o efeito hiperalgésico induzido por CXCL-1 (10 pg). O clocinnamox foi administrado 30 min antes da 3ª hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo Salina (CXCL-1 10 pg + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pelo clocinnamox (Cloc; 40 μg /pata). O clocinnamox ou salina (Sal) foram injetados respectivamente nas patas posteriores esquerda (PE) ou direita (PD) 30 minutos antes da 3ª hora e a medida realizada na pata direita. Cada

barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

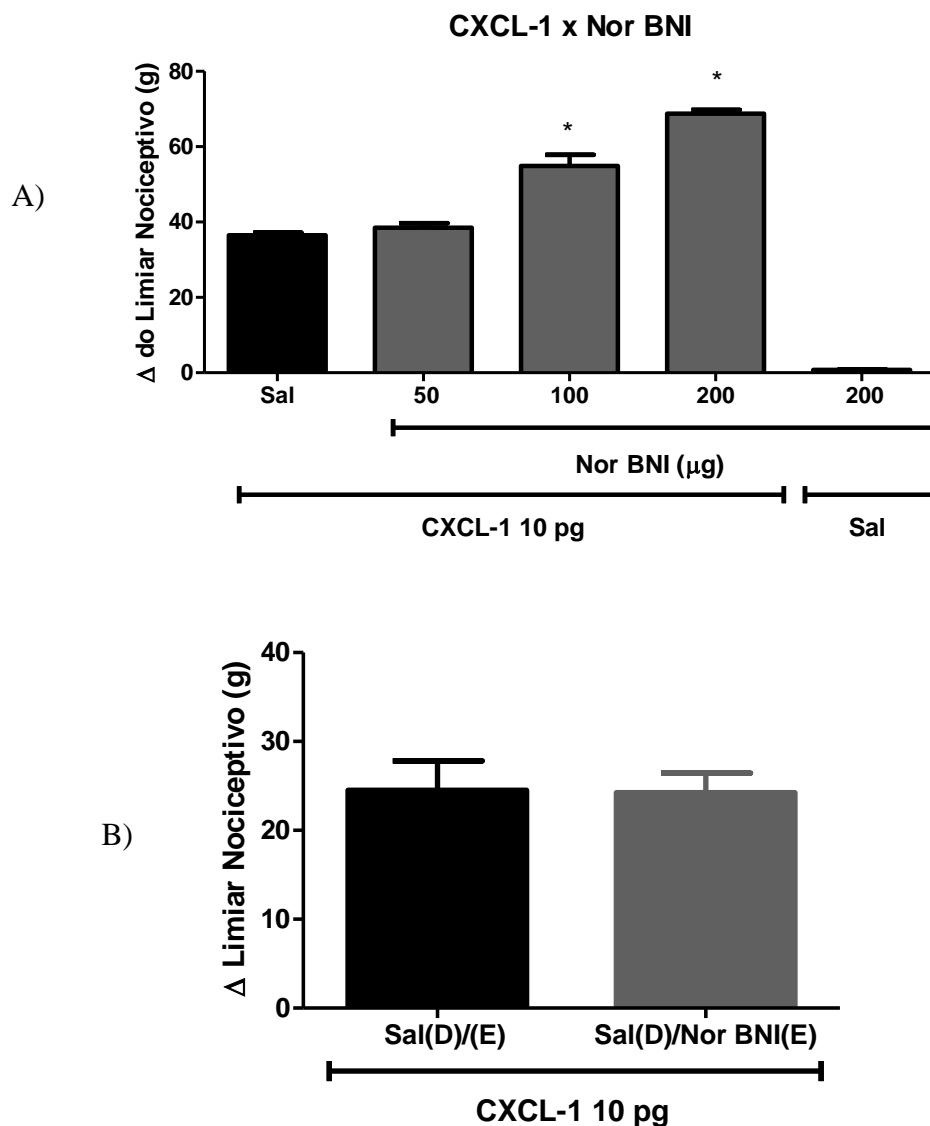


Figura 28 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de Norbinaltorfimina (Nor BNI) sobre a hiperalgesia induzida por CXCL-1 (10 pg). O Nor BNI foi administrado 30 min antes da 3ª hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle Salina (CXCL-1 10 pg + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pelo Nor BNI (200 μg /pata). O Nor BNI ou salina (Sal) foram injetados nas patas posteriores esquerda (PE) ou direita (PD) 30 minutos antes da 3ª hora e a medida realizada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

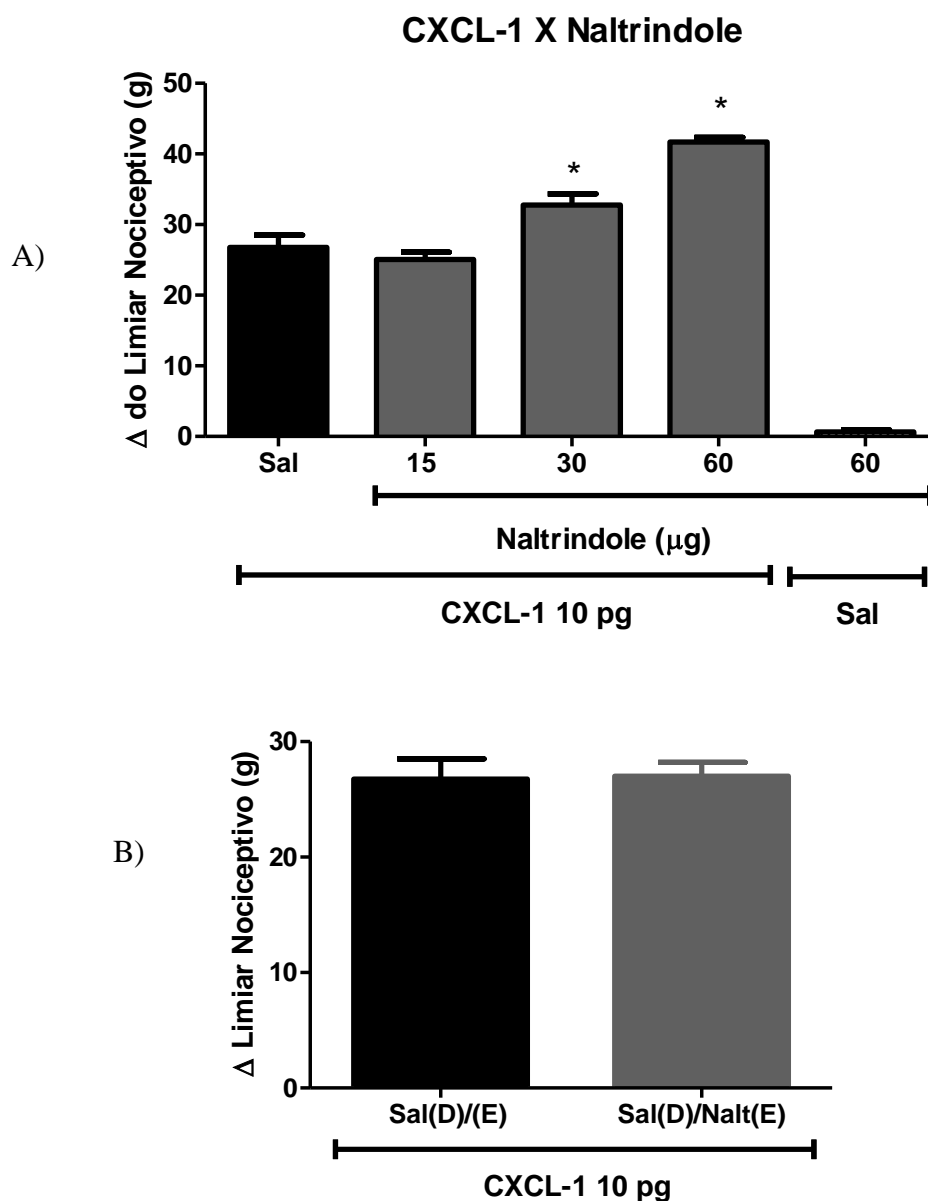


Figura 29 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de Naltrindole (Nalt) sobre a hiperalgesia induzida por CXCL-1 (10 pg). O Naltrindole foi administrado 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle Salina (CXCL-1 10 pg + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pelo Naltrindole (60 μg /pata). O Naltrindole ou salina (Sal) foram injetadas nas patas posteriores esquerda (PE) ou direita (PD) 30 minutos antes da 3^a hora e a medida registrada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

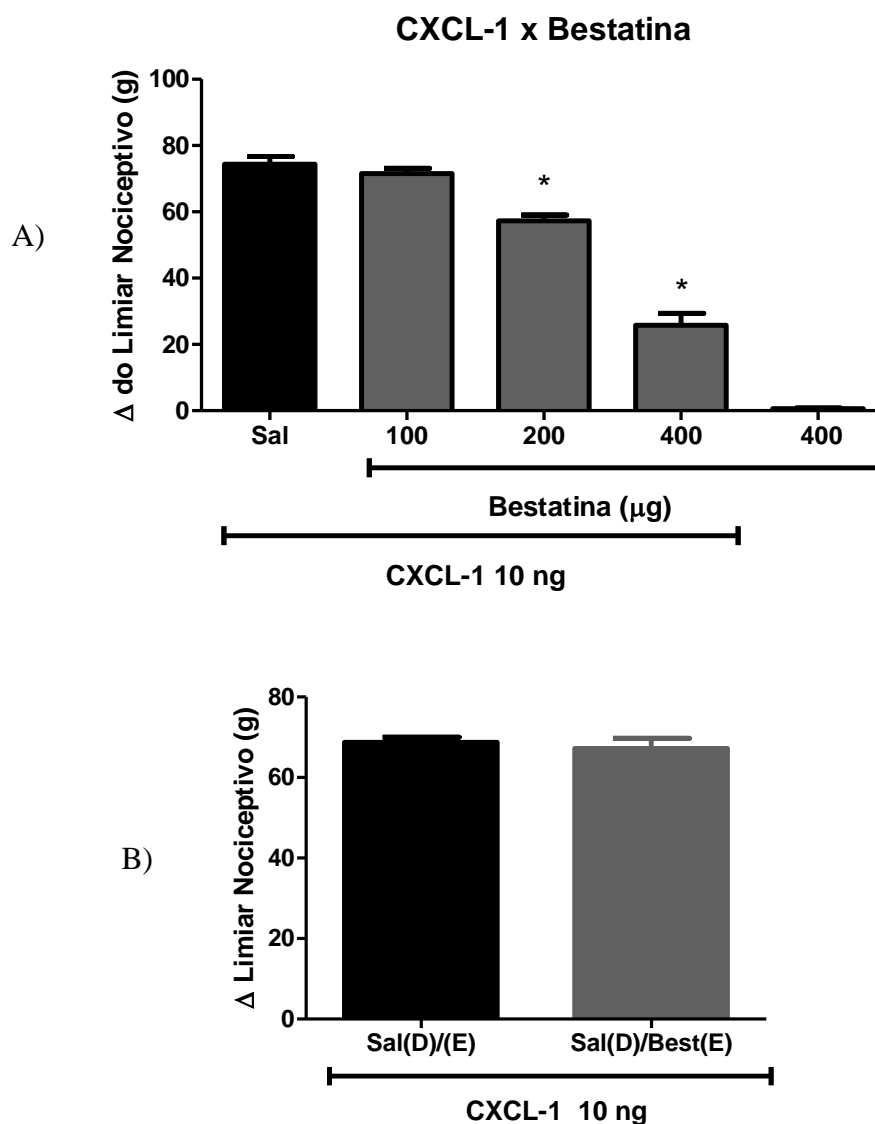


Figura 30 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de Bestatina (Best) sobre a hiperalgesia induzida por CXCL-1 (10 ng). A bestatina foi administrada 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle Salina (CXCL-1 10 ng + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pela bestatina (60 μg /pata). A bestatina ou salina (Sal) foram injetadas respectivamente nas patas posteriores esquerda (PE) ou direita (PD) 30 minutos antes da 3^a hora e a medida realizada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

D- Estudo sobre a influência do antagonismo de receptores opioides e aminopeptidase, frente a hiperalgesia induzida por IL-1 β .

A naloxona, nas doses de 25 e 50 $\mu\text{g/pata}$, 2 horas e 30 minutos depois da administração de IL-1 β (0,1 pg/pata), promoveu uma intensificação do efeito hiperalgésico, observado por um aumento do Δ do limiar nociceptivo dos animais, de forma significativa, observado na 3^a hora. Por outro lado, a dose de 12,5 $\mu\text{g/pata}$ de naloxona não apresentou diferença estatística em comparação com o grupo controle (Figura 31 A). Para a exclusão de um efeito sistêmico da naloxona, o IL-1 β (0,1 pg) foi administrado na pata posterior direita (PD) e esquerda (PE) dos animais, enquanto a naloxona (50 μg) ou seu veículo foram administradas apenas na PE. A avaliação do limiar nociceptivo na PD demonstrou que, nesta dose, a naloxona não provocou nenhum efeito significativo sobre a hiperalgesia induzida por carragenina, sugerindo que sua ação é local (Figura 31 B).

Os antagonistas seletivos clocinnamox (20 e 40 μg), Nor BNI (100 e 200 μg) e naltrindole (30 e 60 μg), também intensificaram o efeito hiperalgésico do IL-1 β (0,1 pg/pata) demonstrado por um aumento do Δ do limiar nociceptivo dos animais, de forma significativa, observado na 3^a hora. A exclusão de um possível efeito sistêmico da droga foi utilizada também para os antagonistas seletivos, sendo verificado que nas maiores doses utilizadas, seus efeitos foram a nível periférico (Figura 32, 33 e 34, respectivamente).

A administração do inibidor de aminopeptidases bestatina, nas doses (100, 200 e 400 $\mu\text{g/pata}$), 30 minutos antes da 3^a hora induziu uma redução significativa do Δ do limiar nociceptivo em relação ao grupo IL-1 β (100 pg) + salina (figura 35). Bestatina (400 μg) ou seu veículo na pata posterior esquerda dos animais não alterou de forma significativa o limiar nociceptivo em resposta à administração de IL-1 β (100 pg), na pata direita, sugerindo que nesta dose, a redução do Δ do limiar nociceptivo induzido pela bestatina envolve mecanismos locais (Figura 35, B).

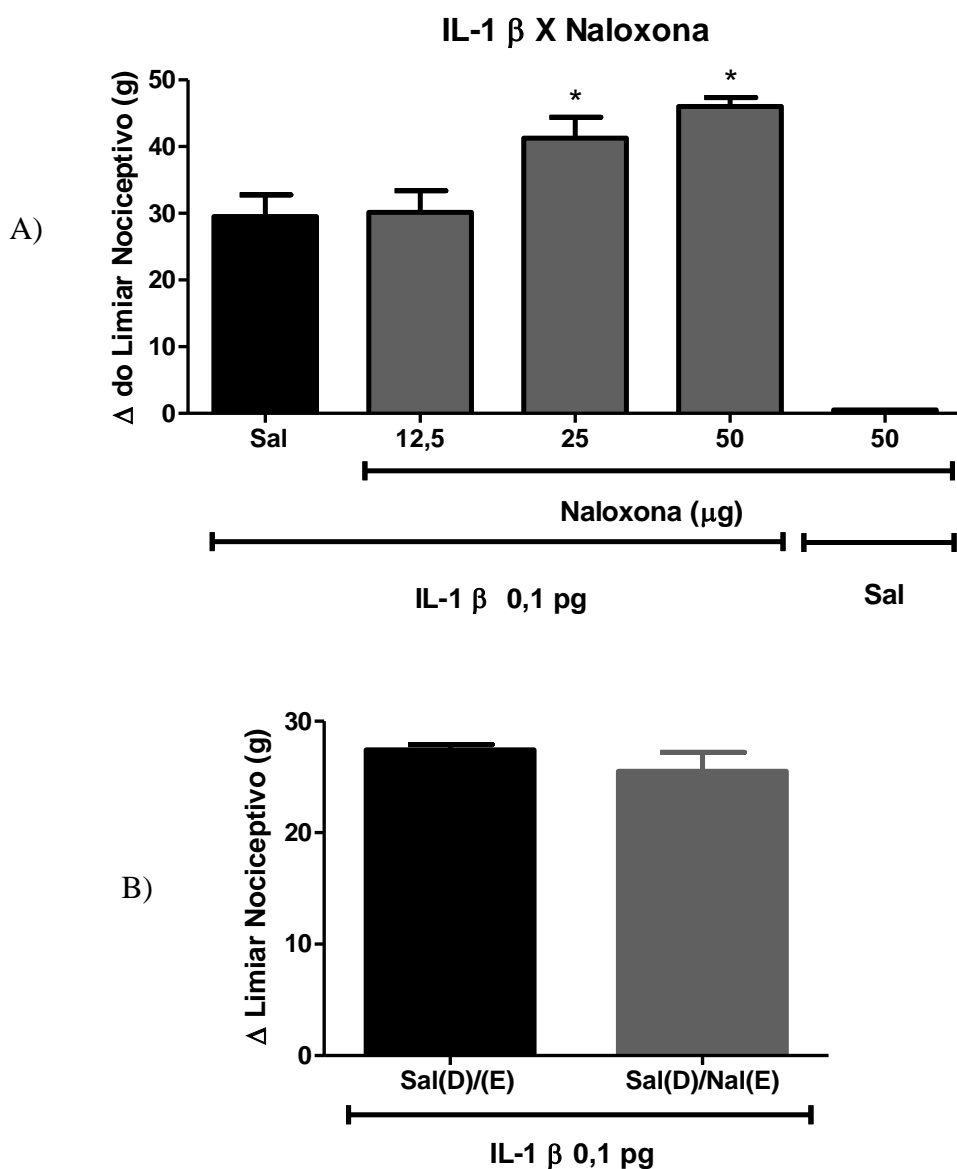


Figura 31 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μ g) de naloxona (Nal) sobre a hiperalgesia induzida por IL1- β (0,1 pg). A naloxona foi administrada 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle Salina (IL1- β 0,1 pg + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pela naloxona (Nal; 50 μ g/pata). A naloxona ou salina (Sal) foram injetadas respectivamente nas patas posteriores esquerda (PE) e direita (PD) 30 minutos antes da 3^a hora e a medida registrada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

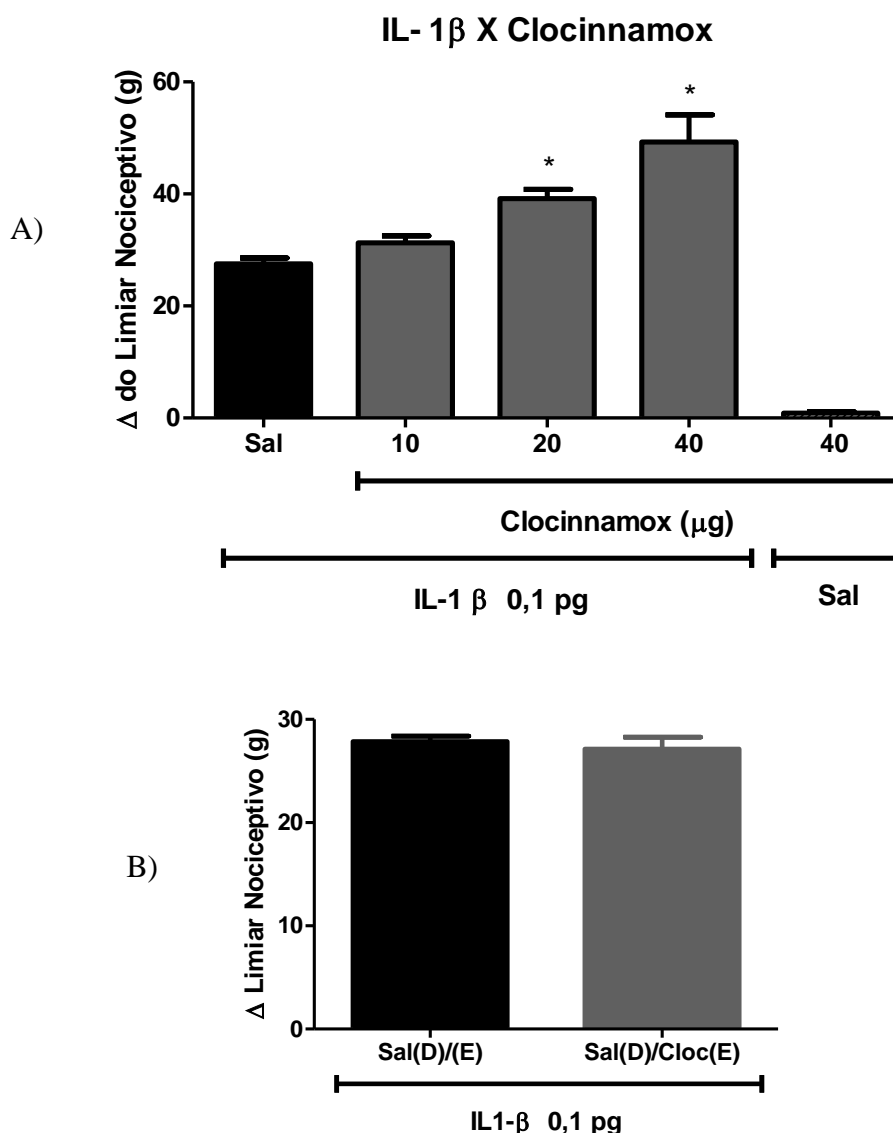


Figura 32 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μ g) de Clocinnamox (Cloc) sobre a hiperalgesia induzida por IL1- β (0,1 pg). O clocinnamox foi administrado 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo salina (IL1- β 0,1 pg + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pelo clocinnamox (Cloc; 40 μ g/pata). O clocinnamox ou salina (Sal) foram injetados respectivamente nas patas posteriores esquerda (PE) e direita (PD) 30 minutos antes da 3^a hora e a medida registrada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

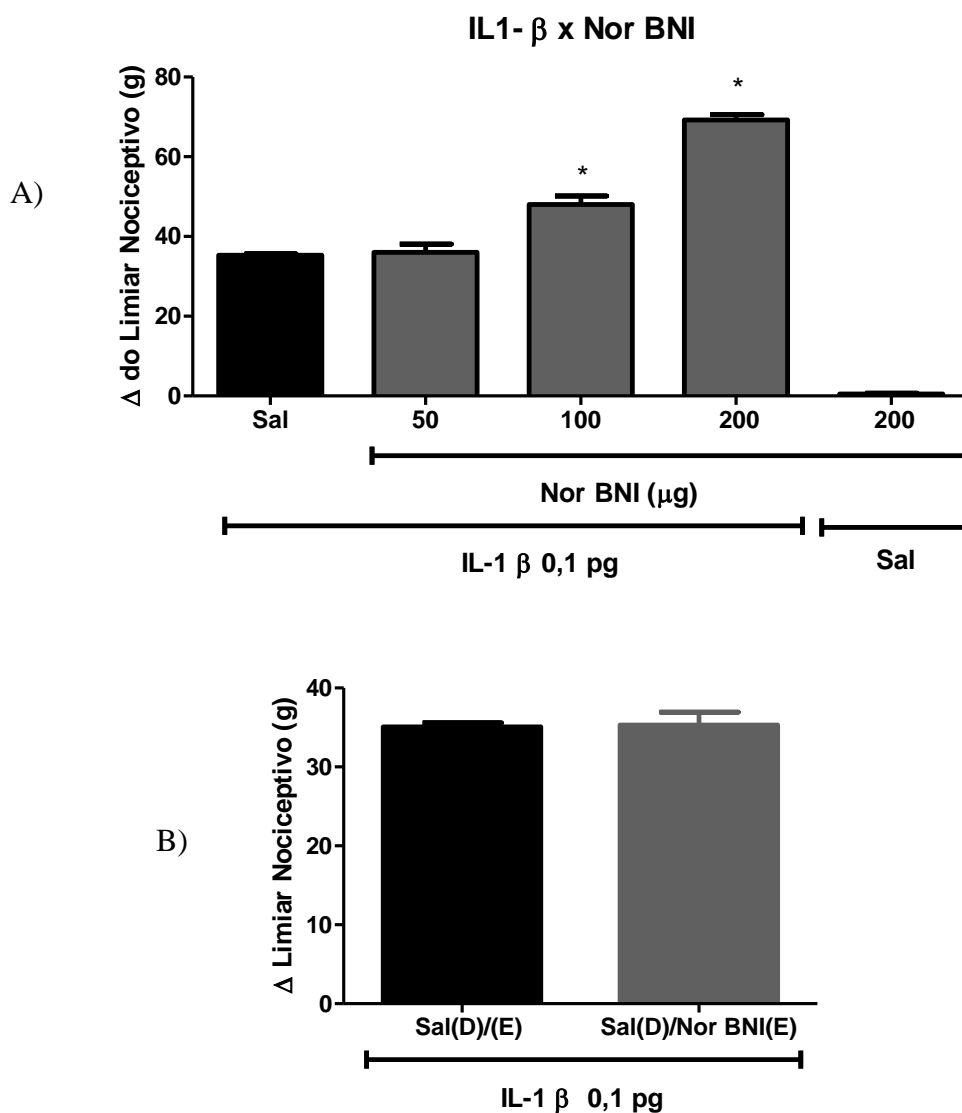


Figura 33 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de Norbinaltorfimina (Nor BNI) sobre a hiperalgesia induzida por IL1- β (0,1 pg). O Nor BNI foi administrado 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle Salina (IL1- β 0,1 pg + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pelo Nor BNI (200 μg /pata). O Nor BNI ou salina (Sal) foram injetados respectivamente nas patas posteriores esquerda (PE) ou direita (PD) 30 minutos antes da 3^a hora e a medida registrada na pata direita. Cada barra

representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

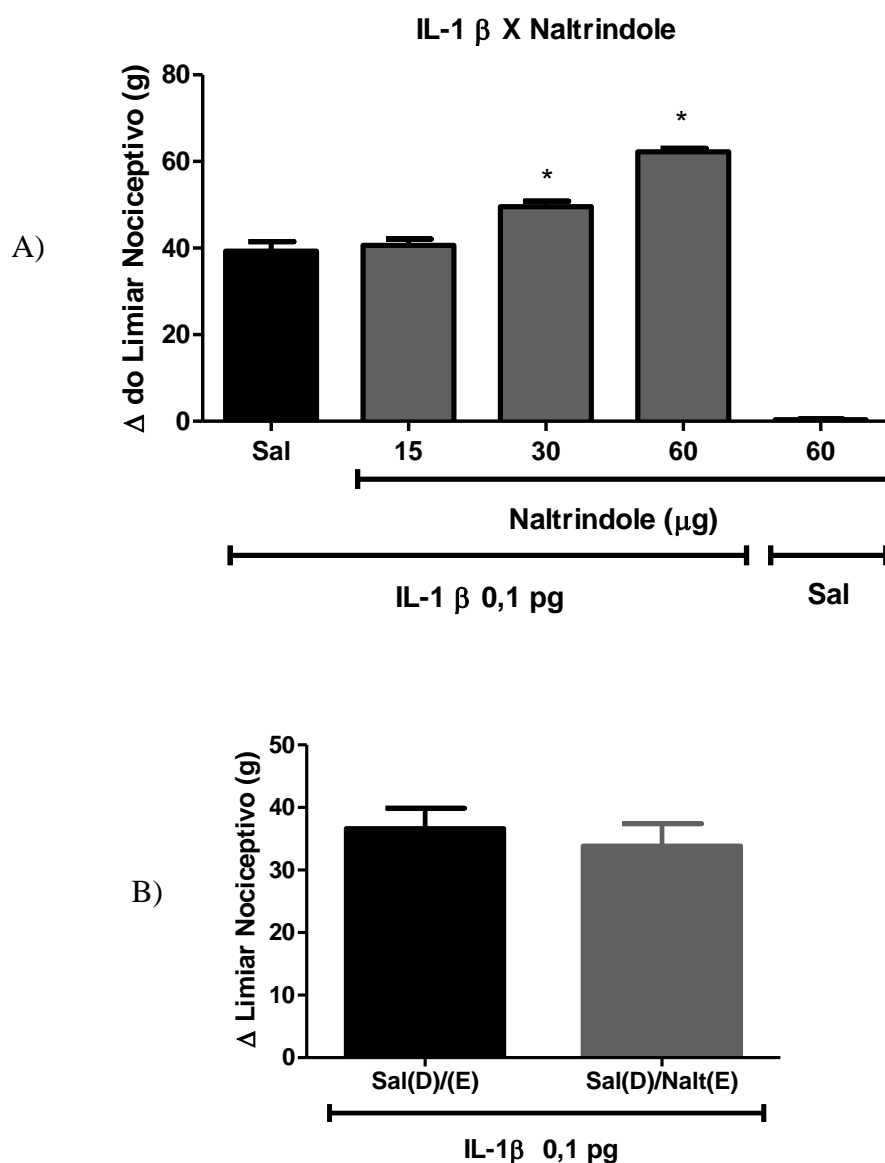


Figura 34 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μ g) de Naltrindole (Nalt) sobre a hiperalgesia induzida por IL1- β (0,1 pg). O Naltrindole foi administrado 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle Salina (IL1- β (0,1 pg + Sal)). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pelo Naltrindole (60 μ g/pata). O Naltrindole ou salina (Sal) foram injetadas respectivamente nas patas posteriores esquerda (PE) ou direita (PD) 30 minutos antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

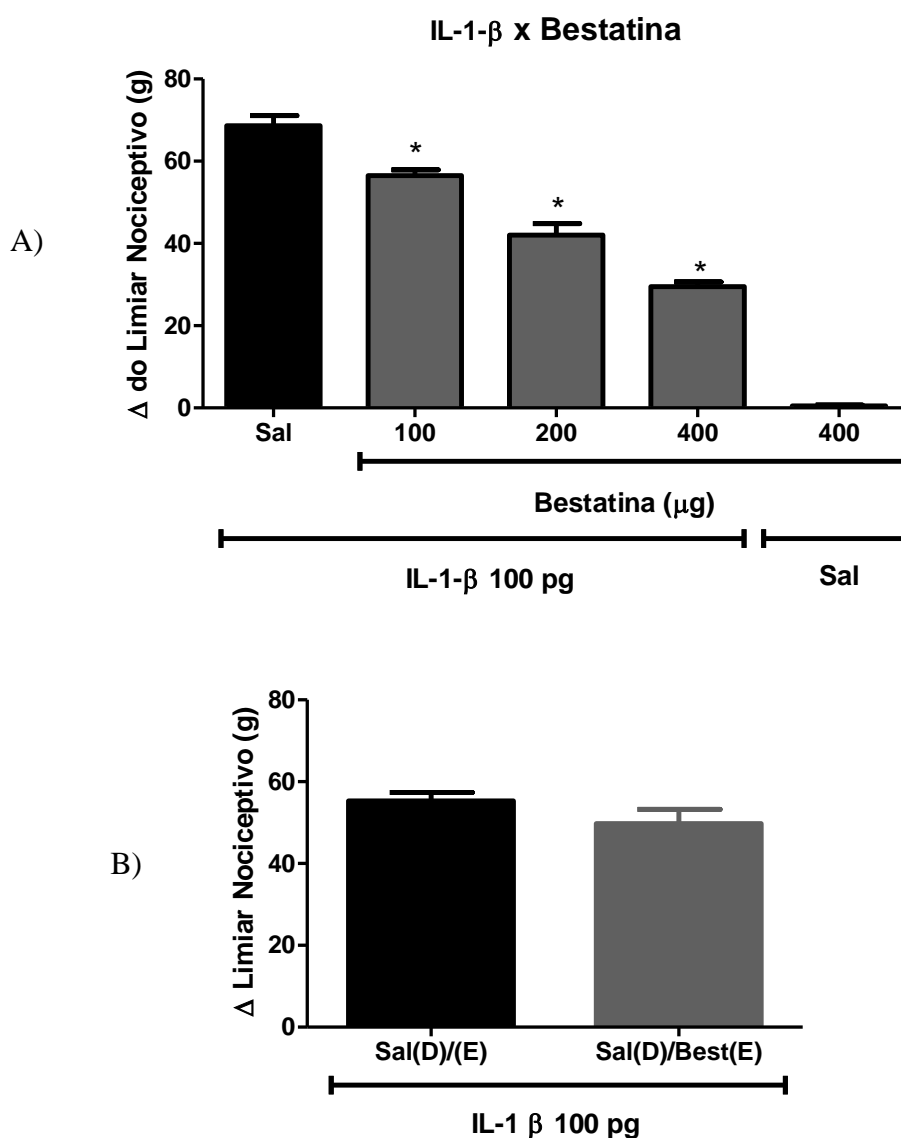


Figura 35 - (A) Efeito da injeção intraplantar de diferentes doses (μ g) de Bestatina (Best) sobre a hiperalgesia induzida por IL1- β (100 pg). A bestatina foi administrada 30 min antes da 3^a hora. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle Salina (IL1- β 100 pg + Sal). (B) Exclusão do efeito sistêmico induzido pela bestatina (400 μ g/pata). A bestatina ou salina (Sal) foram injetadas respectivamente nas patas posteriores esquerda (PE) ou direita (PD) 30 minutos antes da 3^a hora e a medida registrada na pata direita. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente a 4 animais.

E- Estudo sobre a influência do antagonismo de receptores opioides, frente a hiperalgesia induzida por PGE₂ ou NA.

A naloxona no mesmo protocolo de tempo e mesmo no dobro da dose (100 µg/pata) que exacerbou a hiperalgesia induzida pelos mediadores anteriormente estudados, não foi capaz de alterar o efeito hiperalgésico induzido pela PGE₂ (1 µg) ou noradrenalina (NA 125 µg) na pata de camundongos (Figuras 36 e 37). Corroborando o dado da naloxona (100 µg/pata) a administração do inibidor de aminopeptidases, bestatina, na doses (100, 200 e 400 µg/pata) também não alterou a hiperalgesia desses dois mediadores finais (dado não mostrado).

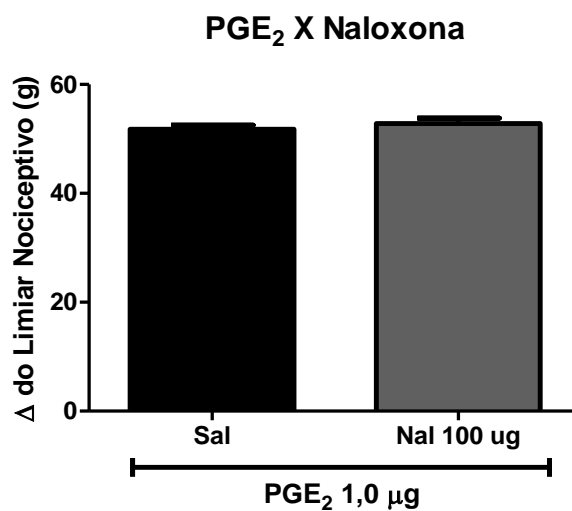


Figura 36 - Efeito induzido pela injeção intraplantar de Naloxona (Nal 100 µg) sobre o efeito hiperalgésico induzido por PGE₂ (1,0 µg). A naloxona foi administrada 30 min antes da 3^a hora. A barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais.

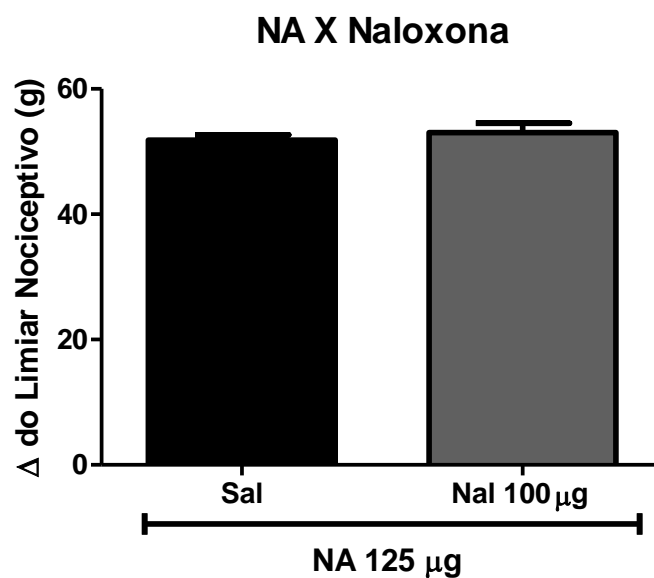


Figura 37 - Efeito da administração intraplantar de naloxona (Nal, 100 μ g) sobre a hiperalgesia induzida pela noradrenalina (NA; 125 μ g/pata) após 5 min. A naloxona foi administrada 30 min antes da injeção de noradrenalina. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referentes a 4 animais.

4.3 - Determinação da expressão proteica dos receptores μ , δ e κ opioides, em tecido de pata, através da técnica de Western Blot.

A fim de avaliar se havia diferença na expressão dos receptores μ , δ e κ opioides, em tecido de pata após a injeção dos agentes inflamatórios carragenina e prostaglandina E₂, em camundongos, realizou-se ensaios de Western Blot. Para essa análise foram utilizados os seguintes grupos experimentais (ver TABELA 2):

TABELA 2 – Divisão dos grupos experimentais.

Grupo	Tratamento (Via intraplantar)	Eutanásia (hora)
1	Salina	3 ^a
2	Cg	2 ^a
3	Cg	3 ^a
4	Cg	4 ^a
5	PGE ₂	2 ^a
6	PGE ₂	3 ^a
7	PGE ₂	4 ^a

O primeiro receptor a ser avaliado foi o MOR (receptor mu opioide). Como pode ser observada na figura 38, a administração de carragenina (100 μ g/pata), em diferentes tempos (2, 3 e 4 horas) não alterou o perfil de expressão deste receptor, quando comparado ao grupo salina. De maneira semelhante, os grupos de animais que receberam a prostaglandina E₂ (1 μ g) como estímulo hiperalgésico, nos diferentes tempos analisados, não apresentaram diferença estatística quando comparado ao grupo controle.

Já o receptor DOR (receptor delta opioide) apresentou um aumento significativo na sua expressão nos tempos de 3 e 4 horas após injeção de carragenina (100 μ g) quando comparado ao grupo salina e aos animais que receberam prostaglandina, figura 39. Pela

mesma figura, pode-se observar que, independentemente do tempo, o tratamento com prostaglandina E₂ (1 µg) não alterou a expressão dos receptores delta.

A figura 40 mostra que o tratamento com carragenina e prostaglandina E₂, em diferentes tempos (2, 3 e 4 horas), não modifica a expressão do receptor KOR (receptor kappa opioide) quando comparado ao grupo controle, salina, não havendo diferença estatística entre os grupos.

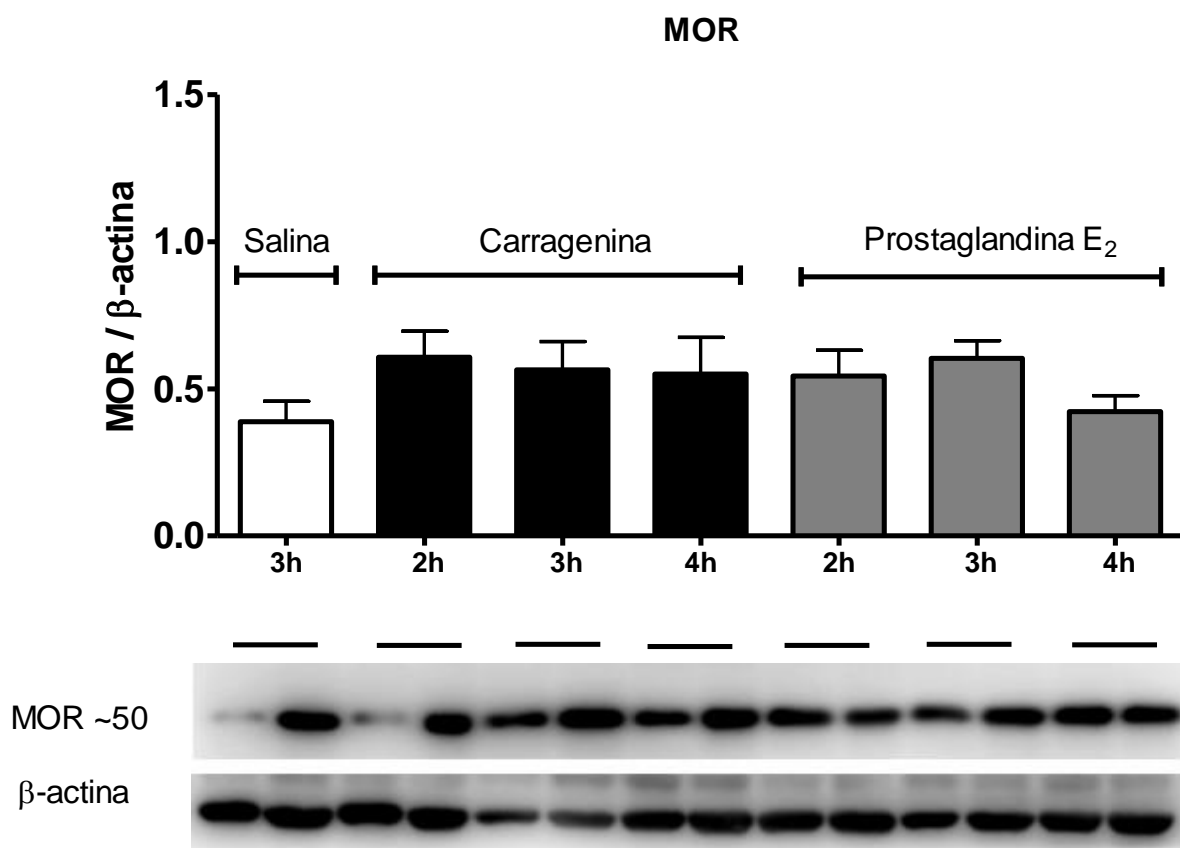


Figura 38 - Avaliação da expressão de receptores μ opioides frente aos estímulos hiperalgésicos induzidos por carragenina (100 μ g) e prostaglandina (1 μ g) em diferentes tempos. Os dados de Western blot foram expressos como média \pm EPM dos valores obtidos para cada amostra, normalizados pelos resultados de β -actina de cada amostra (n=7). A figura abaixo representa níveis proteicos para MOR (receptor μ opioide) e β -actina em tecido de pata de camundongo.

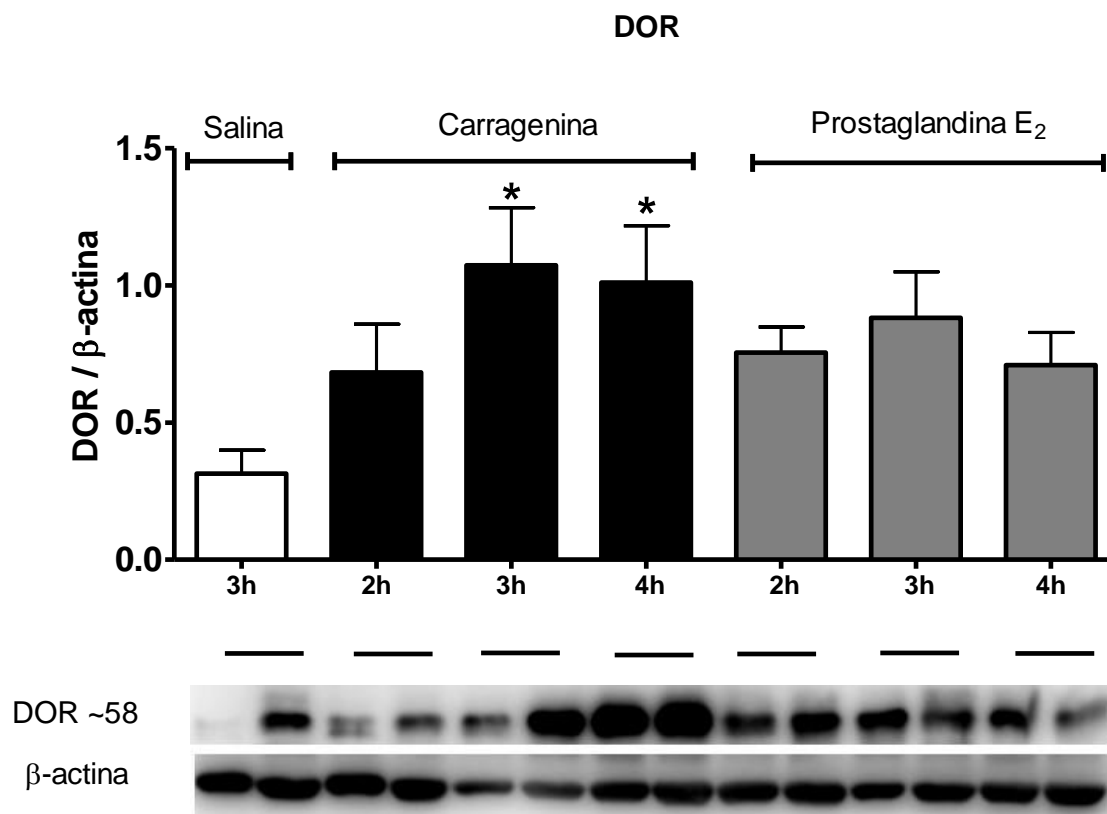


Figura 39 - Avaliação da expressão de receptores δ opioides frente aos estímulos hiperalgésicos induzido por carragenina (100 μ g) e prostaglandina (1 μ g) em diferentes tempos. Os dados de Western blot foram expressos como média \pm EPM dos valores obtidos para cada amostra, normalizados pelos resultados de β -actina de cada amostra (n=7), foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. * indica significância estatística ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle Salina. A figura abaixo representa níveis proteicos para DOR (receptor δ opioide) e β -actina em tecido de pata de camundongo.

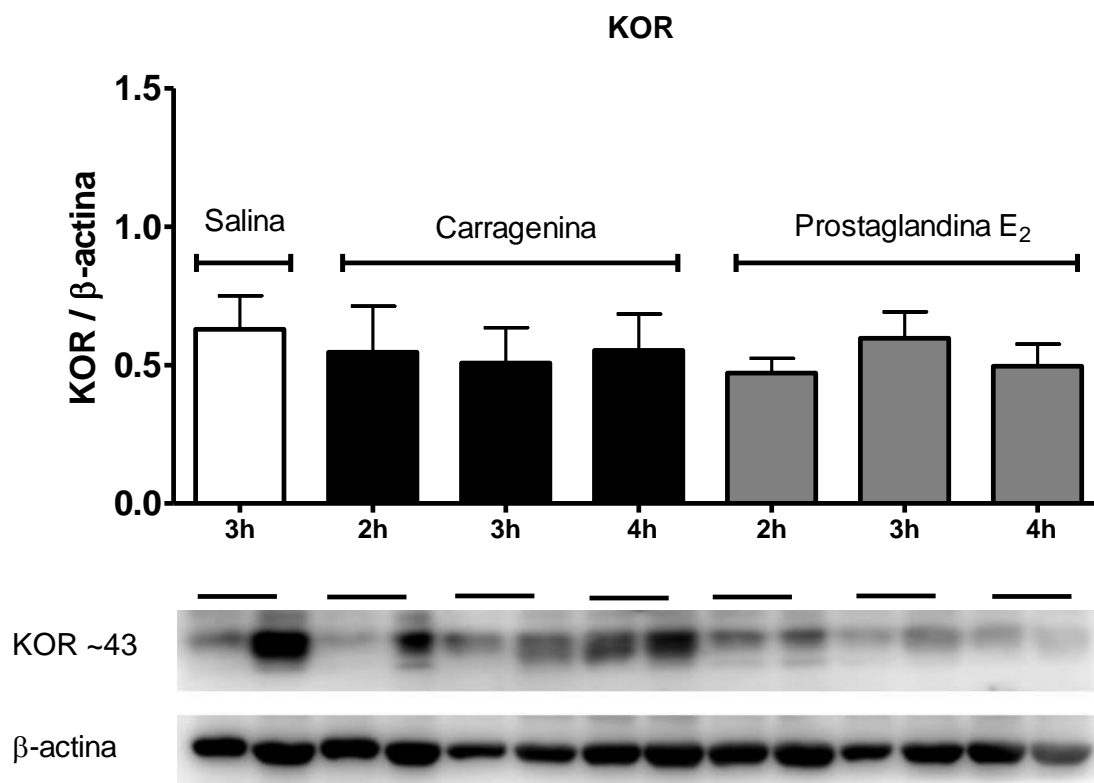


Figura 40 - Avaliação da expressão de receptores κ opioides frente aos estímulos hiperalgésicos induzidos por carragenina (100 μ g) e prostaglandina (1 μ g) em diferentes tempos. Os dados de Western blot foram expressos como média \pm EPM dos valores obtidos para cada amostra, normalizados pelos resultados de β -actina de cada amostra (n=7). A figura abaixo representa níveis proteicos para KOR (receptor κ opioide) e β -actina em tecido de pata de camundongo.

TABELA 3 – Resumo dos dados obtidos na avaliação da expressão de receptores opioides em tecido de pata de animais submetidos à sensibilização induzida por Carragenina (Cg) e prostaglandina E₂ (PGE₂).

Tipo de estímulo	Receptor μ opióide	Receptor κ opióide	Receptor δ opióide
Tecido	Pata	Pata	Pata
Carragenina (Cg)	----	----	+++
Prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	----	----	----

Legenda: Os símbolos significam; (----) não há diferença estatística e (+++) aumento na expressão.

DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

Em adição aos mecanismos que ocorrem no sistema nervoso central, dados da literatura têm mostrado que uma modulação intrínseca da dor pode ocorrer no nível periférico, nos terminais das fibras nociceptivas aferentes e que o processo inflamatório seria responsável por aumentar essa regulação (Stein, 1995). Contudo, os mecanismos envolvidos nesse processo de controle periférico endógeno da dor não estão ainda esclarecidos. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo rastrear quais mediadores inflamatórios podem estar envolvidos na deflagração da modulação endógena periférica da dor inflamatória pela ativação dos receptores opióides em camundongos. Para melhor compreender esse mecanismo utilizamos um modelo de hiperalgesia, que já é bem estabelecido, induzido pela injeção intraplantar de carragenina em camundongos.

A carragenina é um polissacarídeo obtido a partir de extratos de algas pertencentes à classe das *Rhodophyceae*, mais comumente conhecidas como algas vermelhas. A injeção intraplantar de carragenina induz um intenso processo inflamatório, vasodilatação e extravasamento plasmático a partir da liberação de mediadores inflamatórios. Esses mediadores podem ser, por exemplo, de natureza lipídica, como a prostaglandinas (Yuhki *et al.*, 2004) e leucotrienos (Raychaudhuri *et al.*, 1997), ou de natureza proteica como as citocinas, TNF, IL-1, IL-6 e CXCL8. Esses mediadores possuem importante papel na fisiopatologia da inflamação por serem responsáveis pelo recrutamento de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares (Frode *et al.*, 2001).

O atual trabalho teve como objetivo inicial caracterizar a hiperalgesia induzida por carragenina e pelos mediadores inflamatórios, TNF- α , IL-1 β , CXCL1 prostaglandina E₂ e noradrenalina, realizando curvas temporais dose-resposta para cada agente. Cada mediador foi

administrado no tempo 0 (zero) e as medidas do limiar nociceptivo foram registradas a cada uma hora até a sexta hora.

Em nossos experimentos a injeção intraplantar de diferentes doses de carragenina em camundongos reduziu o limiar nociceptivo de forma dose e tempo dependentes. A dose de carragenina responsável por uma redução de aproximadamente 50 % do limiar ocorreu com administração de 100 µg/pata. Em experimentos que objetivaram avaliar uma possível resposta hiperalgésica para as substâncias testadas, caracterizada por redução do limiar nociceptivo, essa foi a dose de escolha, uma vez que, o efeito hiperalgésico induzido é de menor intensidade e, dessa forma, poderia ainda ser intensificado. Já para os experimentos com o objetivo de avaliar a ação antinociceptiva das substâncias testadas, a dose estabelecida foi de 200 µg/pata, uma vez que essa dose foi a responsável por desencadear a hiperalgisia máxima observada. Todas as doses administradas que demonstraram efeito hiperalgésico apresentaram maior pico de ação na terceira hora.

A hiperalgisia observada pela administração intraplantar de carragenina pode ser atribuída, em parte, pela liberação de prostaglandina, uma vez que há aumento nos níveis de eicosanoides após inflamação periférica (Samad *et al.*, 2002). Outro agente com papel corroborativo na indução da hiperalgisia causada pela administração de carragenina são as aminas simpáticas, através dos receptores adrenérgicos α e β e dopaminérgico, DA₁, (Nakamura e Ferreira, 1987). A noradrenalina quando administrada intraperitonalmente potencializou a contorção induzida por ácido acético em camundongos, sugerindo que a nocicepção inflamatória possui além do controle mediado por produtos da via das ciclooxigenases, um controle a partir das aminas simpáticas, possivelmente por ativação dos receptores do tipo DA₁ (Duarte, 1988). Segundo Cunha *et al.* (2005), a liberação das aminas simpáticas e da prostaglandina é precedida pela liberação, em cascata, de várias citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , tanto em ratos quanto em camundongos.

Com o objetivo de se avaliar qual agente inflamatório seria capaz de ativar o sistema de controle periférico da dor inflamatória, analisamos em sequência os mediadores após estímulo inicial por carragenina, como descrito pela cascata de liberação de mediadores proposta por Cunha *et al.* (2005). Sendo assim, a próxima análise realizada foi a caracterização da hiperalgesia induzida pelo TNF- α . Esse primeiro mediador da cascata atua na liberação de IL1- β e prostanoídes, além de poder atuar diretamente na sensibilização dos nociceptores (Cunha *et al.*, 2005). A administração desse mediador em diferentes doses induziu hiperalgesia, por reduzir o limiar nociceptivo, todas com efeito máximo obtido na terceira hora. A dose de escolha para realização de experimentos posteriores ficou definida como 100 pg/pata, uma vez que é a menor dose encontrada que induziu a hiperalgesia.

O TNF- α é um polipeptídeo trimérico, produzido principalmente por células do sistema imune, como macrófagos ativados. Foi descrito pela primeira vez em 1975 e sua liberação está associada ao recrutamento de neutrófilos, aumentando a expressão de moléculas de adesão tanto em células residentes quanto em células do sistema imune; ao aumento da produção local de quimiocinas; e ao processo de diferenciação de leucócitos mononucleares (LO *et al.*, 1992; Botero *et al.*, 2008). O TNF- α induz hiperalgesia por liberação sequencial de mediadores secretados a partir da sua administração, como por exemplo, a IL-1 β , que culmina na formação de produtos da ciclooxigenase, principalmente prostaglandina E₂ (Nakamura e Ferreira, 1987). Por outro lado, a administração de TNF- α pode estimular a liberação de quimiocina, como a CXCL-8, que resulta na liberação de aminas simpáticas, que junto aos prostanoídes representam os mediadores finais necessários para sensibilização dos nociceptores (Cunha *et al.*, 1991; Lorenzetti *et al.*, 2002).

O TNF- α desempenha importante papel no processo inicial da resposta inflamatória. A maioria dos efeitos pró-inflamatórios do TNF- α é mediada via receptor TNF-R1, enquanto que os efeitos anti-inflamatórios são mediados por receptores p75 (TNF-R2). O mecanismo

pelo qual o TNF- α desencadeia a hiperalgesia está relacionado com sua capacidade de ativação direta dos seus receptores p55 (TNF-R1) e da proteína quinase ativada por mitogênio p38 (MAPK), o que por sua vez acarreta aumento das correntes iônicas pelos canais para sódio, tanto em DRG (gânglio da raiz dorsal) quanto em neurônios, e indiretamente pela estimulação da produção de outros fatores pró-nociceptivos, como o fator de crescimento neurotrófico (NGF) (McMahon *et al.*, 2005, Pezet e McMahon, 2006). A adição desta citocina em cultura celular foi responsável por aumentar a densidade de canais de sódio (Nav1.8) no DRG, o que contribui para a dor inflamatória. As citocinas pró-nociceptivas, incluindo o TNF- α , também atuam modificando a permeabilidade neuronal via ativação de PKC, diminuindo a condutância dos canais de potássio, desencadeando excitabilidade neuronal, segundo Jin e Gereau (2006).

Concomitantemente à liberação de TNF- α , a quimiocina derivada de queratinócitos, CXCL-1, é liberada pela carragenina. Sendo assim, foi nosso segundo mediador a ser analisado. No mesmo protocolo descrito anteriormente para carragenina e TNF- α , a CXCL-1 foi avaliada em diferentes tempos e doses. Os nossos resultados mostraram que diferentes doses administradas desse mediador induziu um quadro de hiperalgesia típica, manifestada pela redução do limiar nociceptivo. Todas as doses testadas apresentaram intensidade máxima de ação na terceira hora, com exceção da dose de 1 pg/pata, que não se mostrou hiperalgésica. A dose de 10 pg, submáxima, foi utilizada para experimentos em que as substâncias avaliadas poderiam causar redução do limiar nociceptivo e, dessa forma, o efeito hiperalgésico poderia ser ainda potencializado. Já a dose máxima administrada de CXCL-1 (10 ng/pata) foi utilizada nos experimentos em que poderia ser verificada ação antinociceptiva para as substâncias testadas.

A CXCL1 faz parte da família das quimiocinas, grupo de pequenas proteínas, com tamanho compreendido entre 8 a 12 kDa, desempenham inúmeras funções biológicas, como:

diferenciação de células T, adesão celular e migração e ativação de leucócitos, via ativação de receptores acoplados a proteína G. Importantes trabalhos demonstraram que o aumento da CXCL-1 foi observado durante o processo inflamatório envolvendo nervo periférico, contribuindo para aumento da dor neuropática (Lindia *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2009; Imai *et al.*, 2013). Segundo Gao e Ji (2010), os astrócitos espinhais representam importante fonte da liberação de CXCL-1 e que a incubação destas células na presença de TNF- α é responsável por um aumento nos níveis desta quimiocina. Outro estudo demonstrou que a administração intratecal de CXCL-1 induz rápida ativação de ERK, depende via receptor CXCR2, predominantemente expresso em neurônios da medula espinhal (Zhang *et al.*, 2013), em conclusão esse trabalho sugere que a CXCL1 e o CXCR2 estão envolvidos na interação astrogliar-neuronal.

Assim como descrito para TNF- α , a quimiocina CXCL-1 representa um mediador inflamatório intermediário, que após ser ativado induz a liberação dos mediadores finais, como prostanóides e animas simpáticas, esses responsáveis por sensibilizar os nociceptores e permite o início da transmissão ascendente da dor (Cunha *et al.*, 2005).

Seguindo a cascata de liberação dos mediadores em camundongos, descrita por Cunha *et al.*, 2005, a IL-1 β , outra citocina liberada pela administração de carragenina, foi avaliada em diferentes doses. Corroborando os dados anteriores, essa citocina foi capaz de reduzir o limiar nociceptivo em diferentes doses administradas, e o pico máximo de ação ocorreu na terceira hora. A dose definida para posterior administração de IL-1 β foi de 0,1 pg/pata (dose submáxima) para experimentos em que poderia ser verificada ação hiperalgésica das substâncias testadas, e dessa forma, o seu efeito poderia ser ainda aumentado e 100 pg/pata (dose máxima) para avaliar as substâncias que poderiam causar antinocicepção.

A IL-1 β , com peso aproximado de 33kDa, é produzida inicialmente por macrófagos e monócitos, mas também pode ser secretada por células residentes como células endoteliais e

fibroblastos ativados durante o processo inflamatório. O principal receptor de IL-1 β associado ao processo inflamatório é IL-1RI.

Como anteriormente descrito, os prostanoídes e as aminas simpatomiméticas representam os medidores finais da cascata de liberação de mediadores responsáveis pela ativação direta dos nociceptores. Assim como realizado para as outras substâncias estudadas, tanto a PGE₂ quanto a NA passaram pelo mesmo processo de caracterização, no qual diferentes doses e tempos foram avaliados.

Em nossos experimentos, a administração intraplantar de noradrenalina em variadas doses induziu um quadro de hiperalgesia, caracterizado pela redução do limiar nociceptivo. Diferentemente dos mediadores testados anteriormente a NA apresentou pico de ação em 5 minutos, sendo este efeito observado até 15 minutos da sua administração. Esse fato pode ser explicado por sua rápida captação nos terminais sinápticos em função do seu baixo peso molecular (Rang e cols., 2003). Ficou estabelecido que, para experimentos subsequentes, a dose submáxima de NA utilizada foi de 62,5 ng/pata.

A participação periférica da noradrenalina na dor ainda é contraditória. Alguns trabalhos sugerem uma modulação via aumento local dos receptores adrenérgicos durante a neuropatia (Shi e cols., 2000; Ma e cols., 2005), já outros estudos preveem uma diminuição de receptores adrenérgicos após constrição de nervos espinhais (Cho e cols., 1999; Shi e cols., 2000).

O mecanismo pelo qual a administração de NA causa hiperalgesia parece envolver os receptores de forma subtipica específica, pois segundo Romero (2011), quando se antagoniza receptores α_{2B} observa-se redução da hiperalgesia, já o antagonismo dos receptores α_{2C} induz aumento da hiperalgesia. Em outro trabalho, Khasar e cols. (1995) apontaram que a ativação da via noradrenérgica pode induzir hiperalgesia pela liberação indireta de prostaglandina (PGE₂) na periferia. Sabendo que a participação da noradrenalina no controle endógeno da dor

periférica ainda é controversa, acredita-se que ela possa exercer efeito antinociceptivo, independente do componente celular envolvido, sendo necessária apenas a ativação diferencial dos seus receptores, bem como a dose administrada. Em doses maiores a NA perde sua seletividade, causando hipernocicepção, enquanto que em doses menores pode causar antinocicepção através da ativação de células do sistema inume, contendo opioides (Romero, 2011).

A PGE₂ é responsável pela sensibilização direta dos nociceptores. Sendo um produto final do metabolismo do ácido araquidônico, a PGE₂, presente em sua maioria nos restos de membrana celular, recebe destaque entre as substâncias algogênicas, por induzir, em elevadas concentrações, a redução do limiar nociceptivo, sendo capaz de sensibilizar neurônios aferentes primários a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (Ferreira, 1972; Ferreira e Nakamura, 1979; Bevan, 1999). As doses de administração intraplantar de PGE₂ reduziram expressivamente os limiares de antinocicepção. Esses resultados vão de encontro aos achados do nosso grupo de pesquisa que demonstraram a eficácia da dose e o período de administração em induzir hiperalgesia em ratos (Soares & Duarte, 2001; Alves & Duarte, 2007, Silva *et al.*, 2016). Dessa forma, ficou padronizada a dose de 1 µg/pata, para realização de experimentos subsequentes.

O efeito de sensibilização direta da PGE₂ ocorre devido a sua interação com receptores presentes na membrana dos neurônios (Southall e Vasko, 2001). As vias de sinalização intracelulares envolvidas neste processo são dependentes do tipo de receptor, bem como da célula ativada. Nos últimos anos, vários trabalhos têm mostrado que o DRG expressa em sua membrana receptores do tipo EP1, EP2, EP3 e EP4 e que a ativação dos tipos EP2 e EP4 implicam no aumento na concentração de segundos mensageiros, como a adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Já ativação de EP3 pode aumentar ou diminuir os níveis de adenil ciclase (AC) dependendo da isoforma ativada (Sugimoto *et al.*, 1992; Coleman *et al.*,

1994; Regan *et al.*, 1994; Southall e Vasco, 2001). Enquanto que os receptores EP1 estão associados com a sinalização da fosfolipase C, resultando na liberação de inositol trifosfato (IP₃) e diacil-glicerol (DAG) (Watabe *et al.*, 2003).

As vias intracelulares descritas acima se convergem alterando a permeabilidade da membrana neuronal causando excitabilidade por anular as correntes de potássio (Evans *et al.*, 1999) e aumentar a atividade dos canais de sódio resistentes a tetrodotoxina (Gold *et al.*, 1996), o que explica a hiperalgesia causada pela administração da prostaglandina.

Depois de estabelecidas as doses dos mediadores estudados, bem como o pico máximo de ação de cada um deles, pudemos testar o principal objetivo do trabalho, avaliar a participação das citocinas como deflagradores do controle periférico opioidérgico de dor inflamatória. Dados da literatura têm sugerido que opioides possuem ação potencializada na presença de processos inflamatórios (Stein *et al.*, 1989; Stein *et al.*, 1990; Stein *et al.*, 1991). E que a administração intraplantar de agonistas opioides na presença de inflamação resulta em antinocicepção aumentada e esse efeito foi revertido por administração dos antagonistas seletivos destes receptores (Stein *et al.*, 1988). As hipóteses propostas para explicar a potencialização do efeito analgésico dos opioides na presença da inflamação se baseiam no aumento da expressão dos receptores nas membranas celulares dos neurônios, aumento no transporte destes receptores (Hassan *et al.*, 1993), bem como, maior/melhor ativação dos receptores na membrana celular após a lesão ocasionada pelo processo inflamatório (Olsson, 1990).

Para avaliar a participação e o papel específico dos receptores μ , δ , e κ opioides frente a diferentes estímulos inflamatórios realizamos o antagonismo seletivo e não-seletivo para esses receptores. Após o tratamento inicial com a naloxona, antagonista não seletivo de receptores opioides, foi verificada uma intensificação do efeito hiperalgésico dose dependente da carragenina, TNF- α , CXCL-1 e IL-1 β demonstrado por um aumento do Δ do limiar

nociceptivo dos animais, de forma significativa. Para excluir um possível efeito não periférico, foi realizado um experimento em que a naloxona, foi administrada somente na pata esquerda. A avaliação do limiar nociceptivo na pata direita demonstrou que, nas doses avaliadas, a naloxona não provocou nenhum efeito significativo sobre a hiperalgesia induzida pelos mediadores administrados, sugerindo dessa forma sua ação local. O antagonismo por naloxona nos sugere que, como esperado, o sistema opioide participa na modulação endógena da dor periférica induzida por carragenina, uma vez que a ausência da sinalização opioidérgica piora a hiperalgesia. Os dados encontrados indicam que os mediadores analisados parecem ser capazes de ativar o sistema opioide.

A fim de corroborar os dados previamente encontrados, utilizamos a abordagem farmacológica de aumentar a disponibilidade de peptídeos opioides endógenos através da inibição de enzimas que degradam encefalinas. Em nosso trabalho a injeção de bestatina, inibidor de aminopeptidases (Zharikova et al., 2002) que clivam a encefalina na ligação tirosina-glicina (Hersh, 1982), administrada 30 minutos antes da terceira hora, em diferentes doses, foi capaz de reduzir significativamente o Δ do limiar nociceptivo em relação ao grupo carragenina, TNF- α , CXCL-1 e IL-1 β na dose máxima de cada mediador administrado, de forma dose-dependente, sugerindo um efeito antinociceptivo periférico. Esses dados são justificados pela maior disponibilidade dos peptídeos opioides endógenos em interagirem com seus receptores e promoverem antinocicepção.

Quando analisados os possíveis efeitos dos agentes finais, prostaglandina e noradrenalina, liberados a partir da cascata de mediadores frente ao antagonismo do sistema opioide, observamos que a naloxona no mesmo protocolo de tempo e no dobro da dose (100 μ g/pata) que exacerbou a hiperalgesia induzida pelos mediadores, não foi capaz de alterar o efeito hiperalgésico induzido pela prostaglandina e noradrenalina na pata de camundongos. Esses dados nos permitem inferir que ambos mediadores não são capazes de deflagrarem a via

do controle endógeno periférico opioidérgico. Conforme mencionado anteriormente estes achados vão de encontro com estudos que demonstram que a inflamação e/ou a presença de mediadores inflamatórios induzem o aumento na liberação de peptídeos opioides (Stein *et al.*, 1989; Truong *et al.*, 2003; Sullivan *et al.*, 2015).

Uma vez verificada a participação opioidérgica, procuramos identificar quais os tipos de receptores poderiam estar envolvidos na modulação da dor inflamatória por opióides endógenos. Para tanto, utilizamos antagonistas seletivos para receptores do tipo μ , δ e κ , respectivamente, Clocinnamox, Naltrindole e Nor BNI. O emprego desses antagonistas aumentaram a hiperalgesia inicial desencadeada pela administração de carragenina, TNF- α , CXCL-1 e IL-1 β . Esses dados mostram que o sistema opioide participa do controle endógeno da dor inflamatória através dos seus três receptores. Além disso, podemos concluir que esses efeitos mediados ocorrem periféricamente, uma vez que a administração das drogas (clocinnamox, naltrindole e nor BNI) na pata esquerda não alterou a hiperalgesia avaliada na pata contralateral. É importante salientar que os experimentos realizados até aqui não permitem inferir sobre a natureza dos peptídeos endógenos, uma vez que os mesmos apresentam capacidade de ativar diferentes subtipos de receptores opioides.

Até agora, neste estudo, mostramos que a ativação periférica da sinalização opioidérgica atua de forma a controlar a dor inflamatória. Propomos que os responsáveis fisiológicos dessa ativação, nesse modelo, são o TNF- α , CXCL-1 e a IL-1 β , considerando que estes mediadores liberados pela cascata, têm efeito hiperalgésico agravado pelo antagonismo do sistema opioide e que a administração de inibidor de peptidases na pata inflamada leva a antinocicepção. Em conjunto esses dados podem oferecer uma importante base para novos experimentos que visam elucidar como os receptores opioides poderiam ser mobilizados durante a regulação periférica da dor inflamatória, uma vez que uma possível ativação

adicional destes receptores presentes em neurônios sensoriais periféricos poderia ser o mecanismo pelo qual esse evento é mediado.

Em acordo com os dados da literatura, nossos resultados até aqui apresentados, corroboram o fato dos opioides endógenos apresentarem maior potência analgésica periférica durante o processo inflamatório (Stein *et al.*, 1989), como à exemplo, durante a inflamação induzida por Adjuvante Completo de Freund (ACF) (Maekawa *et al.*, 1996; Mousa *et al.*, 2002; Cahill *et al.*, 2003). Desde que esse evento foi caracterizado, sugeriram algumas hipóteses na tentativa de explicar como isso ocorre. Essas hipóteses incluem aumento na síntese de novos receptores opioides, aumento do transporte axonal dos receptores e maior ativação destes receptores nos nociceptores (Mousa *et al.*, 2001; Olsson, 1990). Nossos dados demonstram a importância de mediadores inflamatórios na modulação opioide.

A fim de elucidar os mecanismos envolvidos na ativação do sistema opioidérgico na modulação endógena da dor e embasados nos trabalhos que demonstraram que a administração periférica de agonistas de receptores μ , δ e κ opioides apresentaram maior efeito analgésico em tecidos inflamados, sugerindo que o processo inflamatório parece regular a ativação periférica dos receptores opioidérgicos, realizamos ensaios de Western Blot, em tecido de pata, após a injeção dos agentes inflamatórios carragenina e prostaglandina E₂, em camundongos e em seguida suas densidades foram avaliadas.

Os mecanismos de ação analgésica mediada por opioides se resumem, na abertura dos canais de potássio, diminuição da produção de AMPc e inibição dos canais cálcio voltagem-dependentes (Schultz e Gross, 2001). A diminuição do influxo de cálcio induz inibição da liberação de neurotransmissores, colaborando para diminuição da transmissão do impulso nervoso (Law *et al.*, 2000). Até a década de 70, a ação dos opioides era basicamente atribuída ao controle central (Kuhar *et al.*, 1973; Basbaum *et al.*, 1976; Fields e Anderson, 1978). Já a partir do final da mesma década, Ferreira e Nakamura (1979) demonstraram, com

administração intraplantar de morfina, reversão do efeito hipernociceptivo induzido por carragenina e prostaglandina.

Os resultados para análise da expressão de receptores opioides pela técnica de western blot foram realizados em tecidos de pata, uma vez que dados da literatura evidenciam que os receptores do tipo μ , δ e κ opioides são transportados, pelos axônios, até o terminal periférico do neurônio aferente primário (Hassan *et al.*, 1993 ; Mousa *et al.*, 2001), a partir da sua síntese no DRG (Dado *et al.*, 1993; Cogessal). Outros estudos mostraram que esses receptores podem ser co-expressos com receptores para substância P e para TRPV1, reforçando a ideia da presença de receptores opioides nas porções periféricas das fibras aferentes nociceptivas (Minami e Satoh, 1995; Li *et al.*, 1998; Wenk e Honda, 1999; Poonyachoti *et al.*, 2002).

Nossos resultados indicam que o processo inflamatório agudo periférico aumenta a expressão proteica para receptores δ opioides, mas não para receptores μ e κ opioides na pata de camundongos, quando o estímulo hiperalgésico é a carragenina. Já quando o estímulo de sensibilização foi a prostaglandina E_2 não observamos esse evento. Vale ressaltar que a hiperalgisia desencadeada pela carragenina envolve a liberação hierárquica de mediadores inflamatórios (Cunha *et al.*, 1991; Cunha *et al.*, 1992; Cunha; Teixeira; Ferreira, 1999; Cunha *et al.*, 2005) enquanto que a hiperalgisia mediada por prostaglandina E_2 não induz resposta inflamatória e sim sensibilização direta nos nociceptores aferentes, por interação a receptores acoplados a segundos-mensageiros (Ferreira, 1981; Dray, 1995). Dessa forma, é possível que a sensibilização induzida pela prostaglandina E_2 , em nosso modelo, não seja o fator responsável pelo aumento da expressão dos receptores opioides. Quanto à análise da expressão proteica dos receptores μ e κ , nossos estudos sugerem que, independente da forma de sensibilização, induzida pela carragenina e prostaglandina E, não houve diferença na expressão dos receptores no tecido da pata, indicando que o evento de controle periférico da

dor pelo sistema opioide parece não depender da sua ativação, ou, em decorrência do período de avaliação da expressão proteica utilizada nesse modelo.

Por fim, nossos dados mostram que a sensibilização aguda por carragenina intraplantar aumenta a expressão proteica para receptores δ opioides no tecido de pata e que essa regulação parece acontecer mais intensamente na terceira hora, corroborando o pico de ação das substâncias testadas, nos experimentos farmacológicos realizados. Em adição a isso, alguns trabalhos têm demonstrado que administração intraplantar de substâncias pro-nociceptivas, como carragenina e Adjuvante Completo de Freud (CFA) na pata de roedores, aumenta a expressão proteica de receptores opioides no DRG, a partir de uma hora após os tratamentos (Hassan *et al.*, 1993; Puehler *et al.*, 2004). Os dados em conjunto indicam a importância de mediadores inflamatórios na sinalização opioidérgica de controle analgésico periférico em camundongos.

CONCLUSÃO

6 - CONCLUSÃO

Os dados obtidos até o momento são compatíveis com a hipótese de que a inflamação causa, além da hiperalgesia, a liberação de substâncias endógenas como peptídeos opioides endógenos e esses peptídeos, por sua vez, estariam exercendo um controle endógeno sobre a dor inflamatória periférica. De acordo com nossos resultados, podemos sugerir que a modulação endógena periférica opioidérgica, nesse modelo, parece ser desencadeada pelos mediadores, TNF- α , CXCL-1 e IL-1 β , tendo a participação dos receptores μ , κ e δ envolvidos no mecanismo antinociceptivo. Por outro lado, os estímulos hiperalgésicos mensurados pela administração de PGE₂ e NA não foram capazes de ativar o sistema opioide periférico de modulação antinociceptiva.

Pelos achados sobre a quantificação de receptores opioides em nosso modelo de dor inflamatória aguda, podemos inferir que essa modulação opioidérgica é dependente dos receptores δ opioides em tecido periférico, mas não do receptor μ e κ . Uma hipótese para a deflagração do sistema de controle opioide periférico da dor inflamatória por TNF- α , CXCL-1 e IL-1 β é proposta na figura 41.

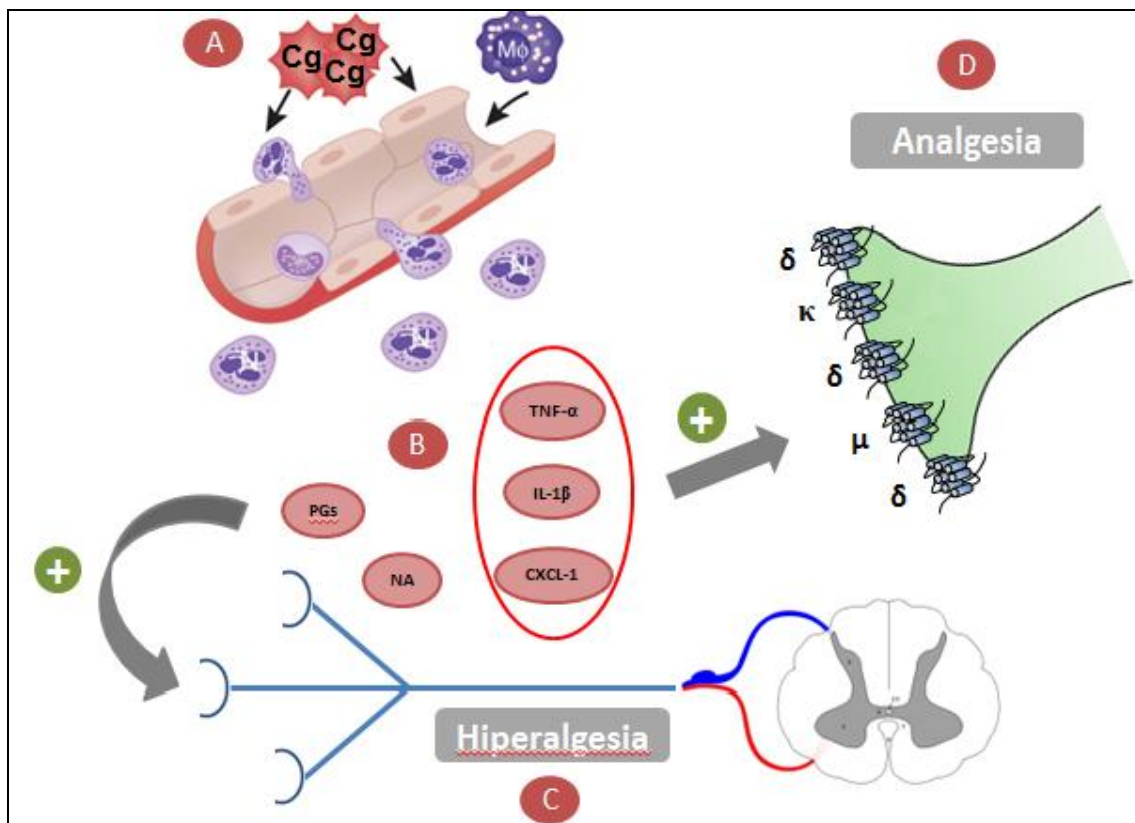


Figura 41 - Hipótese sobre a participação do sistema opioidérgico no mecanismo antinociceptivo de controle periférico endógeno da dor inflamatória aguda. Em A observa-se que administração da carragenina induz um processo inflamatório que culmina na liberação de diferentes mediadores. Em B, esses mediadores liberados podem sensibilizar diretamente os nociceptores e promover a ascensão da informação dolorosa a partir do corno posterior da medula, desencadeando o quadro de hiperalgesia, observada em C. Parte desses mediadores pode promover o aumento da expressão de receptores opioides na periferia, o que induz o quadro de analgesia, como observado em D.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Alves, D.P., Duarte, I.D.G., 2007. Modulação endógena periférica da dor inflamatória pela via opioides/NO/K_{ATP} no modelo de hiperalgesia induzida por carragenina em ratos. Tese Doutorado (departamento de Farmacologia, ICB-UFMG).

Alves, D.P., da Motta, P.G., Lima, P.P., Queiroz-Junior, C.M., Caliari, M.V., Pacheco, D.F., Pacheco, C.F., Francischi, J.N., Duarte, I.D., 2012. Inflammation Mobilizes Local Resources to Control Hyperalgesia: The Role of Endogenous Opioid Peptides. *Pharmacology.* 89:22-28.

Attal, N. et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol.* v.17, n.9, p. 1113- e 88, sep 2010.

Barlocco, D. et al. The opioid-receptor-like 1 (ORL-1) as a potential target for new analgesics. *Eur J Med Chem.* v. 35, n. 3, p. 275-282, 2000.

Basbaum, A., Clanton, C.H., Fields, H.L., 1976. Opiate and stimulus-produced analgesia: functional anatomy of a medullospinal pathway. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA.* 73:4685-4688.

Basbaum, A.I. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. v.139, n. 2, p. 267-284, 2009.

Bevan, S. Nociceptive peripheral neurons: Cellular properties, In: Wall, P.D. e Melzack, R. (ED). *Text Book of Pain*. Edinburgh: Churchill-livingstone, p. 85-103, 1999.

Bodnar, R. J, Klein, G. E. Endogenous opiates and behavior: 2004. *Peptides*. v. 26, n. 12, p. 2629-2711, 2005.

Börner, C., Kraus, J., Schröder, H., Ammer, H., Höllt, V., 2004. Transcriptional regulation of the human mu-opioid receptor gene by interleukin-6. *Mol. Pharmacol.* 66:1719-1726.

Brack, A., Rittner, H.L., Machelska, H., Beschmann, K., Sitte, N., Schäfer, M., Stein, C., 2004. Mobilization of opioid-containing polymorphonuclear cells by hematopoietic growth factors and influence on inflammatory pain. *Anesthesiology*. 100:149-157.

Calignano, A., La Rana, G., Giuffrida, A., Piomelli, D., 1998. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*. 394:277-281.

Carstens, E., Gilly, H., Schreiber, H., Zimmermann, M., 1987. Effects of midbrain stimulation and iontophoretic application of serotonin, noradrenaline, morphine and GABA on electrical thresholds of afferent C- and A-fibre terminals in cat spinal cord. *Neuroscience*. 21:395-406.

Chatuverdi, K *et al*, structure and regulation of opioid receptor. *Biopolymers*. v. 55, n. 4, p. 334-346, 2000.

Clifford, J.; Wolff, M.D. Pain: Moving from Symptom Control Toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Annals of Internal Medicine*. 140 (6): 441-451, 2004.

Coggeshall, R. E. Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain Res.*, v. 764, n. 1-2, p.126-132, 1997.

Costa, A., 2011. Modulação endógena periférica da dor inflamatória pela ação das angiotensinas. Tese Doutorado (departamento de Farmacologia, ICB-UFMG).

Costigan, M.; Scholz, J.; Woolf, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual Review of Neuroscience*. 32: 1-32, 2009.

Costigan, M.; Scholz, J.; Woolf, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual Review of Neuroscience*. 32: 1-32, 2009.

Cunha, F.Q., Poole, S., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H., 1992. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 107: 660-664.

Cunha, T.M., Verri, W.A., Silva, J.S., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2005. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *PNAS*. 102:1755-1760.

De Petrocellis L, Melck D, Bisogno T, Milone A, Di Marzo V. 1999. Finding of the endocannabinoid signalling system in Hydra, a very primitive organism: role in the feeding response. *Neuroscience*. 92:377-387.

Dhawan BN, Cesselin F, Raghbir R, et al. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev* 1996;48(4):567-92.

Dhawan, B. N. *et al* . International union of pharmacology XII classification of opioid receptors. *Pharmacol. Rev*, v.48, n.4, p.567-592, 1996.

Dray, A., 1995. Inflammatory mediators of pain. *British Journal of Anaesthesia*. 75:125-131.

Drew, L.J., Harris, J., Millns, P.J., Kendall, D.A., Chapman, V., 2000. Activation of spinal cannabinoid1 receptors inhibits C-fibre driven hyperexcitable neuronal responses and increases [35S]GTPγS binding in the dorsal horn of the spinal cord of non-inflamed and inflamed rats. *Eur. J. Neurosci*. 12:2079-2086.

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

Dworkin, R.H. *et al*. Advances neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, treatment recommendations. *Arch. Neurol*. vol. 60 , n. 11, p. 1524-1534, 2003.

Dray, A. Inflammatory mediators of pain. *Br. J. Anaesth*. v. 75, p. 125-131, 1995.

Emmerson, P.J, Liu M.R, Woods JH, Medzihradsky F. Binding affinity and selectivity of opioids at mu, delta and kappa receptors in monkey brain membranes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 271:1630-7.

Evans, A. R. *et al.* The cAMP transduction cascade mediates the PGE₂-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurons. *J. Physiol.* v.516, pt.1, p. 163-178, 1999.

Ferreira, S. H.; Lorenzetti, B. B. Prostaglandin hyperalgesia, IV: a metabolic process. *Prostaglandins.* v. 21, n. 5, p. 789-792, 1981.

Ferreira, S. H. *et al.* Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v.334, n.6184, p.698-700, 1988.

Fields, H. State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci.* v. 5, n. 7, p. 565-75, Jul 2004.

Fields, H.L., Basbaum, A. I., Clanton, C. H., Stuart, D. A., 1977. Nucleus Rafhe Magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. *Brain Research.* 126:441-453.

Fields, H. L.; Anderson, S. D. Evidence that raphe-spinal neurons mediate opiate and midbrain stimulation-produced analgesias. *Pain.* v. 5, n. 4, p. 333-349, 1978.

Freitas, C. C.; Vieira, P. R.; Torres, G. V. B.; Pereira, C. R. A. Avaliação da dor com o uso das escalas unidimensionais. *Revista Dor.* 10 (1): 56-62, 2009.

Frode, T. S.; Souza, G. E.; Calixto, J. B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine.* 13 (3): 162-8, 2001.

Fukuoka, H., Kawatani, M., Hisamitsu, T., Takeshige, C., 1994. Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1b in the rat. *Brain Res.* 657:133-140.

Funez, M.I., Ferrari, L.F., Duarte, D.B., Sachs, D., Cunha, F.Q., Lorenzetti, B.B., Parada, C.A., Ferreira, S.H., 2008. Teleantagonism: A pharmacodynamic property of the primary nociceptive neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:19038-19043.

Fürst, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *The Brain Research Bulletin.* 48: 129-141, 1999.

Fürst, S., 1999. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res. Bull.* 48:129-141.

Gold, M. S.; Levine, J. D. Damgo inhibits prostaglandin E2-induced potentiation of a TTX-resistant Na⁺ current in rat sensory neurons in vitro. ***Neurosci. Lett.*** v. 212, n. 2, p. 83- 86, 1996.

Gold, M. S. et al. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***, v. 93, p. 1108-1112, 1996.

Gomes, T., Mamdani, M.M., Paterson, J.M., Dhalla, I.A., Juurlink, D.N. Trends in high-dose opioid prescribing in Canada Recherche Tendances dans la prescription de fortes doses d'opiacés au Canada 60, 826–832, 2014.

Green, A.F., Young P.A., 1951. A comparison of heat and pressure analgesiometric methods in rats. *Brit. J. Pharmacol.* 6:572-585.

Hassan, A.H., Ableitner, A., Stein, C., Herz, A., 1993. Inflammation in the rat paw enhances axonal transport of opioid in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. **Neuroscience**. 55:185-195.

Haws, C.M., Heinricher, M.M., Fields, H.L., 1990. Alpha-adrenergic receptor agonists, but not antagonists, alter the tail-flick latency when microinjected into the rostral ventromedial medulla of the lightly anesthetized rat. **Brain Res**. 533:192-195.

Houser, S.J., Eads, M., Embrey, J.P., Welch, S.P., 2000. Dynorphin B and spinal analgesia: induction of antinociception by the cannabinoids CP55,940, Delta(9)-THC and anandamide. **Brain Res**. 28:337-42.

Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G., 2002. International Union of Pharmacology: XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol. Rev.** 54: 161-202.

Jeanjean, A.P., Moussaoui, S.M., Maloteaux, J.M., Laduron, P.M., 1995. Interleukin-1 beta induces long-term increase of axonally transported opiate receptors and substance P. **Neurosci**. 68:151-157.

Julius, D.; Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. 413, 2001.

Junien. J. L.; Wettstein, J.G. Role of opioids in peripheral analgesia. **Life Sci**. v. 51, n. 26, p. 2009-2018, 1992.

Kawabata, A., Nishimura, Y., Takagi, H., 1992. L-Leucyl-L-arginine, naltrindole and D-arginine block antinociception elicited by L-arginine in mice with carrageenin-induced hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 107:1096-1101.

Kelly, S., Chapman, V., 2003. Cannabinoid CB1 receptor inhibition of mechanically evoked responses of spinal neurones in control rats, but not in rats with hindpaw inflammation. *Eur J Pharmacol.* 474:209-216.

Khan, Z.P., Ferguson, C.N., Jones, R.M., 1999. alpha-2 and imidazoline receptor agonists. Their pharmacology and therapeutic role. *Anaesthesia.* 54:146-65.

Ko, M.L., King, M.A., Gordin, T.L., Crisp, T., 1997. The effects of aging on spinal neurochemistry in the rat. *Brain. Res. Bull.* 42:95-98.

Kosterlitz, H.W, Lord J.A, Paterson SJ, *et al.* Effects of changes in the structure of enkephalins and of narcotic analgesic drugs on their interactions with mu and delta-receptor. *BR J Pharmacol.* 1980; 68:333-42.

Kuhar, M. J. *et al.* Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature*, v. 245, n. 5426, p. 447-450, 1973.

Law, B. K. *et al.* Salicylate-induced growth arrest is associated with inhibition of p70s6k and down-regulation of c-myc, cyclin D1, cyclin A, and proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* v. 275, n. 49, p. 38261-38267, 2000.

Levine, J.D., Taiwo, Y.O., 1994. Inflammatory pain. In: WALL D., Melzack R. (Ed.). Text Book of Pain. 3ed. London: Churchill-Livingstone. Cap.2, p.45-56.

Lewis J. *et al.* Opioids and pain regulation. Pain headache, v. 9, v. 129-159, 1987.

Li, Z., Proud, D., Zhang, C., Wiehler, S., McDougall, J.J., 2005. Chronic arthritis down-regulates peripheral mu-opioid receptor expression with concomitant loss of endomorphin 1 antinociception. Arthritis Rheum. 52:3210-3219.

Lichtman, A.H., Cook, S.A., Martin, B.R., 1996. Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. J. Pharmacol. Exp. Ther. 276:585-93.

Li, J. L. *et al.* Immunocytochemical localization of mu-opioid receptor in primary afferent neurons containing substance P or calcitonin gene-related peptide. A light and electron microscope study in the rat. Brain. Res. v. 794, n. 2, p. 347-352, 1998.

Lichtman, A.H., Martin, B.R., 1991. Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception. J. Pharmacol. Exp. Ther. 258:517-23.

Lorenzetti, B.B. *et al.* Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. Eur Cytokine Netw. v.13, n.4, p.456-461, 2002.

Machelska, H., Cabot, P.J., Mousa, S.A., Zhang, Q., Stein, C., 1998. Pain control in inflammation governed by selectins. *Nat. Med.* 4:1425-2148.

Machelska, H. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. *Neuropeptides*, v. 41, n.6, p. 355-63, Dec 2007.

Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346:561-564.

McMahon, S. B.; Koltzenburg, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. *Trends in Neurosciences*. 13(6):199-201, 1990.

McMahon, S. B.; Koltzenburg, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends** in Neurosciences. 13(6):199-201, 1990.

Melzack, R. *The puzzle of pain*. New York: Basic Books. 1973.

Melzack, R., Wall, P.D., 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 150:971-979.

Melzack, R.; Wall, P. D. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 150 (3699): 971-979, 1965.

Meng, I.D., Manning, B.H., Martin, W.J., Fields, H.L., 1998. An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature*. 395:381-383.

Millan, M. J. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*. 66: 355-474, 2002.

Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66:355-474.

Miller, R. J. Peptides as neurotransmitters: Focus on the enkephalins and endorphins. *Pharmacology & Therapeutics.* 12: 73-108, 1981.

Motta, P.G., Perez, A.C., Alves, D.P., Duarte, I.D., 2011(a). Peripheral control of inflammatory but not neuropathic pain by endogenous cholinergic system. *Pharmacology.* 88:18-25.

Motta, P.G., Perez, A.C., Alves, D.P., Duarte, I.D., 2011(b). Modulation of peripheral inflammatory pain thresholds by M(1) and nicotinic receptor antagonists. *Pharmacology.* 88:309-315.

Mousa S.A, Zhang, Q., Sitte, N., Ji, R., Stein, C., 2001. beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *J. Neuroimmunol.* 115:71-78.

Mousa, S.A., Cheppudira, B.P., Shaqura, M., Fischer, O., Hofmann, J., Hellweg, R., Schäfer, M., 2007. Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. *Brain.* 130:502-513.

Mousa, S.A., Machelska, H., Schäfer, M., Stein, C., 2002. Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. *J. Neuroimmunol.* 126:5-15.

Minami, M.; Satoh, M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci. Res.* v. 23, n. 2, p. 121-145, 1995.

Nakamura, M.; Ferreira, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacology.* v.135, p.145-153, 1987.

Olsson, Y. Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. *Crit. Rev. Neurobiol.* v. 5, n. 3, p. 265-311, 1990.

Pacheco, D., Klein, A., Perez, C., Pacheco, C.M., Francischi, J.N., Duarte, I.D.G., 2008. The μ -opioid receptor agonist morphine, but not agonists at δ or κ -opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 154:1143-1149.

Pertwee, R.G., 2001. Cannabinoid receptors and pain. *Prog. Neurobiol.* 63:569-611.

Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A., Rodríguez de Fonseca, F., 2000. Method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 111:409-419.

Pol, O., Sasaki, M., Jiménez, N., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Puig, M.M., 2005. The involvement of nitric oxide in the enhanced expression of mu-opioid receptors during intestinal inflammation in mice. *Br. J. Pharmacol.* 145:758-766.

Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 1999. In *Cytokines and Pain*, eds. Watkins, L.R., Maier, S.F. (Springer, Berlin), pp. 59-87.

Poole, S., Cunha, F.Q., Selkirk, S., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H., 1995. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *Br. J. Pharmacol.* 115:684-688.

Poonyachoti, S. et al. Chemical coding of neurons expressing delta- and kappa-opioid receptor and type I vanilloid receptor immunoreactivities in the porcine ileum. *Cell Tissue Res.* v. 307, n. 1, p. 23-33, 2002.

Pradhan, A.A., Smith, M.L., Kieffer, B.L., Evans, C.J., 2012. Ligand-directed signalling within the opioid receptor family. *Br. J. Pharmacol.* 167, 960–969. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02075.x.

Proudfit, H.K., 1988. Pharmacologic evidence for the modulation of nociception by noradrenergic neurons. *Prog. Brain Res.* 77:357-370.

Puehler A.,W., Rittnera, A., Mousa, A., Brack, A., Krause, B., Stein A., Schäfer, A., 2006. Interleukin-1 beta contributes to the upregulation of kappa opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation. *Neuroscience.* 141:989-998.

Pugh, G. Jr, Smith, P.B., Dombrowski, D.S., Welch, S.P., 1996. The role of endogenous opioids in enhancing the antinociception produced by the combination of delta 9-tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279:608-16.

Randall, L.O., Selitto, J.J., 1957. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 111:409-419.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J. *Farmacologia*. 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2007.

Raychaudhuri, A.; Chertock, H.; Chovan, J.; Jones, L. S.; Kimble, E. F.; Kowalski, T. J.; Peppard, J.; White, D. H.; Satoh, Y.; Roland, D. Inhibition of LTB₄ biosynthesis in situ by CGS 23885, a potent 5-lipoxygenase inhibitor, correlates with its pleural fluid concentrations in an experimentally induced rat pleurisy model. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 355 (4): 470-4, 1997.

Reynolds, D. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*. 164: 444-445, 1969.

Reynolds, D.V., 1969. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*. 164:444-445.

Rhudy, J. L.; Meagher, M. W. Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. *Pain*. 84 (1): 65-75, 2000.

Rice, A.S., Farquhar-Smith, W.P., Nagy, I., 2002. Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty. Acids*. 66:243-256.

Richardson, J.D., Aanonsen, L., Hargreaves, K.M., 1998. Antihyperalgesic effects of spinal cannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.* 345:145-153.

Riedel, W., Neeck, G., 2001. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 60:404-415.

Rittner, H.L., Brack, A., Machelska, H., Mousa, S.A., Bauer, M., Schäfer, M., Stein, C., 2001. Opioid peptide expressing leukocytes-identification, recruitment and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology*. 95:500-508.

Romero, T.R.L. Participação dos sistemas noradrenérgico, opioidérgico e canabinoideérgico nos mecanismos antinociceptivos central e periférico da xilazina e na modulação endógena periférica da dor inflamatória. Belo Horizonte, 2011. Tese (Doutorado em Farmacologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

Sandkühler, J., 1996. The organization and function of endogenous antinociceptive systems. *Prog. Neurobiol.* 50:49-81.

Schafer, M., Imai, Y., Uhl, G.R., Stein, C., 1995. Inflammation enhances peripheral μ -opioid receptor-mediated analgesia, but not δ -opioid receptor transcription in dorsal root ganglia. *Eur. J. Pharmacol.* 279:165-9.

Schneider, F.; Karoly, P. Conceptions of the pain experience: the emergence of multidimensional models and their implications for contemporary clinical practice. *Clinical Psychology Review*. 3: 61-86, 1983.

Schultz, J.; Gross, G. Opioids and cardioprotection. *Pharmac. Ther.* v. 89, p. 123-137, 2001.

Silva, J. F.; Correa, I.C.; Diniz, T.F.; Lima, P.M.; Santos, R.L.; Cortes, S.F.; Coimbra, C.C.; and Lemos, V.S. Obesity, Inflammation, and Exercise Training: Relative Contribution of iNOS and eNOS in the Modulation of Vascular Function in the Mouse Aorta. *Front. Physiol.* 7:386, 2016. doi: 10.3389/fphys.2016.00386

Smith, F.L., Fujimori, K., Lowe, J., Welch, S.P., 1998. Characterization of delta9-tetrahydrocannabinol and anandamide antinociception in nonarthritic and arthritic rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60:183-191.

Sorkin, L.S., Wallace, M.S., 1999. Acute pain mechanisms. *Surg. Clin. North. Am.* 79:213-29.

Southall, M. D.; Vasko, M. R. Prostaglandin receptor subtypes, EP3 and EP4, mediate the prostaglandin E2 induced cAMP production and sensitization of sensory neurons. *J. Biol. Chem.*, v. 276, n.19, p.16083-16091.

Stein, C., Ahmed, H.S.H., Ryszard, P., Christian, G., Klaus, P., Albert, H., 1990. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:5935-5939.

Stein, C., Millan, M.J., Shippenberg, T.I., Peter, K., Herz, A., 1989. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of μ , δ and κ receptors. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 248:1269-1275.

Stein, C., Schafer, M., Hassan, A.H., 1995. Peripheral opioid receptors. *Ann. Med.* 27:219–221.

Stein, C., Schäfer, M., Machelska, H., 2003. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat. Med.* 9:1003-1009.

Stonski E, Cullen C. Receptor opiode periférico; su utilidad clínica. *Rev Argent Anesthesiol.* 2007; 65: 143-58.

Taylor, S.I., 1999. Deconstructing Type 2 Diabetes Minireview. *Cell.* 97, 9–12.

Truong.W. *et al.* Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. *Ann. Neurol*; v.53, n.3, p.366-375, 2003.

Vanderah, T. W. Pathophysiology of pain. *Medical Clinics of North America.* 91:1-12, 2007.

Waldhoer, M., Bartlett, S.E., Whistler, J.L., 2004. Opioid receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 73:953-990.

Wall, P. D. On the relation of injury to pain: The John J. Bonica lecture. *Pain.* 6: 253-264, 1979.

Watkins, L. R.; Mayer, D. J. Organization of endogenous opiate and non-opiate pain control systems. *Science.* 216: 1185-92, 1982.

Welch, S.P., Eads, M., 1999. Synergistic interactions of endogenous opioids and cannabinoid systems. *Brain Res.* 848:183-90.

Welch, S.P., Thomas, C., Patrick, G.S., 1995. Modulation of cannabinoid-induced antinociception after intracerebroventricular versus intrathecal administration to mice: possible mechanisms for interaction with morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272:310-321.

Wenk, H. N.; Honda, C. N. Immunohistochemical localization of delta opioid receptors in peripheral tissues. *J. Comp. Neurol.* v. 408, n. 4, p. 567-579, 1999.

Woodcock, J.; Witter, J.; Dionne, R. A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. *Nat Rev Drug Discov.* v.6, n.9, p.703-10, sep 2007.

Woolf, C. J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine.* 140 (6): 441-451, 2004.

Woolf, C. J. What is this thing called pain? *Journal of Clinical Investigation.* 120 (11): 3742–3744, 2010.

Woolf, C. J. What is this thing called pain? *Journal of Clinical Investigation.* 120 (11): 3742–3744, 2010.

Woolf, C. J., 1991. Generation of acute pain: central mechanisms. *British Medical Bulletin.* 47:523-533.

Woolf, C. J.; Ma, Q. Nociceptors: Noxious stimulus detectors. *Neuroscience Journal.* 55 (3): 353-64, 2007.

Yaksh, T.L., 1985. Pharmacology of spinal adrenergic systems which modulate spinal nociceptive processing. *Pharmacol Biochem Behav.* 22:845-58.

Yamamoto, J., Kawamata, T., Niiyama, Y., Omote, K., Namiki, A., 2008. Down-regulation of mu opioid receptor expression within distinct subpopulations of dorsal rootganglion neurons in a murine model of bone cancer pain. *Neuroscience.* 151:843-853.

Yuhki, K.; Ueno, A.; Naraba, H.; Kojima, F.; Ushikubi, F.; Narumiya, S.; Oh-ishi, S. Prostaglandin receptors EP2, EP3, and IP mediate exudate formation in carrageenin-induced mouse pleurisy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 311 (3): 1218-24, 2004.

Zollner, C., Shaqura, M.A., Bopaiah, C.P., Mousa, S., Stein, C., Schafer, M., 2003. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol. Pharmacol.* 64:202-210.