

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

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO PERIFÉRICO DO SULFATO DE
MAGNÉSIO EM CAMUNDONGOS

Loyara Rocha Miranda Teixeira

Belo Horizonte

2019

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

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO PERIFÉRICO DO SULFATO DE
MAGNÉSIO EM CAMUNDONGOS

Loyara Rocha Miranda Teixeira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte

Belo Horizonte

2019

“Declaro, no entanto, que não devemos rejeitar a arte antiga como inexistente, apenas porque não atingiu a exatidão em todos os detalhes, mas muito, porque foi capaz, por meio do raciocínio, de passar da profunda ignorância para a perfeita perfeição”.

Hipócrates

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me proporcionar essa oportunidade fantástica!

Ao Professor Igor Dimitri Gama Duarte pela oportunidade de sua orientação, paciência e incentivo desde minha entrada no laboratório.

Aos Professores Thiago Roberto Lima Romero e Andrea de Castro Perez pela agradável convivência e exemplo de competência.

Aos meus pais, Isabel e Aloísio, pela minha educação, por todo carinho, apoio e torcida!

Ao meu esposo Marcelo, um grande companheiro e amigo, amor da minha vida toda!

Às minhas irmãs, Louyse e Laylane, pelo companheirismo e incentivo.

Aos colegas do laboratório de Dor e Analgesia por todo aprendizado, colaboração, companhia e momentos agradáveis, em especial as doutorandas Cristina da Costa Oliveira, Flávia Cristina de Sousa Fonseca e Danielle Diniz Aguiar.

Aos coordenadores da clínica de anestesiologia do Hospital Metropolitano Odilon Behrens, Thadeu Alves Máximo, e do Hospital de Pronto Socorro João XXIII,

Luciana de Souza Cota Carvalho Laurentz e Sérgio Rebello Horta Jardim, pela compreensão e auxílio fundamentais para conclusão desse trabalho.

Aos colegas de trabalho, pela parceria e convivência prazerosa; e a todos os meus amigos pela torcida e incentivo.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Rodner Rodrigues Madureira de Almeida e Thiago Alexandre do Amaral Abílio, pela disponibilidade.

Aos funcionários do Cebio-ICB/UFMG e aos bioteristas da farmacologia, especialmente, Rinaldo do Nascimento, pela dedicação e zelo no cuidado com os animais de experimentação.

Aos órgãos de fomento pelo apoio financeiro para execução desse trabalho.

Aos animais que doaram suas vidas para a ciência!

E, por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para que esse sonho fosse realizado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE GRÁFICOS.....	12
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
1. Introdução.....	19
1.1. Estudo da dor.....	19
1.2. Vias ascendentes.....	23
1.3. Vias descendentes.....	28
1.4. Papel dos canais iônicos e dos aminoácidos excitatórios.....	30
1.5. Papel do Magnésio na dor.....	33
2. Justificativa.....	38
3. Objetivos.....	42
3.1. Objetivo Geral.....	42
3.2. Objetivos Específicos.....	42
4. Material e Métodos.....	45
4.1. Animais de experimentação.....	45
4.2. Fármacos e Solventes.....	45
4.2.1. Agente analgésico sob estudo.....	45

4.2.2.	Agentes hiperalgésicos	46
4.2.3.	Agentes envolvidos no sistema opioidérgico.....	47
4.2.4.	Agentes envolvidos no sistema canabinoidérgico	47
4.2.5.	Agentes envolvidos no sistema Nitrérgico.....	48
4.2.6.	Agentes envolvidos no sistema de canais para potássio	50
4.3.	Via de administração das drogas.....	51
4.3.1.	Intraplantar	51
4.4.	Avaliação do Efeito Antinociceptivo.....	52
4.4.1.	Teste de Retirada de Pata	52
4.4.2.	Medida do limiar nociceptivo e antinociceptivo.....	54
4.4.3.	Exclusão do efeito não local no estudo periférico	55
4.5.	Procedimento experimental.....	55
4.6.	Análise estatística	56
5.	Resultados.....	60
5.1.	Efeito hiperalgésico periférico da PGE₂	60
5.2.	Efeito hiperalgésico periférico da calcimicina.....	62
5.3.	Efeito hiperalgésico periférico do NMDA	64
5.4.	Efeito antinociceptivo periférico do sulfato de magnésio	66
5.4.1.	Efeito antinociceptivo periférico do MgSO ₄ na hiperalgesia induzida pela PGE ₂	66
5.4.2.	Efeito antinociceptivo periférico do MgSO ₄ na hiperalgesia induzida pela Calcimicina	70

5.4.3. Efeito antinociceptivo periférico do MgSO ₄ na hiperalgesia induzida pelo NMDA.....	72
5.5. Avaliação da participação do sistema opioidérgico na antinocicepção periférica induzida pelo MgSO₄.....	74
5.6. Avaliação da participação do sistema canabinoideérgico na antinocicepção periférica induzida pelo MgSO₄.....	76
5.7. Avaliação da participação da via L-Arginina/NO/GMPc na antinocicepção periférica induzida pelo MgSO₄.....	79
5.8. Avaliação da participação dos canais para potássio na antinocicepção periférica induzida pelo MgSO₄.....	86
6. Discussão.....	92
Referências Bibliográficas.....	104
Anexos.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

A23187: Calcimina

AKT: Proteína quinase B (ou PKB)

AMPA: Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolepropionato

AMPc: 3'5'-adenosina-monofosfato cíclico

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

ATP: Trifosfato de adenosina

CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CB₁: Receptor canabinóide do tipo 1

CB₂: Receptor canabinóide do tipo 2

CEBIO: Centro de Bioterismo

DMSO: Dimetilsulfóxido

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

EPM: Erro padrão da média

GMPc: 3'5'-guanosina-monofosfato cíclico

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

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IMS Health: Serviço de Informações e Medidas de Saúde

i.pl.: Intraplantar

IUPHAR - União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (do inglês *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*)

K⁺_{ATP}: Canais para potássio sensíveis a ATP

K⁺_{ca}: Canais para potássio ativados por cálcio

K⁺_v: Canais para potássio dependentes de voltagem

mg/Kg: Miligrama/quilograma

MgSO₄: Sulfato de Magnésio

MK-801: Maleato de Dizocilpina

n: Número de animais experimentais

NaCl: Cloreto de sódio

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NOS_e: Óxido nítrico sintase endotelial

NOS_i: Óxido nítrico sintase induzível

NOS_n: Óxido nítrico sintase neuronal

NMDA: N-metil-D-aspartato

PI3K: Fosfoinositol 3-quinase

PD: Pata posterior direita

PE: Pata posterior esquerda

PGE₂: Prostaglandina E₂

PKA: Proteína quinase A

PKC: Proteína quinase C

PKG: Proteína quinase dependente de GMPc

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

TTX: Tetrodotoxina

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação dos tipos de dor (extraída de Woolf, 2004).	22
Figura 2: Diâmetro axonal e velocidade de condução de fibras sensitivas.	25
Figura 3: O Nociceptor..	31
Figura 4: Ampola de MgSO ₄ utilizada nos experimentos.	46
Figura 5: Ação antagonista farmacológica competitiva reversível não-seletiva da naloxona sobre os receptores μ , δ e κ opioides.	47
Figura 6: Ação antagonista farmacológica competitiva reversível seletiva do AM251 e do AM630 sobre os receptores CB ₁ e CB ₂ canabinoides, respectivamente.....	48
Figura 7: Ferramentas farmacológicas utilizadas para o estudo do sistema nitrérgico e seus locais de ação.....	49
Figura 8: Bloqueadores seletivos dos diferentes canais para potássio e os locais de ação.....	50
Figura 9: Administração de drogas pela via intraplantar em camundongos.	51
Figura 10: Camundongo submetido ao teste de retirada da pata no aparelho algosimétrico.	53
Figura 11: Detalhe da pata do animal submetido ao teste de compressão.....	53
Figura 12: Representação esquemática do mecanismo antinociceptivo periférico do MgSO ₄	103

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito da injeção periférica de PGE ₂ sobre o limiar nociceptivo de camundongos.....	61
Gráfico 2: Efeito da injeção periférica de calcimicina sobre o limiar nociceptivo de camundongos.....	63
Gráfico 3: Efeito da injeção periférica de NMDA sobre o limiar nociceptivo de camundongos.....	65
Gráfico 4: Efeito do MgSO ₄ no limiar nociceptivo em camundongos com hiperalgesia induzida por PGE ₂	67
Gráfico 5: Exclusão do efeito antinociceptivo sistêmico da MgSO ₄	69
Gráfico 6: Reversão do efeito hiperalgésico da calcimicina pelo MgSO ₄	71
Gráfico 7: Reversão do efeito hiperalgésico do NMDA pelo MgSO ₄	73
Gráfico 8: Ausência de antagonismo no efeito antinociceptivo periférico do MgSO ₄ pela administração intraplantar de naloxona (NAX).	75
Gráfico 9: Ausência de antagonismo no efeito antinociceptivo periférico do MgSO ₄ pela administração intraplantar de AM251.	77
Gráfico 10: Ausência de antagonismo no efeito antinociceptivo periférico do MgSO ₄ pela administração intraplantar de AM630.	78
Gráfico 11: O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico do MgSO ₄ pela administração intraplantar de L-NOArg.	80
Gráfico 12: O efeito da administração de L-NPA sobre a antinocicepção periférica do MgSO ₄	81
Gráfico 13: Efeito da administração de LNIL e LNIO sobre a antinocicepção periférica do MgSO ₄	82

Gráfico 14: Antagonismo do efeito antinociceptivo periférico do $MgSO_4$ pela administração intraplantar de ODQ.	84
Gráfico 15: Potencialização do efeito antinociceptivo periférico do $MgSO_4$ pela administração intraplantar de Zaprinasst	85
Gráfico 16: Antagonismo do efeito antinociceptivo periférico do $MgSO_4$ pela administração intraplantar de glibenclamida.	87
Gráfico 17: Ausência de antagonismo no efeito antinociceptivo periférico do $MgSO_4$ pela administração intraplantar de tetraetilamônio.	88
Gráfico 18: Ausência de antagonismo no efeito antinociceptivo periférico do $MgSO_4$ pela administração intraplantar de paxilina.	89
Gráfico 19: Ausência de antagonismo no efeito antinociceptivo periférico do $MgSO_4$ pela administração intraplantar de dequalínio.	90

RESUMO

O magnésio tem inúmeras funções biológicas fundamentais e suas aplicações têm despertado um crescente interesse na medicina. Dentre essas, sua ação analgésica tem sido demonstrada em modelos de dor crônica e aguda, tanto em animais, quanto em estudos clínicos. Entretanto, os mecanismos pelos quais atua são pouco elucidados. O objetivo desse estudo é testar o efeito e os mecanismos antinociceptivos da injeção intraplantar de sulfato de magnésio em modelo de hiperalgesia mecânica com compressão da pata, aplicado no aparelho algosimétrico, em camundongos swiss machos. Em nosso trabalho, a hiperalgesia periférica foi induzida pela injeção intraplantar de prostaglandina E₂ (PGE₂: 2 µg/pata), do inonóforo de cálcio, calcimicina (A23187: 20 µg/pata) e do agonista de receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA: 12 µg/pata). O sulfato de magnésio foi testado com a injeção i.pl. das doses de 20, 40, 80 e 160 µg/pata, tendo sido observada antinocicepção dose-dependente. A ação antinociceptiva periférica máxima, sem efeito sistêmico, foi observada com a dose de 80 µg/pata, em patas com hiperalgesia induzida pela injeção de PGE₂, em comparação a injeção de veículo (NaCl 0,9%). A dose de 40 µg/pata induziu a antinocicepção parcial e a dose de 160 µg/pata provocou efeito sistêmico. Inicialmente, testamos se há participação da via NO/GMPc/K⁺_{ATP} nesse processo. A analgesia induzida pela dose de 80 µg/pata de MgSO₄ foi revertida com a injeção i.pl. de antagonista de NOS não seletivo (L-NOArg: 12, 18 e 24 µg/pata), de antagonista seletivo de NOS_n (L-NPA: 12, 18 e 24 µg/pata) e de inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ: 25, 50 e 100 µg/pata) de maneira dose-dependente e não o foi, pelos antagonistas de NOS_e (L-NIO: 24 µg/pata) e NOS_i (L-NIL: 24 µg/pata). O inibidor da fosfodiesterase específica

de GMPc (Zaprinast: 50 µg/pata) aumentou o efeito antinociceptivo da dose intermediária de MgSO₄ (40 µg/pata). O bloqueador de canais para K⁺ sensíveis a ATP (Glibenclamida: 20, 40 e 80 µg/pata) também reverteu, de maneira dose-dependente, a analgesia induzida pelo MgSO₄ na dose de 80 µg/pata, o que não ocorreu com os bloqueadores de canais para K⁺ dependentes de voltagem (Tetraetilamônio: 30 µg/pata), sensíveis a cálcio de baixa e de alta condutância (Paxilina: 20 µg/pata e Dequalínio: 50 µg/pata, respectivamente). O antagonista inespecífico de receptores opioides (naloxona: 50 µg/pata) e os antagonistas de receptores canabinoides CB₁ (AM 251: 160 µg/pata) e CB₂ (AM630: 100 µg/pata) não reverteram o efeito analgésico do MgSO₄. O efeito antinociceptivo também foi detectado em relação aos estímulos hiperalgésicos da calcimicina e do NMDA, sendo revertido com a injeção i.pl. de MgSO₄ na dose de 80 µg/pata. Nossos resultados demonstram que o MgSO₄ atua como agente antinociceptivo periférico no modelo de dor inflamatória induzido pela injeção de PGE₂, por ativação da via NO/GMPc/K⁺_{ATP}. De forma similar, o sulfato de magnésio também reverte a hiperalgesia induzida pela calcimicina e pelo NMDA, sugerindo antagonismo de cálcio e de glutamato em receptores NMDA como mecanismos associados de ação analgésica.

ABSTRACT

Magnesium plays a fundamental role in many biological functions, and thus there is increasing interest in clinical medicine. In addition, the analgesic functions have been shown in models of acute and chronic pain, as well as in animals and clinical practice. However, mechanisms of action remain unknown. The aim of this study is to verify effect and antinociceptive mechanisms of magnesium sulphate administered locally into the hindpaw. The male swiss mice paw pressure test was used, according described by Randall & Sellito. In our experiments, hyperalgesia was induced by subcutaneous injection of prostaglandin E₂ (PGE₂: 2 µg/paw), calcium ionophore, calcimycin (A23187: 20 µg/paw) and agonist of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NMDA: 12 µg/paw) into the plantar surface of the hindpaw. Magnesium sulphate injected into the right hind paw (20, 40, 80 e 160 µg/paw) induced antinociceptive effect in a dose-dependent manner. The dose of 80 µg per paw was able to reverse the hyperalgesia induced by PGE₂ almost completely without systemic effects, in comparison to vehicle (NaCl 0,9%). However, a dose of 40 µg per paw induced partial antinociception, as a dose of 160 µg per paw produced antinociception in the opposite paw. We have tested whether the NO/cGMP/K⁺_{ATP} pathway plays an important role in this process. The antinociceptive effect of MgSO₄ (80 µg/paw) was antagonized by the non-selective NOS inhibitor (L-NOArg: 12, 18 and 24 µg/paw), the selective neuronal NOS inhibitor (L-NPA: 12, 18, and 24 µg/paw) and the soluble guanylyl cyclase inhibitor (ODQ: 25, 50, and 100 µg/paw) in a dose-dependent manner. Endothelial (eNOS) and inducible (iNOS) selective NOS inhibitors (L-NIO: 24 µg/paw and L-NIL: 24 µg/paw, respectively) were not able to block the antinociceptive effect. The cGMP-phosphodiesterase inhibitor (zaprinast:

50 $\mu\text{g/paw}$) enhanced the antinociceptive effects of low-dose MgSO_4 (40 $\mu\text{g/paw}$). The K^+_{ATP} specific blocker (glibenclamide: 20, 40 and 80 $\mu\text{g/paw}$) antagonized magnesium sulphate-induced peripheral antinociception (80 $\mu\text{g/paw}$) in a dose-dependent manner. In another experiment, the nonselective voltage-dependent K^+ channel blocker (tetraethylammonium: 30 $\mu\text{g/paw}$) and small and large conductance blockers of Ca^{2+} -activated K^+ channels (dequalinium: 50 $\mu\text{g/paw}$ and paxilline: 20 $\mu\text{g/paw}$, respectively) were ineffective at blocking the effect of a local MgSO_4 injection. The non-selective opioids receptors antagonist (naloxone: 50 $\mu\text{g/paw}$), as well as the CB_1 -selective cannabinoid receptor antagonist (AM251: 160 $\mu\text{g/paw}$) and the CB_2 -selective cannabinoid receptor antagonist (AM630: 100 $\mu\text{g/paw}$), did not reverse the analgesic effects of magnesium sulphate. The hyperalgesia induced by calcimycin and NMDA was also reversed by MgSO_4 80 $\mu\text{g/paw}$. Our results suggest that magnesium sulphate induce peripheral antinociceptive effects in the PGE_2 -induced inflammatory pain model by the $\text{NO/cGMP/K}^+_{\text{ATP}}$ pathway activation. At the same way, MgSO_4 also reverse the hyperalgesia induced by calcimycin and NMDA, suggesting calcium and glutamate NMDA receptor antagonism might be additional analgesic mechanisms.

Introdução

1. Introdução

1.1. Estudo da dor

A dor é um aspecto importante no curso da evolução humana, sendo que cada cultura deixou seu testemunho acerca da forma de sentir dor e do impacto causado pela mesma. Dessa forma, o entendimento do conceito e dos mecanismos da dor sofreram inúmeras modificações ao longo da história.

No Egito antigo e entre alguns povos da América pré-colombiana, a dor era vista como resultado da entrada de espíritos dos mortos no corpo através da orelha ou narina. Entre os incas, os portadores de doenças dolorosas seriam vítimas de espíritos malignos e, para que houvesse alívio da dor, era necessário que esses “demônios” fossem expulsos de seus corpos (TEIXEIRA. & YENG, 2017). Na antiga China, o imperador Sheng Nung (2800 a.C.) era grande conhecedor do uso medicinal de ervas para o tratamento da dor (KARKLIS & FERREIRA, 2011).

Os primeiros passos na busca de uma explicação racional da dor ocorreram na Grécia clássica. Aristóteles (384-322 a.C.) procurou uma explicação biológica para sensação dolorosa, que seria conduzida “do sangue ao coração”, visto como “órgão central da alma” (TEIXEIRA. & YENG, 2017). Da mesma forma, Hipócrates (460-370 a.C.) rejeitou teorias mágicas e religiosas, então em voga, e dirigiu-se a observação clínica de que as enfermidades eram desvios dos processos naturais por alterações dos “humores” do organismo, cabendo ao médico restaurar o equilíbrio dos mesmos (KARKLIS & FERREIRA, 2011).

Durante o período medieval, a Igreja Católica destruiu muitos textos gregos e romanos acerca dos conhecimentos médicos, taxando-os de heréticos e suprimindo

a Europa Ocidental de uma investigação e experimentação científica. Nesse período, a dor voltou a ser vista como invasão do corpo por maus espíritos (KARKLIS & FERREIRA, 2011).

Quando o mundo ocidental começou a emergir da “Idade das Trevas” durante o século XII, a tradição grega ressurgiu na Europa. No entanto, com o início do Renascimento no século XV a prática médica grega começa a ser questionada. René Descartes (1596-1650) em seu livro, *Tratado do Homem* (1664), propõe a transferência do centro de sensação da dor do coração para o cérebro (OLSON, 2015b). Também no período renascentista, o poder do ópio para alívio da dor passou a ter reconhecimento. Com o avanço no conhecimento da anatomia e da fisiologia, no século XIX, iniciou-se a possibilidade de assumir a existência do componente emocional na dor (OLSON, 2015a). Também neste século foram publicadas as primeiras teorias que formaram a base para definir que a dor possuía uma via própria (OLSON, 2013).

Em 1973, com o objetivo de estimular e apoiar o estudo da dor e traduzir esse conhecimento em melhoras no seu tratamento, John J. Bonica fundou a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP). Essa associação, em 1979, definiu a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial de tecidos, ou descrita em termos de tal dano (MERSKEY & BOGDUK, 1994). Sendo assim, muito mais que um fenômeno físico, pode-se concluir que a dor é formada a partir da integração de estímulos sensoriais a aspectos emocionais e biopsicossociais (OLSON, 2013). Dessa forma, os termos dor e analgesia envolvem tanto o componente sensorial, quanto o emocional, sendo preferencialmente utilizados ao nos referirmos aos seres humanos (WOOLF, 2004).

Por outro lado, conforme descrição taxonômica da IASP, nocicepção é definida como processo neural de codificação de estímulos nocivos. Esse termo, por excluir o componente emocional da dor, torna-se o mais adequado em modelos de experimentação animal. Assim como o termo antinocicepção, descrito como redução na capacidade de percepção do estímulo doloroso (MERSKEY. & BOGDUK, 1994). Entretanto, não é questionada a presença do componente emocional da dor nos animais, apenas não costumamos mensurar tal componente em avaliações experimentais.

Segundo Woolf (2010), a dor pode ser classificada conforme sua origem etiológica em nociceptiva, inflamatória, neuropática ou disfuncional (**Figura 1**). A dor nociceptiva ocorre a partir da ativação direta do nociceptor por estímulos mecânico, térmico ou químico. Na dor inflamatória, a lesão tecidual dá origem a um processo inflamatório através da ativação celular e liberação de mediadores que ativam ou sensibilizam (diminuem o limiar de ativação) os neurônios nociceptivos periféricos. A dor neuropática, por sua vez, é causada por uma lesão do sistema nervoso central ou periférico. Já a dor disfuncional não tem uma causa evidente, não sendo identificado estímulo, processo inflamatório, nem lesão no sistema nervoso.

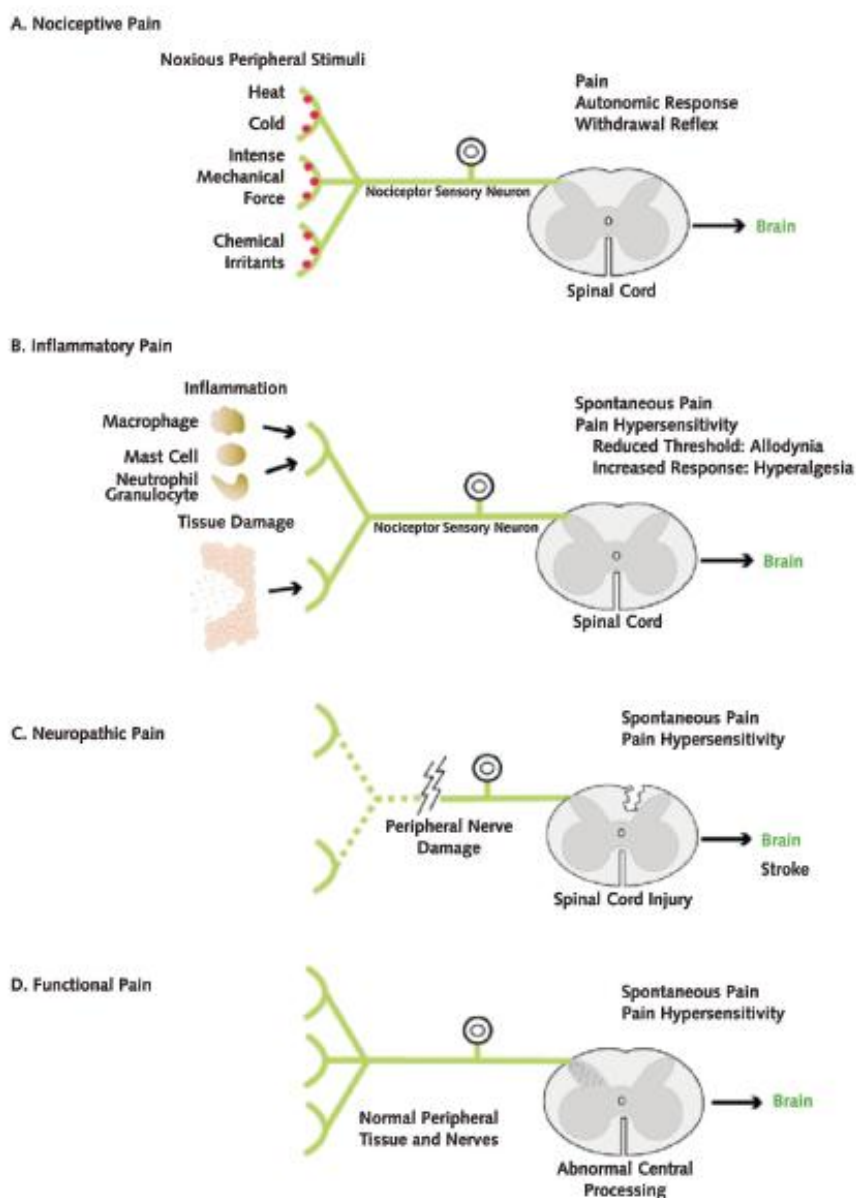


Figura 1: Classificação dos tipos de dor (extraída de Woolf, 2004).

A dor nociceptiva, também chamada de fisiológica, constitui uma função adaptativa de extrema importância, responsável pela reação de retirada reflexa ao queimar ou ao cair um objeto pesado sobre o pé (WOOLF, 2004). Assim, a sua ausência, como ocorre em algumas condições clínicas hereditárias, pode levar a repetidas lesões e a automutilação inconsciente (WOOLF, 2010).

Já na dor inflamatória, após a ocorrência de uma lesão tecidual, inicia-se uma complexa cascata de eventos, caracterizada pela liberação de vários mediadores por células neurais e não neurais, dentre as quais se destacam as prostaglandinas, PGE₂ e PGI₂ (RICHARDSON & VASKO, 2002). As prostaglandinas têm uma função chave na geração da resposta inflamatória e contribuem definitivamente no desenvolvimento dos sinais cardinais da inflamação (dor, calor, rubor, edema e perda de função). A contribuição da PGE₂, para a gênese da dor inflamatória, deve-se à ação em nociceptores periféricos, assim como em sítios centrais, diminuindo o limiar nociceptivo (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011).

Como a hiperalgesia é definida como um aumento da percepção de dor induzida por um estímulo que normalmente a provoca (WOOLF, 2004), na inflamação esse processo é produzido pela PGE₂ através da ativação de receptores específicos acoplados a proteína G. Esses, quando ativados, promovem a formação de segundo mensageiro, o AMPc, responsável pela ativação de proteínas quinases intracelulares, ou de terceiros mensageiros, como o cálcio, que vão interferir em outras proteínas celulares e na regulação de canais iônicos (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). Por outro lado, alodinia consiste em sensação de dor provocada por um estímulo que normalmente não a provoca, e pode ocorrer tanto na dor neuropática quanto na dor inflamatória (WOOLF, 2004).

1.2. Vias ascendentes da dor

Dentre os estímulos sensoriais gerais que o ser humano pode perceber, destacam-se: tato, pressão, temperatura, vibração e dor. Para cada modalidade de sensação, existe um tipo específico de receptor, que é uma especialização do

terminal nervoso do primeiro neurônio sensitivo (neurônio primário). Esse neurônio, por sua vez, é pseudo-unipolar, seu corpo celular encontra-se no gânglio da raiz dorsal e seus estímulos são conduzidos pelas raízes dorsais ao corno posterior da medula, onde fazem sinapse com o neurônio secundário (WOOLF & MA, 2007).

As fibras nervosas podem ou não ser revestidas por mielina, e a velocidade de condução do estímulo será maior quanto mais espessa for a bainha de mielina **(Figura 2)**. As fibras sensoriais são classificadas, conforme sua velocidade de condução, nos tipos A (mielínicas) e C (amielínicas), e as fibras do tipo A ainda são subdivididas em fibras α , β , γ e δ , em ordem decrescente de espessura da bainha de mielina. As fibras $A\alpha$ (10-20 μm) conduzem estímulos das terminações primárias dos fusos musculares e do órgão tendinoso de Golgi. As fibras $A\beta$ (5-15 μm) conduzem estímulos táteis mais discretos, já as fibras $A\gamma$ (2-10 μm) são responsáveis por terminações secundárias dos fusos musculares, enquanto as fibras $A\delta$ (1-5 μm) conduzem sensibilidade térmica, dolorosa e tato não discriminativo, assim como as fibras C (0,5-2 μm), que também conduzem a sensação de coceira.

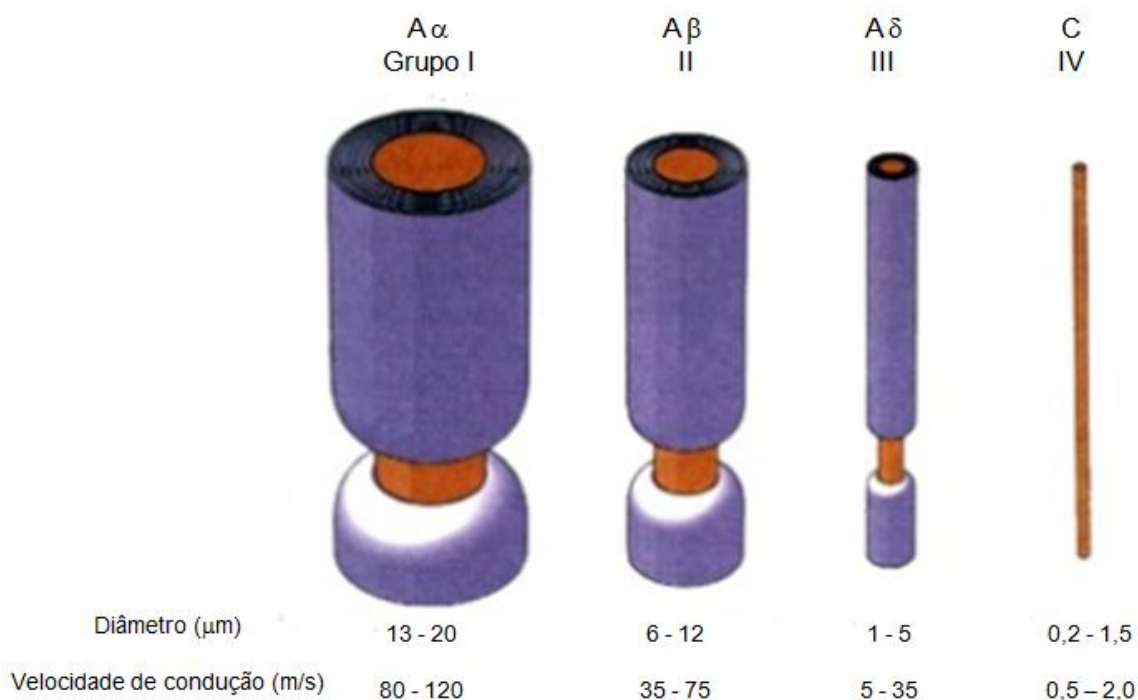


Figura 2: Diâmetro axonal (micrômetros) e velocidade de condução (metros/segundo) de fibras sensitivas (modificado de Guyton e Hall, 2017).

A sensação dolorosa ocorre a partir da transformação de um estímulo mecânico, térmico ou químico captado pelo Sistema Nervoso Periférico (SNP) e conduzido ao Sistema Nervoso Central (SNC), onde pode ser interpretada como dor, ao nível do córtex somatossensorial (MELLO & DICKENSON, 2008). Durante a execução desse processo, ocorrem quatro fenômenos, a saber: transdução, transmissão, percepção e modulação da dor (WOOLF, 2004).

A transdução ocorre quando estímulos nocivos como calor, frio, compressão intensa, agentes químicos e estiramento ou contração muscular excessivos ativam terminações nervosas livres do tipo C e A δ , denominadas nociceptores (WOOLF, 2004). Nesse caso, o estímulo sensorial é transformado em um sinal neuronal, o potencial de ação. O que diferencia os nociceptores de outros receptores sensoriais

é o alto limiar dos primeiros, desta forma só são responsivos a estímulos sensoriais mais intensos, capazes de atingir o limiar nociceptivo (WOOLF & MA, 2007).

As fibras A δ têm uma fina camada de mielina, medem 1-5 μ m, são responsivas a estímulos nocivos térmicos e/ou mecânicos, e ao serem ativadas, induzem uma sensação dolorosa bem localizada e específica. Já as fibras do tipo C são amielínicas, medem 0,5-2 μ m, são responsivas a estímulos de origem mecânica, térmica e/ou química, e por serem multirresponsivas, são denominadas receptores polimodais. Após a ativação, induzem uma sensação dolorosa difusa e inespecífica (FEIN, 2014). As fibras A β , embora se relacionem mais comumente a estímulos táteis, também podem veicular informações nociceptivas em condições normais ou após lesão tecidual ou sensibilização por substâncias inflamatórias (MILLAN, 2002). Dentre os neurotransmissores responsáveis pela comunicação entre os neurônios primário e secundário dessa via destacam-se glutamato, substância P e ATP (SCHOLZ & WOOLF, 2002). Ao processo de condução do sinal pelas fibras nociceptivas ao SNC dá-se o nome de Transmissão (WOOLF, 2004).

A substância cinzenta medular foi estudada e dividida em dez lâminas (I a X), conforme a organização histológica dos corpos celulares e dendritos, denominadas lâminas de Rexed. As fibras nociceptivas fazem sinapse principalmente com as lâminas I, II e V para projeção da informação dolorosa. A lâmina II é constituinte da substância gelatinosa de Rolando, e a maior parte é formada por interneurônios que fazem sinapse com as fibras nociceptivas, mas não ascendem a informação. Já na lâmina I, a maior proporção é de células de projeção, das quais um número significativo faz sinapse com o tálamo. Os neurônios aí situados são, em sua maioria, neurônios nociceptivos específicos ou de limiar elevado, enquanto os neurônios da lâmina V são de espectro dinâmico amplo, ou não específicos, ou

multiceptivos, porque respondem a uma vasta intensidade de estímulos, desde o inócuo até o nocivo (TEIXEIRA, 2009; TEIXEIRA, 2017). O maior contingente de fibras dos neurônios secundários cruza a linha mediana na comissura branca e desloca-se rostralmente via quadrante anterolateral oposto da medula projetando-se aos núcleos do tálamo e, menos densamente, na formação reticular, mesencéfalo, sistema límbico, hipotálamo e outros. O trato espinomesencefálico ascende à Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG, do inglês), o trato espinoreticular à substância reticular no tronco encefálico e o trato espinotalâmico ao tálamo, esse último o mais importante no processo de transmissão do estímulo algico (TEIXEIRA, 2017; OLIVEIRA JR. & HOLANDA, 2017).

O neurônio talâmico terciário faz sinapse no córtex cerebral, onde ocorre o fenômeno complexo e ainda pouco elucidado da percepção da dor. O córtex somatossensorial primário está relacionado, sobretudo, com a função discriminativa de localização e intensidade da dor, já o córtex somatossensorial secundário parece estar relacionado à memória e à integração sensorial do estímulo doloroso. Outros locais de sinapse dos neurônios terciários no córtex cerebral são o córtex do cíngulo anterior (relacionado com a integração das respostas afetivas, cognitivas e comportamentais relacionadas a dor), a ínsula (responsável pela regulação das respostas neurovegetativas durante o fenômeno doloroso) e o córtex pré-frontal (relacionado a aspectos comportamentais, pragmáticos e cognitivos no estado de dor) (OLIVEIRA JR. & HOLANDA, 2017; JALES JR. et al, 2017).

A modulação da dor ocorre em vários pontos da via descrita, com aumento ou redução do limiar ou da transmissão dolorosa, como abordado a seguir.

1.3. Vias descendentes de modulação da dor

A partir de trabalhos publicados na segunda metade do século XX, suscitado por observações de comportamentos sem dor frente a estímulos extremamente nocivos observados em soldados da Segunda Guerra Mundial, foi postulada a existência de um sistema endógeno para controle modulatório da nocicepção a nível espinhal e supra espinhal (ver COLLIER, 2018). Beecher, um anestesiologista americano que serviu nesse confronto, escreveu em 1946 que “emoções fortes podem bloquear a dor” e observou que queixas de dor e o consumo de morfina eram menores em ferimentos semelhantes de soldados feridos em batalhas que em acidentes automobilísticos civis. Essas diferenças foram mais detalhadamente abordadas em um segundo artigo, também de sua autoria, publicado em 1956, em que descreve que a dor não é uma medida direta da lesão tecidual em decorrência de um ferimento, e que fatores externos como ansiedade, estresse físico, medo e perigo de morte seriam fundamentais determinantes da presença e nível de dor.

Em 1965, Melzack & Wall propuseram a existência de um sistema específico para modulação da dor através da “teoria do portão da dor”, segundo a qual as informações nociceptivas periféricas que chegam ao corno dorsal da medula espinhal não são automaticamente transferidas aos centros superiores, de tal forma que o impulso aferente sofre uma atuação de sistemas moduladores antes que a percepção dolorosa termine de ser evocada. Essa modulação pode ser realizada por aferências sensoriais de pressão ou tato, de fibras A α ou A β respectivamente, que estimulam interneurônios inibitórios no corno dorsal da medula diminuindo a transmissão nociceptiva (MILLAN, 1999).

O sistema nervoso central também envia informações para os interneurônios inibitórios em toda extensão da via de transmissão nociceptiva. Por esses impulsos serem conduzidos por fibras que os carregam no sentido oposto da via ascendente da dor, dá-se o nome de vias descendentes. Esses estímulos podem ser inibitórios, quando estimulam os interneurônios inibitórios, ou facilitatórios, quando inibem os interneurônios inibitórios (MILLAN, 2002).

A existência de um controle endógeno da dor foi fortemente suportada por Reynolds em 1969, ao demonstrar que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal, localizada no mesencéfalo, era capaz de induzir processos analgésicos em ratos e ao mesmo tempo manter suas outras respostas comportamentais inalteradas (OSSIPOV et. al., 2010). Desde então, numerosos sítios antinociceptivos supraespinhais que originam vias descendentes modulatórias para o corno dorsal da medula espinhal têm sido identificados, dentre eles podemos citar os núcleos periventriculares posteriores e intermediários no hipotálamo, o córtex anterior do giro do cíngulo, a ínsula, o núcleo cuneiforme, o locus coeruleus na ponte e os núcleos do trato solitário e rostral ventromedial no bulbo (MILLAN, 2002).

A partir destas evidências experimentais, os mediadores químicos que atuam nas vias descendentes passaram a ser extensivamente pesquisados (OSSIPOV et al., 2010). Dessa forma, descobriu-se a existência dos peptídeos opioides endógenos, tais como, β -endorfinas, dinorfinas e encefalinas, as quais exercem funções modulatórias, primordialmente através da ativação de receptores opioides (MILLAN, 2002). A evolução na compreensão dos múltiplos sistemas endógenos envolvidos no controle da dor levou a descoberta de diversos outros mediadores químicos atuantes nas vias descendentes, dentre os quais podemos citar os

endocanabinoides, a noradrenalina, a dopamina, a serotonina e a acetilcolina (OLIVEIRA JR. & HOLANDA, 2017).

1.4. Papel dos canais iônicos e dos aminoácidos excitatórios

O envolvimento de canais iônicos na nocicepção e na antinocicepção é bem conhecido (FEIN, 2014). Da terminação nervosa nociceptiva, os estímulos sensoriais são conduzidos ao SNC por fibras periféricas via canais para sódio resistentes a tetrodotoxina (TTX) dependentes de voltagem (WOOLF & MA, 2007). São importantes também para os estímulos sensoriais os canais para cálcio e potássio.

Os canais para sódio são constituídos por uma subunidade α , formadora do poro sensível a voltagem, e de subunidades auxiliares β . Há nove genes primários que codificam os canais para sódio (NaV1.1 a NaV1.9), sendo seis sensíveis a TTX (NaV1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.6 e 1.7) e três com correntes resistentes a TTX (NaV1.5, 1.8 e 1.9). Os canais NaV1.7 e 1.8 estão presentes em quase todos os nociceptores e o NaV1.9 somente nos nociceptores (TEIXEIRA, 2017). Os canais para sódio abrem-se quando o potencial de membrana despolariza as células desencadeando o potencial de ação que, ao despolarizar o terminal sináptico, aumenta a concentração intracelular de cálcio, fenômeno necessário para liberação de neurotransmissores e ocorrência das sinapses químicas (TEIXEIRA, 2009). A distribuição dos canais para sódio está representada na **figura 3**.

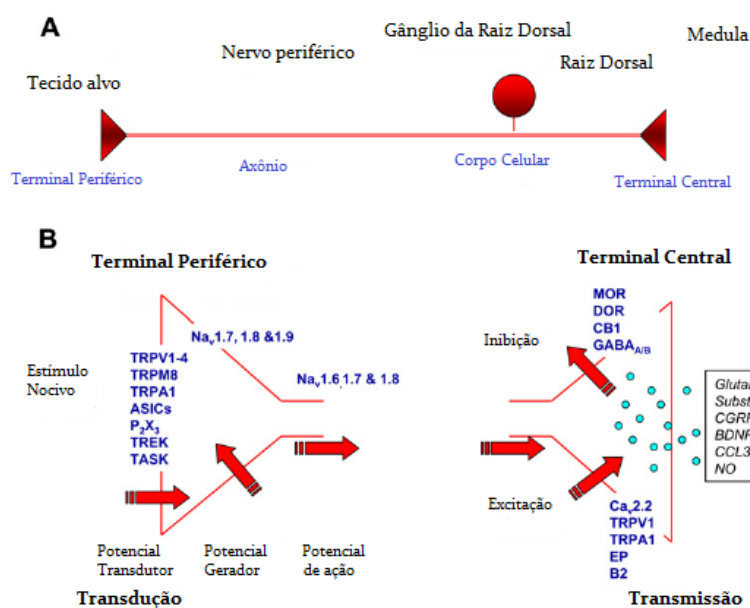


Figura 3: O Nociceptor. (A) Componentes operacionais do nociceptor. (B) Transdução é mediada por canais iônicos transdutores os quais despolarizam o terminal periférico ativando os canais para sódio voltagem-dependentes. Transmissão ocorre em resposta ao influxo de cálcio no terminal central liberando glutamato e outros neurotransmissores com influências excitatórias e inibitórias (modificado de Woolf e Ma, 2007).

Os canais iônicos também participam da gênese da dor inflamatória, em que o estímulo de nociceptores por mediadores da inflamação resultam na ativação da adenilato ciclase, com aumento do AMPc e do cálcio intracelular, desencadeando redução do limiar de disparo do potencial de ação da fibra nociceptiva. Por isso, substâncias que ativam a adenilato ciclase, doadoras de AMPc ou que aumentam a concentração de cálcio intracelular são capazes de induzir a hiperalgesia, como isoprenalina, dibutilil AMPc e o ionóforo de cálcio calcimicina (FERREIRA & NAKAMURA, 1979; PRADO, 2001). Por outro lado, substâncias bloqueadoras de canal para cálcio, como nifedipina e verapamil, demonstraram função antinociceptiva isoladamente ou potencializando outras substâncias analgésicas (MIRANDA et al., 1992; PRADO, 2001). Cátions que bloqueiam o poro de canais para cálcio como

césio, lítio, manganês e magnésio têm sido descritos como agentes antinociceptivos (PRADO, 2001).

Os canais para potássio não participam da geração do potencial de ação, entretanto, são fundamentais para a manutenção do potencial de repouso e reduzem a instabilidade da membrana neuronal (FEIN, 2014). Além disso, numerosos estudos demonstram a capacidade de agonistas de vários receptores acoplados à proteína G em estimular a abertura de canais para potássio (NORTH, 1989), processo este, envolvido na indução de antinocicepção (OCAÑA et al., 2004). Esse processo ocorre via ativação da guanilato ciclase com consequente aumento do GMPc, mecanismo responsável pela função antinociceptiva de doadores de GMPc e de inibidores de fosfodiesterase específica de GMPc, como dibutilil GMPc e vardenafil, respectivamente (FERREIRA & NAKAMURA, 1979; GEDIZ et al., 2015). O aumento do GMPc intracelular levaria a abertura de canais para potássio sensíveis a ATP com hiperpolarização da membrana e função antinociceptiva (SOARES et al., 2000; OCAÑA et al., 2004).

Os principais neurotransmissores excitatórios dos aferentes primários são o glutamato, a substância P e o ATP (DUBIN & PATAPOUTIAN, 2010). Há evidências de que aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) sejam liberados com neuropeptídeos de ação lenta pelas mesmas terminações nervosas dos aferentes primários no corno dorsal da medula. Os receptores, cuja ligação de neurotransmissores ativa diretamente canais iônicos acoplados a suas estruturas transmembranares, são designados ionotrópicos, enquanto os que atuam através de sistemas de segundos mensageiros recebem o nome de metabotrópicos. Há três tipos de receptores ionotrópicos de glutamato no corno dorsal da medula: NMDA, AMPA e Cainato (TRAYNELIS et al., 2010).

A ação do glutamato no receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) propicia o influxo celular de cálcio acoplado ao influxo de sódio e efluxo de potássio. O aumento nos níveis de cálcio intracelulares desencadeados pela ativação de receptores NMDA leva a excitabilidade neuronal relacionada à transmissão nociceptiva (FERRARI et al., 2014). Para que o receptor NMDA seja ativado, é necessária a presença de glicina e de glutamato. Por isso normalmente mantém-se inativo, mesmo na presença de glutamato, porque seu canal é parcialmente bloqueado pelo magnésio. A ativação dos receptores NMDA pela liberação de glutamato e glicina despolariza parcialmente a membrana neuronal e reduz o bloqueio do receptor causado pelo magnésio (MAYER et al., 1984).

1.5. Papel do Magnésio na dor

O magnésio é o quarto cátion mais abundante no corpo humano, tem numerosas funções fisiológicas, incluindo estabilidade de ácidos nucleicos, função neuromuscular e síntese proteica (KOINIG et al., 1998). Um homem adulto tem em média 24 g de magnésio no corpo, estocado principalmente nos ossos (60%), nos músculos (20%) e nos tecidos moles (20%), em grande parte ligado a quelantes, como adenosina 5'-trifosfato e DNA. O magnésio plasmático pode estar ionizado (60%), ligado a proteínas (33%) ou complexado a ânions (7%), com concentração plasmática normal de 0,7 a 1,0 mM (1,7 a 2,4 mg/dL) (HERROEDER et al., 2011).

Por ser bloqueador competitivo de canais para cálcio, o magnésio atua como antagonista farmacológico endógeno na captação e na distribuição de cálcio. Também tem efeito modulatório nas correntes de sódio e potássio, influenciando no potencial de ação (FAWCETT et al., 1999). No Sistema Nervoso Central, o magnésio

tem efeito depressor, atuando como antagonista de receptor NMDA e inibidor da liberação de catecolaminas (HERROEDER et al., 2011).

O magnésio também tem efeito antinociceptivo em modelos humanos e animais (KOINIG et al., 1998). Vários estudos indicam que o magnésio potencializa os efeitos analgésicos de opioides e anestésicos gerais e locais em diferentes modelos animais de dor (NECHIFOR, 2011). Por outro lado, a restrição dietética de magnésio diminui o limiar nociceptivo em ratos, o que é revertido pelo antagonista de receptor NMDA, MK-801 (TAKANO et al., 2000). Além disso, dados da literatura demonstram que o magnésio pode incrementar o efeito analgésico da cetamina em um modelo de hiperalgisia térmica em ratos, pois ambos bloqueiam o receptor NMDA de formas distintas (SAVIC VUJOVIC et al., 2015).

Utilizado isoladamente, o magnésio também tem demonstrado eficácia analgésica (BEGON et al., 2000; RONDÓN et al., 2010). Um estudo clínico demonstrou que a administração de magnésio diminui a necessidade de analgésicos nos períodos pós e intra-operatórios, inclusive de opioides (KOINIG et al., 1998). Em um modelo humano de ação periférica de drogas analgésicas, Bondok e El-Hady (2006) demonstraram que o sulfato de magnésio intra-articular é efetivo para analgesia pós-operatória de cirurgia de artroscopia de joelho.

No cenário do manejo multimodal da dor, com uso de menores doses de opioides e associação de medicamentos com diferentes mecanismos de ação, o magnésio surge como uma aposta promissora com poucos efeitos colaterais, quando utilizado em baixas doses, e raras contra-indicações (STESSEL et al., 2013). Além do mais, sua ação sobre o antagonismo de receptores NMDA na estratégia multimodal poderia influenciar no processamento da dor, na plasticidade

neuronal, na sensibilização central e, em última análise, na cronificação da dor (FERRARI et al., 2014).

Embora estudos clínicos e experimentais tenham demonstrado efeitos benéficos da administração de magnésio para tratamento da dor, os resultados de alguns trabalhos ainda são controversos (HERROEDER et al., 2011). A suplementação oral de magnésio em pacientes com dor neuropática em um estudo duplo-cego e randomizado não demonstrou alívio significativo na dor quando comparado ao placebo (PICKERING et al., 2011). Além disso, a administração de sulfato de magnésio como adjuvante associado a anestésicos locais em bloqueios anestésicos de nervo ciático em ratos demonstra a redução de sua duração (HUNG et al., 2008). Os efeitos conflitantes com ações analgésicas, hiperalgésicas ou ausentes do magnésio tanto em estudos clínicos, quanto em estudos experimentais pode ser explicado por vários fatores, como: doses distintas, momento de administração, tipo de sal estudado, escore de dor utilizado, população estudada, protocolo de dor e técnica anestésica (HERROEDER et al., 2011). Da mesma forma, sua ação periférica é controversa e pouco explorada, sendo citado ora como agente antinociceptivo, na maioria das publicações a respeito (BEGON et al., 2000; TAKANO et al., 2000; SREBRO et al., 2014), ora como agente nociceptivo (SREBRO et al., 2015).

Srebro e cols. descrevem o sulfato de magnésio como agente nociceptivo periférico quando usado em dose intra-plantares elevadas, o que ocorreria devido ao aumento da produção de NO e formação de GMPc. Contudo, esse mesmo grupo em 2014 demonstrou que a administração intratecal de sulfato de magnésio induziu efeito analgésico em patas de ratos inflamadas após injeção de carragenina, fato esse também explicado pelo aumento da produção de NO. Entretanto, em um

modelo de dor inflamatória visceral no teste de contorção, a injeção subcutânea de sulfato de magnésio induziu a analgesia, que não foi revertida com injeção de antagonistas da via NO/GMPc/K⁺_{ATP} (VUCKOVIC et al., 2015).

Nossa revisão literária encontrou como possíveis mecanismos de ação antinociceptiva do mesmo: **(1)** o antagonismo de receptores NMDA (KOINIG et al., 1998; ISHIZAKI et al., 1999; BEGON et al., 2000; TAKANO et al., 2000; HERROEDER et al., 2011; SAVIC VUJOVIC et al., 2015) **(2)** antagonismo de canais para cálcio (TAKANO et al., 2000; SIRVINSKAS & LAURINAITIS, 2002; LIN et al., 2010; HERROEDER et al., 2011; SAVIC VUJOVIC et al., 2015; LEE et al., 2015) e **(3)** produção de óxido nítrico (SREBRO et al., 2014).

Embora os dados na literatura não demonstrem atuação do MgSO₄ sobre os sistemas opioidérgico e canabinoidérgico de forma direta, os mesmos foram testados devido a sua importância no cenário da antinocicepção, conforme já mencionado.

Pelo exposto, o presente trabalho estuda a ação antinociceptiva periférica do sulfato de magnésio, assim como os mecanismos pelos quais atua periféricamente.

Justificativa

2. Justificativa

A dor é uma das principais causas do sofrimento humano, suscitando incapacidades, comprometimento da qualidade de vida e imensuráveis repercussões psicossociais e econômicas (BOTTEGA & FONTANA, 2010). Entre as razões que a tornam um problema de saúde pública estão: a) a alta prevalência, tanto em países ricos quanto em países em desenvolvimento; b) a escassez de análises epidemiológicas populacionais mais abrangentes; c) dificuldade em quantificar a intensidade e a gravidade do sintoma, assim como em mensurar o impacto de seus efeitos sobre a vida social e laboral do indivíduo; e, por isso, d) geração de custos elevados para a sociedade e para o sistema de saúde (SERRANO et al., 2017).

Não há dados de prevalência global de dor no Brasil. Entretanto, conforme publicação da Sociedade Brasileira para Estudo da Dor (SBED), a parcela da população brasileira que se queixa ou sofre de dor é de cerca de 30%. Esse número se assemelha aos países desenvolvidos, contudo o problema em nosso país pode ser considerado mais preocupante devido às restrições econômicas e porque não há uma política de saúde voltada para a abordagem multidisciplinar e o tratamento da dor (SIQUEIRA, 2013).

Além do sofrimento e das repercussões psicossociais da dor, outros fatores que não podem deixar de serem suscitados quando esse assunto é abordado, são os gastos econômicos e a dependência de drogas analgésicas. Segundo o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos entre 2000 e 2014, a taxa de óbitos por sobredose de opioides aumentou 200% (CICERO & ELLIS, 2017), enquanto as internações por uso indevido e dependência duplicaram no período entre 2000 e 2012 (RUDD et al., 2016). De acordo com a consultoria

internacional IMS Health, de 2006 a 2010 o mercado global desses remédios teve crescimento de 27% (OWENS et al., 2014). No Brasil, o segmento movimentou US\$ 902 milhões em 2010, magnitude que torna o país líder de consumo de analgésicos entre as nações emergentes e sexto maior mercado do mundo, à frente de países como Japão e Espanha (GARCIA et al., 2013).

Na medicina veterinária, a dor é um dos aspectos mais importantes no que diz respeito ao bem-estar animal. Para o seu reconhecimento, o médico veterinário encontra na literatura um conjunto de comportamentos e reações que podem ser indicadores de dor no animal, assim como várias escalas de avaliação de dor que o podem auxiliar nessa tarefa. Apesar disso, a avaliação da intensidade da dor e da resposta do animal ao tratamento continua a ser um desafio, uma vez que não há comunicação direta entre o paciente e o médico, estando a interpretação desses comportamentos sujeitos à subjetividade do observador. Da mesma forma, mesmo com escalas definidas o estabelecimento de prevalência desse sintoma na população animal é extremamente difícil, sendo feita em grupos específicos como em cães, mais comumente, ou em animais internados em unidades de terapia intensiva, por exemplo (MORAN & HOFMEISTER, 2013).

Nesse contexto, torna-se necessário o estudo de abordagens alternativas no tratamento da dor que sejam mais eficientes, com menos efeitos colaterais e menores custos. Uma delas é a abordagem multimodal, com combinação de vários agentes com função analgésica, que reduziria a dose individual de cada droga, aumentando a eficácia e reduzindo os efeitos adversos (STESSEL et al., 2013).

O magnésio tem um papel fundamental em muitas funções celulares e descobertas recentes ampliam o espectro de suas utilidades clínicas. É bem estabelecido o benefício clínico de sua aplicação em pacientes com eclâmpsia ou

taquicardia ventricular polimórfica (*torsades de points*) (NECHIFOR, 2011). Recentemente, têm sido aventadas funções antinociceptivas, anestésicas e neuroprotetoras que requerem maiores investigações (HERROEDER et al., 2011). O sal sulfato de magnésio é um fármaco altamente disponível no serviço público de saúde, principalmente para tratamento das condições acima e para reposição de magnésio em casos de hipomagnesemia. Tal disponibilidade, associado a seu baixo custo, o fizeram o sal escolhido para nosso estudo.

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Verificar a possibilidade do sulfato de magnésio produzir efeito antinociceptivo após administração periférica, assim como os mecanismos envolvidos no processo.

3.2. Objetivos Específicos

Investigar se o sulfato de magnésio, administrado perifericamente, induz antinocicepção frente a hiperalgesia induzida pela administração de prostaglandina E₂, no modelo de retirada reflexa da pata de camundongo submetida à compressão.

Avaliar se há a participação da via opioidérgica no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo sulfato de magnésio.

Avaliar se há a participação da via canabinoidérgica no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo sulfato de magnésio.

Avaliar se há a participação da via L-arginina/NO/GMPc no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo sulfato de magnésio.

Avaliar se há a participação de canais para potássio no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo sulfato de magnésio.

Investigar se o sulfato de magnésio, administrado perifericamente, induz a antinocicepção em modelo animal de hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de calcimicina.

Investigar se o sulfato de magnésio, administrado perifericamente, induz a antinocicepção em modelo animal de hiperalgesia induzida pela administração

intraplantar de NMDA (agonista de receptores ionotrópicos de glutamato tipo N-metil-D-aspartato).

Materials e Métodos

4. Materiais e Métodos

4.1. Animais de experimentação

Nos experimentos de caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo do sulfato de magnésio foram utilizados camundongos da linhagem Swiss machos, pesando entre 30 e 40 g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO-ICB/UFMG). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, acomodados em caixas plásticas com dimensões de 30x16x12 cm forradas com cama de maravalha e com livre acesso à ração e água, em número máximo de 15 animais por caixa. Permaneceram em ambiente com temperatura controlada (23 a 25°C) e com ciclo claro-escuro de 12 horas (07:00-19:00 h). Para a experimentação, os animais eram levados para uma sala específica no laboratório de dor e analgesia (LDA) com dois dias de antecedência, onde ficaram sob as mesmas condições descritas para o biotério. Após os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de cetamina 300 mg/kg e xilazina 45 mg/kg. Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o protocolo número 240/2017 (**Anexo I**).

4.2. Fármacos e Solventes

4.2.1. Agente analgésico sob estudo

- Sulfato de Magnésio 50% (MgSO_4 50%, Isofarma, Brasil) dissolvido em água, mantido em geladeira em solução de estoque. Antes das injeções, o MgSO_4 foi diluído em solução salina (NaCl a 0,9%) e mantido a temperatura ambiente (**Figura 4**).

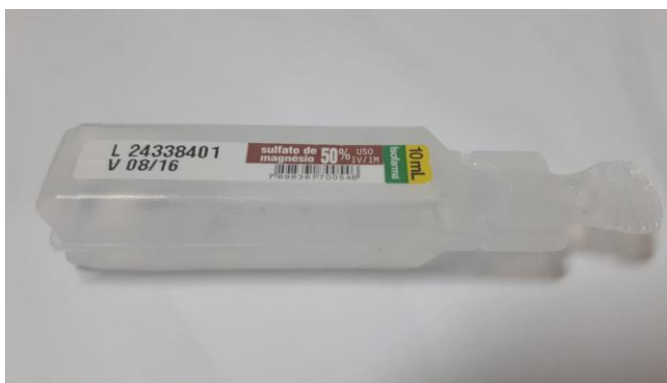


Figura 4: Ampola de MgSO_4 utilizada nos experimentos.

4.2.2. Agentes hiperalgésicos

- Prostaglandina E_2 (PGE_2 , Sigma, EUA) mantida em freezer em solução de estoque dissolvido em etanol. Antes das injeções, a PGE_2 foi diluída em solução salina (NaCl a 0,9%) obtendo-se a concentração de etanol a 10% em solução salina.

- Ácido N-metil-D-aspartato (NMDA, Cayman, EUA), agonista seletivo de receptor de glutamato N-metil-D-aspartato, mantido em freezer em solução de estoque dissolvido em DMSO 10% em solução salina.

- Calcimicina (A-23187, Cayman, EUA), ionóforo de cálcio, mantido em freezer em solução de estoque dissolvido em DMSO 10% em solução salina.

4.2.3. Agentes envolvidos no sistema opioidérgico

- Naloxona (Sigma, EUA), antagonista não seletivo dos receptores μ , δ e κ opioides, dissolvido em solução salina (**Figura 5**).

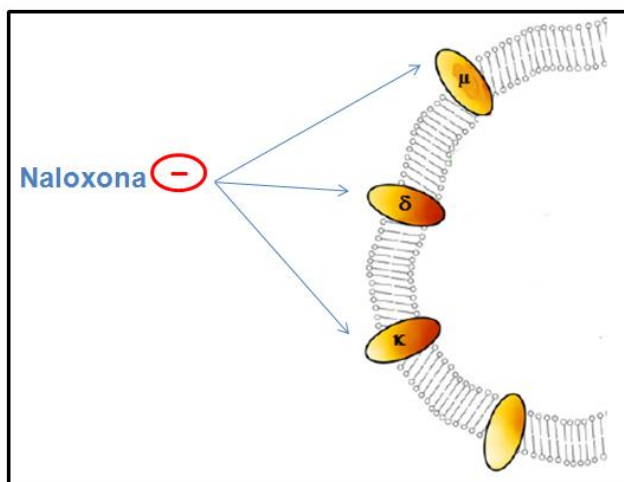


Figura 5: Ação antagonista farmacológica competitiva reversível não-seletiva da naloxona sobre os receptores μ , δ e κ opioides.

4.2.4. Agentes envolvidos no sistema canabinoidérgico

- AM251 [1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-(1-piperidil) pirazol-3 carboxamida] (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores canabinoides CB₁, dissolvido em DMSO 10% em solução salina (**Figura 6**).

- AM630 [6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil) etil]-1H-indol-3 il] (4metoxifenil) metanona (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores canabinoides CB₂, dissolvido em DMSO 10% em solução salina (**Figura 6**).

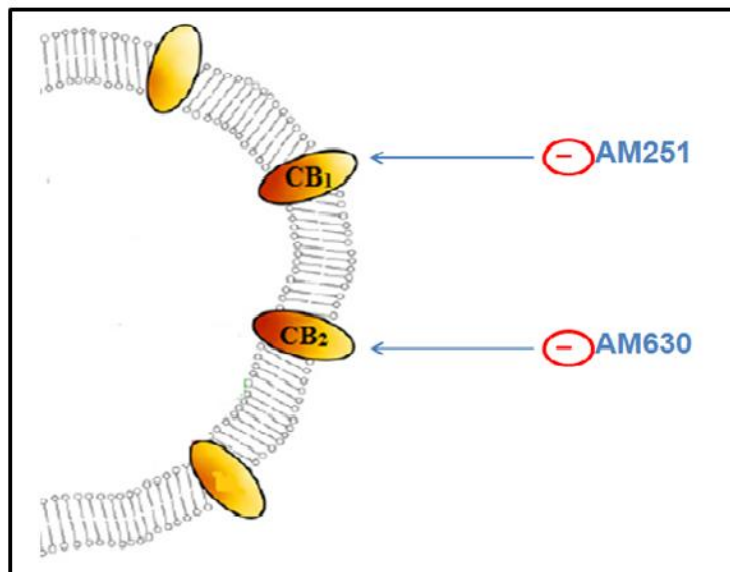


Figura 6: Ação antagonista farmacológica competitiva reversível seletiva do AM251 e do AM630 sobre os receptores CB₁ e CB₂ canabinoides, respectivamente.

4.2.5. Agentes envolvidos no sistema Nitrérgico

- L-NOArg (N^G-Nitro-L-arginina) (RBI, EUA), inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase (NOS), dissolvido em solução salina.

- L-NPA (N^w-Propil-L-arginina) (Sigma, EUA), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), dissolvido em solução salina.

- L-NIO (Dihidrocloridrato de N⁵-(1-Iminoetil)-L-ornitina) (Sigma, EUA), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOSe), dissolvido em solução salina.

- L-NIL (Hidrocloridrato de N^6 -(1-Iminoetil)-L-lisina) (Sigma, EUA), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOSi), dissolvido em solução salina.

- ODQ (1*H*-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-*a*]quinoxalina-1-ona) (RBI, EUA), inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel, dissolvido em DMSO 10% em solução salina.

- Zaprinast (Sigma, EUA), inibidor específico da enzima fosfodiesterase específica do GMPc, dissolvido em DMSO 10% em solução salina.

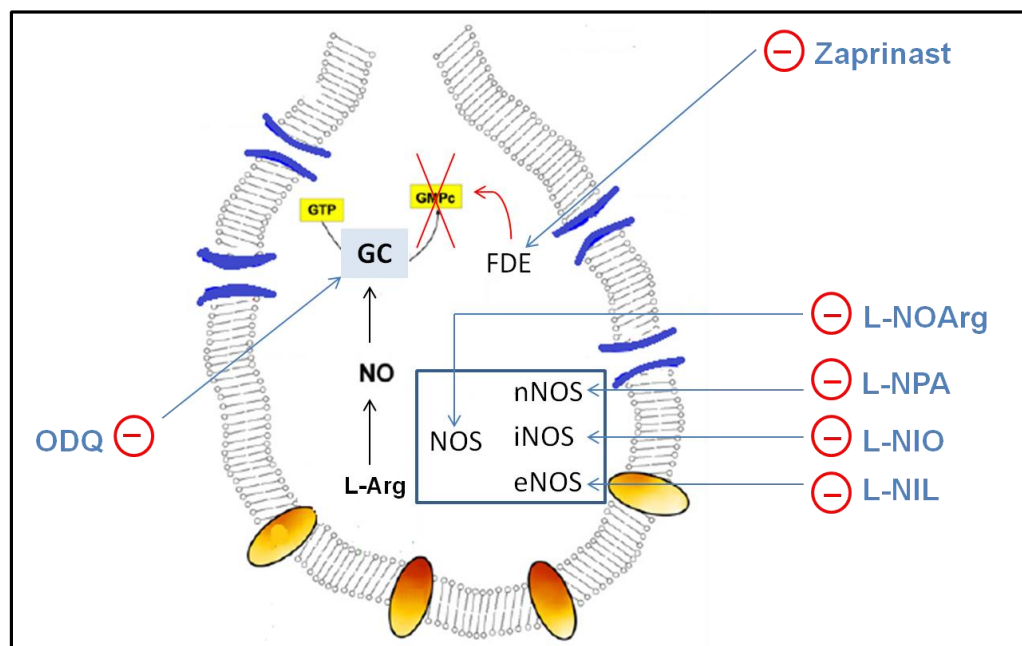


Figura 7: Ferramentas farmacológicas utilizadas para o estudo do sistema nitrérgico e seus locais de ação.

4.2.6. Agentes envolvidos no sistema de canais para potássio

- Glibenclamida: Glib (Sigma, EUA), bloqueador seletivo dos canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), dissolvido em Tween 20 1% e DMSO 2% em solução salina.

- Tetraetilamônio: TEA (Sigma, EUA), bloqueador seletivo dos canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v), dissolvido em solução salina.

- Cloreto de dequalínio: DQ (Sigma, EUA), bloqueador seletivo dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de baixa condutância (K_{Ca}), dissolvido em solução salina.

- Paxilline: Pax (Sigma, EUA), bloqueador seletivo dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de alta condutância (K_{Ca}), dissolvido em solução salina.

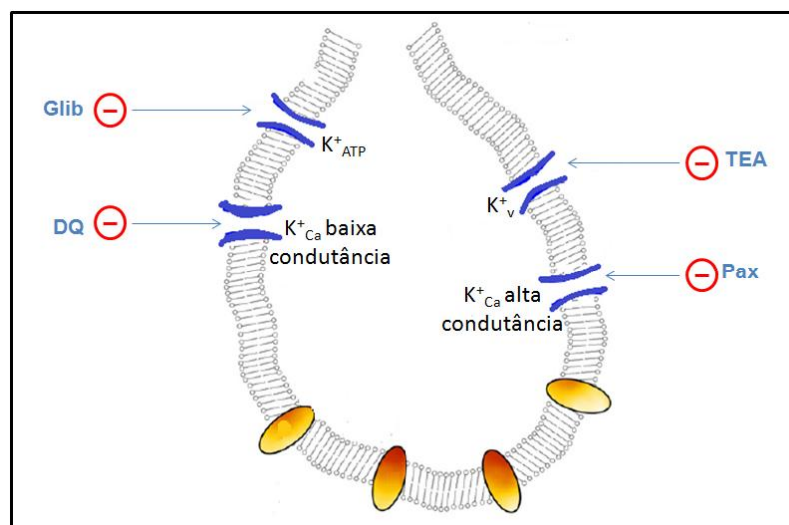


Figura 8: Bloqueadores seletivos dos diferentes canais para potássio e os locais de ação.

4.3. Via de administração das drogas

4.3.1. Intraplantar

Todas as drogas utilizadas foram administradas por via intraplantar (i.pl.), a qual consiste em uma injeção subcutânea no coxim plantar da pata posterior do camundongo, utilizando-se uma agulha com dimensões de 8,0 x 0,3 mm (**Figura 8**). Em todos os experimentos foi utilizada a pata posterior direita dos animais, com exceção do protocolo utilizado para excluir a possibilidade de um efeito não local, em que foram utilizadas ambas as patas posteriores. O volume de injeção de cada droga foi de 20 μ L.



Figura 9: Administração de drogas pela via intraplantar em camundongos.

4.4. Avaliação do Efeito Antinociceptivo

4.4.1. Teste de Retirada de Pata

Para realizar a medida da hiperalgesia, foi utilizado o método de retirada de pata submetida à compressão, descrito originalmente por Randall & Selitto (1957) para ratos, com a finalidade de medir o limiar nociceptivo ao estímulo mecânico. Posteriormente, Kawabata *et al.* (1992) adaptaram este teste para camundongos.

No teste, o camundongo é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a superfície plantar da pata a ser testada é colocada sob a parte compressora do aparelho algosimétrico (Ugo Basile, Itália) (**Figura 9**). A parte compressora do aparelho consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se coloca a superfície dorsal da 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 camundongo (**Figuras 10 e 11**). A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 16 g/s ou 10 g/cm, mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador. Ao observar a resposta nociceptiva do animal, padronizada como retirada reflexa da pata, o experimentador desaciona o pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta à pata, sendo que o último valor, correspondente ao limiar nociceptivo, fica indicado na escala do aparelho e expresso em gramas (g). O valor de 150 g foi usado como valor de corte para reduzir a possibilidade de causar uma lesão na pata dos camundongos.

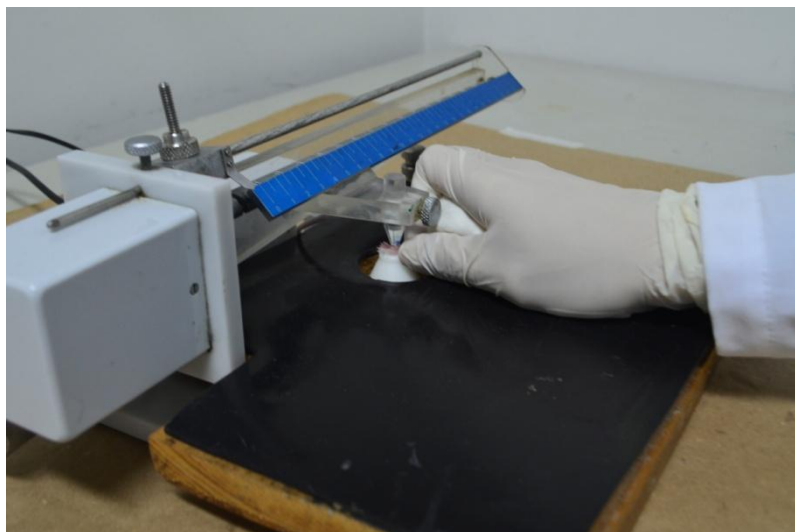


Figura 10: Camundongo submetido ao teste de retirada da pata no aparelho algométrico (Randall & Selitto).



Figura 11: Detalhe da pata do animal submetido ao teste de compressão. A superfície dorsal é apoiada sobre uma parte plana do aparelho (Ugo Basile, Itália), enquanto o coxim plantar é comprimido pela superfície cônica com uma pressão crescente a partir do acionamento do pedal pelo experimentador.

O aprendizado para a detecção do limiar nociceptivo do camundongo, consiste no treinamento do experimentador para identificar o momento em que o animal percebe o estímulo doloroso e desenvolve uma reação de reflexo de retirada da

pata. É importante ressaltar que o animal é ambientalizado ao aparelho no dia que antecede o teste. Essa ambientalização consiste em submeter o animal a medidas sucessivas no aparelho algosimétrico, mimetizando a situação a ser vivenciada no dia do experimento. Esse procedimento é muito importante, pois evita que o animal desenvolva uma reação aversiva simplesmente devido à situação estranha imposta ao mesmo.

4.4.2. Medida do limiar nociceptivo e antinocicepção

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

Para avaliação de um possível efeito antinociceptivo periférico do sulfato de magnésio, foi realizado o acompanhamento temporal do limiar nociceptivo dos animais, em função da sua ação sobre o efeito hiperalgésico induzido tanto pela prostaglandina (com curva dose-resposta ao longo do tempo), quanto pela calcimina ou pelo NMDA (com reversão da dose mínima capaz de induzir ao máximo efeito hiperalgésico com a dose e tempo de administração do $MgSO_4$ já estabelecidos na curva anterior).

Considerando a hiperalgesia como diminuição do limiar nociceptivo, sua intensidade foi avaliada pela diferença (Δ) do limiar nociceptivo obtido no início do experimento (valor basal), antes de qualquer injeção (tempo zero), em relação ao

limiar medido após 3 h da injeção do agente hiperalgésico utilizado (tempo em que se observa o efeito máximo dos agentes utilizados, conforme o protocolo experimental).

Se durante o desenvolvimento da hiperalgesia, 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.

4.4.3. Exclusão do efeito não local no estudo periférico

Em todos os experimentos é utilizada a pata posterior direita dos animais, com exceção do protocolo utilizado para excluir a possibilidade de um efeito não local, neste caso testam-se ambas as patas.

Para a exclusão do efeito não local do agente testado, o agente hiperalgésico PGE₂ foi administrado em ambas as patas traseiras dos animais. Na pata posterior esquerda, administrou-se solução salina (controle), enquanto na pata posterior direita administrou-se sulfato de magnésio na maior dose com ação antinociceptiva encontrada na curva de dose-resposta. Foram realizadas compressões em ambas as patas.

4.5. Procedimento experimental

As doses e os tempos de administração dos fármacos foram definidos através de dados da literatura e em experimentos preliminares (pilotos) realizados em nosso laboratório, como descritos nas legendas de todos os gráficos na seção de resultados.

O sulfato de magnésio ou seu veículo (salina) foi injetado quinze minutos antes da terceira hora da injeção da PGE₂, calcimicina e NMDA (momento de pico da hiperalgesia dessas drogas).

O antagonista não seletivo dos receptores μ , δ e κ opioides (naloxona) foi administrado 30 minutos antes do sulfato de magnésio.

Os antagonistas dos receptores canabinoides CB₁ e CB₂ (AM251 e AM630, respectivamente) foram administrados 10 minutos antes do sulfato de magnésio.

O inibidor da enzima NOS (L-NOArg), bem como os inibidores seletivos das isoformas de NOS, NOS_i, NOS_e e NOS_n (L-NIL, L-NIO e L-NPA, respectivamente), foram administrados 30 minutos antes do sulfato de magnésio.

O inibidor da enzima guanilil ciclase solúvel (ODQ) foi administrado 10 minutos antes do sulfato de magnésio, enquanto o inibidor seletivo da enzima fosfodiesterase específica do GMPc (Zaprinast) foi administrado 60 minutos antes do sulfato de magnésio.

O bloqueador dos canais para potássio sensíveis a voltagem (tetraetilamônio) foi administrado 30 minutos antes da administração do sulfato de magnésio. Os bloqueadores dos demais canais para potássio (glibenclamida, dequalínio e paxilina) foram administrados 5 minutos antes da administração do sulfato de magnésio.

4.6. Análise estatística

A fórmula empregada para o cálculo do tamanho mínimo da amostra para uma estimativa confiável da média populacional é dada por: $n = [(Z_{\alpha/2} \cdot \delta)/E]^2$, em que:

n = Número amostral;

$Z_{\alpha/2}$ = Valor crítico que corresponde ao grau de confiança desejado;

δ = Desvio-padrão;

E = Erro absoluto (Erro máximo de estimativa).

Considerando experimentos pilotos realizados pelo experimentador no Laboratório de Dor e Analgesia e tomando uma amostra de 13 animais como a amostra piloto, que se comporta de modo normal, de acordo com o teste de normalidade, foi possível calcular para estas um desvio padrão de 11,822 g. Fixando a confiabilidade do estudo em 95%, foi possível obter o valor relativo de $Z_{\alpha/2}$ a essa percentagem de 1,96. Considerando-se um erro absoluto de 10,4 g foi possível realizar o cálculo do n amostral:

$$n = (1,96 \cdot 11,822/10,4)^2$$

$$n = 4,96; n \sim 5.$$

A estimativa de Erro absoluto é, aproximadamente, 8% da média amostral obtida nos experimentos piloto. Os valores de confiança (grau de significância) e de erro absoluto foram selecionados de modo a atender os parâmetros estatísticos, sem, entretanto, permitir que o valor do n amostral se apresentasse elevado, inviabilizando, assim, a realização do projeto.

Os resultados obtidos foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Como os dados apresentaram distribuição normal, optamos por submetê-los ao teste paramétrico da análise de variância *two-way* ou *one-way* ANOVA, seguida pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas, quando as amostras são comparadas em relação a duas ou apenas a uma variável,

respectivamente. Serão considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram feitas usando o programa GraphPad Prism 5.

Resultados

5. Resultados

5.1. Efeito hiperalgésico da PGE₂

Para que fosse testada a ação hiperalgésica da prostaglandina E₂ fizemos curvas dose-resposta ao longo do tempo. A PGE₂ foi administrada na pata posterior direita dos animais nas doses de 0,5; 1 e 2 µg por pata e foram feitas medidas do limiar nociceptivo de hora em hora por 6 horas. Foi observado pico do limiar hiperalgésico na 3^a hora após a administração da droga, sendo o efeito máximo observado na dose de 2 µg (menor limiar nociceptivo) (**Gráfico 1**).

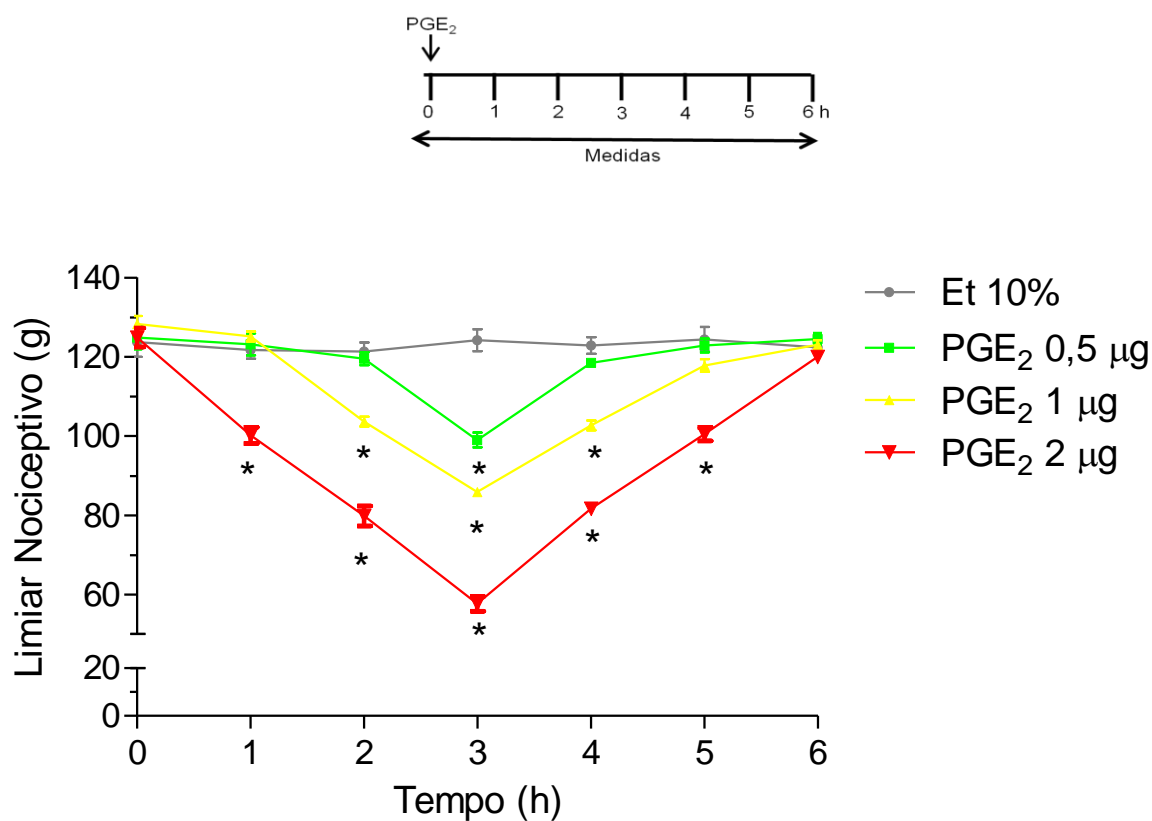


Gráfico 1: Efeito da injeção periférica de PGE₂ sobre o limiar nociceptivo de camundongos.

Prostaglandina E₂ (µg/pata) foi administrada na pata traseira direita do animal. A resposta nociceptiva foi medida pelo teste de pressão na pata tal como descrito em Materiais e Métodos de hora em hora por 6 horas. Cada símbolo representa a média ± S.E.M. do limiar nociceptivo em gramas (g), referentes a cinco animais por grupo. * indica uma diferença estatística significativa em relação à injeção de Etanol 10% (Et 10%) como controle ($p < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

5.2. Efeito hiperalgésico da calcimicina

O perfil hiperalgésico da calcimicina foi determinado em curvas dose-resposta ao longo do tempo. A calcimicina foi injetada na pata posterior direita dos animais nas doses de 5, 10 e 20 μg por pata e foram feitas medidas do limiar nociceptivo de hora em hora por 6 horas. Foi observado pico do limiar hiperalgésico na 3^a hora após a administração da droga, e o efeito máximo de redução do limiar nociceptivo na dose de 20 μg (**Gráfico 2**).

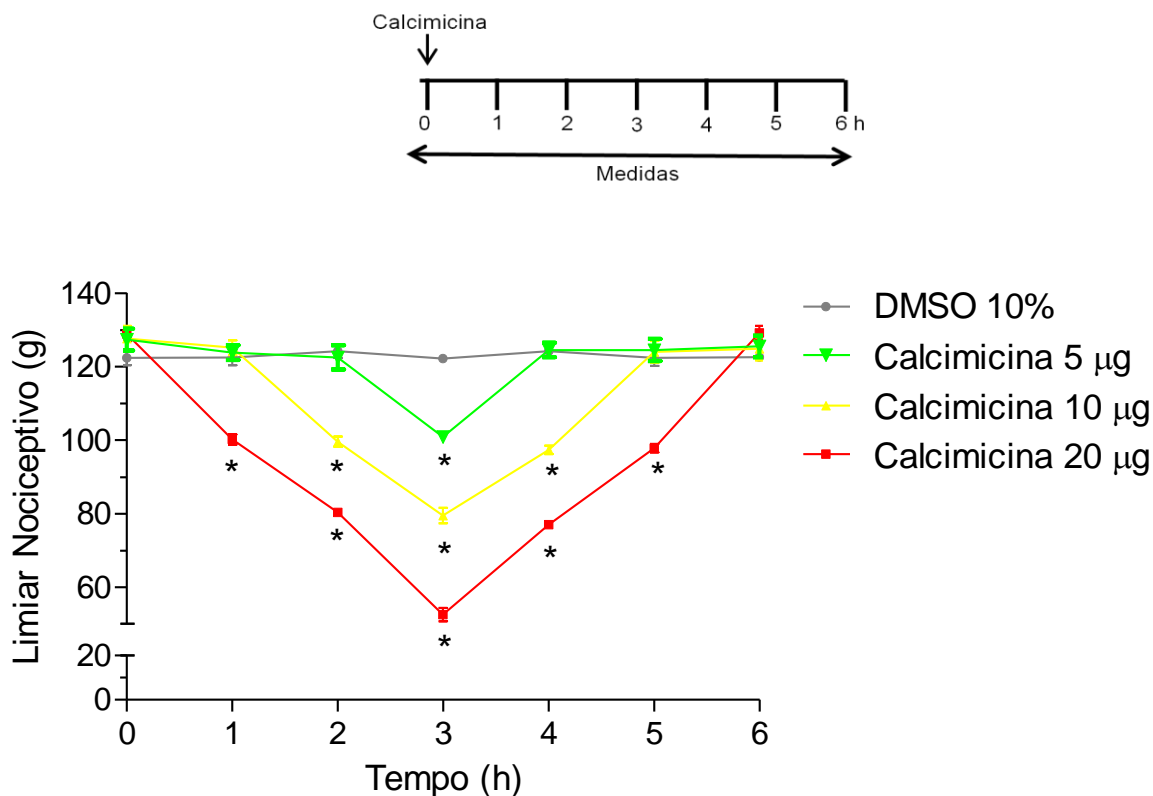


Gráfico 2: Efeito da injeção periférica de calcimicina sobre o limiar nociceptivo de camundongos. Calcimicina ($\mu\text{g}/\text{pata}$) foi administrada na pata traseira direita do animal. A resposta nociceptiva foi medida pelo teste de pressão na pata tal como descrito em Materiais e Métodos de hora em hora por 6 horas. Cada símbolo representa a média \pm S.E.M., referentes a cinco animais. * indica uma diferença estatística significativa em relação à injeção de DMSO 10% como controle ($p < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni). DMSO = Dimetilsulfóxido.

5.3. Efeito hiperalgésico do NMDA

A hiperalgesia induzida pelo NMDA foi caracterizada em curvas dose-resposta ao longo do tempo. O NMDA foi injetado na pata posterior direita dos animais nas doses de 3, 6 e 12 μg por pata e foram feitas medidas do limiar nociceptivo de hora em hora até a 6^a hora. O pico do limiar hiperalgésico foi observado na 3^a hora após a administração da droga, sendo 12 μg a menor dose capaz de induzir o máximo de efeito hiperalgésico (**Gráfico 3**).

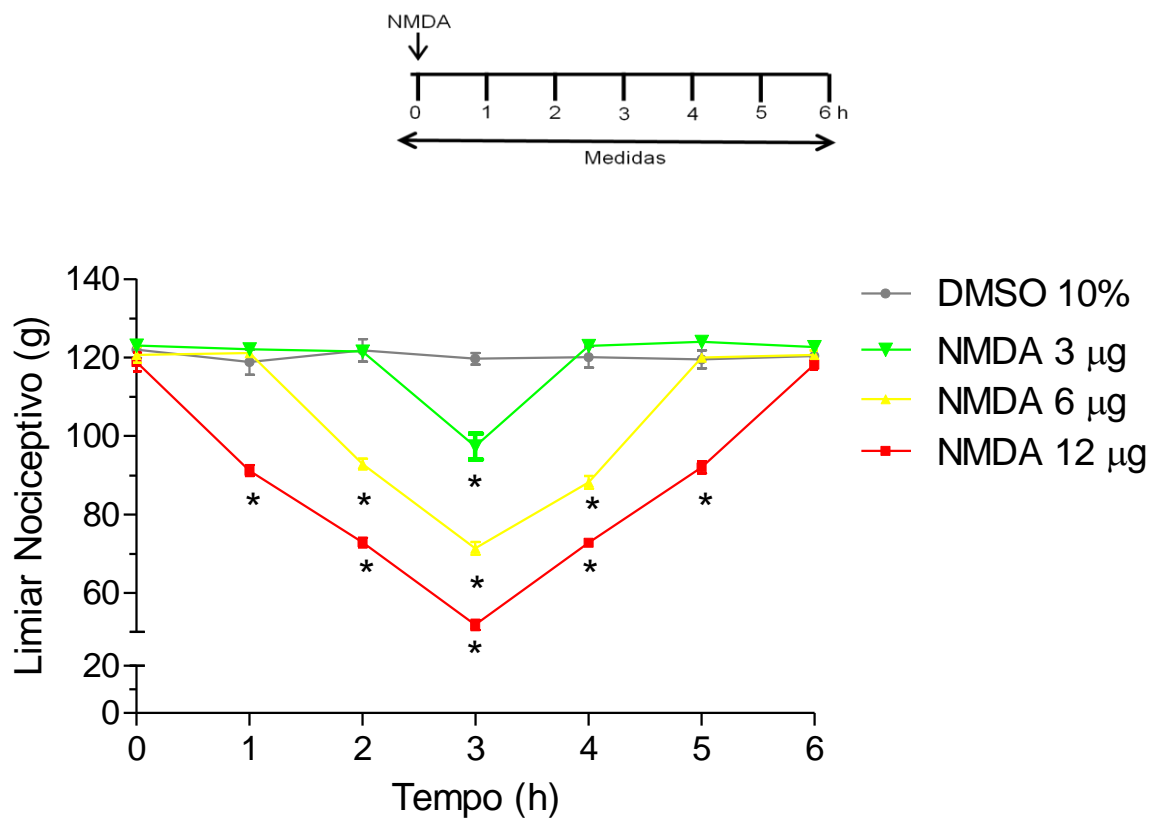


Gráfico 3: Efeito da injeção periférica de NMDA sobre o limiar nociceptivo de camundongos.

NMDA ($\mu\text{g/pata}$) foi administrado na pata traseira direita do animal. A resposta nociceptiva foi medida pelo teste de pressão na pata tal como descrito em Materiais e Métodos de hora em hora por 6 horas.

Cada símbolo representa a média \pm S.E.M. do limiar nociceptivo em gramas (g), referentes a cinco animais. * indica uma diferença estatística significativa em relação à injeção de DMSO 10% como controle ($p < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni). DMSO = Dimetilsulfóxido.

5.4. Efeito antinociceptivo periférico do sulfato de magnésio

5.4.1. Efeito antinociceptivo do $MgSO_4$ na hiperalgesia induzida pela PGE_2

A fim de avaliar o possível efeito antinociceptivo periférico induzido pelo sulfato de magnésio foram realizadas curvas dose-resposta ao longo do tempo. A administração de sulfato de magnésio (20, 40, 80 e 160 μ g) na pata traseira direita foi realizada na terceira hora após administração de PGE_2 , no pico da hiperalgesia induzida pela dose de 2 μ g/pata (**Gráfico 4**). Foram feitas medidas do limiar nociceptivo de cinco em cinco minutos entre a terceira e a quarta hora após administração de PGE_2 . O sulfato de magnésio apresentou efeito antinociceptivo dose-dependente, sendo que a dose de 80 μ g/pata foi capaz de induzir ao maior efeito antinociceptivo periférico e seu pico de ação ocorreu 15 minutos após sua administração, sendo essa dose e esse tempo utilizado em experimentos posteriores. A latência e a duração de ação que se pode averiguar pelo método foram de 5 minutos e 30 minutos, respectivamente.

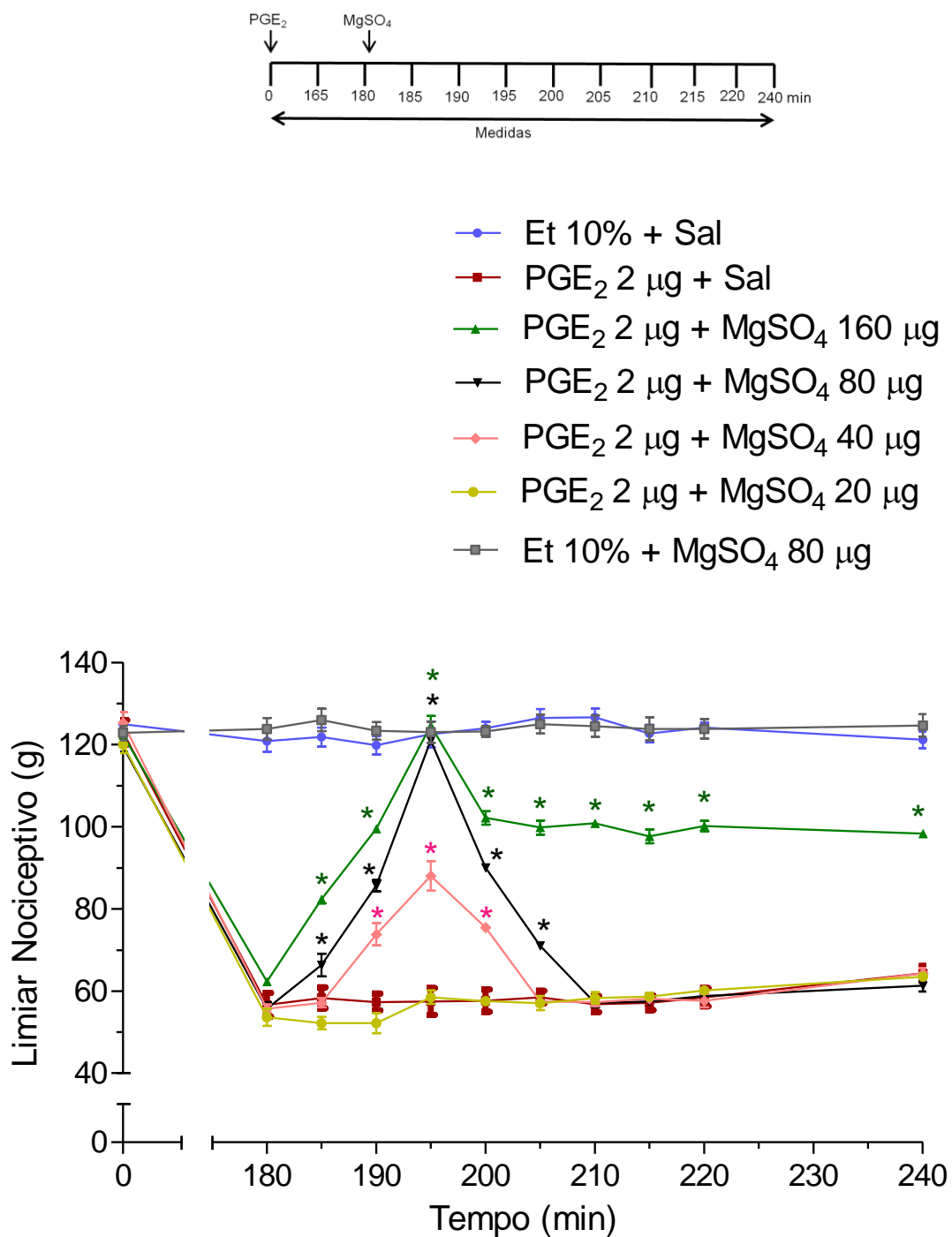


Gráfico 4: Efeito do MgSO₄ no limiar nociceptivo em camundongos com hiperalgesia induzida por PGE₂. MgSO₄ (µg/pata) foi administrado na pata traseira direita na terceira hora após a injeção local da PGE₂ (momento de pico da hiperalgesia por PGE₂). A resposta antinociceptiva foi medida no teste de pressão da pata tal como descrito em Materiais e Métodos. Cada símbolo representa a média ± S.E.M. do limiar nociceptivo em gramas (g) referentes a cinco animais por grupo. * indica uma diferença estatística significativa em relação à injeção de PGE₂ 2 µg + Salina como controle hiperalérgico (p < 0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

O próximo passo foi avaliar se o sulfato de magnésio administrado sem o estímulo hiperalgésico da PGE₂ induz a hipoalgesia. O MgSO₄ na dose de 80 µg não induziu o aumento do limiar nociceptivo, não havendo diferença estatística entre esse grupo (Et 10% + MgSO₄ 80 µg) e o grupo controle com veículos (Et 10% + Salina) (**Gráfico 4**).

Posteriormente, para exclusão de um possível efeito sistêmico, a prostaglandina E₂ foi administrada nas patas posteriores direita (PD) e esquerda (PE), o MgSO₄ (80µg) foi administrado apenas na pata direita, e seu veículo (salina), foi administrado apenas na pata esquerda. Tanto o veículo na pata esquerda, quanto o MgSO₄ na pata direita foram administrados 15 minutos antes da terceira hora após injeção de PGE₂ (**Gráfico 5**). Os resultados demonstram que o MgSO₄ induziu efeito antinociceptivo restrito à pata tratada, uma vez que não alterou a hiperalgesia induzida pela PGE₂ na pata contralateral, descartando um efeito sistêmico. No entanto, quando a dose foi dobrada (160 µg), o sulfato de magnésio passou a apresentar efeito também na pata contralateral.

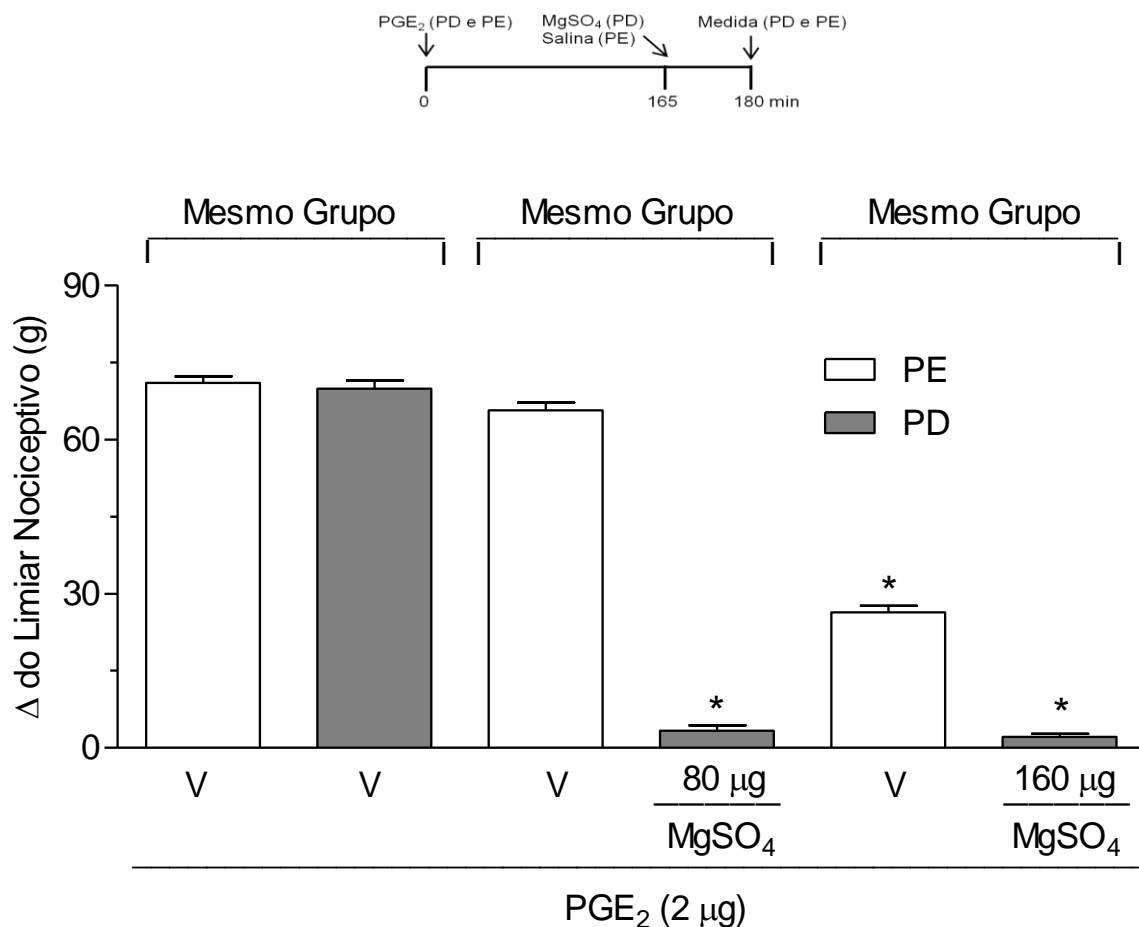


Gráfico 5: Exclução do efeito antinociceptivo sistêmico da MgSO₄. MgSO₄ (80 e 160 µg/pata) foi administrado na pata direita 15 minutos antes da terceira hora da injeção de PGE₂ (2 µg/pata), que foi administrada em ambas as patas traseiras. Salina, como controle, foi administrada na pata esquerda dos animais. A resposta antinociceptiva foi medida, em ambas as patas na terceira hora. Cada coluna representa a média ± S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referentes a cinco animais por grupo. * indica uma diferença estatística significativa em relação à injeção de PGE₂ 2 µg + Salina como controle (p <0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni). PD = pata direita, PE = pata esquerda.

5.4.2. Efeito antinociceptivo do $MgSO_4$ na hiperalgesia induzida pela Calcimicina

Para investigar a ação antinociceptiva por bloqueio de canais para cálcio, foi utilizado como agente hiperalgésico a calcimicina na dose de 20 μ g, com pico de ação nociceptiva na terceira hora, conforme observado no **Gráfico 2**. Foi feita a injeção de calcimicina na dose de 20 μ g e, 15 minutos antes da terceira hora, foi injetado sulfato de magnésio na dose de 80 μ g. Foi observada reversão do efeito hiperalgésico do ionóforo nessa situação (**Gráfico 6**).

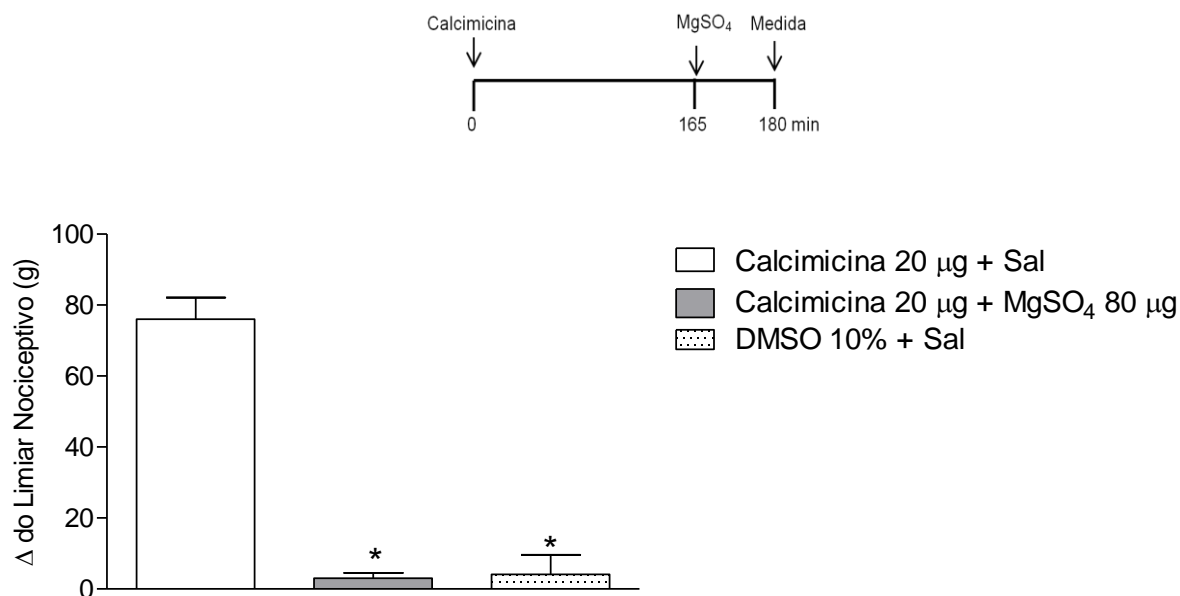


Gráfico 6: Reversão do efeito hiperalgésico da calcimicina pelo MgSO₄. A calcimicina foi injetada na dose de 20 µg/pata e, 15 minutos antes da terceira hora, o MgSO₄ 80 µg/pata também foi injetado na pata posterior direita. A resposta antinociceptiva foi medida na terceira hora pelo teste de pressão na pata. Cada coluna representa a média e o S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * indica uma diferença estatística significativa em relação a Calcimicina 20µg + Salina (p<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni). DMSO = Dimetilsulfóxido.

5.4.3. Efeito antinociceptivo do $MgSO_4$ na hiperalgesia induzida pelo NMDA

Com o propósito de investigar a função antinociceptiva do $MgSO_4$ por mecanismo de antagonismo de receptores de glutamato tipo NMDA, foi feita injeção de NMDA na dose de 12 μg e, 15 minutos antes da terceira hora, o $MgSO_4$ na dose de 80 μg foi injetado, havendo reversão total do efeito hiperalgésico do NMDA **(Gráfico 7)**.

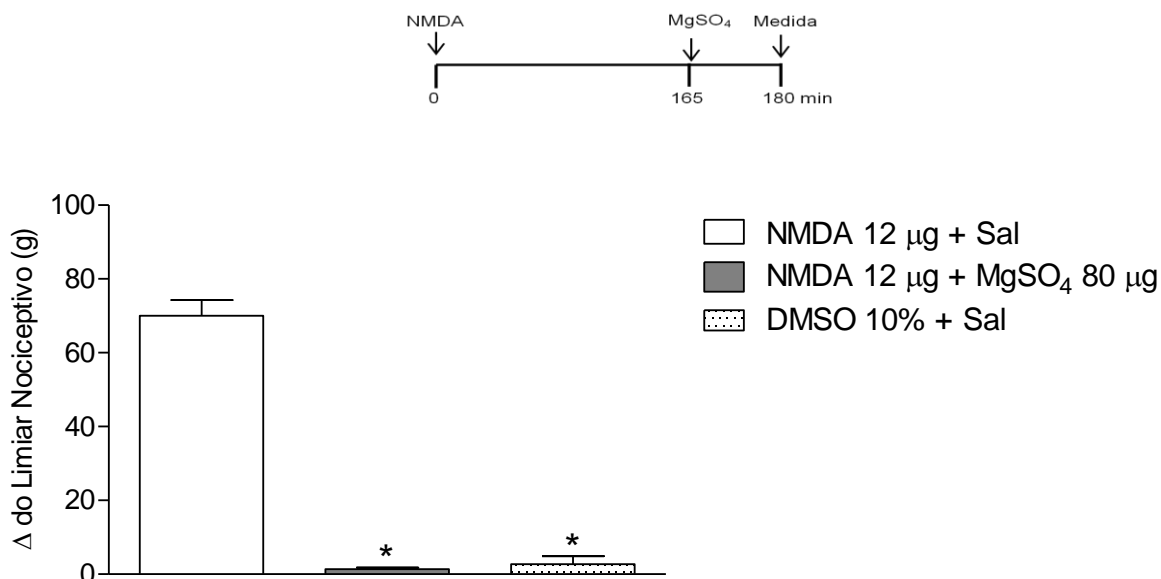


Gráfico 7: Reversão do efeito hiperalgésico do NMDA pelo MgSO₄. O NMDA foi injetado na dose de 12 μg/pata e, 15 minutos antes da terceira hora, o MgSO₄ 80 μg/pata também foi injetado na pata posterior direita. A resposta antinociceptiva foi medida na terceira hora (coincidindo a pico de ação de ambas as drogas) pelo teste de pressão na pata. Cada coluna representa a média e o S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * indica uma diferença estatística significativa em relação a NMDA 12 μg + Salina (p<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni). DMSO = Dimetilsulfóxido.

5.5. Avaliação da participação do sistema opioidérgico na antinocicepção periférica induzida pelo MgSO_4

Como demonstrado no **Gráfico 8**, a naloxona na dose de 50 μg , um antagonista não seletivo dos receptores opioides, não reverteu a antinocicepção periférica induzida pelo MgSO_4 (80 $\mu\text{g/pata}$).

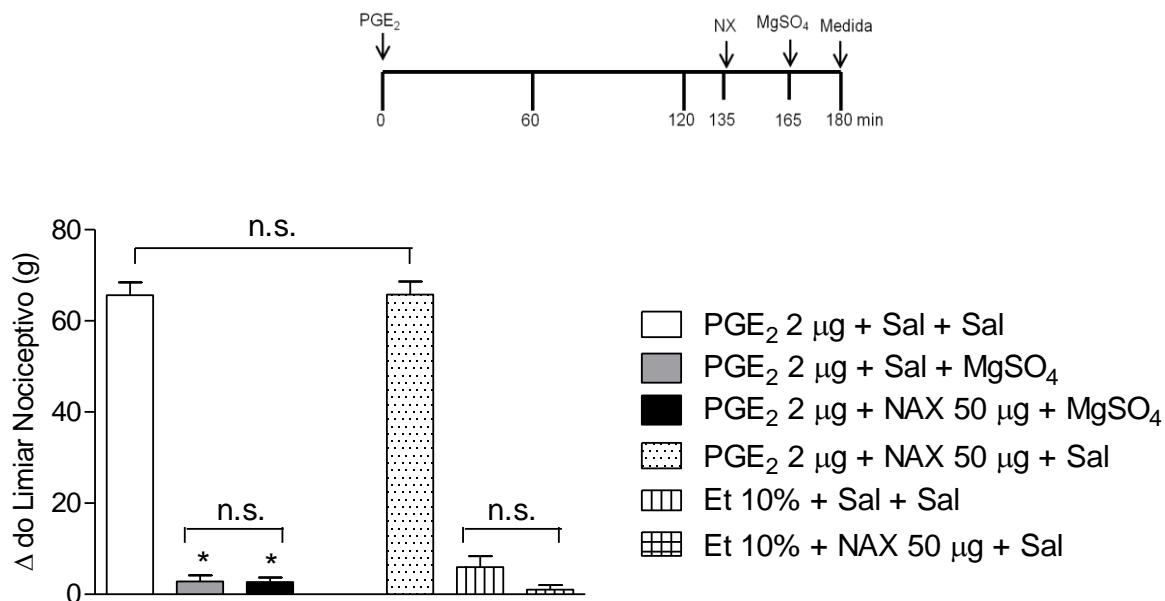


Gráfico 8: Ausência de antagonismo do efeito antinociceptivo periférico do MgSO₄ pela administração intraplantar de naloxona (NAX). A naloxona (50 μg/pata) foi administrada 30 minutos antes do MgSO₄ (80 μg/pata). Cada coluna representa a média ± S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * indica diferença estatística significativa em relação ao grupo PGE₂ 2 μg + Salina + Salina (p<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

5.6. Avaliação da participação do sistema canabinoide na antinociceção periférica induzida pelo MgSO₄

Como mostrado nos **Gráficos 9 e 10**, o AM251 (160 µg/pata), um antagonista seletivo dos receptores canabinoide CB₁ e o AM630 (100 µg/pata), um antagonista seletivo dos receptores canabinoide CB₂, respectivamente, não revertem a antinociceção periférica induzida pelo MgSO₄ (80 µg/pata).

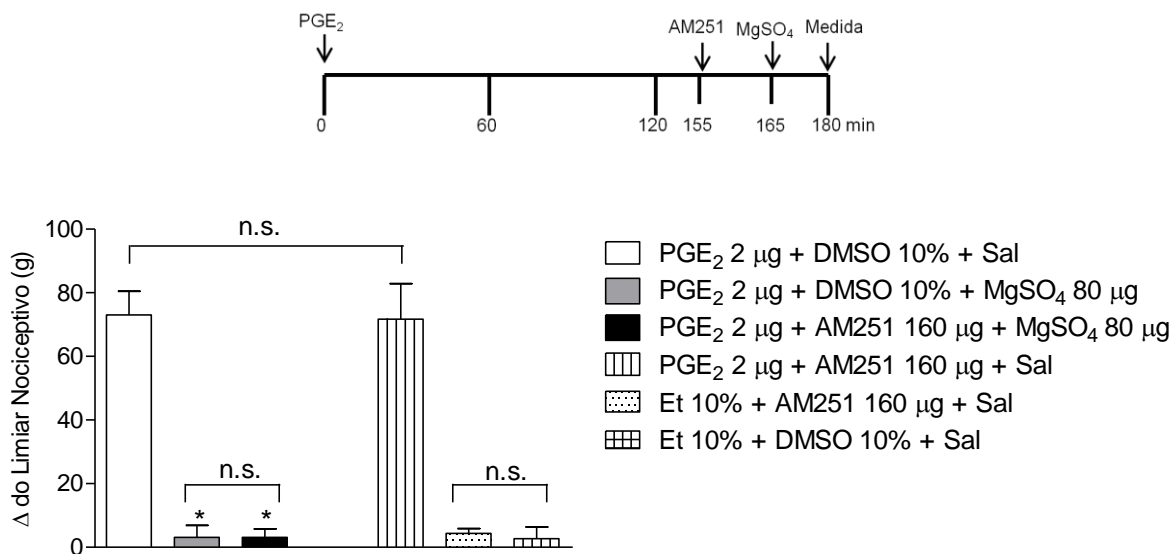


Gráfico 9: Ausência de antagonismo no efeito antinociceptivo periférico do MgSO₄ pela administração intraplantar de AM251. O AM251 (160 µg/pata) foi administrado 10 minutos antes do MgSO₄ (80 µg/pata). Cada coluna representa a média ± S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * indica diferença estatística significativa em relação a PGE₂ 2 µg + DMSO 10% + Salina (p<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni). DMSO = Dimetilsulfóxido.

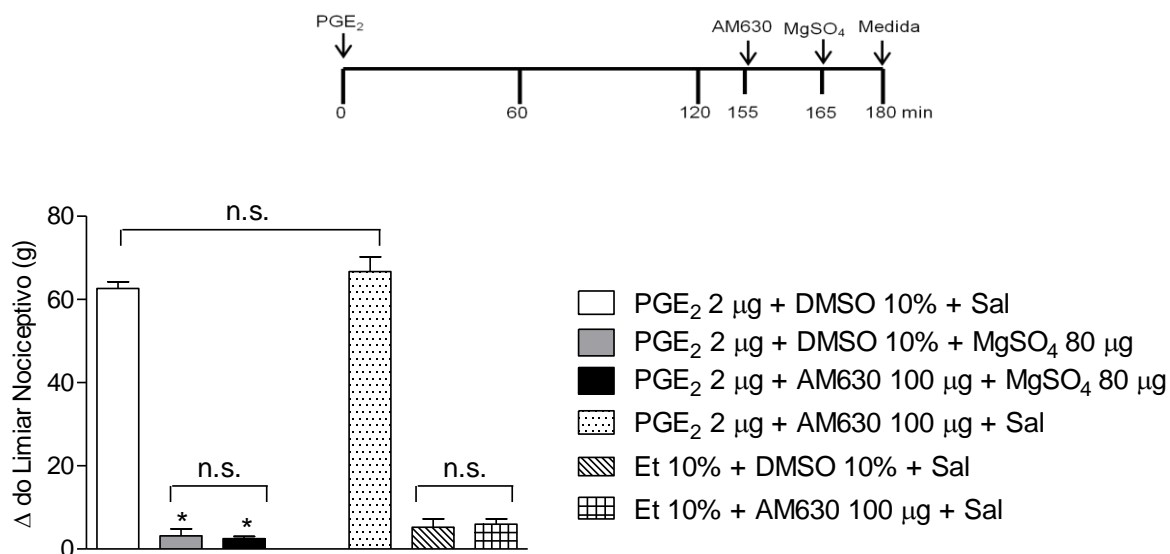


Gráfico 10: Ausência de antagonismo no efeito antinociceptivo periférico do $MgSO_4$ pela administração intraplantar de AM630. O AM630 (100 μg /pata) foi administrado 10 minutos antes do $MgSO_4$ (80 μg /pata). Cada coluna representa a média \pm S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * indica diferença estatística significativa em relação a PGE_2 2 μg + DMSO 10% + Salina ($p < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni). DMSO = Dimetilsulfóxido.

5.7. Avaliação da participação da via L-Arginina/NO/GMPc na antinocicepção periférica induzida pelo MgSO₄

5.7.1. Efeito da inibição da enzima Óxido Nítrico Sintase

A L-NOarg (12, 18 e 24 µg), conforme mostrado no **Gráfico 11**, um inibidor não seletivo da enzima NO-sintase (NOS), reverteu a antinocicepção periférica induzida pelo MgSO₄ (80 µg/pata) de maneira dose-dependente. Além disso, a L-NOArg não causou analgesia quando administrada na ausência do MgSO₄, como também pode ser observado no **Gráfico 11**.

Quando a NO-sintase neuronal (NOSn) foi inibida de maneira seletiva pelo L-NPA (12, 18 e 24 µg) houve reversão do efeito antinociceptivo periférico induzido pelo MgSO₄ (80 µg/pata) também de maneira dose-dependente, o que é observado no **Gráfico 12**. O mesmo não ocorreu com o uso dos inibidores seletivos da NO-sintase induzível (NOSi), o L-NIL (24 µg), e NO-sintase endotelial (NOSe), o L-NIO (24 µg), como mostra o **Gráfico 13**.

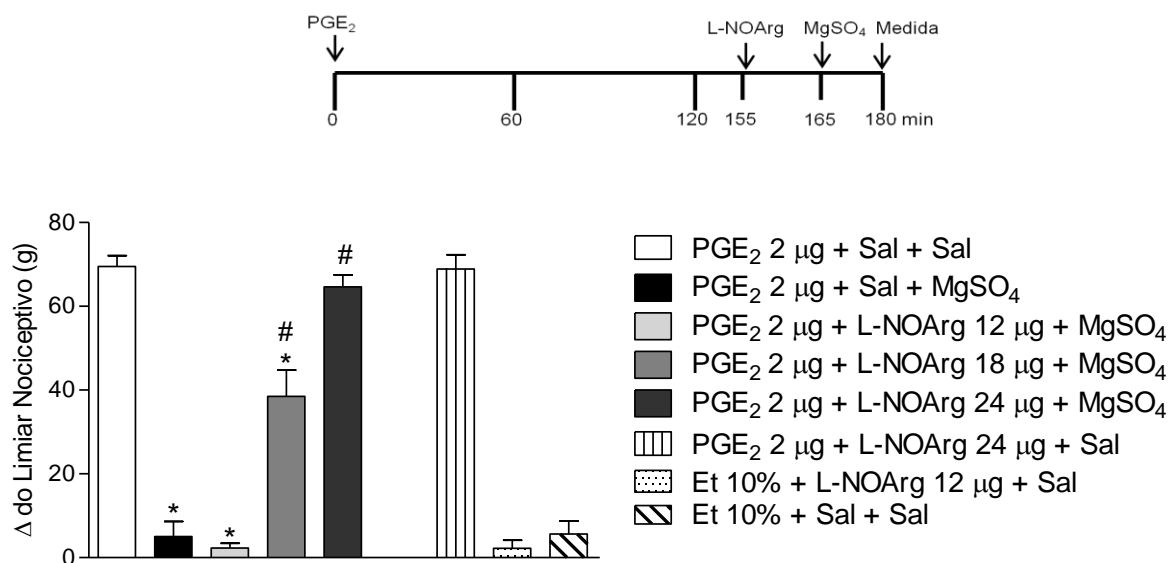


Gráfico 11: O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico do $MgSO_4$ pela administração intraplantar de L-NOArg. O L-NOArg (12, 18 e 24 $\mu g/pata$) foi administrado 30 minutos antes do $MgSO_4$ (80 $\mu g/pata$). Cada coluna representa a média \pm S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE_2 2 μg + Salina + Salina e PGE_2 2 μg + Salina + $MgSO_4$ 80 μg , respectivamente ($p < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

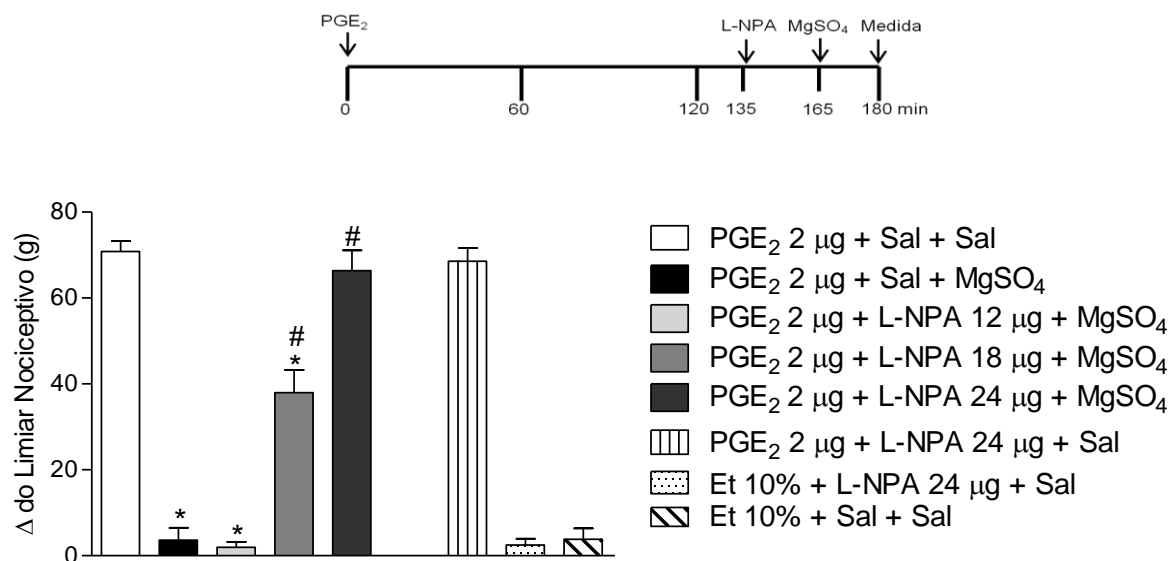


Gráfico 12: O efeito da administração de L-NPA sobre a antinocicepção periférica do MgSO₄. O L-NPA (12, 18 e 24 μg/pata) foram administradas 30 minutos antes do MgSO₄ (80 μg/pata). Cada coluna representa a média ± S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE₂ 2 μg + Salina + Salina e PGE₂ 2 μg + Salina + MgSO₄ 80μg, respectivamente (p<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

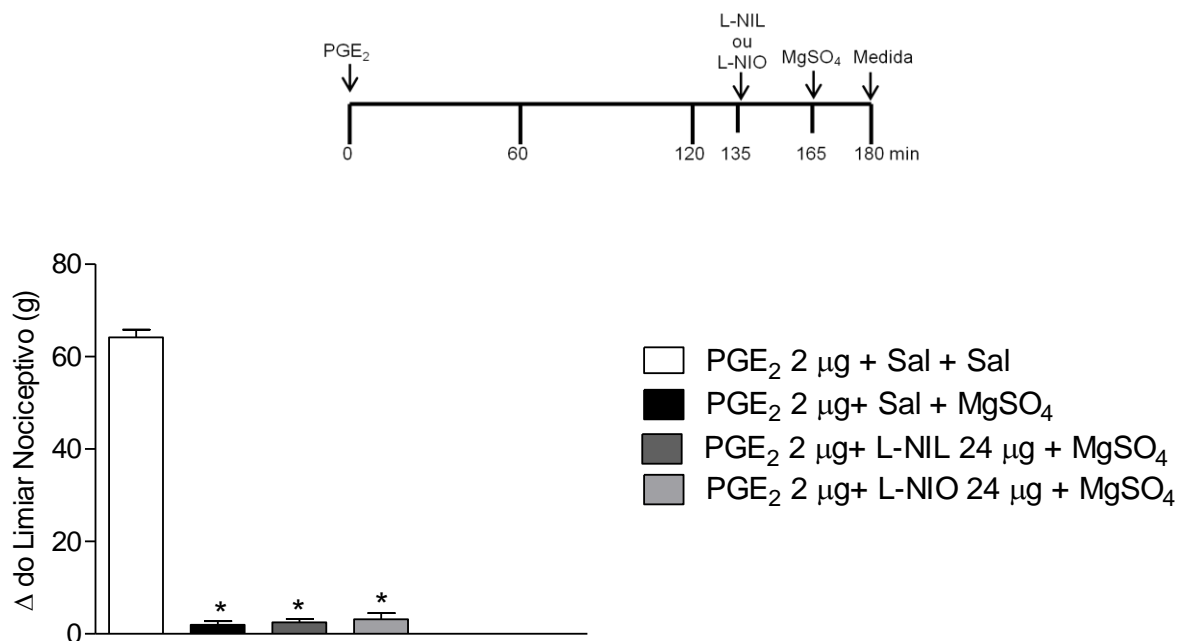


Gráfico 13: Ausência de efeito da administração de LNIL e LNIO sobre a antinociceção periférica do MgSO₄. Ambas as drogas (24 µg/pata) foram administradas 30 minutos antes do MgSO₄ (80 µg/pata). Cada coluna representa a média ± S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * indica uma diferença estatística significativa em relação a PGE₂ 2µg + Salina + Salina (p<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

5.7.2. Efeito da inibição da enzima Guanilato Ciclase Solúvel

O **Gráfico 14** mostra que o ODQ (25, 50 e 100 µg), um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, reverteu a antinocicepção periférica induzida pelo MgSO₄ (80 µg/pata) de maneira dose-dependente.

5.7.3. Efeito da inibição da enzima Fosfodiesterase específica para GMPc

O zaprinast (50 µg), conforme apresentado no **Gráfico 15**, um inibidor específico da enzima fosfodiesterase específica para GMPc, potencializou a antinocicepção periférica induzida pelo MgSO₄ na dose de 40 µg, que induziria, na ausência desse inibidor, a uma antinocicepção parcial no modelo de hiperalgesia induzida pela PGE₂.

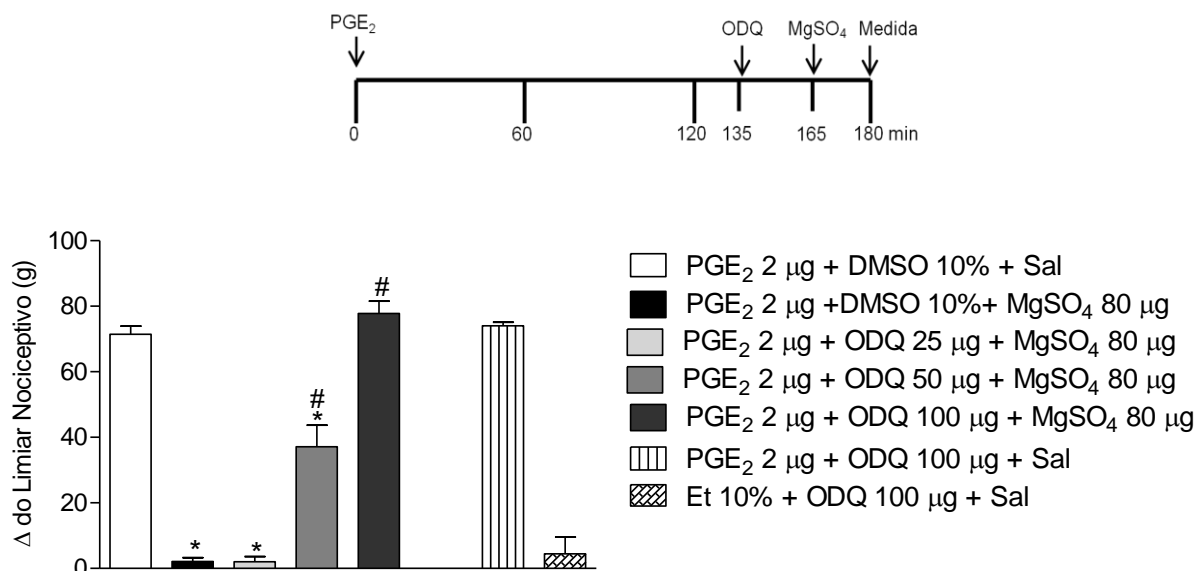


Gráfico 14: Antagonismo do efeito antinociceptivo periférico do MgSO₄ pela administração intraplantar de ODQ. O ODQ (25, 50 e 100 μg/pata) foi administrado 30 minutos antes do MgSO₄ (80 μg/pata). Cada coluna representa a média ± S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE₂ 2 μg + Salina + Salina e PGE₂ 2 μg + DMSO 10% + MgSO₄ 80 μg, respectivamente (p<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni). DMSO = Dimetilsulfóxido.

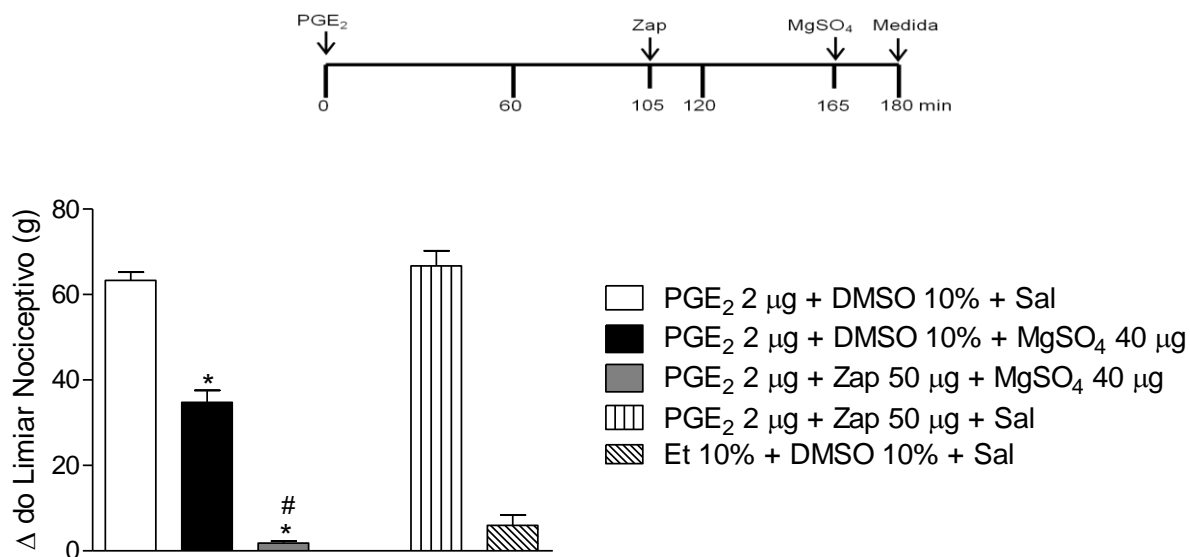


Gráfico 15: Potencialização do efeito antinociceptivo periférico do MgSO₄ pela administração intraplantar de Zaprinas. O Zaprinas (Zap: 40 μg) foi administrado 60 minutos antes do MgSO₄ (40 μg/pata). Cada coluna representa a média ± S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE₂ 2 μg + Salina + Salina e PGE₂ 2 μg + DMSO 10% + MgSO₄ 40 μg, respectivamente (p<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni). DMSO = Dimetilsulfóxido.

5.8. Avaliação da participação dos canais para potássio na antinocicepção periférica induzida pelo $MgSO_4$

A antinocicepção periférica induzida pelo $MgSO_4$ (80 μg /pata) foi revertida pela glibenclamida (20, 40 e 80 μg), um bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP, de maneira dose dependente (**Gráfico 16**). Por outro lado, o tetraetilamônio (30 μg), um bloqueador dos canais para potássio dependente de voltagem, a paxilina (20 μg) e o dequalínio (50 μg), bloqueadores dos canais para potássio ativados por cálcio de alta e baixa condutância, respectivamente, não foram capazes de reverter a antinocicepção periférica induzida pelo $MgSO_4$ (**Gráficos 17, 18 e 19**).

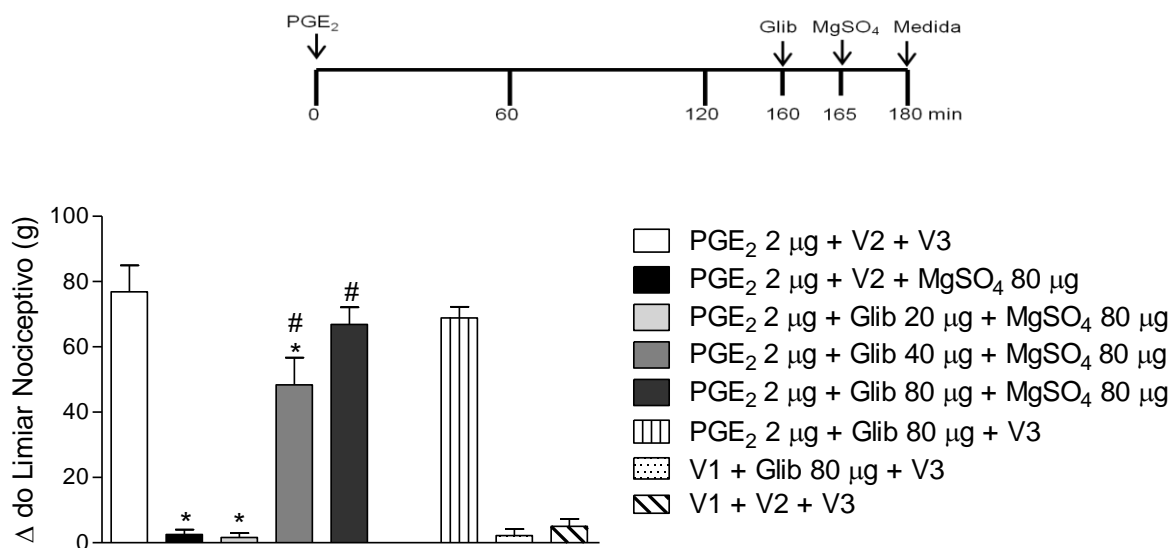


Gráfico 16: Antagonismo do efeito antinociceptivo periférico do $MgSO_4$ pela administração intraplantar de glibenclamida. A glibenclamida (Glib: 20, 40 e 80 μg) foi administrada 5 minutos antes do $MgSO_4$ (80 μg /pata). V1 = Etanol 10%, V2 = Tween 20 1% + DMSO 2% e V3 = Solução salina de NaCl a 0,9%. Cada coluna representa a média \pm S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE_2 2 μg + Salina + Salina e PGE_2 2 μg + V2 + $MgSO_4$ 80 μg , respectivamente ($p < 0,05$, ANOVA + pós-teste Bonferroni). DMSO = Dimetilsulfóxido.

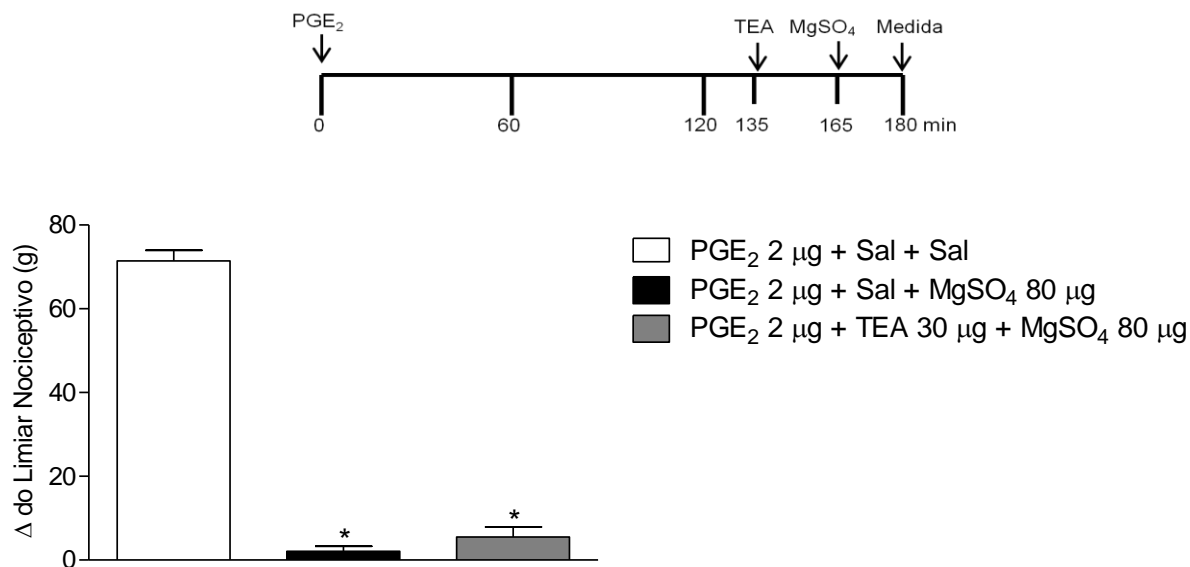


Gráfico 17: Ausência de antagonismo no efeito antinociceptivo periférico do MgSO₄ pela administração intraplantar de tetraetilamônio. O tetraetilamônio (TEA: 30 μg/pata) foi administrado 30 minutos antes do MgSO₄ (80 μg/pata). Cada coluna representa a média ± S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * indica uma diferença estatística significativa em relação a PGE₂ 2μg + Salina + Salina (p<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

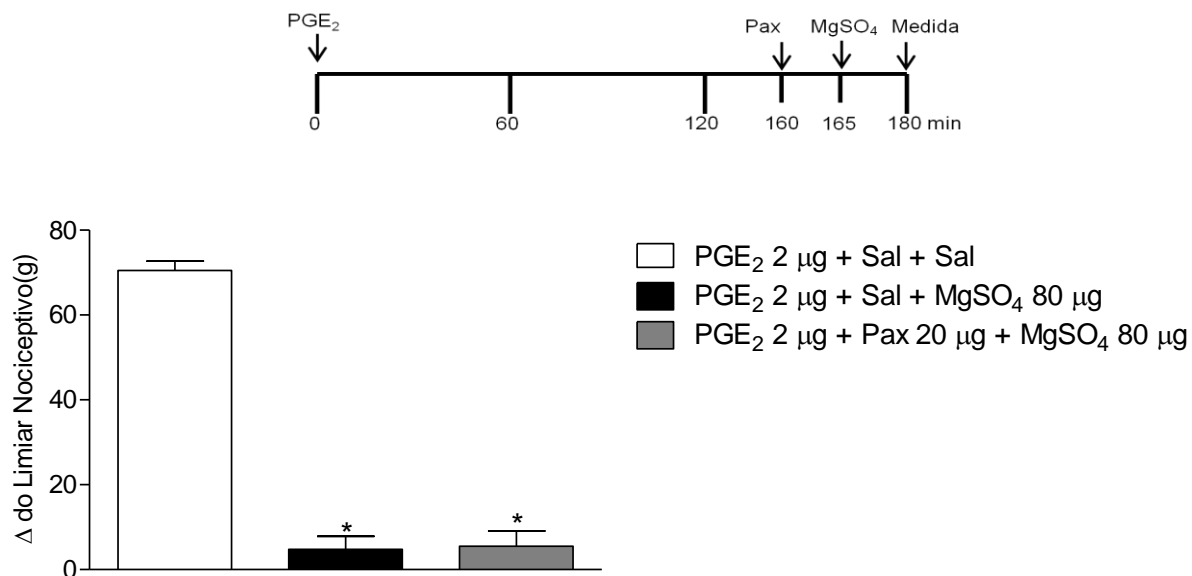


Gráfico 18: Ausência de antagonismo no efeito antinociceptivo periférico do MgSO₄ pela administração intraplantar de paxilina. A paxilina (Pax: 20 μg/pata) foi administrada 5 minutos antes do MgSO₄ (80 μg/pata). Cada coluna representa a média ± S.E.M. do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * indica uma diferença estatística significativa em relação ao grupo PGE₂ 2 μg + Salina + Salina (p<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

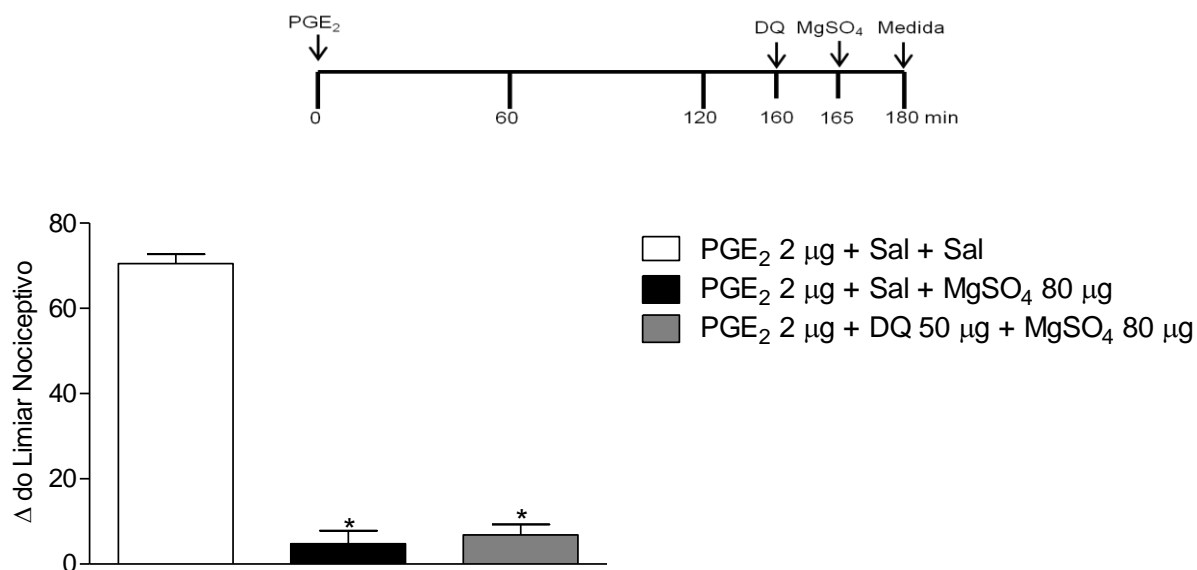


Gráfico 19: Ausência de antagonismo no efeito antinociceptivo periférico do MgSO₄ pela administração intraplantar de dequalínio. O dequalínio (DQ: 50 µg/pata) foi administrado 5 minutos antes do MgSO₄ (80 µg/pata). Cada coluna representa a média ± S.E.M., do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g), referente a cinco animais por grupo. * indica uma diferença estatística significativa em relação a PGE₂ 2 µg + Salina + Salina (p<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

Discussão

6. Discussão

O magnésio tem um papel fundamental em muitas funções celulares e há um interesse crescente em estudar suas aplicações clínicas (SIRVINSKAS & LAURINAITIS, 2002). Embora vários estudos experimentais e pesquisas clínicas indiquem um papel analgésico, seus resultados ainda são conflitantes e seus mecanismos de ação pouco explorados.

Desde o início da década de 90, os efeitos do magnésio na dor pós-operatória e no consumo de opioides têm sido intensamente estudados. Ainda que a maioria dos estudos demonstrem a redução do consumo de analgésicos no intra e no pós-operatório após a suplementação com magnésio durante a anestesia, alguns poucos trabalhos revelam efeitos benéficos ausentes ou insignificantes (HERROEDER et al., 2011). Vários estudos também têm demonstrado que o uso de sulfato de magnésio no intraoperatório induz a redução do requerimento de anestésicos e bloqueadores neuromusculares durante a anestesia geral (SIRVINSKAS & LAURINAITIS, 2002).

A redução do consumo de opioides durante a anestesia e, em casos mais extremos, inclusive o não uso, na chamada anestesia “opioid-free”, tem sido defendida em casos específicos. Em pacientes portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS) e em obesos mórbidos há redução do risco de depressão respiratória e fraqueza da musculatura faríngea após a extubação (FORGET, 2018; LAVAND’HOMME & ESTEBE, 2018). Além disso, atualmente é defendido um benefício teórico na cirurgia oncológica, em que se evita a supressão imunológica e a neoangiogênese tumoral induzidos por opioides (BHARATI et al., 2016). Nesses casos, o uso de técnicas regionais, como os bloqueios de neuroeixo ou de nervos periféricos, e a associação

de drogas para manutenção da anestesia geral, como propofol, lidocaína, cetamina e sulfato de magnésio, poupando o uso de opioides, têm se mostrado extremamente benéficos (TAHERI et al., 2015; FORGET & CATA, 2017).

Em nosso trabalho, examinamos a hipótese de que o sulfato de magnésio possua efeito antinociceptivo periférico em doses bem menores do que as doses habitualmente capazes de induzir nocicepção. Os efeitos antinociceptivos em modelos animais e experimentais são atribuídos, geralmente, ao bloqueio de receptores NMDA e a regulação do influxo celular de cálcio. Entretanto, alguns estudos recentes apontam para aumento da produção de NO como mecanismo antinociceptivo (SREBRO et al., 2015), enquanto outros descrevem a capacidade do sulfato de magnésio em ativar a Fosfoinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt (SU et al., 2013; LEE et al., 2015). A ativação da PI3K/Akt, conforme demonstrado por Cunha e colaboradores em 2010, causa estimulação da enzima NOS_n e, por sua vez, da via NO/GMP_c/K_{ATP} no nociceptor (CUNHA et al., 2010).

No estudo das vias de antinocicepção do MgSO₄ e de seus possíveis mecanismos de atuação analgésica, por inibição de cálcio ou antagonismo da ação de aminoácidos excitatórios, calculamos a diferença (Δ) do limiar nociceptivo obtido no início do experimento (valor basal), antes de qualquer injeção (tempo zero), em relação ao limiar medido após 3 horas da injeção dos agentes ou antagonistas em estudo. Trabalhar com o Δ do limiar nociceptivo permite uma melhor avaliação dos resultados, uma vez que cada animal possui uma determinada sensibilidade à dor e um valor específico de limiar nociceptivo basal.

Nossos experimentos evidenciaram que a injeção de sulfato de magnésio em várias doses mostrou-se eficaz em induzir a antinocicepção periférica, sendo a dose de 80 μ g/pata a que induziu efeito antinociceptivo mais intenso, portanto escolhida

para os experimentos que se seguiram. Nossos resultados mostram ainda que o sulfato de magnésio administrado sozinho, na ausência de estímulo hiperalgésico, não induz a qualquer alteração no limiar nociceptivo dos animais. No teste de exclusão do efeito sistêmico do sulfato de magnésio a dose de 80 µg apresentou efeito exclusivamente local, não havendo a participação do efeito sistêmico da droga, o que contribui para a sustentação da hipótese sobre os mecanismos da ação periférica propostos nesse trabalho.

É mandatório observar que a dose de sulfato de magnésio mais eficaz em induzir antinocicepção periférica em nosso modelo (80 µg) foi aproximadamente 80 vezes menor que a dose requerida para induzir efeito hiperalgésico máximo (6,2 mg) na pata de ratos, como descrito por Srebro, 2015, em modelos experimentais equivalentes. Sendo assim, uma dose bem abaixo da necessária para induzir hiperalgesia quando injetada periféricamente, pode induzir a antinocicepção por mecanismos ainda não totalmente elucidados. Além disso, doses altas de sulfato de magnésio também podem causar efeitos colaterais graves com intoxicação como Bloqueio Atrioventricular Total (BAVT), convulsões, coma e parada cardiorrespiratória (LU & NIGHTINGALE, 2000).

Nesse trabalho, utilizamos como agentes hiperalgésicos a injeção intraplantar de prostaglandina E₂, de calcimicina e de NMDA. Estudos propõem que, através do aumento da concentração de AMPc e ativação das proteínas quinases A (PKA) e C (PKC), a PGE₂ ativa correntes de sódio resistentes à tetrodotoxina e inibe canais para potássio dependentes de voltagem, aumentando assim a excitabilidade neuronal, o que diminui o limiar de ativação dos neurônios aferentes primários (KASSUYA et al., 2007; SACHS et al., 2009). De fato, a PGE₂ é capaz de sensibilizar diretamente neurônios aferentes primários a estímulos químicos,

térmicos e mecânicos (FERREIRA & NAKAMURA, 1979a; FERREIRA & NAKAMURA, 1979b), sem requerer a participação de células ou mediadores intermediários (KAWABATA, 2011), tendo por isso a vantagem sobre outros métodos de hiperalgesia, como a carragenina, eliminando a possibilidade do efeito periférico do fármaco estudado ser resultante de um bloqueio da liberação ou ação de mediadores produzidos durante um processo inflamatório (VINEGAR et al., 1987). Nossos resultados corroboram estudos prévios realizados em nosso laboratório que demonstram a intensidade máxima de hiperalgesia induzida pela injeção local de PGE₂ na dose de 2 µg/pata, com pico de ação entre a 3^a e a 4^a hora após a injeção (SOARES & DUARTE, 2001; ALVES & DUARTE, 2002; PACHECO & DUARTE, 2005).

O aumento transitório na concentração de cálcio citoplasmático é um passo importante na liberação de neurotransmissores e na excitabilidade da membrana celular, o que ocorre via passagem de cálcio por canais de membrana, liberação de estoques intracelulares e transporte por bombas iônicas. Por sua vez, influxo celular de cálcio ocorre de três formas: por canais para cálcio sensíveis a voltagem, canais para cálcio inespecíficos ativados por ligante e canais para cálcio acoplados a receptor (PRADO, 2001). Há várias linhas de evidência que apontam para o envolvimento do aumento citoplasmático do cálcio na nocicepção, seja por injeção intracerebroventricular, intratecal ou intraplantar (CODERRE & MELZACK, 1992), sendo essa hipótese testada em nosso trabalho.

A calcimicina, um ionóforo de cálcio identificado inicialmente como A23187, foi desenvolvida como antibiótico e age ligando-se a cátions divalentes permitindo que atravessem a membrana celular (ABBOTT et al., 1979). Suas propriedades hiperalgésicas foram descritas primeiramente por Ferreira e Nakamura em 1979.

Assim como PGE₂, a calcimicina também sensibiliza diretamente neurônios aferentes primários a estímulos mecânicos, via aumento da concentração intracelular de cálcio com pico de ação entre a 3^a e 4^a horas após a injeção (FERREIRA & NAKAMURA, 1979a). Além de induzir a hiperalgesia quando utilizada isoladamente, a calcimicina também diminui o limiar nociceptivo quando utilizada em combinação com outros agentes hiperalgésicos como no teste da formalina (CODERRE & MELZACK, 1992). Em nosso trabalho, constatamos que a menor dose intra-plantar capaz de induzir a hiperalgesia foi 20 µg/pata com pico de ação na 3^a hora após a injeção.

As funções do magnésio como antagonista natural dos íons cálcio tanto por sítios de absorção no trato gastrointestinal, como nos sítios de ligação e em funções celulares são bem conhecidas (FAWCETT et al., 1999). Antagonistas de canais para cálcio, seja em forma iônica como magnésio ou lítio, ou compostos como verapamil, diltiazem e nifepidina têm demonstrado ações analgésicas em modelos animais tanto de dor aguda, quanto de dor crônica com diferentes formas de administração (PRADO, 2001). Dessa forma, corroborando o fato do aumento do cálcio intracelular induzir a hiperalgesia, e o magnésio ter propriedades antinociceptivas, um dos mecanismos aventados para tal, naturalmente, é a inibição do influxo de cálcio (HERROEDER et al., 2011; NECHIFOR, 2011). Embora essa seja uma hipótese lógica, não há na literatura estudos que tentem comprovar em modelos animais de nocicepção esse mecanismo claro de ação do magnésio. Em nossos experimentos, a hiperalgesia induzida pela calcimicina foi revertida pelo sulfato de magnésio intra-plantar sugerindo confirmação da teoria em questão.

Vários estudos demonstram também a participação de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) e seus receptores na transmissão nociceptiva

central, na modulação e na sensibilização que induz a hiperalgesia e alodinia (LAWAND et al., 1997). O NMDA é um agonista seletivo para um desses receptores excitatórios, o receptor NMDA, cuja ativação induz o influxo celular de sódio e cálcio e o efluxo de potássio. Sendo assim, a ação de aminoácidos excitatórios sobre receptores NMDA sensibiliza o potencial de membrana, o que sugere que sua estimulação está relacionada a condutância sensível a voltagem (MAYER et al., 1984). Essa sensibilização neuronal induz a nocicepção em modelos animais de dor em vários locais da via, tanto em injeções no gânglio da raiz dorsal, como intratecal, ou intraplantar (ZHOU et al., 1996; PARK et al., 2000; FERRARI et al., 2014; MERT et al., 2014). Nos nossos experimentos, a menor dose intra-plantar capaz de induzir a hiperalgesia foi 12µg/pata com pico de ação também na 3ª hora após a injeção.

O magnésio é um bloqueador endógeno do canal do receptor NMDA e tem demonstrado eficácia analgésica em modelos animais e humanos de dor (SAVIC VUJOVIC et al., 2015). Um dos mecanismos aventados em vários trabalhos na literatura para essa ação analgésica é justamente o antagonismo de receptores NMDA (HERROEDER et al., 2011). No nosso estudo pressupomos essa hipótese, uma vez que o sulfato de magnésio foi capaz de induzir a antinocicepção no modelo de hiperalgesia induzido pela injeção intraplantar de NMDA.

Foi demonstrado que, a nível periférico, vários agentes induzem antinocicepção ao liberar opioides endógenos e endocanabinoides (ROMERO & DUARTE, 2009; REIS et al., 2009; ROMERO et al., 2009).

A participação de opioides endógenos na antinocicepção periférica tem sido extensivamente estudada nas últimas décadas (SMITH, 2008). Os efeitos dos opioides ocorrem em consequência da ativação central e/ou periférica dos seus receptores. Os receptores opioides μ , κ e δ são acoplados à proteína G_i e, ao serem

ativados, diminuem o nível de AMPc intracelular via subunidade α_i , impedindo a ação dos canais para cálcio voltagem dependentes, atenuando a excitabilidade neuronal (KIEFFER & GAVÉRIAUX-RUFF, 2002).

Desde a descoberta do receptor canabinoide acoplado a proteína G e a identificação de canabinoides endógenos, esse sistema tem sido estudado e implicado em diversos contextos fisiológicos (RICE et al., 2002). Os compostos chamados “endocanabinoides”, eicosanoides derivados de ácido araquidônico, constituem um grupo relativamente diversificado, com pelo menos dois membros já bastante estudados: o N-araquidonoil etanolamina (AEA), mais conhecido como anandamida e o 2-araquidonoil glicerol (2-AG). A produção dos endocanabinoides só ocorre sob demanda, a partir do aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , não ocorrendo estocagem em vesículas secretórias (CALIGNANO et al., 2000). O antagonismo dos receptores canabinoides periféricos CB_1 e CB_2 , como AM251 e AM630, respectivamente, nos oferece uma ferramenta interessante para pesquisar esse sistema (ROMERO & DUARTE, 2013).

Mesmo não havendo na literatura indícios de ação antinociceptiva do magnésio via antagonismo de receptores opioides ou canabinoides, optamos por testá-los devido a importância de ambos os sistemas no contexto da analgesia. Em nossos experimentos a naloxona, um antagonista não seletivo de receptores opioides não reverteu a antinocicepção do sulfato de magnésio no modelo de hiperalgesia induzido pela injeção de PGE_2 . Da mesma forma, os antagonistas de receptores canabinoides AM251 e AM630 também não reverteram a analgesia produzida pelo sulfato de magnésio também nos animais com hiperalgesia induzida pela PGE_2 . Assim, podemos presumir que não há envolvimento desses sistemas na antinocicepção periférica induzida pelo $MgSO_4$.

No entanto, é bem descrita na literatura a potencialização do efeito de opioides por associação com o magnésio tanto em estudos clínicos, quanto em estudos experimentais. Essa combinação é extremamente interessante, aumentando o nível de segurança no uso de opioides com redução de doses e efeitos adversos (KROIN et al., 2000; BAHRENBURG et al., 2015). O mecanismo aventado para esse sinergismo sugere que o antagonismo do magnésio levando a redução da ativação de quinases induzidas pelo receptor NMDA, assim como a diminuição do influxo celular de cálcio, causaria uma redução da fosforilação do receptor opioide e, conseqüentemente, potencialização da analgesia induzida pela ligação aos receptores μ opioides na membrana celular (BUJALSKA-ZADROZNY et al., 2017).

Em se tratando de antinocicepção, ao longo dos últimos 30 anos, vários trabalhos demonstraram um mecanismo de ação periférico dependente de NO para vários agentes analgésicos (FERREIRA et al., 1991; DUARTE et al., 1992; REIS et al., 2009; ROMERO et al., 2011; ROMERO et al., 2011; GEDIZ et al., 2015). Além da bem reconhecida ativação da NOS pelo complexo cálcio/calmodulina, mecanismos alternativos têm sido propostos e um deles envolve a fosforilação dessa enzima pela via de sinalização PI3K/AKT (CUNHA et al., 2010). Entre as enzimas da família PI3K, PI3K γ é ativada pela subunidade $\beta\gamma$ de receptores acoplados a proteína Gi, incluindo receptores opioides (CUNHA et al., 2010). Entretanto, a ativação da PI3K γ /AKT também pode ocorrer por bloqueio de canais para cálcio tipo L, sendo esse o mecanismo descrito para ativação da via pelo sulfato de magnésio (LEE et al., 2015).

Srebro e colaboradores em 2014 demonstraram que ação antinociceptiva do sulfato de magnésio utilizado por via subcutânea no modelo de dor inflamatória induzida pela carragenina foi revertida tanto pelo antagonista não seletivo da enzima

NOS e quanto pelo inibidor seletivo da enzima NOS_n, por outro lado o efeito analgésico do sulfato de magnésio é restabelecido quando o animal é tratado com doador de NO (SREBRO et al., 2014). Em outro trabalho, o aumento da atividade da enzima PI3K/AKT se mostrou crucial para os efeitos anti-inflamatórios do sulfato de magnésio observado em cultura de macrófagos (SU et al., 2013). Dessa forma, avaliamos a participação da via NO/GMP_c/K_{ATP} na ação antinociceptiva periférica do sulfato de magnésio em nosso modelo.

Com a finalidade de verificar se o sulfato de magnésio leva ao aumento da síntese de NO, utilizamos o inibidor não seletivo da NOS, o N^G-Nitro-L-arginina (L-NOArg), um análogo da L-arginina, que inibe competitivamente a enzima NOS, bloqueando a síntese de NO (SUSCHEK et al., 1999). Foi observado que o L-NOArg reverteu o efeito antinociceptivo periférico do sulfato de magnésio de maneira dose-dependente, sugerindo que o NO é um mediador importante para tal efeito.

O NO é enzimaticamente formado a partir da L-arginina por três isoenzimas, as constitutivas (NOS_n e NOS_e) e a isoforma induzível (NOS_i), sendo as três isoformas localizadas periféricamente em neurônios do gânglio da raiz dorsal (MONCADA et al., 1997). De acordo com os resultados obtidos, sugerimos que o sulfato de magnésio administrado periféricamente ativa a NOS_n. A ativação da isoenzima NOS_n, e não da NOS_e e NOS_i, está envolvida no mecanismo antinociceptivo periférico de vários tipos de analgésicos, incluindo anandamida, morfina, SNC80 (agonista do receptor δ opioide), bremazocina, acetilcolina, xilazina, dipirona e diclofenaco (ROMERO et al., 2011).

O NO uma vez formado, promove a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel e conseqüentemente aumento das concentrações de GMP_c (MURAD et al., 1990; DUARTE et al., 1990). O aumento desse segundo mensageiro está

relacionado com o efeito antinociceptivo periférico de vários analgésicos (DUARTE et al., 1990; FERREIRA et al., 1991; DUARTE et al., 1992). Em nossos resultados foi observado que a administração do ODQ, um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, reverteu de forma dose-dependente o efeito antinociceptivo periférico induzido pelo sulfato de magnésio. Portanto, os resultados sugerem que o $MgSO_4$ aumenta os níveis de NO, com consequente ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e aumento dos níveis de GMPc em nosso modelo. A ativação da NOS pelo magnésio pode resultar de mecanismo não relacionados ao antagonismo NMDA, uma vez que o magnésio tem demonstrado não só diminuir a atividade de receptores NMDA, como também a atividade de outros canais para cálcio pré e pós-sinápticos e modular a secreção de neurotransmissores (SREBRO et al., 2014).

De forma similar, a cetamina, um antagonista não competitivo de receptores NMDA, possui propriedade antinociceptiva periférica em doses subanestésicas por mecanismos semelhantes, com ativação da via NO/GMPc/ K_{ATP} (ROMERO et al., 2011; ROMERO & DUARTE, 2013). Ademais, a associação entre cetamina e sulfato de magnésio em baixas doses demonstrou uma ação analgésica sinérgica contra dor nociceptiva aguda (SAVIC VUJOVIC et al., 2015).

Em 2000, Soares e colaboradores, em nosso laboratório, estabeleceram a relação entre a ativação de canais para K^+ sensíveis ao ATP no mecanismo de antinocicepção periférica de doadores de NO (SOARES et al., 2000). No ano seguinte, Soares e Duarte demonstraram o envolvimento dos canais K_{ATP} na antinocicepção periférica induzida por um análogo de GMPc permeável a membrana (SOARES & DUARTE, 2001). Desde então, vários trabalhos verificaram a ligação entre a participação da via NO/GMPc e a ativação dos canais para potássio na

antinocicepção periférica (ALVES & DUARTE, 2002; PACHECO & DUARTE, 2005; REIS et al., 2011; ROMERO & DUARTE, 2013).

No presente estudo, foi observado que o efeito antinociceptivo periférico do sulfato de magnésio foi revertido pela administração local da sulfoniluréia glibenclamida, bloqueador seletivo dos canais para K^+ sensíveis ao ATP, mas não pelos bloqueadores seletivos para os canais para K^+ dependentes de voltagem (tetraetilamônio), dos canais para K^+ ativados por Ca^{2+} de baixa (dequalínio) e de alta (paxilina) condutância (OCAÑA & BAEYENS, 1993), sugerindo o envolvimento apenas do canal K_{ATP} no evento estudado. Entretanto, ainda não ficou claro como o sulfato de magnésio ativa a cascata inicial via PI3K/AKT/NOSn, visto que não se liga a receptores opioides ou canabinoides em nociceptores periféricos.

Diante desses resultados, sugerimos que o sulfato de magnésio induza a antinocicepção periférica por mecanismos que ativam a via L-arginina/NO/GMPc/ K_{ATP} .

Em conclusão, nossos dados sugerem, pela primeira vez, a ação antinociceptiva periférica induzida pelo sulfato de magnésio quando administrado em baixas doses em patas pré-tratadas com PGE_2 , e que há envolvimento do sistema nitrérgico e dos canais para potássio sensíveis a ATP nesse processo. Além disso, o $MgSO_4$ também é capaz de induzir a antinocicepção periférica em patas pré-tratadas com calcimicina e NMDA, corroborando com a hipótese de analgesia por antagonismo de canais para cálcio e antagonismo de receptores de glutamato NMDA. Nossa hipótese é que o sulfato de magnésio cause hiperpolarização celular, via antagonismo de canais para cálcio, antagonismo NMDA e pela via NO/GMPc/ K_{ATP} , com consequente efeito antinociceptivo. Ressaltamos a necessidade de investigações futuras a respeito dos mecanismos celulares de ativação da via

NO/GMPc/ K_{ATP} , uma vez que não demonstramos a participação dos sistemas opioidérgico e canabinóide em nossos experimentos. Nossa hipótese de trabalho está representada na **figura 12**.

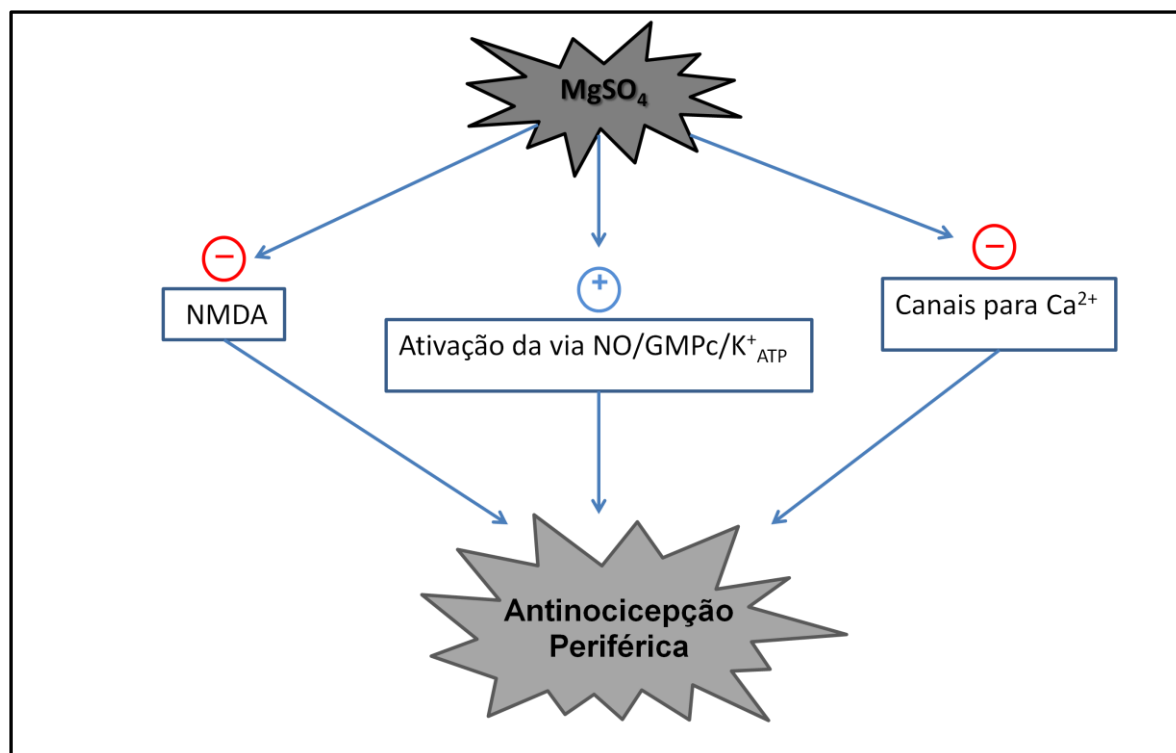


Figura 12: Representação esquemática do mecanismo antinociceptivo periférico do $MgSO_4$. Antagonismo de canais para cálcio, a ativação da via NO/GMPc/ K_{ATP}^+ , e o antagonismo de receptores de glutamato NMDA induzem a hiperpolarização celular e, conseqüentemente, antinocicepção periférica.

Referências Bibliográficas

ABBOTT, B. J. et al. Microbial transformation of A23187, a divalent cation ionophore antibiotic. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 16, n. 6, p. 808–12, dez. 1979.

ALVES, D.; DUARTE, I. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. **European journal of pharmacology**, v. 444, n. 1–2, p. 47–52, 24 maio 2002.

BAHRENBERG, A. et al. Antinociceptive effects of epidural magnesium sulphate alone and in combination with morphine in dogs. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 42, n. 3, p. 319–328, 2015.

BEGON, S. et al. Magnesium and MK-801 have a similar effect in two experimental models of neuropathic pain. **Brain Research**, v. 887, p. 436–439, 2000.

BHARATI, S. J.; CHOWDHURY, T.; BERGESE, S. D.; GHOSH, S. Anesthetics impact on cancer recurrence : What do we know ? **464 Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 464–468, 2016.

BOTTEGA, F. H.; FONTANA, R. A dor como quinto sinal vital: utilização da escala de avaliação por enfermeiros de um hospital geral. **Texto e Contexto - Enfermagem**, v. 19, n. 2, p. 283–290, 2010.

BUJALSKA-ZADROZNY, M. et al. Magnesium enhances opioid-induced analgesia – What we have learnt in the past decades? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. November, p. 113–127, 2017.

CALIGNANO, A. et al. A role for the endogenous cannabinoid system in the peripheral control of pain initiation. **Progress in Brain Research**, v. 129, p. 471–482, 2000.

CICERO, T. J.; ELLIS, M. S. Understanding the demand side of the prescription opioid epidemic: Does the initial source of opioids matter? **Drug and alcohol dependence**, v. 173 Suppl, p. S4–S10, 2017.

CODERRE, T. J.; MELZACK, R. The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 3671–5, set. 1992.

COLLIER, R. A short history of pain management. **CMAJ**, v. 190, n. Janeiro, p. 26–27, 2018.

CUNHA, T. M. et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K /AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 9, p. 4442–4447, 2010.

DUARTE, I. D. et al. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **European journal of pharmacology**, v. 217, n. 2–3, p. 225–7, 7 jul. 1992.

DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **European journal of pharmacology**, v. 186, n. 2–3, p. 289–93, 21 set. 1990.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760–72, nov.

2010.

FAWCETT, W. J.; HAXBY, E. J.; MALE, D. A. Magnesium: physiology and pharmacology. **British journal of anaesthesia**, v. 83, n. 2, p. 302–20, ago. 1999.

FEIN, A. **Nociceptors and the perception of pain**. [s.l: s.n.]. v. 1^a ed.

FERRARI, L. F. et al. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 51, p. 18363–8, 23 dez. 2014.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **European journal of pharmacology**, v. 201, n. 1, p. 121–2, 16 ago. 1991.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **PROSTAGLANDINS**, v. 18, n. 2, p. 179–190, 1979a.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. II - Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. **Prostaglandins**, v. 18, n. 2, p. 191–200, ago. 1979b.

FORGET, P. Opioid-free anaesthesia . Why and how ? A contextual analysis. **Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine**, p. 2–5, 2018.

FORGET, P.; CATA, J. Stable anesthesia with alternative to opioids: Are ketamine and magnesium helpful to stabilize hemodynamics during surgery? A systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, 2017.

GARCIA, L. P. et al. Gastos das famílias brasileiras com medicamentos segundo a renda familiar : análise da Pesquisa de Orçamentos Familiares de 2002-2003 e de 2008-2009. **Cad. Saúde Pública**, v. 29, n. 8, p. 1605–1616, 2013.

GEDIZ, E. İ. et al. Antinociceptive Effect of Vardenafil on Carrageenan-Induced Hyperalgesia in Rat: involvement of Nitric Oxide/Cyclic Guanosine Monophosphate/Calcium Channels Pathway. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 14, n. 4, p. 1137–43, 2015.

HERROEDER, S. et al. Magnesium--essentials for anesthesiologists. **Anesthesiology**, v. 114, n. 4, p. 971–93, abr. 2011.

HUNG, Y.-C. et al. Magnesium sulfate diminishes the effects of amide local anesthetics in rat sciatic-nerve block. **Regional anesthesia and pain medicine**, v. 32, n. 4, p. 288–95, 2008.

ISHIZAKI, K. et al. The effect of intrathecal magnesium sulphate on nociception in rat acute pain models. **Anaesthesia**, v. 54, n. 3, p. 241–6, mar. 1999.

JALES JR., L.H., JALES NETO, L. H. . B. Mecanismos neurais e modulação da dor. In: POSSO, I.P.; GROSSMANN, E.; FONSECA, P.R.B.; PERISSINOTTI, D.M.N.; OLIVEIRA JR, J.O.; SOUZA, J.B.; SERRANO, S.C.; VALL, J. (Ed.). . **Tratado de Dor: publicação da Sociedade Brasileira para Estudo da Dor**. 1^a ed. ed. Rio de Janeiro, RJ: Atheneu, 2017. p. 235–251.

KARKLIS, I. P. E FERREIRA, R. C. **A Dor: uma experiência na História**. Disponível em: <https://sbhm.webnode.com.br/news/a_dor%3A_uma_experi%C3%AAncia_na_historia/>. Acesso em: 15 ago. 2018.

KASSUYA, C. A. L. et al. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **British journal of pharmacology**, v. 150, n. 6, p. 727–37, mar. 2007.

KAWABATA, A. Prostaglandin E2 and pain--an update. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 34, n. 8, p. 1170–3, 2011.

KIEFFER, B. L.; GAVÉRIAUX-RUFF, C. Exploring the opioid system by gene knockout. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 5, p. 285–306, 2002.

KOINIG, H. et al. Magnesium sulfate reduces intra- and postoperative analgesic requirements. **Anesthesia and analgesia**, v. 87, n. 1, p. 206–10, jul. 1998.

KROIN, J. S. et al. Magnesium Sulfate Potentiates Morphine Antinociception at the Spinal Level. **Anesth Analg**, v. 90, n. December, p. 913–917, 2000.

LAVAND'HOMME, P.; ESTEBE, J. Opioid-free anesthesia : a different regard to anesthesia practice. **Current medical research and opinion & Pain Medicine**, v. 31, 2018.

LAWAND, N. B.; WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. **European journal of pharmacology**, v. 324, n. 2–3, p. 169–77, 18 abr. 1997.

LEE, P. et al. Phosphoinositide 3-kinase β , phosphoinositide 3-kinase δ , and phosphoinositide 3-kinase γ mediate the anti-inflammatory effects of magnesium sulfate. **The Journal of surgical research**, v. 197, n. 2, p. 390–7, ago. 2015.

LIN, C. Y. et al. L-type calcium channels are involved in mediating the anti-inflammatory effects of magnesium sulphate. **British journal of anaesthesia**, v. 104, n. 1, p. 44–51, jan. 2010.

LU, J. F.; NIGHTINGALE, C. H. Magnesium Sulfate in Eclampsia and Pre-Eclampsia Pharmacokinetic Principles. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 38, n. 4, p. 305–314, 2000.

MAYER, M. L.; WESTBROOK, G. L.; GUTHRIE, P. B. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. **Nature**, v. 309, n. 5965, p. 261–3, 1984.

MELLO, R. D.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8–16, 2008.

MERSKEY, H. E BOGDUK, N. **Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage**. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

MERT, T. et al. Modulating actions of NMDA receptors on pronociceptive effects of locally injected remifentanil in diabetic rats. **Pharmacological reports : PR**, v. 66, n. 6, p. 1065–72, dez. 2014.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1–164, jan. 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, abr. 2002.

MIRANDA, H. F. et al. **Antinociceptive effects of Ca^{2+} channel blockers** **Eur J Pharmacol**, 7 jul. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1425934>>

MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacological reviews**, v. 49, n. 2, p. 137–142, 1997.

MORAN, C. E.; HOFMEISTER, E. H. Prevalence of pain in a university veterinary intensive care unit. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 29–36, 2013.

MURAD F, ISHII K, FÖRSTERMANN U, GORSKY L, KERWIN JF JR,

POLLOCK J, H. M. EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. **Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.**, v. 24, p. 441–448, 1990.

NECHIFOR, M. Magnesium involvement in pain. **Magnesium research**, v. 24, n. 4, p. 220–2, dez. 2011.

NORTH, R. A. Drug receptors and the inhibition of nerve cells. **Br. J. Pharmacol.**, v. 98, n. December 1988, p. 13–28, 1989.

OCAÑA, M. et al. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **European journal of pharmacology**, v. 500, n. 1–3, p. 203–19, 1 out. 2004.

OCAÑA, M.; BAEYENS, J. M. Differential effects of K⁺ channel blockers on antinociception induced by M₂-adrenoceptor, GABA_B and μ -opioid receptor agonists. **British journal of pharmacology**, v. 110, p. 1049–1054, 1993.

OLIVEIRA JR. & HOLANDA. Fisiologia da nocicepção e da supressão da dor. In: POSSO, I.P.; GROSSMANN, E.; FONSECA, P.R.B.; PERISSINOTTI, D.M.N.; OLIVEIRA JR, J.O.; SOUZA, J.B.; SERRANO, S.C.; VALL, J. (Ed.). . **Tratado de Dor: publicação da Sociedade Brasileira para Estudo da Dor**. 1^a ed. Rio de Janeiro, RJ: Atheneu, 2017. p. 215–228.

OLSON, K. . **History of pain: A Brief Overview of the 19th and 20th Centuries**. Disponível em: <<https://www.practicalpainmanagement.com/pain/history-pain-brief-overview-19th-20th-centuries>>. Acesso em: 21 ago. 2018a.

OLSON, K. A. **History of Pain: The Nature of Pain**. Disponível em: <<https://www.practicalpainmanagement.com/pain/acute/history-pain-nature-pain>>. Acesso em: 21 ago. 2018.

OLSON, K. A. **History of pain: A Brief Overview of the 17th and 18th Centuries**. Disponível em: <<https://www.practicalpainmanagement.com/pain/history-pain-brief-overview-17th-18th-centuries>>. Acesso em: 21 ago. 2018b.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779–87, nov. 2010.

OWENS, P. L. et al. **Hospital inpatient utilization related to opioid overuse among adults, 1993-2012**. Disponível em: <<https://www.hcup-us.ashrq.gov/reports/statbriefs/sb177-Hospitalizations-for-Opioid-Overuse.jsp>>. Acesso em: 12 out. 2018.

PACHECO, D. F.; DUARTE, I. D. G. Delta-opioid receptor agonist SNC80 induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K⁺ channels. **European journal of pharmacology**, v. 512, n. 1, p. 23–8, 4 abr. 2005.

PARK, Y. H. et al. The role of nitric oxide and prostaglandin E₂ on the hyperalgesia induced by excitatory amino acids in rats. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 52, n. 4, p. 431–6, abr. 2000.

PICKERING, G. et al. Oral magnesium treatment in patients with neuropathic pain : a randomized clinical trial. v. 24, n. 2, p. 28–35, 2011.

PRADO, W. A. Involvement of calcium in pain and antinociception. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 34, n. 4, p. 449–61, abr. 2001.

REIS, G. M. L. et al. Opioid receptor and NO/cGMP pathway as a mechanism of peripheral antinociceptive action of the cannabinoid receptor agonist anandamide. **Life sciences**, v. 85, n. 9–10, p. 351–6, 26 ago. 2009.

REIS, G. M. L. et al. Endogenous cannabinoid receptor agonist anandamide

induces peripheral antinociception by activation of ATP-sensitive K⁺ channels. **Life sciences**, v. 88, n. 15–16, p. 653–7, 11 abr. 2011.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, maio 2011.

RICE, A. S. C.; FARQUHAR-SMITH, W. P.; NAGY, I. Endocannabinoids and pain: Spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 66, n. 2–3, p. 243–256, 2002.

RICHARDSON, J. D.; VASKO, M. R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 302, n. 3, p. 839–45, set. 2002.

ROMERO, T. R. L. et al. Probable involvement of alpha(2C)-adrenoceptor subtype and endogenous opioid peptides in the peripheral antinociceptive effect induced by xylazine. **European journal of pharmacology**, v. 608, n. 1–3, p. 23–7, 17 abr. 2009.

ROMERO, T. R. L. et al. Ketamine activates the L-arginine/Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway to induce peripheral antinociception in rats. **Anesthesia and analgesia**, v. 113, n. 5, p. 1254–9, nov. 2011.

ROMERO, T. R. L.; DUARTE, I. D. G. α 2-Adrenoceptor agonist xylazine induces peripheral antinociceptive effect by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 613, n. 1–3, p. 64–67, jun. 2009.

ROMERO, T. R. L.; DUARTE, I. D. G. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by ketamine. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 40, n. 4, p. 419–24, jul. 2013.

ROMERO, T. R. L.; RESENDE, L. C.; DUARTE, I. D. G. The neuronal NO synthase participation in the peripheral antinociception mechanism induced by several analgesic drugs. **Nitric oxide : biology and chemistry**, v. 25, n. 4, p. 431–5, 30 nov. 2011.

RONDÓN, L. J. et al. Magnesium attenuates chronic hypersensitivity and spinal cord NMDA receptor phosphorylation in a rat model of diabetic neuropathic pain. **The Journal of physiology**, v. 588, n. Pt 21, p. 4205–15, 1 nov. 2010.

RUDD, R. A. et al. **Increases in drug and opioid overdose deaths – United States 2000-2014.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6450a3.htm>>. Acesso em: 12 out. 2018.

SACHS, D. et al. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. **British journal of pharmacology**, v. 156, n. 5, p. 826–34, mar. 2009.

SAVIC VUJOVIC, K. R. et al. A synergistic interaction between magnesium sulphate and ketamine on the inhibition of acute nociception in rats. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 19, n. 13, p. 2503–9, jul. 2015.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature neuroscience**, v. 5 Suppl, n. november, p. 1062–7, nov. 2002.

SERRANO, S. C.; TEODORO, A. L.; SOUZA, A. P. Epidemiologia da dor. In: POSSO, I.P.; GROSSMANN, E.; FONSECA, P.R.B.; PERISSINOTTI, D.M.N.;

OLIVEIRA JR, J.O.; SOUZA, J.B.; SERRANO, S.C.; VALL, J. (Ed.). . **Tratado de Dor: publicação da Sociedade Brasileira para Estudo da Dor**. 1ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Atheneu, 2017. p. 33–47.

SIQUEIRA, J. T. T. **Porque a dor é também uma questão de saúde pública!** Disponível em: <http://www.sbed.org.br/materias.php?cd_secao=74>. Acesso em: 12 out. 2018.

SIRVINSKAS, E.; LAURINAITIS, R. Use of magnesium sulfate in anesthesiology. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 38, n. 7, p. 695–8, 2002.

SMITH, H. S. Peripherally-acting opioids. **Pain physician**, v. 11, n. 2 Suppl, p. S121-32, 2008.

SOARES, A. C. et al. Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. **European journal of pharmacology**, v. 400, n. 1, p. 67–71, 14 jul. 2000.

SOARES, A. C.; DUARTE, I. D. Dibutyl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K(+) channels in the rat PGE2-induced hyperalgesic paw. **British journal of pharmacology**, v. 134, n. 1, p. 127–31, set. 2001.

SREBRO, D. P. et al. Anti-hyperalgesic effect of systemic magnesium sulfate in carrageenan-induced inflammatory pain in rats: influence of the nitric oxide pathway. **Magnesium research**, v. 27, n. 2, p. 77–85, 2014.

SREBRO, D. P. et al. TRPA1, NMDA receptors and nitric oxide mediate mechanical hyperalgesia induced by local injection of magnesium sulfate into the rat hind paw. **Physiology & behavior**, v. 139, p. 267–73, fev. 2015.

STESSEL, B. et al. Is s-ketamine with ou without magnesium sulphate an alternative for postoperative pain treatment? Randomised study. **European Journal of Anaesthesiology**, v. 30, n. 2, p. 90–94, 2013.

SU, N. et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway is involved in mediating the anti-inflammation effects of magnesium sulfate. **The Journal of surgical research**, v. 185, n. 2, p. 726–32, dez. 2013.

SUSCHEK, C. V et al. Effects of Magnesium Dobesilate on Nitric Oxide Synthase Activity in Endothelial Cells. **International Journal of Angiology**, v. 8, p. 21–24, 1999.

TAHERI, A. et al. Effect of Low-Dose (Single-Dose) Magnesium Sulfate on Postoperative Analgesia in Hysterectomy Patients Receiving Balanced General Anesthesia. **Anesthesiology Research and Practice**, v. 2015, 2015.

TAKANO, Y. et al. Antihyperalgesic effects of intrathecally administered magnesium sulfate in rats. **Pain**, v. 84, p. 175–179, 2000.

TEIXEIRA, M.J. E YENG, L. T. A evolução histórica dos conhecimentos a respeito da dor. In: POSSO, I.P.; GROSSMANN, E.; FONSECA, P.R.B.; PERISSINOTTI, D.M.N.; OLIVEIRA JR, J.O.; SOUZA, J.B.; SERRANO, S.C.; VALL, J. (Ed.). . **Tratado de Dor: publicação da Sociedade Brasileira para Estudo da Dor**. 1ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Atheneu, 2017. p. 3–17.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. In: ALVES NETO, O.; COSTA, C.M.C.; SIQUEIRA, J.T.T.; TEIXEIRA, M. J. (Ed.). . **Dor, princípios e prática**. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 205–226.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da dor. In: : : POSSO, I.P.; GROSSMANN, E.; FONSECA, P.R.B.; PERISSINOTTI, D.M.N.; OLIVEIRA JR, J.O.; SOUZA, J.B.; SERRANO, S.C.; VALL, J. (Ed.). . **Tratado de Dor: publicação da Sociedade**

Brasileira para Estudo da Dor. 1^a ed. Rio de Janeiro, RJ: Atheneu, 2017. p. 155–198.

TRAYNELIS, S. F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacological reviews**, v. 62, n. 3, p. 405–96, set. 2010.

VINEGAR, R. et al. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Federation proceedings**, v. 46, n. 1, p. 118–26, jan. 1987.

VUCKOVIC, S. et al. The antinociceptive effects of magnesium sulfate and MK-801 in visceral inflammatory pain model: The role of NO/cGMP/K(+)ATP pathway. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 11, p. 1621–7, 2015.

WOOLF, C. J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Annals of internal medicine**, v. 140, n. 6, p. 441–51, 16 mar. 2004.


WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3742–4, nov. 2010.

WOOLF, C. J. E; MA, Q. Nociceptors — Noxious Stimulus Detectors. **Neuron Review**, v. 55, n. August 2, p. 353–364, 2007.

ZHOU, S.; BONASERA, L.; CARLTON, S. M. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats. **Neuroreport**, v. 7, n. 4, p. 895–900, 22 mar. 1996.

Anexos

Anexo I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 240/2017
Título do projeto: Avaliação do efeito antinociceptivo periférico do sulfato de magnésio em camundongos
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Igor Dimitri Gama Duarte
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Farmacologia

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

Aprovado na reunião do dia 02/10/2017. Validade: 02/10/2017 à 01/10/2022
Belo Horizonte, 04/10/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

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