

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

**Um estudo sobre os mecanismos antinociceptivos periféricos induzidos pela  
serotonina**

**Danielle Diniz Aguiar**

**BELO HORIZONTE**

**2015**

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

**Um estudo sobre os mecanismos antinociceptivos periféricos induzidos pela  
serotonina**

**Danielle Diniz Aguiar**

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

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero.

Co-orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte.

**BELO HORIZONTE**

**2015**

“Desistir? Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei tão a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros; mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e à N. S. Aparecida por esse grande presente que é a vida!

Ao Prof. Thiago Roberto Lima Romero pela oportunidade de sua orientação, confiança e incentivo desde minha entrada no laboratório.

Ao Prof. Igor Dimitri Gama Duarte pela co-orientação, por todos os ensinamentos, pela agradável convivência e exemplo de competência.

À Prof<sup>a</sup>. Andréa de Castro Perez pela convivência e contribuições nesse trabalho.

À todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas, pela competência e comprometimento.

À minha mãe Marina por todo apoio e carinho.

Ao meu marido Marcone pelo companheirismo, incentivo, amor e tanta paciência.

À Minha Grande Família e a todos meus amigos por todo carinho e torcida. Vocês são presentes de Deus na minha vida!

Aos amigos da Faculdade de Educação, em especial à Gláucia pela parceria e desprendimento que foram fundamentais para concluir essa etapa.

À Cybele, Daniela, Zaine e ao grupo Miudinho por me ajudarem a encontrar o equilíbrio nesse momento tão importante.

A todos os colegas do Laboratório de Dor e Analgesia por todo aprendizado, colaboração, companhia e momentos agradáveis, em especial à Júlia, pela parceria!

Aos colegas de Pós-graduação pelo companheirismo e convívio agradável.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia e Farmacologia, Cintya Menezes Fonseca, Nilda Lucas Laurindo e Rodner Rodrigues Madureira de Almeida pela disponibilidade e paciência.

Aos funcionários do Cebio-ICB/UFMG e aos bioteristas Jorge Costa Ferreira, Rinaldo do Nascimento e Wellington Palhares, o trabalho de vocês é fundamental para o sucesso da nossa pesquisa!

E a todos àqueles que de alguma maneira contribuíram para esse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	VII
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	XI
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XIII
<b>RESUMO</b> .....	XIV
<b>ABSTRACT</b> .....	XVI
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 Dor, sua transmissão e modulação .....	19
1.2 A serotonina .....	25
1.3 Serotonina no contexto nociceptivo e antinociceptivo .....	32
1.4 Serotonina e sua interação com outros sistemas analgésicos.....	33
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	37
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	39
3.1 Objetivo geral .....	39
3.2 Objetivos específicos .....	39
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
4.1 Animais de experimentação .....	41
4.2 Drogas e solventes.....	41
4.2.1 Agente hiperalgésico .....	41
4.2.2 Substância sob teste.....	41
4.2.3 Fármacos envolvidos na via serotoninérgica .....	41
4.2.4 Fármacos envolvidos na via opioide .....	42
4.2.5 Fármacos envolvidos na via canabinoide .....	43
4.2.6 Fármacos envolvidos na via L-arginina/NO/GMPc .....	45
4.2.7 Fármacos envolvidos nos testes com canais para potássio .....	46
4.2.8 Administração das drogas .....	46
4.3 Teste de retirada da pata .....	47
4.3.1 Medida do limiar nociceptivo, hiperalgesia e antinocicepção .....	49
4.4 Procedimento experimental.....	50
4.5 Dosagem de nitrito realizada pelo método de Reação de Griess.....	51
4.6 Análise estatística ... ..	53

<b>5 RESULTADOS</b> .....	55
5.1 Efeito antinociceptivo periférico da serotonina. ....	55
5.2 Efeitos dos antagonistas serotoninérgicos na antinocicepção induzida pela serotonina.....	57
5.3 Avaliação da participação do sistema opioidérgico no efeito antinociceptivo periférico da serotonina.....	60
5.3.1 Efeito dos antagonistas dos receptores opioidérgicos na antinocicepção induzida pela serotonina . ....	60
5.3.2 Peptídeos opioides potencializam a antinocicepção periférica induzida pela serotonina. ....	62
5.4. Avaliação da participação do sistema canabinoidérgico no efeito antinociceptivo periférico da serotonina. ....	63
5.4.1 Efeito dos antagonistas canabinoides na antinocicepção induzida pela serotonina. ....	63
5.4.2 Endocanabinoides potencializam a antinocicepção periférica induzida pela serotonina.....	64
5.5 Avaliação da participação da via L-arginina/NO/GMPc no efeito antinociceptivo periférico da serotonina.....	66
5.5.1 Efeito da inibição da enzima Óxido Nítrico Sintase.....	66
5.5.2 Mensuração dos níveis de nitrito após a injeção intraplantar de serotonina.. ....	67
5.5.3 Efeito da inibição da enzima Guanilato Ciclase Solúvel. ....	68
5.6. Avaliação da participação dos canais para potássio no efeito antinociceptivo periférico da serotonina.....	69
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

**2-AG** - 2-araquidonoil glicerol

**Ach** - acetilcolina

**AEA** - N-araquidonoil etanolamina

**AINES** - anti-inflamatórios não esteroidais

**AMPc** - 3'5'-adenosina-monofosfato cíclico

**ANOVA** - análise de variância

**ATP** - trifosfato de adenosina

**CGRP** - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

**DAG** - diacilglicerol

**DMSO** - dimetilsulfóxido

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

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

**E.P.M.** - erro padrão da média

**FAAH** - hidrolase de amida de ácido graxo

**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

**i.pl** - intraplantar

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

**K<sub>ATP</sub>** - canais para potássio sensíveis ao ATP

**K<sub>Ca</sub>** - canais para potássio ativados por cálcio

**K<sub>M</sub>** - Constante de Michaelis - Mentem

**K<sub>v</sub>** - canais para potássio dependentes de voltagem

**MAGL** - monoacilglicerol lipase

**N** - número de animais por grupo

**NAPE** - N-araquidonoil fosfatidiletatolamina

**NO** - óxido nítrico

**NOS** - óxido nítrico sintase

**eNOS** - óxido nítrico sintase endotelial

**iNOS** - óxido nítrico sintase induzível

**nNOS** - óxido nítrico sintase neuronal

**NPS** - nitroprussiato de sódio

**PEA** - palmitoiletanolamida

**PGE<sub>2</sub>** - prostaglandina E<sub>2</sub>

**PKA** - proteína quinase A

**PKC** - proteína quinase C

**POMC** - pró-opiomelanocortina

**SERT** - transportador de serotonina

**SNC** - sistema nervoso central

**TEA** - tetraetilamônio

**THC** - Δ9-tetrahidrocanabinol

**VMAT** - transportador vesicular de monoaminas

**V<sub>max</sub>** - velocidade máxima

**Δ** - delta

**5-HT** - 5-hidroxitriptamina



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Classificação dos tipos de dor.....	21
<b>Figura 2</b> - Tipos de fibras sensitivas .....	22
<b>Figura 3</b> - Síntese de 5-HT .....	27
<b>Figura 4</b> - Classificação, subtipos e mecanismos de transdução dos receptores de 5-HT. ....	30
<b>Figura 5</b> – Mecanismo de ação de fármacos que interagem com o sistema serotoninérgico.....	42
<b>Figura 6</b> – Mecanismo de ação de fármacos que interagem com o sistema opioidérgico.....	43
<b>Figura 7</b> – Mecanismo de ação de fármacos que interagem com o sistema canabinoidérgico. ....	44
<b>Figura 8</b> – Mecanismo de ação de fármacos que interagem com o sistema nitrérgico .....	45
<b>Figura 9</b> – Mecanismo de ação de fármacos que interagem com os canais para potássio.....	46
<b>Figura 10</b> - Administração de drogas pela via intraplantar. ....	47
<b>Figura 11</b> – Camundongo submetido ao teste de retirada de pata.....	48
<b>Figura 12</b> - Parte compressora do aparelho (Ugo Basile, Itália) .....	49

**Figura 13** - Hipótese sobre o mecanismo antinociceptivo periférico induzido pela serotonina..... 91

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Efeito da serotonina no limiar nociceptivo em camundongos com hiperalgesia induzida por PGE<sub>2</sub>..... 55
- Gráfico 2** - Efeito da serotonina quando administrada sozinha, sem qualquer agente hiperalgésico.....56
- Gráfico 3** - Exclusão do efeito antinociceptivo sistêmico da serotonina.....57
- Gráfico 4** - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de isamoltano (ISA)..... 58
- Gráfico 5** - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de cetanserina (Cet)..... 58
- Gráfico 6** - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de ondansetrona (Onda). ..... 59
- Gráfico 7** - O efeito da administração intraplantar de BRL15572 e SB-269970 sobre a antinocicepção periférica da serotonina ..... 59
- Gráfico 8** - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de naloxona (NX) ..... 60
- Gráfico 9** - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de clocinnamox (Cloc)..... 61
- Gráfico 10** - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de naltrindole (NTD) e nor-binaltorfimina (Nor) ..... 62
- Gráfico 11** - Administração intraplantar de bestatina (Best) potencializa o efeito antinociceptivo periférico da serotonina ..... 62

<b>Gráfico 12</b> - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de AM251 .....	63
<b>Gráfico 13</b> - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de AM630 .....	64
<b>Gráfico 14</b> - Administração intraplantar de MAFP e JZL184 potencializa o efeito antinociceptivo periférico da serotonina .....	65
<b>Gráfico 15</b> - Administração intraplantar de VDM11 potencializa o efeito antinociceptivo periférico da serotonina .....	65
<b>Gráfico 16</b> - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de L-NOarg.....	66
<b>Gráfico 17</b> - O efeito da administração intraplantar de LNIL, LNIO e LNPA sobre a antinocicepção periférica da serotonina .....	67
<b>Gráfico 18</b> - Serotonina aumenta os níveis de nitrito na presença de PGE <sub>2</sub> ...	68
<b>Gráfico 19</b> - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de ODQ .....	68
<b>Gráfico 20</b> - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de glibenclamida (Glib).....	69
<b>Gráfico 21</b> - O efeito da administração intraplantar de tetraetilamônio (TEA), paxilina (PX) e dequalínio (DQ) sobre a antinocicepção periférica da serotonina.....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Distribuição dos receptores serotoninérgicos .....	31
--	----

## RESUMO

A serotonina (5-HT) é uma amina biogênica com importantes funções no sistema nervoso central, como comportamento, humor, sono e apetite, além de fazer parte da via inibitória descendente da dor. Até o momento, apenas seu papel pró-nociceptivo foi descrito ao nível periférico. Sendo assim, nos propusemos a verificar se a serotonina poderia estar associada a um efeito nociceptivo ao nível periférico, bem como a seletividade de seus receptores nesse evento, e a participação dos sistemas opioidérgico, canabinoidérgico, nitrérgico e dos canais para potássio neste mecanismo. O teste de pressão da pata de camundongo foi usado em animais que tiveram a sensibilidade aumentada por injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> (2µg), sendo utilizado para as análises estatísticas a análise de variância ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Para verificar a seletividade de receptores na resposta antinociceptiva, utilizamos antagonistas seletivos dos receptores serotoninérgicos (isamoltano 5-HT<sub>1B</sub>, BRL 15572 5-HT<sub>1D</sub>, cetanserina 5-HT<sub>2A</sub>, ondansetrona 5-HT<sub>3</sub> e SB-269970 5-HT<sub>7</sub>). A serotonina administrada na pata traseira direita (62,5, 125, 250 e 500 ng e 1 µg) produziu efeito antinociceptivo manifestado de forma dose dependente. Os antagonistas seletivos para os receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub> nas doses de 100 ng, 1 µg e 10 µg, reverteram o efeito antinociceptivo induzido pela serotonina na dose de 250 ng. Já os antagonistas seletivos para os receptores 5-HT<sub>1D</sub> e 5-HT<sub>7</sub> (10 µg) não foram capazes de reverter o efeito antinociceptivo induzido pela serotonina. A fim de avaliar a participação do sistema opioidérgico nesse evento, usamos os antagonistas seletivos para os receptores opioides µ, δ e κ clocinnamox (10, 20 e 40 µg), naltrindole (60 µg) e nor-binaltorfimina (200 µg) respectivamente, que reverteram o efeito antinociceptivo induzido pela serotonina (250 ng). A bestatina (400 µg), inibidor de encefalinases que degradam peptídeos

opioides, potencializou o efeito antinociceptivo induzido pela serotonina (menor dose 62,5 ng). Para avaliar a participação do sistema canabinoide, utilizamos os antagonistas seletivos para os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, AM251 (20, 40 e 80 µg) e AM630 (25, 50 e 100 µg) respectivamente, que revertem o efeito antinociceptivo induzido pela serotonina. Já o MAFP (0,5 µg), um inibidor da enzima FAAH que degrada anandamida, o JZL184 (3,75 µg), um inibidor da enzima MAGL que degrada o 2-AG, e o VDM11 (2,5 µg) um inibidor da captação de anandamida, potencializaram o efeito antinociceptivo induzido pela serotonina (menor dose, 62,5 ng). Já nos testes para verificar a participação do sistema nitrérgico e canais para potássio, o efeito antinociceptivo da serotonina foi revertido, de forma dose dependente, pelo inibidor não seletivo de isoformas da NOS, L-NOArg (12,5, 25 e 50 µg), pelo inibidor seletivo para a isoforma neuronal LNPA (24 µg) e pelo inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ (25, 50 e 100 µg). Adicionalmente, a glibenclamida (20, 40 e 80 µg), um bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP, reverteu o efeito da serotonina. Já o bloqueador dos canais para potássio sensíveis à voltagem, tetraetilamônio (30 µg), e os bloqueadores de canais para potássio ativados por cálcio de baixa e alta condutância, dequalínio (50 µg) e paxilina (50 µg), respectivamente, não revertem o efeito da serotonina. Além disso, a administração intraplantar de serotonina (250 ng) induziu um aumento significativo dos níveis de nitrito no homogeneizado da superfície plantar da pata de camundongos. Nossos dados sugerem, pela primeira vez, a ação antinociceptiva periférica induzida pela serotonina, e ainda, fornecem evidências que há participação dos sistemas opioide e canabinoide, com subsequente ativação da via NO/GMPc/K<sub>ATP</sub> nessa resposta.

## ABSTRACT

Serotonin (5-HT) is a biogenic amine with important functions in the central nervous system, such as behavior, mood, sleep and appetite, and is part of the descending inhibitory pain pathway. So far, only its pro-nociceptive role was described at the peripheral level. Therefore, we set out to verify that serotonin could be linked to a nociceptive effect at peripheral level, as well as the selectivity of its receptors in this event, and the participation of opioidergic, cannabinoidergic, nitrenergic systems and potassium channels in this mechanism. The mouse paw pressure model was used to test in animals that had increased sensitivity to intraplantar injection of PGE<sub>2</sub> (2 µg), being used for statistical analysis to analysis of variance ANOVA followed by Bonferroni post test. To check the selectivity of receptors in event, selective serotonergic receptors antagonists (isamoltan 5-HT<sub>1B</sub>, BRL 15572 5-HT<sub>1D</sub>, ketanserin 5-HT<sub>2A</sub>, ondansetron 5-HT<sub>3</sub> e SB-269970 5-HT<sub>7</sub>) were used. Serotonin administered on right hind paw (62,5, 125, 250 and 500 ng and 1 µg) produced antinociceptive effect manifested in a dose-dependent. Selective antagonists for the 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors, in doses of 100 ng, 1 µg and 10 µg, reversed the antinociceptive effect induced by serotonin at the dose of 250 ng. Also, selective antagonists for the 5-HT<sub>1D</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors (10 µg) were unable to reverse the antinociceptive effect induced by serotonin. In order to evaluate the participation of the opioidergic system, use the selective antagonist for opioid receptors µ, δ and κ clocinnamox (10, 20 and 40 µg), naltrindole (60 µg) and nor-binaltorfimina (200 µg) respectively, which reversed the antinociceptive effect induced by serotonin (250 ng). Bestatin (400 µg), an encefalinases inhibitor that degrade peptides, opioids increased the antinociceptive effect induced by serotonin (lowest dose 62,5 ng). To assess the participation of the cannabinoidergic system, selective antagonists for the



CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors, AM251 (20, 40 and 80 μg) and AM630 (25, 50 and 100 μg) respectively, were used and they reversed the antinociceptive effect induced by serotonin. In addition, MAFP (0,5 μg), an inhibitor of the FAAH enzyme which breaks down anandamide, JZL184 (3,75 μg), an inhibitor of MAGL enzyme that degrades the 2-AG, and the VDM11 (2,5 μg), an inhibitor of anandamide uptake, have strengthened the antinociceptive effect induced by serotonin (lowest dose 62,5 ng). Also, tests to verify the participation of nitrergic system and channels for potassium, serotonin antinociceptive effect was reversed, so dose dependent, by non-selective inhibitor of isoforms of the us, L-NOArg (12,5, 25 and 50 μg), by selective inhibitor for neuronal isoform LNPA (24 μg) and the soluble guanylate cyclase inhibitor, ODQ (25, 50 and 100 μg). Additionally, glyburide (20, 40 and 80 μg), potassium channel ATP-sensitive blocker, reversed the effect of serotonin. Also the potassium channel blocker, voltage-sensitive tetraetilamônio (30 μg), and potassium channel blockers calcium-activated high and low conductance, dequalínio (50 μg) and paxilina (50 μg), respectively, not reversed the effect of serotonin. In addition, the administration of serotonin intraplantar (250 ng) induced a significant increase in levels of nitrite in the homogenate of mice's foot plantar surface. Our data suggest, for the first time, the peripheral antinociceptive action induced by serotonin, and provide evidence that there is participation of the opoidergic and cannabinoidergic systems in the action, with subsequent activation of the NO/GMPc/K<sub>ATP</sub> pathway.

# *1 Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Dor, sua transmissão e modulação

Por muito tempo a dor foi considerada uma forma de punição por faltas cometidas no âmbito religioso. A dor foi inicialmente conceituada pelo filósofo francês René Descartes (1596-1650), ao descrever que esta seria produzida por um sistema de transmissão direto, proveniente dos tecidos lesados na periferia até o cérebro, e que deveria haver uma relação entre o grau de dano tecidual e a intensidade da dor (Schneider & Karoly, 1983). Nesse conceito, o antigo pressuposto de que a dor era "representada" no coração foi abandonado (pressuposto comum dos antigos egípcios). O cérebro assumiu o lugar do coração, e a teoria de Descartes abriu as portas para que a neurociência explicasse os mecanismos da dor (IASP, 2010). Atualmente, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial de tecidos ou descrita em termos de tal dano (IASP, 1979).

Embora a intensidade da agressão tecidual e a amplitude da percepção dolorosa estejam freqüentemente relacionadas, é possível ocorrer uma dissociação entre essas duas variáveis (Lima & Almeida, 2002). Em algumas situações a dor pode ocorrer independentemente da presença de dano tecidual, por exemplo, em áreas amputadas do corpo (Melzack, 1973). Em contrapartida, pode ocorrer lesão tecidual sem a percepção da dor, como por exemplo, durante atividades físicas intensas ou em exposições a fatores de estresse e medo (Wall, 1979; Rhudy & Megler, 2000). "Sentir dor" é função adaptativa de extrema importância, de tal maneira que sua ausência, como ocorre em algumas condições clínicas hereditárias (Cox *et al.*, 2006; Indo, 2001), pode levar à repetidas lesões e à uma automutilação inconsciente (Woolf, 2010).

Apesar dos animais não apresentarem a capacidade de relatar verbalmente a ocorrência da dor, eles exibem respostas comportamentais típicas, através das quais podemos constatar a presença da dor e sua intensidade (Langford *et al*, 2010). Por isso, nocicepção, termo proposto por Sherrington (1906) referindo-se à percepção de um estímulo potencialmente lesivo ao organismo, é o termo que melhor substitui a denominação dor em animais por se tratar exclusivamente do componente fisiológico da condução do impulso nervoso até o cérebro, não levando em consideração o componente emocional, devido à dificuldade de ser mensurado com fidelidade em animais (Besson e Chaouch, 1987). Entretanto, salientamos que a presença do componente emocional da dor nos animais não é questionada (Jones, 1992).

Segundo Woolf (2010), a dor pode ser classificada como nociceptiva, inflamatória ou patológica (neuropática ou disfuncional) (**Figura 1**). A dor nociceptiva ocorre a partir da ativação direta do nociceptor por estímulos mecânico, térmico ou químico. A dor inflamatória, após 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. Finalmente, a dor patológica, decorrente de um funcionamento anormal do sistema nervoso, sendo subdividida em dor neuropática e disfuncional. A dor neuropática é causada por uma lesão do sistema nervoso central ou periférico e a dor disfuncional não tem uma causa evidente, não sendo identificado estímulo, processo inflamatório, nem lesão no sistema nervoso, sendo a possível causa uma disfunção bioquímica e liberação de neurotransmissores.

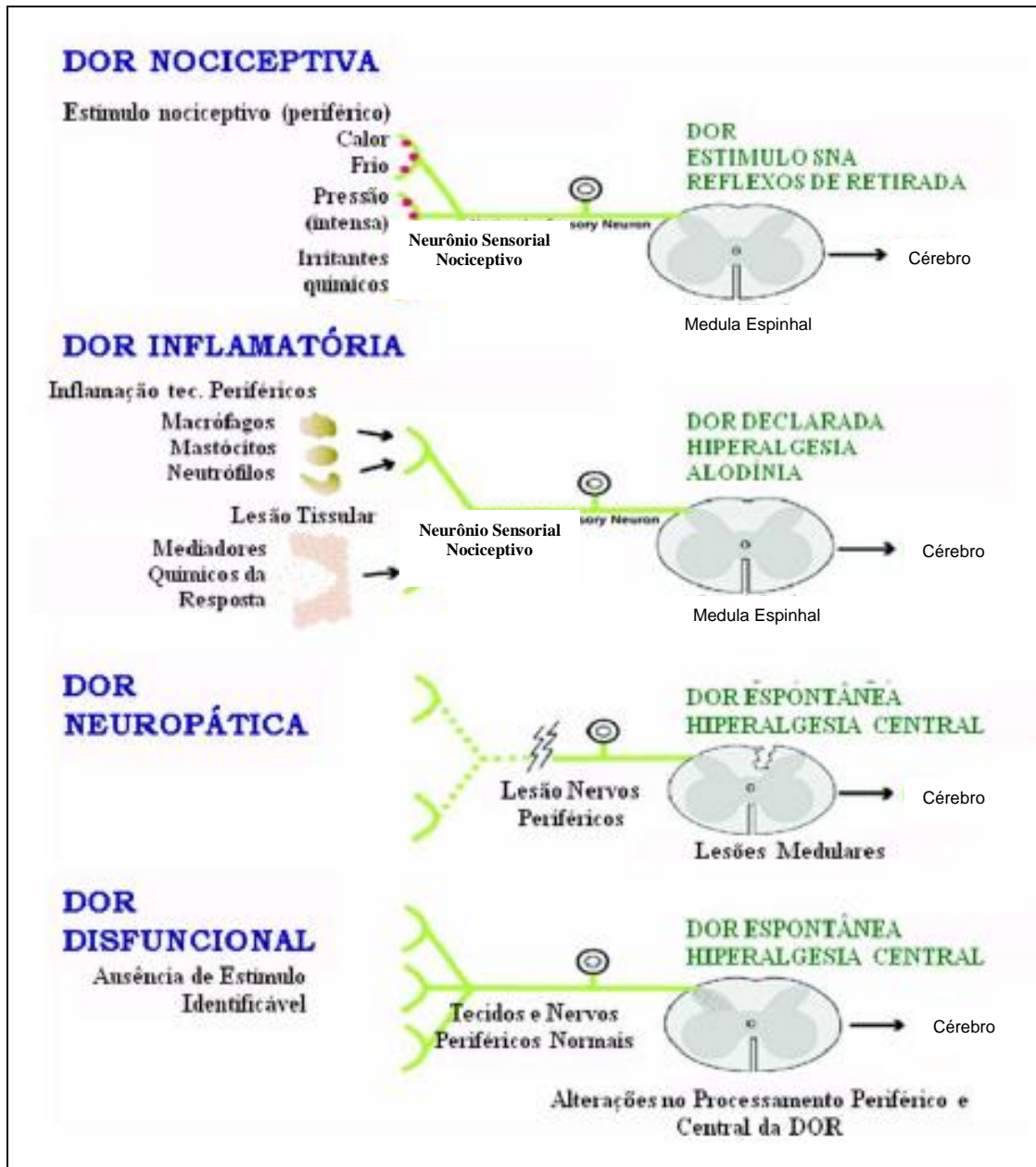
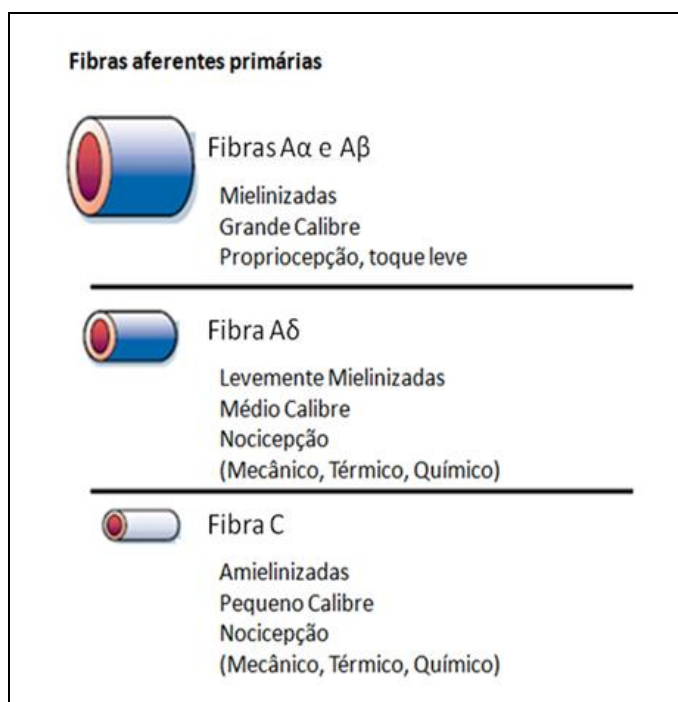


Figura 1 - Classificação dos tipos de dor (figura adaptada de Clifford & Woolf, 2004).

Em relação a esta sinalização sensorial nociceptiva, em 1906, Charles Sherrington propôs a existência de um conjunto de terminações nervosas, cuja função seria receber estímulos nocivos. Posteriormente, foi postulado a definição de nociceptores: receptores em terminações nervosas responsáveis por detectar estímulos potencialmente lesivos (McMahon & Koltzenburg, 1990). Os corpos celulares desses neurônios encontram-se localizados nos gânglios da raiz dorsal

dos nervos espinhais ou no gânglio trigeminal. Os nociceptores diferenciam-se dos outros receptores sensoriais pelo seu limiar de disparo mais alto do que de outros neurônios, sendo normalmente ativados somente por estímulos de intensidade nociceptiva suficientes para causar algum grau de lesão tecidual (Kumazawa, 1990; Cesare e McNaughton, 1997).

Os receptores sensoriais podem ser classificados em três tipos principais (revisado por Millan, 1999): (a) fibras  $A\beta$  e  $A\alpha$ , condutoras rápidas mielinizadas; (b) fibras  $A\delta$ , condutoras de velocidade intermediária, levemente mielinizadas; (c) fibras C, condutoras mais lentas amielinizadas (revisado por Fein, 2012) **(Figura 2)**.



**Figura 2 -Tipos de fibras sensitivas** (extraída de Julius & Basbaum, 2001).

As fibras  $A\alpha$  e  $A\beta$  não são consideradas fibras nociceptivas, sendo estas mais envolvidas na detecção de estímulos não nocivos como tato (Holdcroft & Jaggar, 2005).

As fibras  $A\delta$  têm capacidade de responder a estímulos nocivos térmicos e/ou mecânicos, e ao serem ativadas, induzem uma sensação dolorosa bem localizada e

específica (Meyer *et al.*, 2006). Já as fibras do tipo C são responsivas a estímulos de origem mecânica, térmica e/ou química, e por serem multi-responsivas são denominadas receptores polimodais. Após a ativação induzem uma sensação dolorosa difusa e inespecífica (revisado por Vanderah, 2007). Existem ainda os nociceptores silenciosos, um subconjunto de fibras C presentes na pele, articulações e vísceras que em condições normais não respondem ao estímulo nocivo. Em condições de inflamação esses nociceptores podem ser sensibilizados e ativados por mediadores químicos (Millan, 1999).

A detecção do estímulo da dor ocorre primeiramente nos nociceptores, cuja função é transformar estímulos de natureza química, mecânica ou térmica em estímulos elétricos (potenciais de ação) carreando a informação nociceptiva da periferia ao corno dorsal da medula espinhal (Rang *et al.*, 1991). No corno dorsal haverá a ativação do segundo neurônio da via ascendente da dor, sendo o glutamato, substância P e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), os transmissores predominantes nesta ativação (Fürst, 1999). Após serem ativados, os neurônios de segunda ordem conduzirão os estímulos do corno dorsal da medula até o tálamo, ocorrendo aí a segunda sinapse da via entre os neurônios de segunda e terceira ordem, os quais transmitirão as informações para o córtex cerebral, onde serão processadas e interpretadas ao nível da consciência (Basbaum & Fields, 1984).

Esta ascendência do estímulo nociceptivo não seria um evento estático e sim dinâmico, com várias possibilidades de controle ao longo de seu tráfego da periferia ao sistema nervoso central, além da deflagração desta modulação após a sensibilização central.

Vários trabalhos sustentam a hipótese da existência de um controle modulatório da nocicepção a nível espinhal e supra espinhal. Ao nível espinhal a teoria do portão da dor (Melzack & Wall, 1965) sugere que a lâmina II do corno dorsal, chamada de substância gelatinosa, principalmente constituída de interneurônios inibitórios, que uma vez ativados por fibras mais mielinizadas (táteis) culminam por inibir as sinapses excitatórias no corno dorsal da medula. Já a estimulação por fibras menos mielinizadas (nociceptivas) inibem, através de ramificações colaterais, os interneurônios da substância gelatinosa permitindo a chegada da informação nociceptiva aos neurônios secundários do corno dorsal. Em resumo, o balanço entre a informação conduzida pelas fibras periféricas nociceptivas e táteis modulam a informação nociceptiva ao nível do corno dorsal da medula espinhal. Já ao nível supra-espinhal verificou-se a existência de um sistema descendente contribuindo para a inibição da via nociceptiva (Reynolds, 1969), sendo que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal induziu marcante antinocicepção, capaz de inibir respostas reflexas a estímulos nocivos sem alterar respostas reflexas a estímulos ambientais em gatos. Esse sistema supra-medular projeta-se via funículo dorso-lateral (Basbaum *et al.*, 1976; Fields *et al.*, 1977), chega ao corno dorsal da medula espinhal e determina efeitos inibitórios sobre a transmissão nociceptiva nesse local (Fields, 1988; Fields & Basbaum, 1999).

Além da substância cinzenta, existem numerosos sítios antinociceptivos supraespinhais originando vias descendentes para o corno dorsal, dentre elas o hipotálamo, núcleo magno da rafe, núcleo reticular paragigantocelular, núcleo parabraquial, locus coeruleus, núcleo do trato solitário e núcleo reticular dorsal (Millan, 2002).



Neste contexto, múltiplos sistemas endógenos vêm sendo descritos como envolvidos na modulação da dor, com importância central para o sistema noradrenérgico (Carstens *et al.*, 1987; Proudfit, 1988; Haws *et al.*, 1990), opioidérgico (Watkins & Mayer, 1982; Carstens *et al.*, 1987; Ko, 1997; Fürst, 1999) e serotoninérgico (Chitour *et al.*, 1982; Carstens *et al.*, 1987).

### 1.2 A serotonina

Entre os mediadores de origem celular, a 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina apresenta importante papel na mudança fenotípica dos nociceptores, e pode ser encontrada em vertebrados, celenterados, tunicados, moluscos, artrópodes e até mesmo em grãos, frutas e em venenos de vespas e escorpiões (Sanders-Bush & Hazelwood, 2011).

A serotonina foi isolada e caracterizada em meados de 1948 por Maurice Rapport e Irvine Page (Rapport *et al.*, 1948 a-c). O isolamento da 5-HT ocorreu após décadas de investigações que tinham como objetivo caracterizar uma substância vasoconstritora supostamente presente em plaquetas (Janeway *et al.*, 1918; Reid & Bick, 1942; Zucker, 1944). A concepção do nome serotonina advém do radical latim *serum* (soro) e da palavra *tonic*, de origem grega.

Em 1937, o cientista italiano Vittorio Erspamer extraiu uma substância das células enterocromafins do trato gastrintestinal que induzia contração da musculatura lisa, sendo então denominada enteramina (Erspamer & Asero, 1952). Posteriormente, em 1952, o mesmo pesquisador demonstrou que a enteramina e serotonina eram a mesma substância (Reid & Rand, 1952).

Anteriormente a essas observações, já era conhecida a melhor capacidade do soro de causar contração de musculatura lisa quando comparado com o plasma

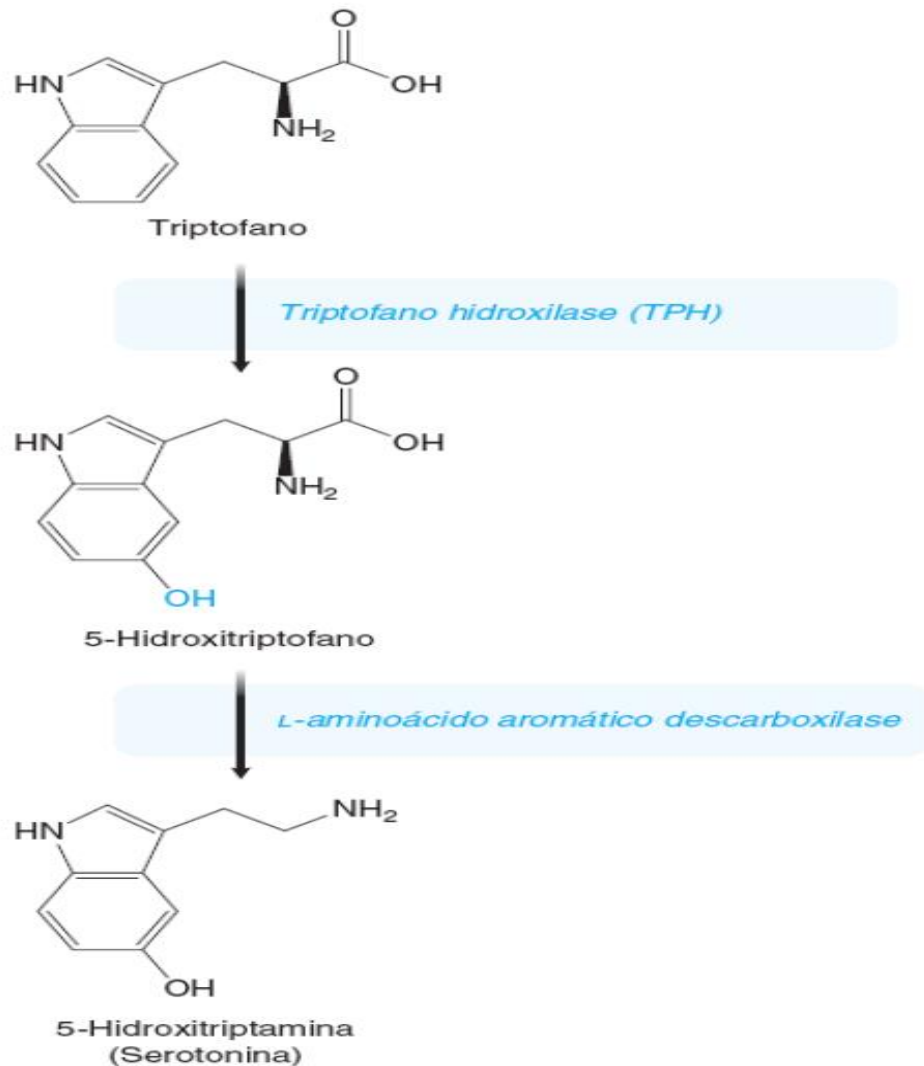
(Janeway *et al.*, 1918). Tal fato sustentou a ideia de que a 5-HT seria armazenada e liberada durante o processo de coagulação, ao invés de estar presente de forma livre na circulação. Janeway e colaboradores propuseram já em 1918 que essa substância vasoconstritora estava presente em plaquetas. Foi demonstrado que a 5-HT circulante era transportada primariamente em plaquetas em várias espécies animais e suspeitava-se de que pudesse desempenhar algum papel na hemostasia (Humphrey & Jaques, 1954).

A 5-HT foi rapidamente identificada em vários tecidos, incluindo cérebro, pulmões, rins, plaquetas e trato gastrintestinal. Enquanto seu papel sobre a função plaquetária ainda era investigado, Brodie & Shore (1957) propuseram um papel de neurotransmissor para 5-HT baseados em estudos que demonstravam a localização de seus receptores em áreas específicas de cérebros de vertebrados (Twarog & Page, 1953; Amin *et al.*, 1954). Posteriormente, foi demonstrado que 5-HT estava localizada principalmente em terminações nervosas em preparações isoladas de cérebro de mamíferos (Michaelson & Whittaker, 1963; Zieher & De Robertis, 1963).

Dahlstroem & Fuxe (1964) foram os primeiros a mapear núcleos específicos no cérebro que continham 5-HT. Esse grupo de neurônios ficou conhecido como sistema serotoninérgico. Nessa época, 5-HT era apenas o terceiro neurotransmissor descoberto e já estava associada a uma variedade de funções do sistema nervoso central, como humor, comportamento, ciclo sono-vigília e apetite (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008).

Em paralelo, gradualmente o sistema serotoninérgico teve a sua maquinaria elucidada. A 5-HT é uma amina biogênica, semelhante a epinefrina, norepinefrina, dopamina e histamina, sendo produzida em duas etapas. Na primeira delas, o aminoácido essencial triptofano sofre hidroxilação originando o 5-hidroxitriptofano (5-

HTP), por ação da enzima triptofano hidroxilase. Na segunda etapa, o 5-HTP é descarboxilado originando a 5-HT (**Figura 3**). Estudos farmacológicos iniciais demonstraram que as reações de hidroxilação e descarboxilação ocorrem quase que instantaneamente na presença do triptofano (Clark *et al.*, 1954).



**Figura 3 - Síntese de 5HT**

Apesar de duas enzimas serem necessárias para a conversão do triptofano em 5-HT, a hidroxilação do triptofano é considerada a etapa limitante por várias razões. Além da triptofano hidroxilase apresentar  $K_M$  relativamente alto ( $3 \times 10^{-5}$  M; Tong & Kaufman, 1975), essa enzima, por outro lado, possui afinidade muito baixa

para outros aminoácidos e sua distribuição é limitada aos tecidos que contêm serotonina (Noguchi *et al.*, 1973; Tyce, 1990, Champier *et al.*, 1997). A atividade específica da triptofano hidroxilase contrasta com a ação inespecífica da triptofano descarboxilase. Esta enzima também apresenta  $K_M$  relativamente alto, entre  $8 \times 10^{-6}$  e  $8 \times 10^{-4}$  M, estando presente na maioria dos tecidos (Clark *et al.*, 1954; Tyce, 1990). Considerando-se que essa etapa não representa fator limitante na síntese de 5-HT, torna-se difícil reduzir as concentrações da 5-HT inibindo-se apenas essa enzima.

De forma interessante, a conversão do triptofano em 5-HT corresponde a apenas 5% do total do metabolismo do triptofano, o que pode ser explicado por alguns fatores: a localização da enzima triptofano hidroxilase restrita ao cérebro e células enterocromafins, e em menor extensão, em plaquetas, além da conversão enzimática do triptofano proveniente da dieta à kinurenina (um metabólito) pela triptofano pirrolase do fígado, que responde por cerca de 95% do metabolismo do triptofano (Tyce, 1990).

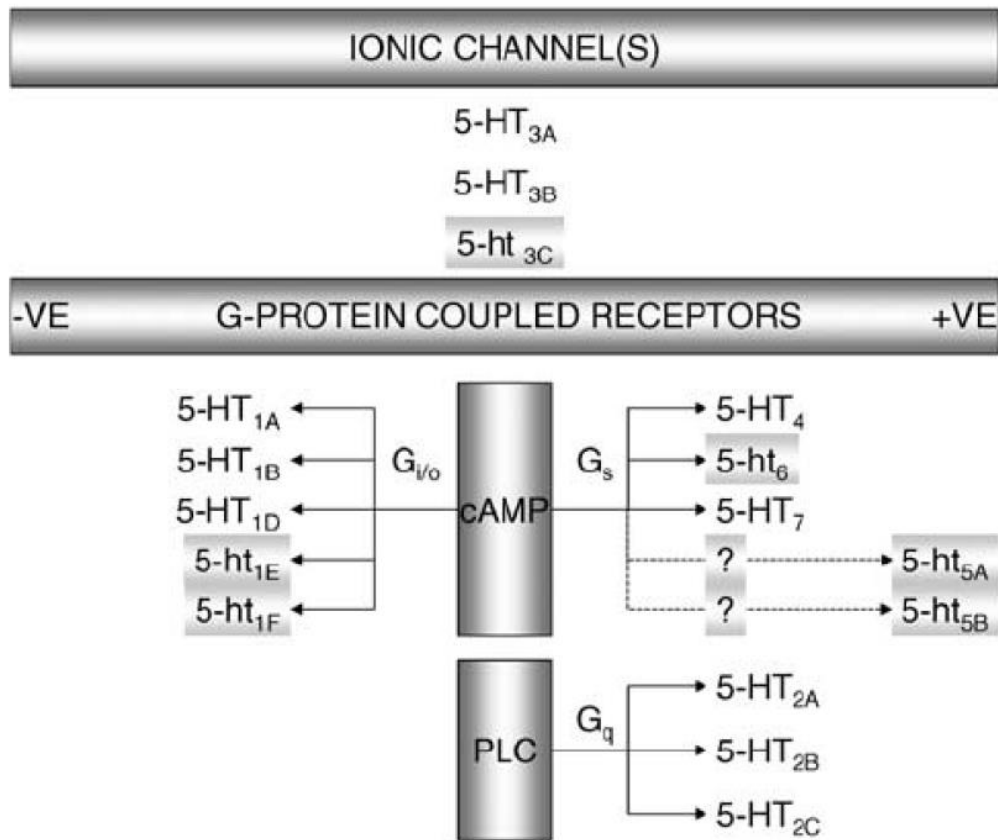
No SNC, a 5-HT é sintetizada e armazenada em neurônios localizados principalmente na ponte e no mesencéfalo. O núcleo da rafe representa o maior núcleo com fibras serotoninérgicas ascendentes que se projetam para o encéfalo e fibras descendentes que se estendem para o bulbo e medula espinhal. Um pequeno número de núcleos serotoninérgicos também está presente na formação reticular com fibras que se projetam para o bulbo (Dahlstroem & Fuxe, 1964). Fora do SNC, a síntese de 5-HT é limitada às células enterocromafins, e em menor extensão, em plaquetas. As plaquetas podem apresentar pequena capacidade de produção de 5-HT, porém representam o mais importante local de armazenamento de 5-HT fora do SNC. Os primeiros estudos já demonstraram que as plaquetas captam

rapidamente a 5-HT do plasma, deixando apenas baixas concentrações circulantes dessa substância (Toh, 1954; Hardisty & Stacey, 1955). Cerca de 90-95% da serotonina corporal está localizada em tecidos periféricos, sendo a maioria armazenada em plaquetas e células enterocromafins.

Aproximadamente 99% do total da 5-HT corpórea localiza-se na porção intracelular, o que implica em um mecanismo de fina regulação. A concentração de 5-HT nos tecidos depende das taxas de síntese, captação e metabolismo (Tyce, 1990). Os transportadores de recaptção seletiva da serotonina (SERT) reciclam a 5-HT da fenda sináptica de volta ao neurônio pré-sináptico. Quando a 5-HT retorna ao citoplasma neuronal, o neurotransmissor é transportado em vesículas através do transportador vesicular de monoaminas (VMAT) ou sofre degradação pelo sistema de monoamina oxidase (MAO), representando a primeira via metabólica para a 5-HT (Mcisaac & Page, 1959). Essa enzima é ubíqua e existe em duas isoformas, MAO-A e MAO-B, sendo a 5-HT inativada principalmente pela isoforma A (Sandler *et al.*, 1981), formando o ácido 5-hidroxiacético (5-HIAA) que é excretado na urina.

Os efeitos induzidos pela 5-HT resultam de sua interação com receptores pertencentes a sete famílias, divididos em pelo menos quatorze subtipos, que apresentam ampla distribuição no sistema nervoso central e periférico, bem como em vários outros tecidos (Hoyer *et al.*, 1994 e 2002). Estruturalmente, todos os receptores serotoninérgicos são acoplados à proteína G (metabotrópicos) e possuem sete domínios transmembrana, com exceção dos receptores 5-HT<sub>3</sub>, que são ionotrópicos (Zeitz *et al.*, 2002). A **Figura 4** e a **Tabela 1** contêm informações sobre o mecanismo de transdução e a distribuição tecidual dos principais receptores de 5-HT.

Canais iônicos e receptores acoplados à proteína G



**Figura 4 - Classificação, subtipos e mecanismos de transdução dos receptores de 5-HT.** Em letras minúsculas, receptores cujo papel ainda não foi completamente estabelecido. *AMPc*: monofosfato de adenosina cíclico; *PLC*: fosfolipase C; +VE: acoplamento positivo; -VE: acoplamento negativo. Adaptado de Hoyer *et al.*, 2002.

Tabela 1 - Distribuição tecidual dos principais receptores de 5-HT

Receptores	Distribuição tecidual
5-HT <sub>1A</sub>	Cérebro, corno dorsal da medula espinhal, gânglio superior cervical, rins
5-HT <sub>1B</sub>	SNC, DRG, gânglio trigêmeo, timo, baço, linfócitos, SCV
5-HT <sub>1D</sub>	DRG, corno dorsal da medula espinhal, gânglio superior cervical, gânglio trigêmeo
5-HT <sub>1F</sub>	Cérebro, útero, mesentério, coração, gânglio trigêmeo, timo, linfócitos
5-HT <sub>2A</sub>	DRG, corno dorsal da medula espinhal, gânglio superior cervical, cérebro, coração, timo, baço, linfócitos
5-HT <sub>2B</sub>	Timo, baço, linfócitos, útero, traqueia, estômago, rins
5-HT <sub>2C</sub>	SNC, DRG, linfócitos
5-HT <sub>3</sub>	SNC, DRG, corno dorsal da medula espinhal, gânglio trigêmeo, bexiga
5-HT <sub>4</sub>	Cérebro, coração, intestino, plexo mioentérico
5-HT <sub>6</sub>	Cérebro, gânglio superior cervical, timo, baço, linfócitos
5-HT <sub>7</sub>	Cérebro, DRG, gânglio superior cervical, gânglio trigêmeo, timo, baço, linfócitos, coração

Tabela adaptada de Nascimento 2011

### 1.3 Serotonina no contexto nociceptivo e antinociceptivo

Receptores serotoninérgicos são expressos em fibras aferentes primárias, neurônios de projeção e interneurônios, o que torna a ação da 5-HT bastante complexa.

Vários estudos têm contribuído para elucidar o papel pró-nociceptivo da 5-HT. Esta, quando administrada periféricamente, induz dor em humanos (Jensen *et al.*, 1990), além de dor e edema de pata em ratos (Sufka *et al.*, 1992; Taiwo & Levine, 1992; Cole *et al.*, 1995). Além disso, a 5-HT endógena, produzida *in loco*, está envolvida na resposta nociceptiva induzida pela injeção subcutânea de formaldeído na pata de ratos (Doak & Sawynok, 1997; Parada *et al.*, 2001). Parada *et al.* (2001) demonstraram que o composto 48/80 (um indutor de desgranulação de mastócitos) induz resposta nociceptiva e que cromoglicato (um inibidor da desgranulação de mastócitos) inibe a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído em ratos. Diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos estão associados à resposta nociceptiva induzida por 5-HT, tendo sido demonstrado que a administração i.pl. de metisergida, cetanserina ou ondansetrona (antagonistas 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, respectivamente) atenuam a resposta nociceptiva induzida pela injeção local de 5-HT (Sufka *et al.*, 1992; Taiwo & Levine, 1992; Tokunaga *et al.*, 1998). Outros estudos também indicam o envolvimento de receptores 5-HT<sub>3</sub> no processamento nociceptivo periférico, uma vez que antagonistas seletivos desses receptores inibem a resposta nociceptiva induzida por formalina ou por outros estímulos inflamatórios em ratos (Giordano & Rogers, 1989; Okamoto *et al.*, 2004).

Por outro lado, neurônios serotoninérgicos estão presentes na medula rostroventral e no núcleo magno da rafe, de onde se projetam para a medula



espinhal formando sinapses nas lâminas I, II, IV e V, fazendo parte do sistema da via inibitória descendente (Millan, 2002). Estudos conduzidos por Reynolds (1969) já mostravam que a liberação de 5-HT no corno dorsal da medula espinhal induzida pela estimulação da substância cinzenta periaquedutal causava ativação de interneurônios inibitórios, resultando em inibição dos neurônios espinhais (Peng *et al.*, 1996). Nesses locais, a 5-HT, ativa receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> em interneurônios inibitórios, inibindo o corno dorsal da medula espinhal por mecanismos dependentes da liberação de opioides (Peng *et al.*, 1996).

### **1.4 Serotonina e sua interação com outros sistemas analgésicos**

Além da clássica interação serotoninérgica e opioidérgica na via descendente analgésica (Peng *et al.*, 1996) outros trabalhos também reforçam a relação entre estes sistemas.

Taber & Latranyi (1981) mostraram uma relação entre os opioides e a ação da 5-HT, em que a depleção central de serotonina bloqueou o efeito antinociceptivo de agonistas opioides assim como os analgésicos não opioides. Neste trabalho foi avaliada a ação da p-clorofenilalanina (PCPA), um inibidor da síntese de 5-HT, frente aos efeitos antinociceptivos de três classes de analgésicos: agonista opioide (morfina), agonista-antagonista opioide (pentazocina) e anti-inflamatório não-esteroidal (aspirina e clonixina) avaliados no teste de retirada de pata de rato. O efeito analgésico de doses equivalentes para cada uma dessas drogas foi abolido 48 horas após a administração de PCPA (300 ou 150 mg/kg i.p.). PCPA não alterou a atividade antiedematogênica da clonixina e bloqueou o aumento do tempo de reação induzido pela morfina à pressão aplicada a pata não inflamada

na mesma extensão da pata inflamada. O 5-hidroxitriptofano (5-HTP, 80mg/kg i.p.), precursor da serotonina, restaurou a atividade antinociceptiva de todas as drogas.

Em trabalhos conduzidos por Kimura e colaboradores (2014), foi demonstrado que a administração sistêmica de morfina aumenta a liberação de 5-HT no corno dorsal da medula através de ativação dos neurônios serotoninérgicos na medula ventromedial rostral.

Em se tratando de canabinoides, vários trabalhos demonstram a interação dos sistemas canabinoidérgico e serotoninérgico na modulação da dor.

Mallet *et al.*, (2008) propõe que analgesia induzida por acetaminofeno, um anti-inflamatório não esteroide, tem a participação indireta de receptores CB<sub>1</sub> na formação do seu metabolito ativo (AM404), e posterior envolvimento de receptores serotoninérgicos espinhais supressores de dor. Foi sugerido que o AM40 é capaz de reforçar a atividade do sistema endocanabinoide através da inibição de recaptação de anandamida ou pela redução da sua degradação (por inibição da FAAH). Além disso, foi demonstrado que o efeito antinociceptivo induzido por um agonista do receptor CB<sub>1</sub> (ACEA) dependia de que vias serotoninérgicas descendentes bulbospinal estivessem intactas.

Rácz *et al.*, (2008) mostraram que a analgesia induzida por canabinoides em ratos deficientes de receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, foi completamente bloqueada por ondansetrona, um antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>3</sub>.

E semelhante ao que acontece com o sistema opioide, trabalhos conduzidos por Seyrek *et al.*, (2010) e Dogrul *et al.*, (2012) sugerem que canabinoides administrados por via sistêmica exercem efeito antinociceptivo mediado por receptores CB<sub>1</sub> por ativação de vias descendentes serotoninérgicas.

Em relação à interação entre os sistemas serotoninérgico e nitrérgico, Charion *et al.*, (2007) demonstraram que a interação física entre o transportador de serotonina (SERT) e a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) leva à modulação recíproca de atividades, onde a nNOS reduz a atividade de SERT *in vivo* e que a captação de 5-HT estimula a atividade da nNOS.

Miller & Hoffman (1994) demonstraram que a ativação de um receptor de adenosina A<sub>3</sub> resulta em aumento da captação de 5-HT em células de ratos com leucemia basofílica (RBL 2H3), e que esse aumento é bloqueado por inibidores de NOS e por um inibidor de quinase dependente de GMPc, sugerindo que aumento do transporte ocorre por meio da geração de NO e aumento dos níveis de GMPc.

Em relação à interação entre o sistema serotoninérgico e canais para potássio, Robles *et al.*, (1996) demonstram que o efeito antinociceptivo central de vários agonistas do receptor 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT, buspirona, lesopitron e tandospirona) foi inibido pelas sulfoniluréias gliquidona e glipizide.

Em outro trabalho, Hajhashemi & Amin (2011) demonstraram que o pré-tratamento com glibenclamida reverteu parcialmente os efeitos antinociceptivos da fluvoxamina (inibidor seletivo da recaptção de serotonina) e amitriptilina (inibidor não seletivo da recaptção de monoaminas), sugerindo que K<sub>ATP</sub> (canais para potássio dependentes de ATP) têm um papel importante na atividade analgésica dessas drogas.

## *2 Justificativa*

## 2. JUSTIFICATIVA

O papel da 5-HT na nocicepção pode variar de acordo com os subtipos de receptores ativados. Esta, quando administrada periféricamente, induz dor em humanos (Jensen *et al.*, 1990) e em ratos por ativação dos receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> (Sufka *et al.*, 1992; Taiwo & Levine, 1992). Além disso, a 5-HT endógena, produzida *in loco*, está envolvida na resposta nociceptiva induzida pela inflamação por formalina na pata de ratos (Parada *et al.*, 2001), possivelmente através dos receptores 5-HT<sub>3</sub> (Giordano & Rogers, 1989; Okamoto *et al.*, 2004). Por outro lado, estudos conduzidos a partir de 1969 já mostravam que a liberação de 5-HT no corno dorsal da medula espinhal induzida pela estimulação da substância cinzenta periaquedutal causava ativação de interneurônios inibitórios, resultando em inibição dos neurônios espinhais (Reynolds, 1969; Peng *et al.*, 1996). Nesses locais, a 5-HT, ativa receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> em interneurônios inibitórios por mecanismos dependentes de opioides (Peng *et al.*, 1996).

*3 Objetivos*

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Verificar a possibilidade da serotonina provocar efeito antinociceptivo após administração periférica e eventuais mecanismos envolvidos neste evento.

### 3.2 Objetivos específicos

- Investigar se a serotonina, administrada periféricamente, induz antinocicepção em modelo de hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de PGE<sub>2</sub>, no modelo de retirada da pata de camundongo submetida à compressão, bem como a seletividade dos receptores serotoninérgicos envolvidos neste evento.
- Investigar se há a participação da via opioidérgica no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pela serotonina.
- Investigar se há a participação da via canabinoidérgica no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pela serotonina.
- Investigar se há a participação da via L-arginina/NO/GMPc no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pela serotonina.
- Investigar se há a participação dos canais para potássio no mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pela serotonina.

## *4 Materiais e Métodos*



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 30 e 40 g. provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (Cebio-ICB/UFMG). Esses foram alojados em caixas plásticas de dimensões 30x16x12 centímetros (4/caixas) com cama de forragem, tendo livre acesso à ração e água. Permaneceram em ambiente com temperatura controlada (23 a 25°C), em regime claro-escuro de 12 horas. Após os procedimentos experimentais os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal do agente anestésico geral uretana em concentração de 25% na dose de 5 ml/Kg. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o Protocolo nº 50/2013. **(Anexo I)**.

### 4.2 Drogas e Solventes

#### 4.2.1 Agente hiperalgésico

- Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, Sigma, EUA) mantida em freezer, em solução estoque, dissolvida em etanol. Antes das injeções, a PGE<sub>2</sub> foi diluída em solução salina (0,9% de NaCl), obtendo-se a concentração de etanol 2% em salina.

#### 4.2.2 Substância sob teste

- Serotonina (Cloridrato, Sigma), dissolvida em salina, mantida no freezer em solução estoque.

#### 4.2.3 Fármacos envolvidos na via serotoninérgica

– Isamoltano (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1B</sub>, dissolvido em salina;

- BRL 15572 (Sigma), antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>1D</sub>, dissolvido em solução de DMSO 4% em salina;
- Cetanserina (Biotrend, Suíça), antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, dissolvido em salina;
- Ondansetrona (Cristália, Brasil), antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>3</sub>, dissolvido em salina;
- SB-269970 (Sigma), antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>7</sub>, dissolvido em salina.

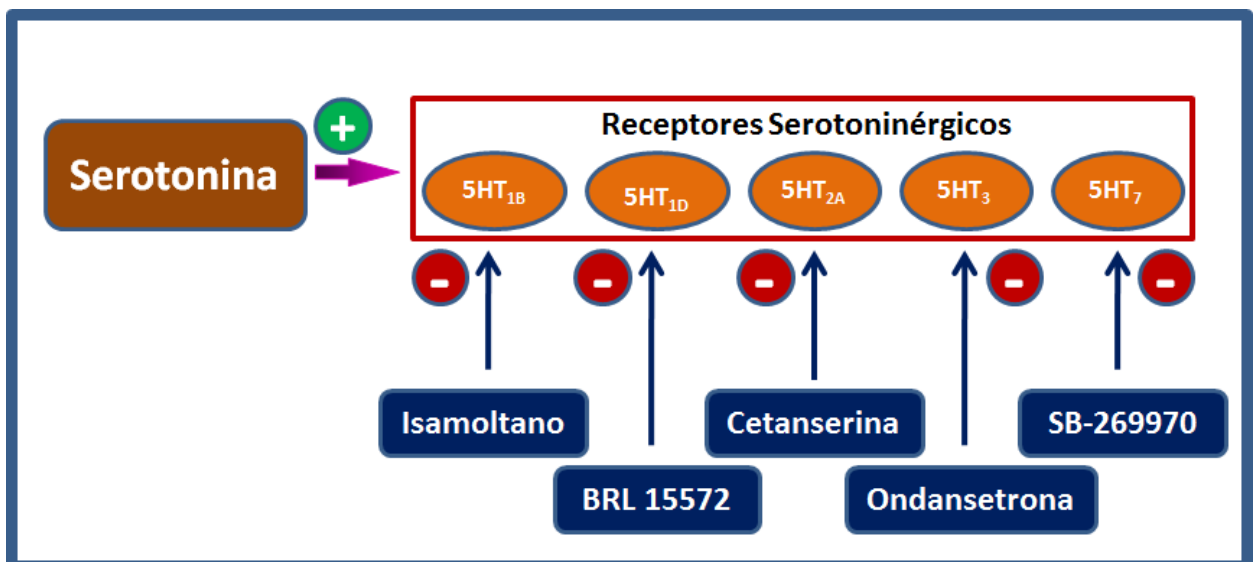


Figura 5 – Mecanismo de ação de fármacos que interagem com o sistema serotoninérgico

#### 4.2.4 Fármacos envolvidos na via opioidérgica

- Naloxona (Sigma, EUA), antagonista não seletivo de receptores opioides, dissolvida em salina.
- Clocinnamox (Tocris), antagonista seletivo dos receptores  $\mu$  opioides, dissolvido em salina.
- Naltrindole (Tocris), antagonista seletivo dos receptores  $\delta$  opioides, dissolvido em salina.

- Nor-binaltorfimina (Tocris), antagonista seletivo dos receptores  $\kappa$  opioides, dissolvida em salina.
- Bestatina (Tocris), inibidor da enzima amino peptidase N, enzima que degrada peptídeos opioides endógenos, dissolvida em salina.

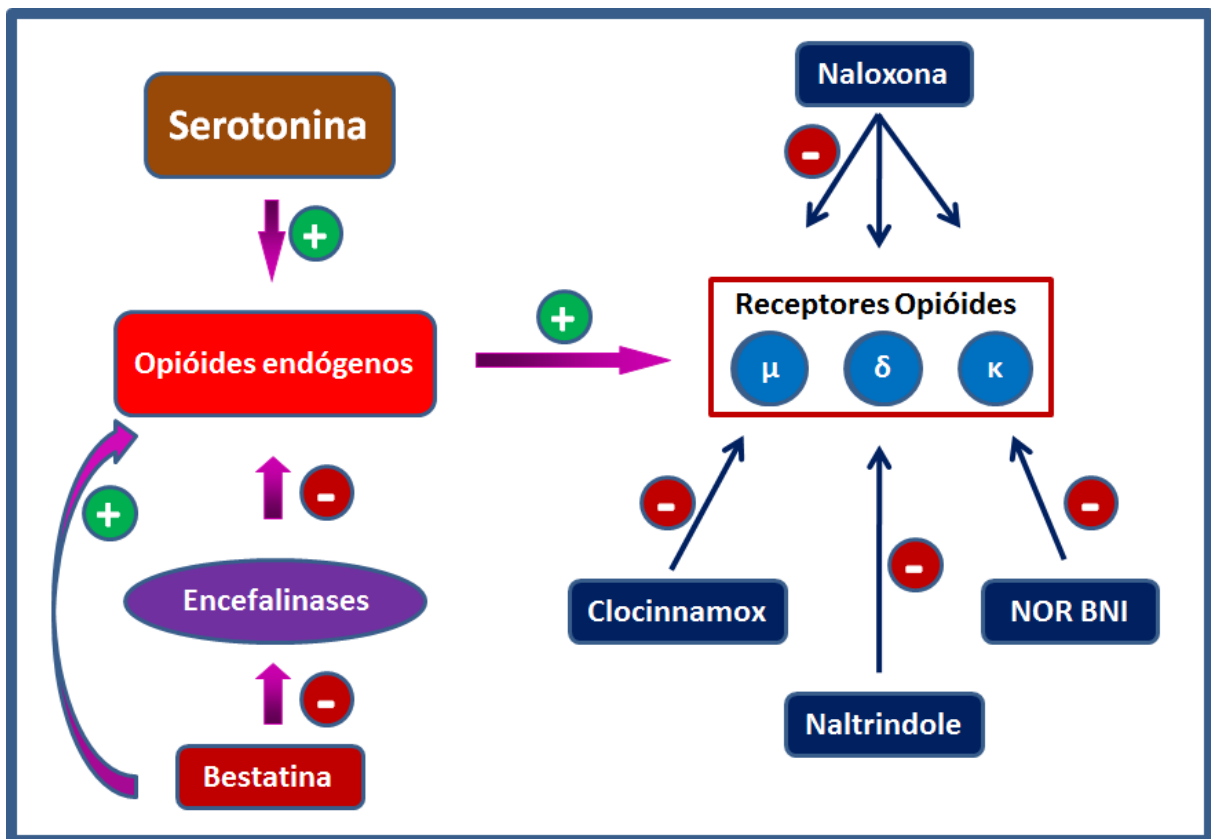


Figura 6 – Mecanismo de ação de fármacos que interagem com o sistema opioide.

#### 4.2.5. Fármacos envolvidos na via canabinoide

- AM251 [1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-(1-piperidil) pirazol-3 carboxamida] (Tocris), antagonista seletivo dos receptores  $CB_1$  canabinoides, dissolvido em DMSO 10% em salina.

- AM630 [6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil) etil]-1*H*-indol-3 il] (4metoxifenil) metanona (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores CB<sub>2</sub> canabinoides, dissolvido em DMSO 10% em salina.
- MAFP (metil araquidonil fluorofosfonato) (ácido (5*Z*, 8*Z*, 11*Z*, 14*Z*)-eicosatetraenil-fosfonofluorídrico metil ester) (Tocris), inibidor da enzima ácido graxo amida hidrolase (*FAAH*, *fatty acid amide hydrolase*), dissolvido em etanol 3%.
- VDM11 [(5*Z*, 8*Z*, 11*Z*, 14*Z*)-*N*-(4-Hidroxi-2-metilfenil)-5, 8, 11,14-eicosatetraenamida] (Tocris), inibidor do transportador de anandamida, dissolvido em tocris solve 10%.
- JZL184 (ácido 4-[Bis (1,3-benzodioxil-5-il) hidroximetil]-1-piperidinocarboxílico 4-nitrofenil éster) (Tocris), inibidor da enzima monoacilglicerol lipase (*MAGL*), dissolvido em salina.

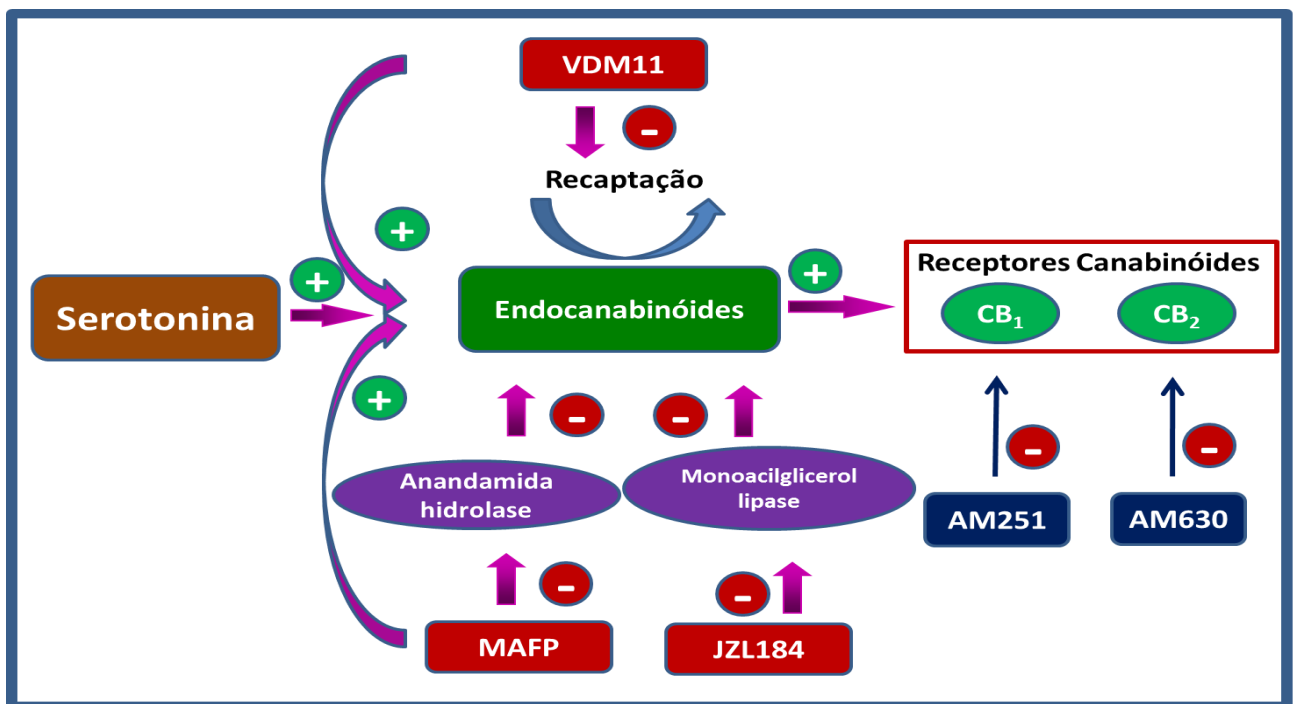


Figura 7 – Mecanismo de ação de fármacos que interagem com o sistema canabinoide.

**4.2.6. Fármacos envolvidos na via L-arginina/NO/GMPc**

- L-NOArg ( $N^G$ -Nitro-L-arginina) (RBI, EUA), inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase (NOS), dissolvido em salina.
- L-NPA ( $N^W$ -Propil-L-arginina) (Sigma, EUA), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), dissolvido em salina.
- L-NIO (Dihidrocloridrato de  $N^5$ -(1-Iminoetil)-L-ornitina) (Sigma), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), dissolvido em salina.
- L-NIL (hidrocloridrato de  $N^6$ -(1-Iminoetil)-L-lisina) (Sigma), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), dissolvido em salina.
- ODQ (1*H*-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-*a*]quinoxalina-1-ona) (RBI), inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase solúvel, dissolvido em DMSO 10% em salina.

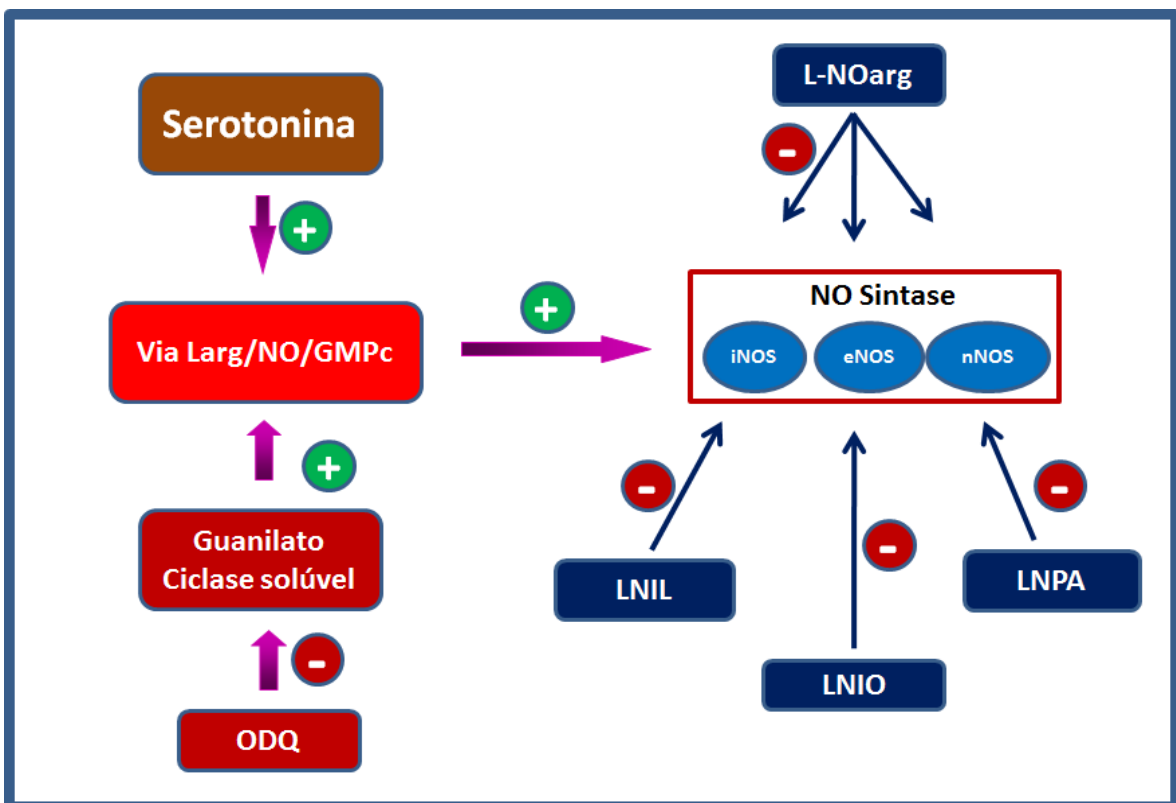


Figura 8 – Mecanismo de ação de fármacos que interagem com o sistema nitrérgico.

#### 4.2.7 Fármacos envolvidos nos testes com canais para potássio

- Glibenclamida (Sigma), bloqueador seletivo dos canais para  $K^+$  sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ), dissolvida em Tween 20 1% em salina.
- Tetraetilamônio (Sigma), bloqueador seletivo dos canais para  $K^+$  dependentes de voltagem ( $K_V$ ), dissolvido em solução salina.
- Cloreto de dequalínio (Santa Cruz, EUA), bloqueador seletivo dos canais para  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de baixa condutância ( $K_{Ca}$ ), dissolvido em salina.
- Paxilina (Sigma), bloqueador seletivo dos canais para  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de alta condutância ( $K_{Ca}$ ), dissolvida em salina.

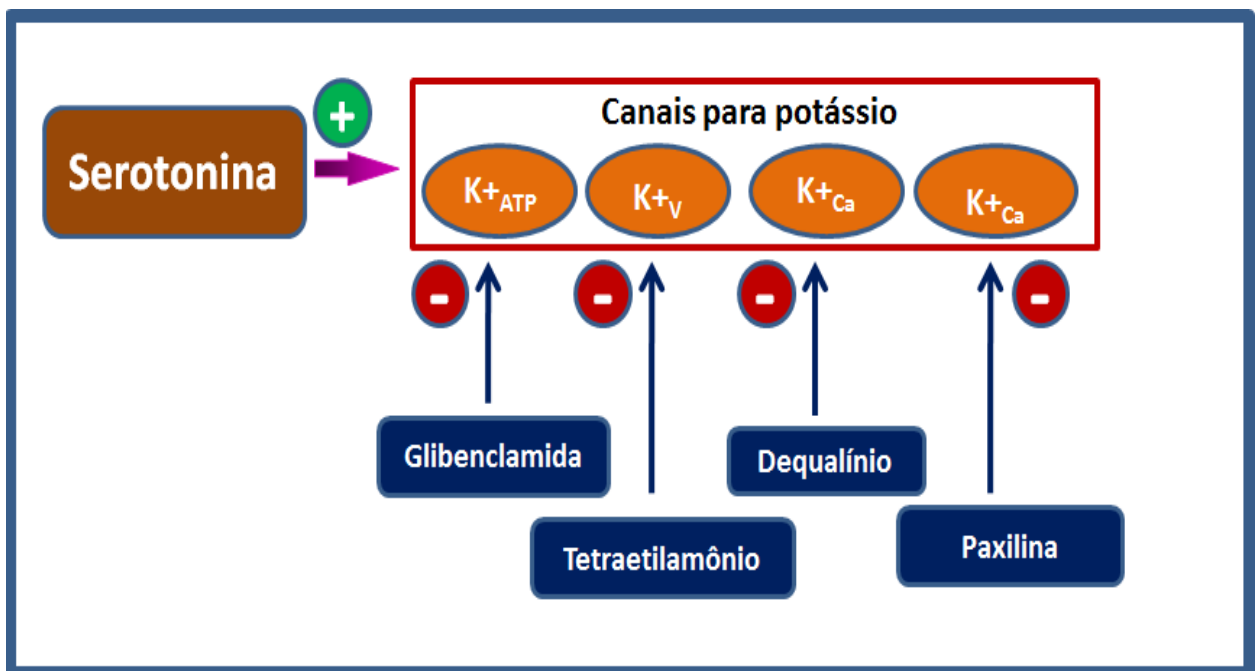


Figura 9 – Mecanismo de ação de fármacos que interagem com os canais para potássio.

#### 4.2.7. Administração das drogas

Todas as drogas foram administradas por via subcutânea na superfície plantar (via intraplantar) da pata posterior de camundongos num volume de 20  $\mu$ L

**(Figura 10).** A pata posterior direita foi utilizada em todos os experimentos, exceto para o teste de exclusão de um possível efeito sistêmico, para o qual a PGE<sub>2</sub> foi injetada em ambas as patas posteriores.



**Figura 10 - Administração de drogas pela via intraplantar.**

### 4.3 Teste da retirada de pata

O método de retirada da pata submetida à compressão, descrito originalmente por Randall e Selitto (1957) e adaptado para camundongos por Kawabata *et al.* (1992) foi utilizado para a mensuração da hiperalgesia periférica em camundongo **(Figura 11)**. No teste, o animal é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a pata sob teste é “apresentada”, por sua superfície plantar, à parte compressora do aparelho, que consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se coloca a pata do animal, e outra cônica, com uma área de 1,75 mm<sup>2</sup> na extremidade, por meio da qual é aplicada uma pressão na superfície plantar da pata do animal **(Figura 12)**. A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 16 g/segundo marcado na régua numerada do aparelho, mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador, necessária para induzir um reflexo de retirada de

pata do animal. Ao observar a resposta nociceptiva do animal, o experimentador desacionará o pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta à pata, sendo que o último valor, que corresponde ao limiar nociceptivo, fica indicado na escala do aparelho e expresso em gramas (g). É importante ressaltar que o animal é ambientalizado ao aparelho no dia que antecede o teste. Essa ambientalização consiste em submeter o animal à mesma situação que será vivenciada no dia do experimento. A pata do animal é submetida ao aparelho três vezes, ou até que o mesmo não manifeste mais uma reação de fuga. Esse procedimento é importante para permitir uma melhor observação da resposta nociceptiva do animal, que durante o teste deve permanecer quieto, evitando que desenvolva uma reação de fuga simplesmente devido à situação estranha imposta a ele.



**Figura 11- Camundongo submetido ao teste de retirada de pata.**





**Figura 12 - Parte compressora do aparelho (Ugo Basile, Itália) utilizado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de camundongos.**

#### **4.3.1 Medida do limiar nociceptivo, hiperalgesia 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 da administração do agente hiperalgésico. Os limiares foram sempre medidos três vezes, observando um intervalo mínimo de 10 segundos entre cada medida, sendo o resultado final a média dessas medidas.

Para avaliação de um possível efeito antinociceptivo periférico da serotonina, foi realizado o acompanhamento temporal do limiar nociceptivo dos animais, em função da sua ação sobre o efeito hiperalgésico induzido pela prostaglandina. Considerando a hiperalgesia como diminuição do limiar nociceptivo, nos demais experimentos sua intensidade foi avaliada pela diferença ( $\Delta$ ) 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 de prostaglandina (tempo em que se observa efeito máximo deste agente hiperalgésico).

Se antes ou durante o desenvolvimento da hiperalgesia induzida pela prostaglandina for administrado um fármaco com ação antinociceptiva, será verificada uma redução da intensidade de hiperalgesia, ou seja, uma diminuição do  $\Delta$  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  $\Delta$  a valores próximos àqueles obtidos quando se administra somente o agente hiperalgésico.

#### **4.4 Procedimento experimental**

As doses e os tempos de injeção das drogas utilizadas foram baseados em experimentos preliminares (pilotos) e em dados da literatura.

A serotonina ou seu veículo (salina) foi injetada dez minutos antes da terceira hora da injeção da PGE<sub>2</sub> (momento de pico da hiperalgesia por PGE<sub>2</sub>).

Os antagonistas seletivos dos receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>7</sub> (isamoltano, BRL 15572, cetanserina, ondansetrona e SB-269970, respectivamente) foram administrados 10 minutos antes da serotonina.

Os antagonistas dos receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  opioides (naloxona, clocinnamox, naltrindole e nor-binaltorfimina, respectivamente) bem como o inibidor de encefalinases (bestatina) foram administrados 30 minutos antes da serotonina.

Os antagonistas dos receptores canabinoides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (AM251 e AM630, respectivamente) bem como os inibidores da captação e degradação de

anandamida (VDM11 e MAFP, respectivamente) e o inibidor da degradação de 2-AG (JZL184) foram administrados 10 minutos antes da serotonina.

O inibidor da enzima NO-sintase (L-NOArg), os inibidores seletivos das isoformas de NO-sintase, iNOS, eNOS e nNOS (LNIL, LNIO e LNPA, respectivamente), bem como o inibidor da enzima guanilil ciclase solúvel (ODQ) foram administrados 30 minutos antes da serotonina.

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

Os protocolos de administração foram registrados nas legendas de todos os gráficos.

### **4.5 Dosagem de nitrito realizada pelo método de reação de Griess**

A dosagem de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) foi realizada usando a Reação de Griess (Green *et al.*, 1982). Esse método colorimétrico requer que o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) seja reduzido a nitrito sendo esse determinado pela Reação de Griess. A redução enzimática de nitrato para nitrito requer a enzima nitrato redutase.

A serotonina (250 ng/pata) foi administrada 10 minutos antes da terceira hora da injeção da PGE2 (2  $\mu\text{g}$ ). Após 10 minutos, os animais foram eutanasiados e o tecido da superfície plantar das patas posteriores direitas dos camundongos foi coletado. As amostras foram homogeneizadas separadamente a 4°C com auxílio de um homogeneizador de tecidos (potter) em tampão Tris-HCl 30 mM (pH 7,5) contendo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 5 mM, sacarose 250 mM, KCl

30mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2%, fenil-metilfluorido sulfóxido (PMSF) (50  $\mu$ g/ml), benzamidina 100  $\mu$ M, antipaína 50  $\mu$ M e leupetina 50  $\mu$ M. As amostras foram então centrifugadas (10.000 rpm, 15 min).

Posteriormente, 100  $\mu$ l do sobrenadante foi adicionado a uma placa de 96 poços onde foi incubado por 30 minutos à 37°C na presença de 0,2 U/mL *Aspergillus* nitrato redutase, 50 mM HEPES, 5  $\mu$ M FAD e 0.1 mM NADPH totalizando um volume de 500  $\mu$ L. Para a formação do branco foi adicionado 100  $\mu$ l de solução HEPES. Após esse período, 5  $\mu$ l de LDH (1500 U/ml) e 50  $\mu$ l de ácido pirúvico (100 mM) foram adicionados a cada poço com o intuito de oxidar a reação do NADPH. Esta oxidação do NADPH catalisada pela LDH é essencial para a redução dos nucleotídeos de piridina (NADPH à NADH) que é fortemente inibida pela Reação de Griess. Em seguida, 50  $\mu$ L da solução resultante da reação anterior foram transferidos para outra placa de 96 poços, na presença de 500  $\mu$ l de reagente de Griess (0,2% (p/v) de naftileno etilenodiamina e 2% (p/v) de sulfanilamida em 5% (v/v) de ácido fosfórico e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A concentração de nitrito nas amostras foi calculada com base em uma curva padrão com concentrações pré-determinadas de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ). A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Versamax, Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda de 543 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Os resultados de nitrito foram normalizados pela concentração de proteína analisadas pelo método descrito por Lowry (1951). A concentração de proteína nas amostras foi calculada com base em uma curva padrão com concentrações pré-determinadas de albumina.

A dosagem de nitrito foi realizada no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, do Departamento de Fisiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela

aluna de pós-doutorado Grazielle Caroline da Silva, sob orientação da professora Virgínia Soares Lemos.

### **4.6 Análise Estatística**

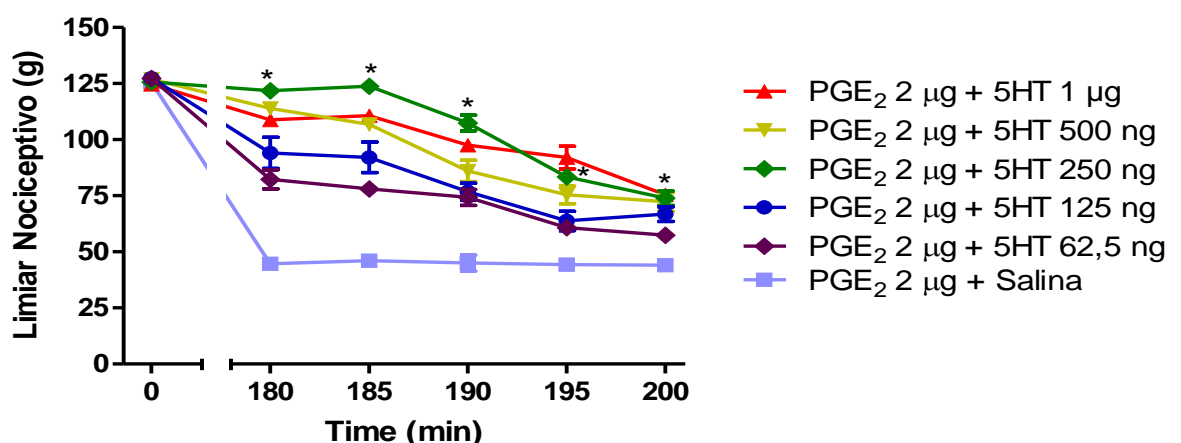
Os resultados obtidos foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Foram considerados estatisticamente significativos valores de  $P < 0.05$ . As análises estatísticas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

## *5 Resultados*

## 5. RESULTADOS

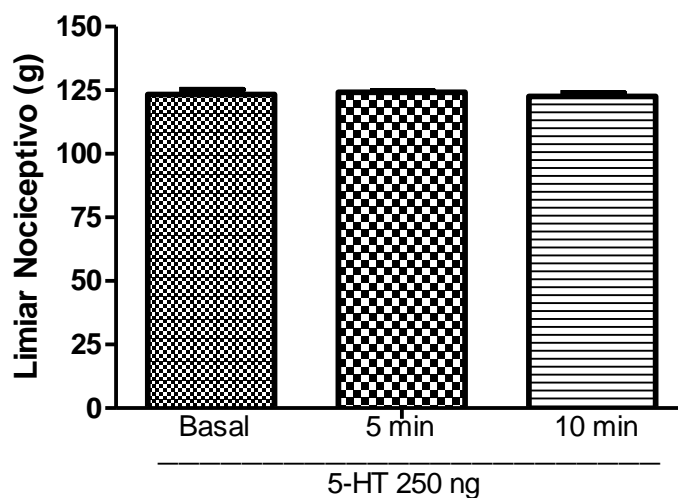
### 5.1. Efeito antinociceptivo periférico da serotonina

A fim de avaliar o possível efeito antinociceptivo periférico induzido pela serotonina, fizemos experimentos para determinar as curvas de tempo-efeito e dose resposta da antinocicepção induzida por essa amina. A administração de serotonina (62,5, 125, 250, 500 ng e 1  $\mu$ g) na pata traseira direita induziu uma resposta antinociceptiva frente à hiperalgesia induzida por injeção local de PGE<sub>2</sub> (2  $\mu$ g/pata). A dose de 250 ng produziu maior resposta antinociceptiva (**Gráfico 1**), sendo essa dose usada nos experimentos posteriores. Sabendo que o pico de ação da PGE<sub>2</sub> é de 3 horas após sua administração, e visto que o pico do efeito antinociceptivo da serotonina ocorreu 10 minutos após sua administração, a serotonina foi administrada 10 minutos antes da terceira hora após a administração de prostaglandina E<sub>2</sub>, e as medições foram feitas na terceira hora, de tal forma que, durante o momento das medições, havia um pico simultâneo do efeito de ambas as substâncias.



**Gráfico 1 - Efeito da serotonina no limiar nociceptivo em camundongos com hiperalgesia induzida por PGE<sub>2</sub>.** Serotonina ( $\mu$ g/pata) foi administrada na pata traseira direita 10 minutos antes da terceira hora da injeção local da PGE<sub>2</sub> (momento de pico da hiperalgesia por PGE<sub>2</sub>). A resposta antinociceptiva foi medida no teste de pressão da pata tal como descrito em Materiais e Métodos. Cada linha representa a média e S.E.M. referentes ao n = 4 de animais. \* indica uma diferença estatística significativa em relação à injeção de PGE<sub>2</sub> 2  $\mu$ g+ Salina como controle (P <0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

Nosso próximo passo foi avaliar se a serotonina sozinha, sem administração de qualquer substância hiperalgésica, induziria algum efeito antinociceptivo nos animais. Serotonina na dose de 250 ng foi administrada e as medições do limiar nociceptivo foram feitas 5 minutos e 10 minutos após sua administração (pico de ação da serotonina). A serotonina não induziu alteração no limiar nociceptivo, como mostra o **Gráfico 2**.

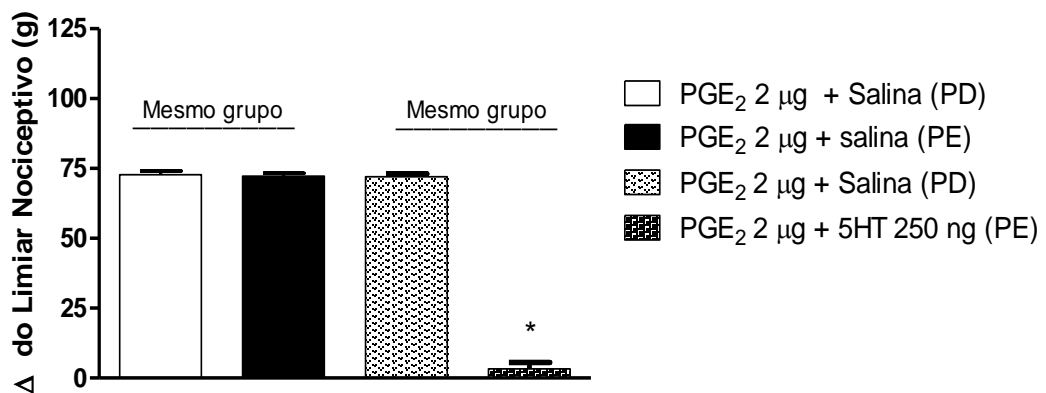


**Gráfico 2** – Efeito da serotonina quando administrada sozinha, sem qualquer agente hiperalgésico. Serotonina (250 ng) foi administrada na pata traseira direita dos animais. Cada coluna representa a média S.E.M. (n = 4).

Em seguida, para exclusão de um possível efeito sistêmico, a prostaglandina  $E_2$  foi administrada nas patas posteriores direita (PD) e esquerda (PE), e a serotonina (250 ng) foi administrada apenas na pata esquerda, e seu veículo, salina, administrada apenas na pata direita. Medições do limiar nociceptivo de ambas as patas foram feitas, antes e 180 minutos após a injeção da  $PGE_2$  e em seguida calculou-se a diferença entre as médias destas medições ( $\Delta$  do limiar nociceptivo) (**Gráfico 3**). Esses resultados demonstram que a serotonina induziu efeito antinociceptivo restrito à pata tratada, uma vez que não alterou a hiperalgesia



induzida pela PGE<sub>2</sub> na pata contralateral, sugerindo somente um efeito local, descartando um efeito sistêmico. Trabalhar com o  $\Delta$  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. Em todos os experimentos subsequentes será utilizado o valor de  $\Delta$  do limiar nociceptivo para uma melhor observação da resposta nociceptiva estudada.

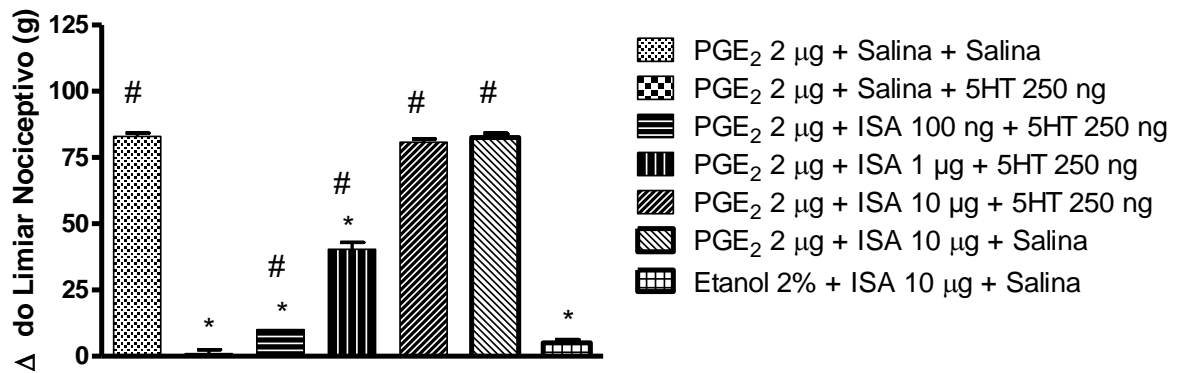


**Gráfico 3 - Exclusão do efeito antinociceptivo sistêmico da serotonina.** Serotonina (250 ng) foi administrada na pata esquerda 10 minutos antes da terceira hora de PGE<sub>2</sub> (2 µg), que foi administrada em ambas as patas traseiras. Salina, como controle da serotonina, foi administrada na pata direita dos animais. A resposta antinociceptiva foi medida, em ambas as patas. Cada coluna representa a média S.E.M. (n = 4). \* indica uma diferença estatística significativa em relação à injeção de PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina como controle (P < 0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni). PD = pata direita, PE = pata esquerda.

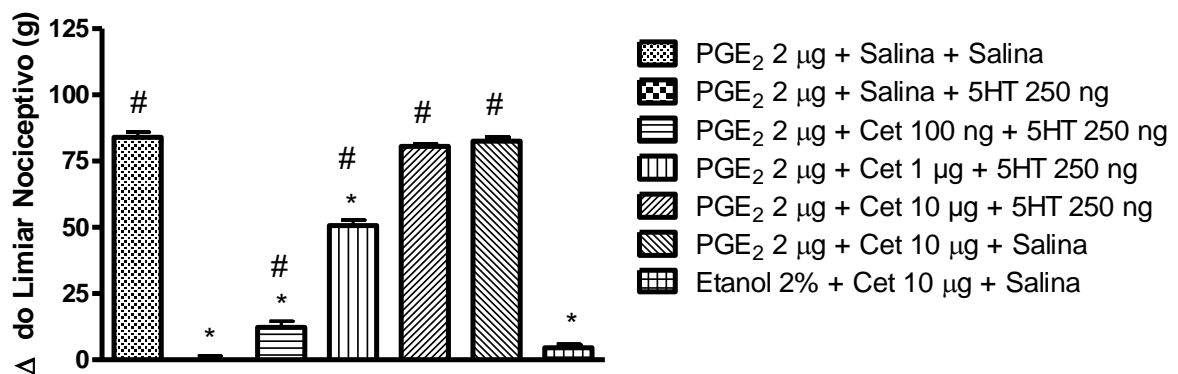
## 5.2. Efeito dos antagonistas serotoninérgicos na antinocicepção induzida por serotonina

O isamoltano (100 ng, 1 e 10 µg/pata), um antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>1B</sub>, a cetanserina (100 ng, 1 e 10 µg/pata) um antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> e a ondansetrona (100 ng, 1 e 10 µg/pata) um antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>3</sub> reverteram a antinocicepção periférica induzida pela

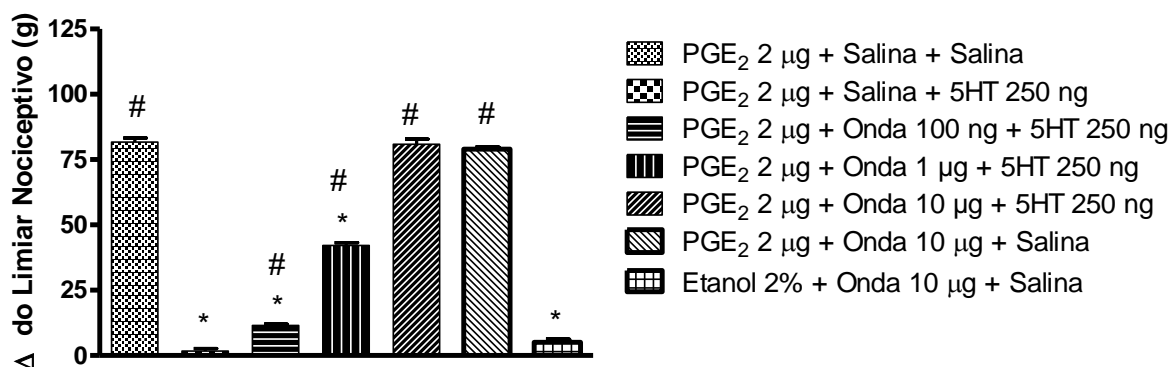
serotonina (250 µg/ pata) de maneira dose-dependente (**Gráficos 4, 5 e 6, respectivamente**).



**Gráfico 4 - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de isamoltano (ISA).** O isamoltano (µg) foi administrado 10 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. (n = 4). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + 5HT 250 ng injetadas como controles, respectivamente (P<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

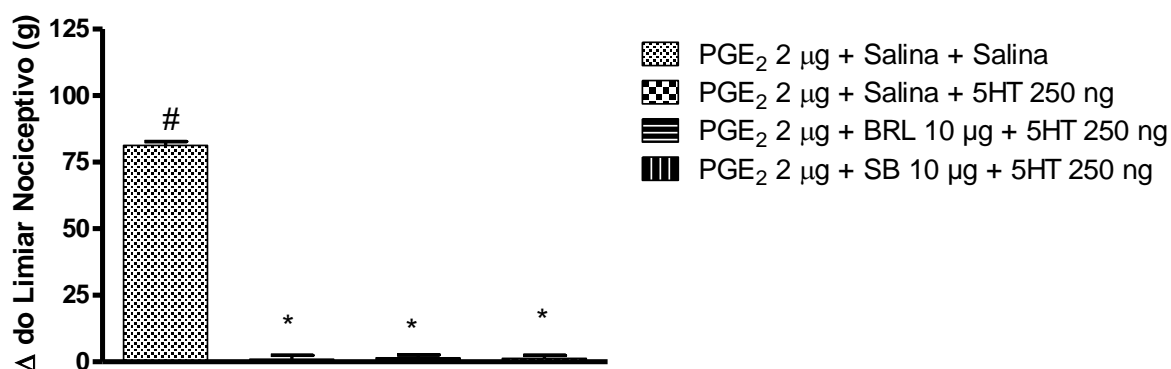


**Gráfico 5 - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de cetanserina (Cet).** A cetanserina (µg) foi administrada 10 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. (n = 4). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + 5HT 250 ng injetadas como controles, respectivamente (P<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).



**Gráfico 6 - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de ondansetrona (Onda).** A ondansetrona (µg) foi administrada 10 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. (n = 4). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + 5HT 250 ng injetadas como controles, respectivamente (P<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

Já o BRL15572 (10 µg/pata), um antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>1D</sub> e o SB-269970 (10 µg/pata), um antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>7</sub>, não revertem a antinocicepção periférica induzida pela serotonina (250 ng/pata), como mostra o **Gráfico 7**.



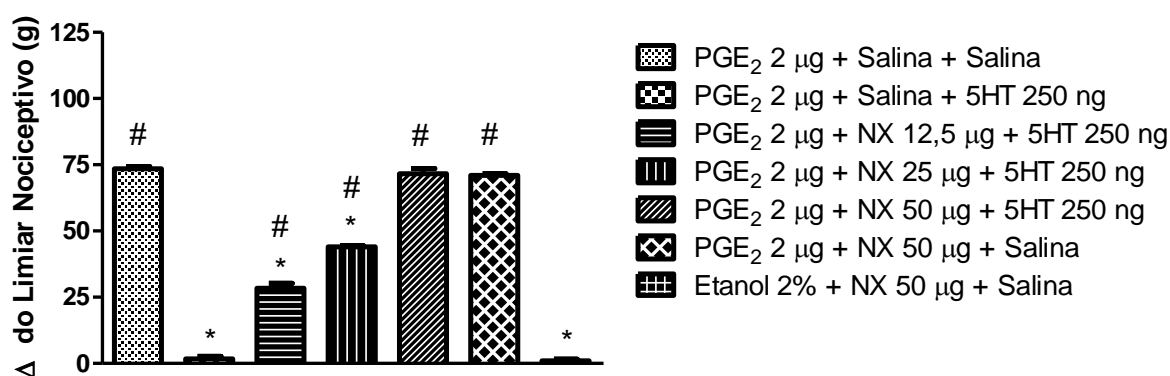
**Gráfico 7 - O efeito da administração de BRL15572 e SB-269970 sobre a antinocicepção periférica da serotonina.** As drogas (µg) foram administradas 10 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. (n = 4). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + 5HT 250 ng injetadas como controles, respectivamente (P<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

### 5.3 Avaliação da participação do sistema opioidérgico no efeito antinociceptivo periférico da serotonina

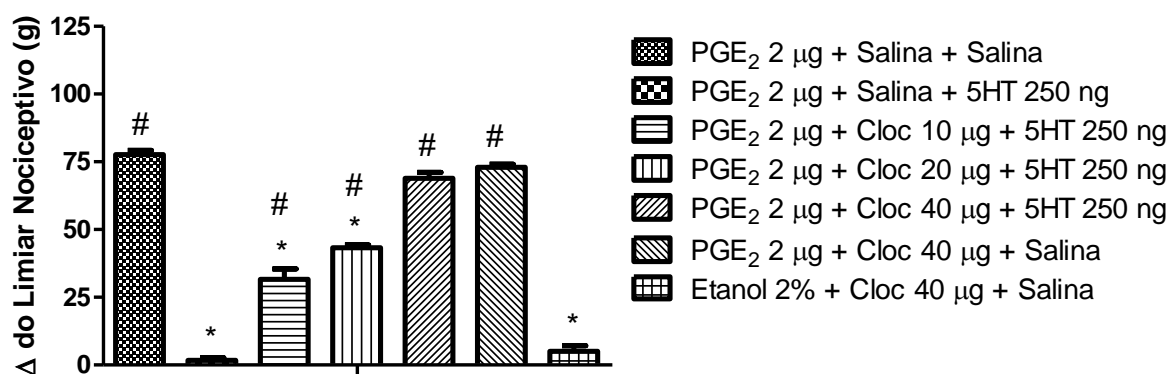
#### 5.3.1 Efeito dos antagonistas dos receptores opioidérgicos na antinocicepção induzida pela serotonina

Como mostrado no **Gráfico 8**, a naloxona (12,5, 25 e 50  $\mu\text{g/pata}$ ), um antagonista não seletivo dos receptores opioides reverteu de maneira dose-dependente a antinocicepção periférica induzida pela serotonina (250 ng/ pata).

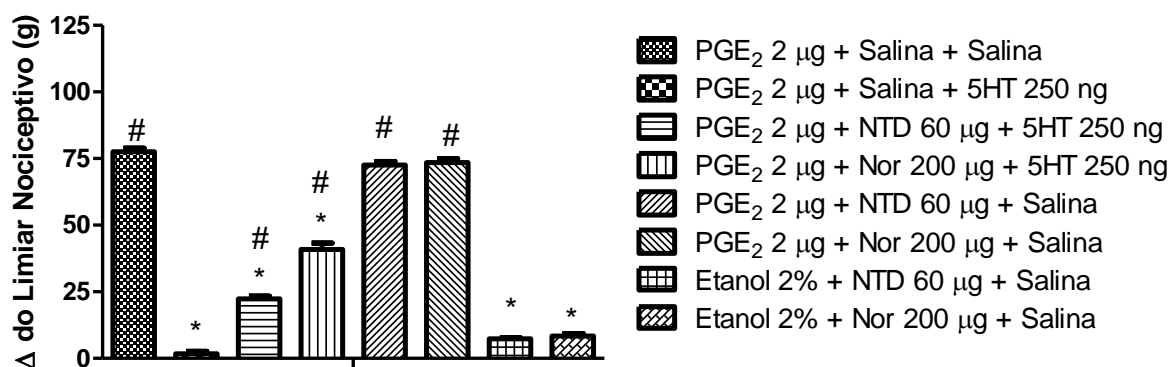
De forma semelhante (**Gráfico 9**), o clocinnamox (10, 20 e 40  $\mu\text{g/pata}$ ), um antagonista seletivo dos receptores opioides tipo  $\mu$  também reverteu de maneira dose-dependente a antinocicepção periférica induzida pela serotonina (250 ng/ pata).



**Gráfico 8 - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de naloxona (NX).** A naloxona ( $\mu\text{g}$ ) foi administrada 30 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. ( $n = 4$ ). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + Salina + 5HT 250 ng injetadas como controles, respectivamente ( $P < 0,05$ , ANOVA + pós-teste Bonferroni).



**Gráfico 9 - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de clocinnamox (CloC).** O clocinnamox (µg) foi administrado 30 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. (n = 4). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + 5HT 250 ng injetadas como controles, respectivamente (P<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).



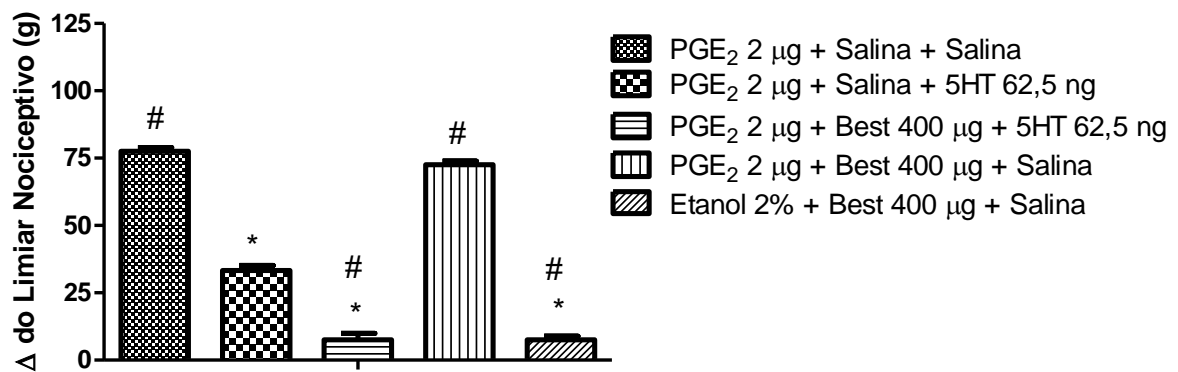
**Gráfico 10 - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de naltrindole (NTD) e nor-binaltorfimina (Nor).** As drogas (µg) foram administradas 30 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. (n = 4). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + 5HT 250 ng injetadas como controles, respectivamente (P<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

Como mostra o **Gráfico 10**, o naltrindole (60 µg/pata), um antagonista seletivo dos receptores opioides tipo δ, e a nor-binaltorfimina (200 µg/pata), um antagonista

seletivo dos receptores opioides tipo  $\kappa$ , reverteram, ambos de maneira parcial, a antinociceção periférica induzida pela serotonina (250 ng/pata).

### 5.3.2 Peptídeos opioides potencializam a antinociceção periférica induzida pela serotonina

A bestatina (400  $\mu\text{g/pata}$ ), inibidor de encefalinases que degradam peptídeos opioides (encefalinas), potencializou a antinociceção periférica induzida pela serotonina menor dose (62,5 ng/ pata) (**Gráfico 11**).

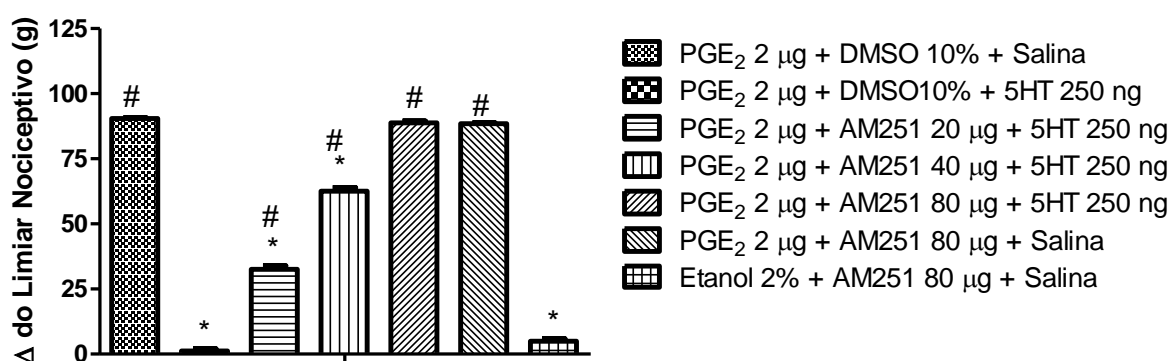


**Gráfico 11 - Administração intraplantar de bestatina (Best) potencializa o efeito antinociceptivo periférico da serotonina.** A bestatina ( $\mu\text{g}$ ) foi administrada 30 minutos antes da serotonina (62,5 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. ( $n = 4$ ). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + Salina + 5HT 62,5 ng injetadas como controles, respectivamente ( $P < 0,05$ , ANOVA + pós-teste Bonferroni).

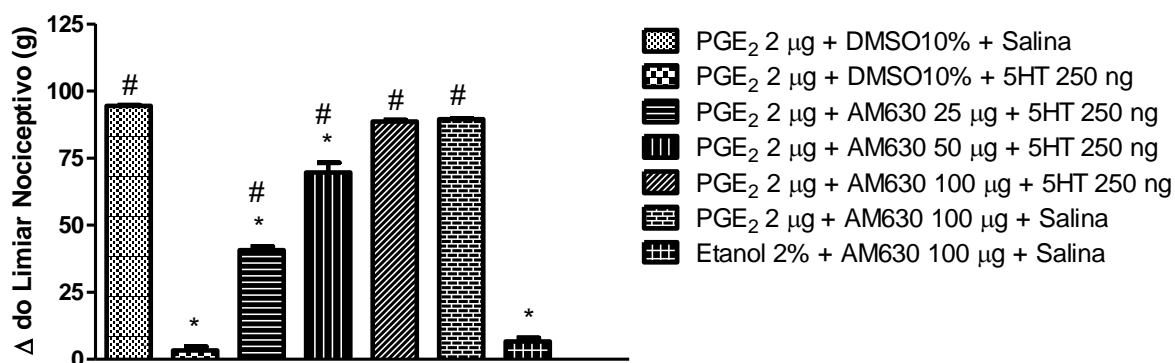
#### 5.4. Avaliação da participação do sistema canabinoidérgico no efeito antinociceptivo periférico da serotonina

##### 5.4.1. Efeito dos antagonistas canabinoides na antinocicepção induzida pela serotonina

Como mostrado nos **Gráficos 12 e 13**, o AM251 (20, 40 e 80  $\mu\text{g/pata}$ ), um antagonista seletivo dos receptores canabinoidérgicos  $\text{CB}_1$  e o AM630 (25, 50 e 100  $\mu\text{g/pata}$ ), um antagonista seletivo dos receptores canabinoidérgicos  $\text{CB}_2$ , respectivamente, reverteram dose-dependentemente a antinocicepção periférica induzida pela serotonina (250 ng/pata).



**Gráfico 12 - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de AM251.** O AM251 ( $\mu\text{g}$ ) foi administrado 10 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. ( $n = 4$ ). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + DMSO 10% + Salina e PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + DMSO 10% + 5HT 250 ng injetados como controles, respectivamente ( $P < 0,05$ , ANOVA + pós-teste Bonferroni).

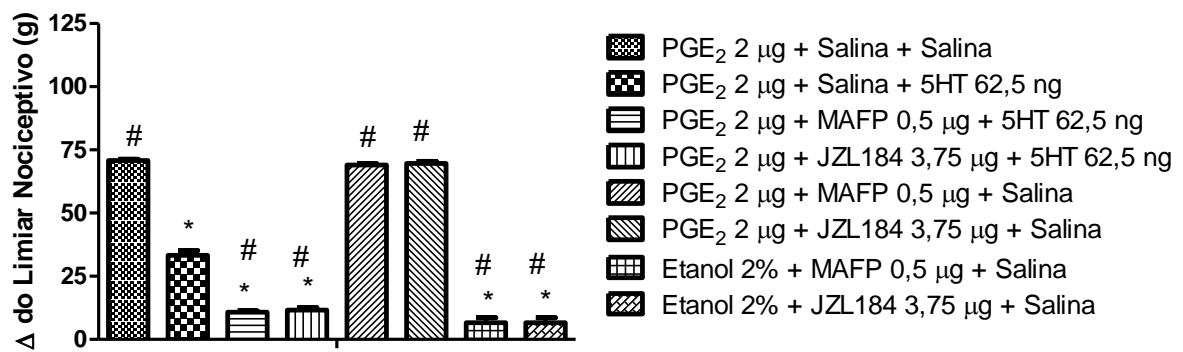


**Gráfico 13 - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de AM630.** O AM630 ( $\mu\text{g}$ ) foi administrado 10 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. ( $n = 4$ ). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + DMSO 10% + Salina e PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + DMSO 10% + 5HT 250 ng injetados como controles, respectivamente ( $P < 0,05$ , ANOVA + pós-teste Bonferroni).

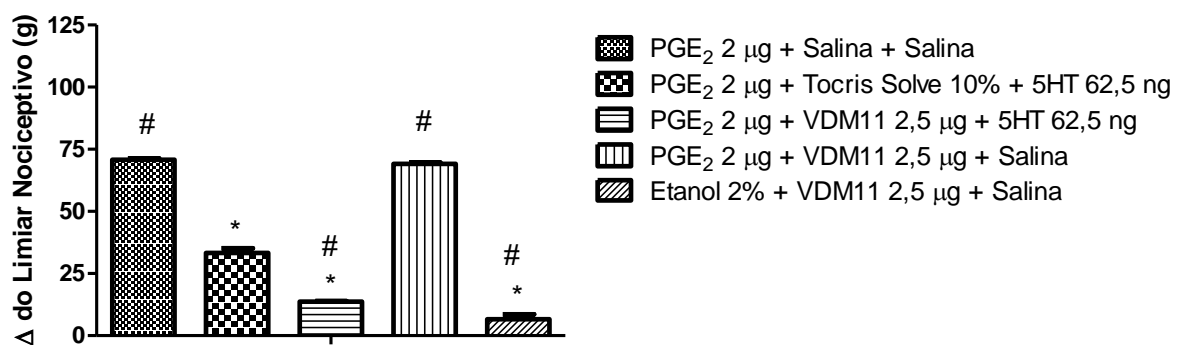
#### 5.4.2. Endocanabinóides potencializam a antinocicepção periférica induzida pela serotonina

O MAFP (0,5  $\mu\text{g/pata}$ ), um inibidor da enzima FAAH que degrada o endocanabinóide anandamida, e o JZL184 (3,75  $\mu\text{g/pata}$ ), um inibidor da enzima MAGL que degrada o endocanabinóide 2-araquidonilglicerol (2-AG), potencializaram a antinocicepção periférica induzida pela serotonina na menor dose (62,5 ng/pata), como mostra o **Gráfico 14**. Também o VDM11 (2,5  $\mu\text{g/pata}$ ), um inibidor da recaptção do endocanabinóide anandamida, potencializou a antinocicepção periférica induzida pela serotonina baixa dose (62,5 ng/pata), (**Gráfico 15**).





**Gráfico 14 - Administração intraplantar de MAFP e JZL184 potencializa o efeito antinociceptivo periférico da serotonina.** A drogas (µg) foram administradas 10 minutos antes da serotonina (62,5 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. (n = 4). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + 5HT 62,5 ng injetadas como controles, respectivamente (P<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

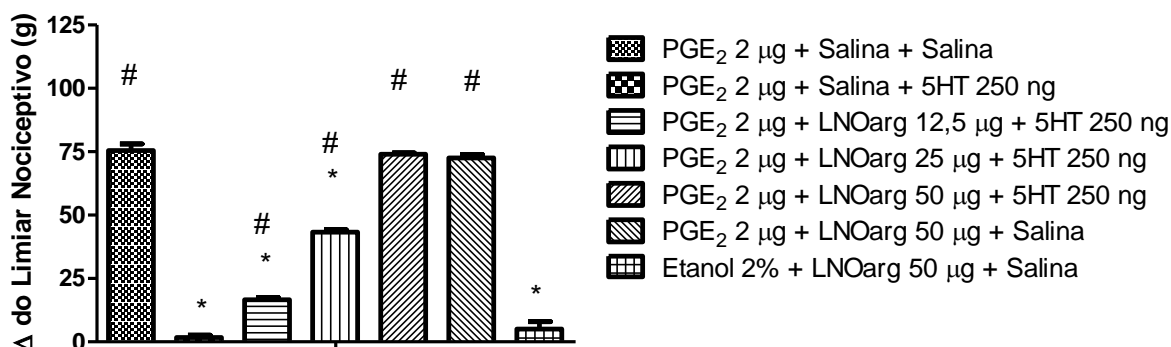


**Gráfico 15 - Administração intraplantar de VDM11 potencializa o efeito antinociceptivo periférico da serotonina.** O VDM11 (µg) foi administrado 10 minutos antes da serotonina (62,5 ng /pata). Cada coluna representa a média S.E.M. (n = 4). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2 µg + Tocris Solve 10% + 5HT 62,5 ng injetados como controles, respectivamente (P<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

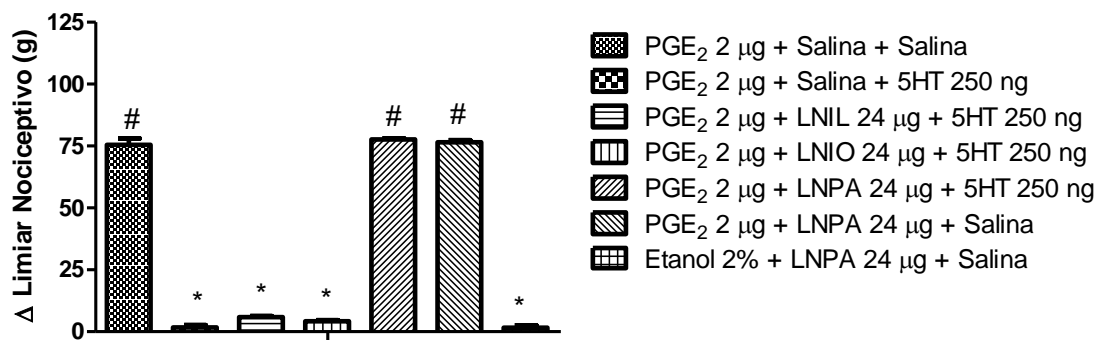
### 5.5. Avaliação da participação da via L-arginina/NO/GMPc no efeito antinociceptivo periférico da serotonina

#### 5.5.1 Efeito da inibição da enzima Óxido Nítrico Sintase

O **Gráfico 16** mostra que o L-NOarg (12,5, 25 e 50  $\mu$ g), um inibidor não seletivo da enzima NO-sintase, reverteu a antinocicepção periférica induzida pela serotonina (250 ng/pata) de maneira dose-dependente. Por outro lado, apenas o LNPA (24  $\mu$ g), um inibidor seletivo da enzima NO-sintase neuronal reverteu o efeito antinociceptivo periférico induzido pela serotonina (250 ng/pata). O mesmo não ocorreu com o uso dos inibidores seletivos da NO-sintase induzível, o LNIL (24  $\mu$ g), e NO-sintase endotelial, o LNIO (24  $\mu$ g), como mostra o **Gráfico 17**.



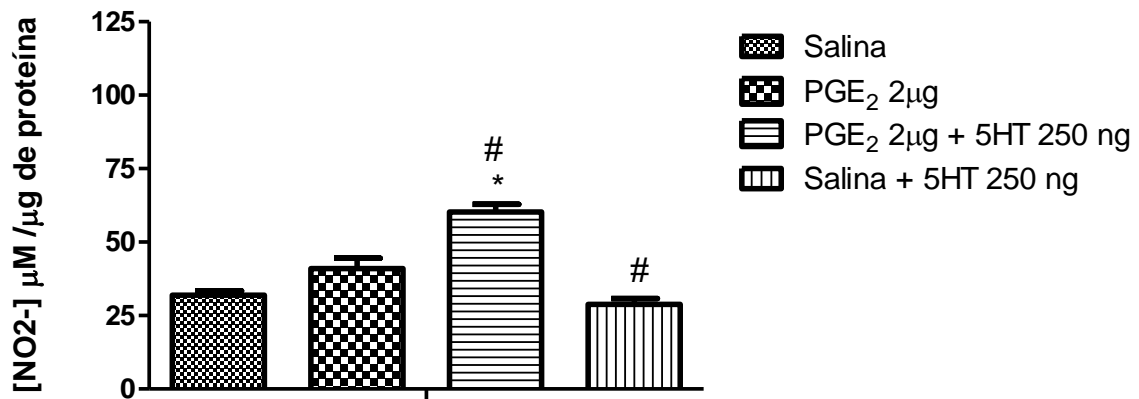
**Gráfico 16 - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de L-NOarg.** O L-NOarg ( $\mu$ g) foi administrado 30 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. (n = 4). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2  $\mu$ g + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2  $\mu$ g + Salina + 5HT 250 ng injetadas como controles, respectivamente (P<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).



**Gráfico 17 - O efeito da administração de LNIL, LNIO e LNPA sobre a antinociceção periférica da serotonina.** As drogas ( $\mu\text{g}$ ) foram administradas 30 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. ( $n = 4$ ). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + Salina + 5HT 250 ng injetadas como controles, respectivamente ( $P < 0,05$ , ANOVA + pós-teste Bonferroni).

#### 5.5.2. Mensuração dos níveis de nitrito após a injeção intraplantar de serotonina.

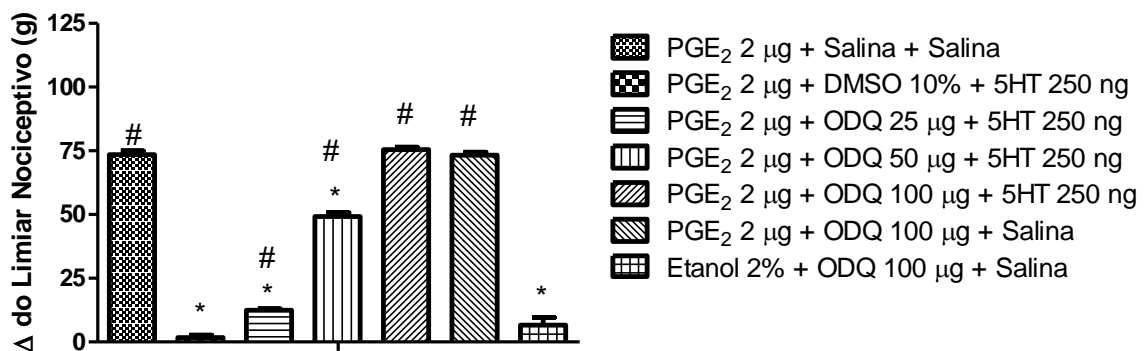
A administração intraplantar de serotonina (250 ng/pata) induziu um aumento significativo dos níveis de nitrito no homogeneizado da superfície plantar da pata de camundongos que receberam previamente PGE<sub>2</sub> em comparação com os grupos controles. Por outro lado, nem PGE<sub>2</sub> nem serotonina quando injetados sozinhos foram capazes de induzir aumento dos níveis de nitrito nas amostras analisadas (**Gráfico 18**).



**Gráfico 18 – Serotonina aumenta os níveis de nitrito na presença de PGE<sub>2</sub>.** A serotonina (250 ng/pata) foi administrada por via intraplantar 10 minutos antes do pico de ação da PGE<sub>2</sub>. Cada coluna representa a média S.E.M. (n = 8). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a salina e PGE<sub>2</sub> 2 μg, respectivamente (P<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

### 5.5.3. Efeito da inibição da enzima Guanilato Ciclase Solúvel

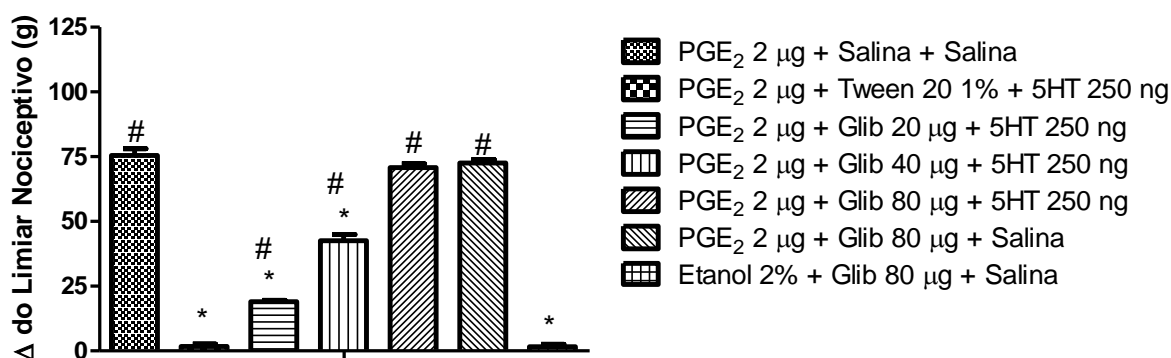
Como mostrado no **Gráfico 19**, o ODQ (25, 50 e 100 μg), um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, reverteu a antinocicepção periférica induzida pela serotonina (250 ng/pata) de maneira dose-dependente.



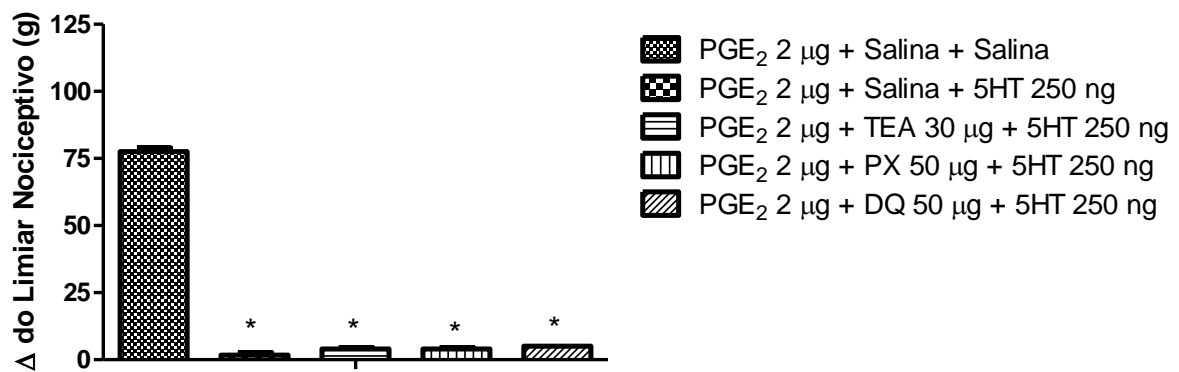
**Gráfico 19 - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de ODQ.** O ODQ (μg) foi administrado 30 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. (n = 4). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2 μg + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2 μg + DMSO 10% + 5HT 250 ng injetadas como controles, respectivamente (P<0,05, ANOVA + pós-teste Bonferroni).

### 5.6. Avaliação da participação dos canais para potássio no efeito antinociceptivo periférico da serotonina

A glibenclamida (20, 40 e 80  $\mu\text{g}$ ), um bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP, reverteu a antinociceção periférica induzida por serotonina (250 ng/ pata) de maneira dose dependente (**Gráfico 20**). Por outro lado, o tetraetilamônio (30  $\mu\text{g}$ ), um bloqueador dos canais para potássio dependente de voltagem, a paxilina (50  $\mu\text{g}$ ) e o dequalínio (50  $\mu\text{g}$ ), bloqueadores dos canais para potássio ativados por cálcio de alta e baixa condutância, respectivamente, não foram capazes de reverter a antinociceção periférica induzida pela serotonina (**Gráfico 21**).



**Gráfico 20 - O antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da serotonina pela administração intraplantar de glibenclamida.** A glibenclamida ( $\mu\text{g}$ ) foi administrada 5 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. ( $n = 4$ ). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + Tween 20 1% + 5HT 250 ng injetadas como controles, respectivamente ( $P < 0,05$ , ANOVA + pós-teste Bonferroni).



**Gráfico 21 - O efeito da administração intraplantar de tetraetilamônio (TEA), paxilina (PX) e dequalínio (DQ) sobre a antinocicepção periférica da serotonina.** O tetraetilamônio ( $\mu\text{g}$ ) foi administrado 30 antes da serotonina (250 ng/pata). A paxilina e o dequalínio ( $\mu\text{g}$ ) foram administrados 5 minutos antes da serotonina (250 ng/pata). Cada coluna representa a média S.E.M. ( $n = 4$ ). \* e # indicam uma diferença estatística significativa em relação a PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + Salina + Salina e PGE<sub>2</sub> 2  $\mu\text{g}$  + Salina + 5HT 250 ng injetadas como controles, respectivamente ( $P < 0,05$ , ANOVA + pós-teste Bonferroni).

## *6 Discussão*

## 6. DISCUSSÃO

Até o momento, estudos apontam a serotonina apenas com propriedades pró-nociceptivas ao nível periférico, ainda assim, fornecendo informações fragmentadas, não permitindo uma avaliação de forma ampla e sistemática que auxilie a elucidar o papel dessa amina biogênica, assim como de seus receptores na antinocicepção periférica (Nascimento, 2011).

Na presente série de experimentos, nós examinamos a hipótese que a serotonina, neurotransmissor de fundamental importância no contexto da antinocicepção central, também possui efeito antinociceptivo periférico em doses bem menores do que as doses normalmente usadas para induzir nocicepção. O papel da 5-HT na nocicepção pode variar de acordo com os subtipos de receptores ativados. Vários estudos têm contribuído para elucidar o papel pró-nociceptivo de 5-HT quando administrada perifericamente, em humanos (Jensen *et al.*, 1990) e em ratos por ativação dos receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> (Sufka *et al.*, 1992; Taiwo & Levine, 1992). Além disso, a 5-HT endógena, produzida *in loco*, está envolvida na resposta nociceptiva induzida pela inflamação por formalina na pata de ratos (Parada *et al.*, 2001), possivelmente através dos receptores 5-HT<sub>3</sub> (Giordano & Rogers, 1989; Okamoto *et al.*, 2004).

Em nossos experimentos, a injeção de serotonina em várias doses, surpreendentemente, se mostrou eficaz em induzir antinocicepção periférica, sendo a dose de 250 ng/pata a que induziu o efeito antinociceptivo mais intenso, portanto escolhida para os próximos experimentos. Nossos resultados mostram ainda que a serotonina quando administrada sozinha não induz qualquer alteração no limiar nociceptivo dos animais; o único efeito observado foi o aparecimento de edema nas



pata. O edema é formado após a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de líquido intersticial, e é um efeito comum encontrado em vários trabalhos que usaram administração periférica de serotonina, (Cole *et al*, 1995; Santos *et al*, 2013). A nossa estratégia de exclusão do possível efeito sistêmico da serotonina mostrou que a dose de 250 ng só induz efeito local, não havendo participação de vias centrais neste evento, contribuindo para a sustentação da hipótese sobre os mecanismos de ação periférica proposta para a serotonina neste trabalho.

Salientamos que a dose mais eficaz para induzir antinocicepção (250 ng), em nosso modelo, foi 40 vezes menor que a dose requerida para induzir efeito hiperalgésico máximo (10 µg) na pata de ratos, como observado por Nascimento, (2011), em modelos experimentais similares. Assim sendo, uma dose de serotonina bem abaixo da necessária para induzir dor em animais pode estar, contrariamente, induzindo antinocicepção periférica por mecanismos ainda não descritos.

Neste estudo, utilizamos como agente hiperalgésico a injeção intraplantar de prostaglandina E<sub>2</sub>. Estudos propõem que, através do aumento da concentração de AMPc e ativação das proteínas quinases A (PKA) e C (PKC), a PGE<sub>2</sub> 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 (Vanegas e Schaible, 2001; Kassuya *et al.*, 2007; Sacks *et al.*, 2009). De fato, estudos mostram que a PGE<sub>2</sub> é capaz de sensibilizar diretamente neurônios aferentes primários a estímulos químicos, térmicos e mecânicos (Ferreira, 1972; Ferreira e Nakamura, 1978; 1979), sem requerer a participação de células intermediárias (Kawabata, 2011), tendo por isso a

vantagem sobre outros métodos de hiperalgesia, como a carragenina, por eliminar 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 PGE<sub>2</sub> na dose de 2 µg/pata (Soares & Duarte, 2001; Pacheco & Duarte, 2005; Alves *et al.*, 2012).

Ao nível periférico, o gânglio da raiz dorsal comumente expressa os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>7</sub> (Wu *et al.* 2001, Liu *et al.* 2005). Avaliando os nossos resultados sobre a seletividade dos receptores da serotonina envolvidos no evento analgésico na periferia, verificamos que isamoltano, cetanserina e a ondansetrona (antagonistas seletivos dos receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, respectivamente) reverteram o efeito antinociceptivo periférico induzido por 5HT de maneira dose-dependente, sugerindo a participação destes receptores nesse mecanismo de ação. Drogas antagonistas seletivas são comumente usadas para verificar a participação de receptores específicos. Nossos estudos também mostraram que esses antagonistas seletivos testados não causam qualquer hiperalgesia ou efeito antinociceptivo quando administrados isoladamente.

Recentemente, Granados-Soto e colaboradores (2010) mostraram que agonistas seletivos dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> e 5-HT<sub>1F</sub> administrados diretamente na pata inibem a resposta nociceptiva induzida por formaldeído em ratos. Além disso, também foi mostrado que esse efeito antinociceptivo é inibido de forma dose-dependente por antagonistas seletivos para os mesmos receptores. Foi demonstrado que há aumento da expressão de mRNA

de 5-HT<sub>1B</sub> após a inflamação (Wu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005). De acordo com esses dados é provável que estes receptores estejam presentes nos terminais periféricos de fibras aferentes primárias, corroborando a proposta de Nicholson *et al.*, (2003), de que mRNA de 5-HT<sub>1B</sub> é distribuído ao longo de neurônios sensoriais. Tomados em conjunto, estes dados sugerem que o efeito antinociceptivo induzido pelo agonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>1B</sub> resulta da ativação desse tipo de receptores localizado nos terminais periféricos de fibras aferentes primárias. Nossos resultados acrescentam a essa possibilidade, o envolvimento de receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>3</sub>.

Em seus trabalhos, Alhaider & Wilcox (1993) demonstraram que a administração intratecal de agonistas dos receptores 5-HT<sub>1B</sub> induz antinocicepção em camundongos, e que esse efeito foi revertido após administração de um antagonista desses mesmos receptores. Embora não tenha avaliado diretamente o comportamento nociceptivo, foi mostrado em outro estudo que sumatriptano, um agonista 5-HT<sub>1B/1D</sub>, inibe em baixas doses o extravasamento de plasma induzido por capsaicina em ratos (Pierce *et al.*, 1996), sugerindo um papel inibitório desempenhado por esses receptores em diferentes situações.

Vários estudos também já evidenciaram o papel dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> no processamento periférico da resposta nociceptiva, como por exemplo, na analgesia induzida por substância doce em ratos, uma vez que o aumento dos limiares nociceptivos causados pela ingestão de sacarose foi antagonizado pela administração periférica de cetanserina (Rebouças *et al.*, 2005). Nesse mesmo trabalho, a metisergida, um antagonista serotoninérgico não seletivo, também antagonizou a analgesia induzida por sacarose de maneira semelhante à causada

por cetanserina, sugerindo assim que outros subtipos de receptores serotoninérgicos, além da subfamília 5-HT<sub>2</sub>, exercem um papel importante na analgesia.

Também são encontrados trabalhos na literatura demonstrando o efeito antinociceptivo associado ao receptor 5-HT<sub>3</sub>. Sasaki e colaboradores (2001) observaram que a administração intratecal de um agonista 5-HT<sub>3</sub> produz redução da resposta induzida por formaldeído em ratos, e que esse efeito antinociceptivo é revertido pela administração do antagonista 5-HT<sub>3</sub> ondansetrona. Adicionalmente, em camundongos, já foi demonstrado em modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético que o efeito antinociceptivo de paroxetina, inibidor seletivo da captação de 5-HT, é reduzido pela administração de ondansetrona, sugerindo assim a participação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> na analgesia periférica em dor quimicamente estimulada (Kesim *et al.*, 2005).

Em contraste, o BRL15572 e o SB269970, (antagonistas seletivos dos receptores 5-HT<sub>1D</sub> e 5-HT<sub>7</sub>, respectivamente) não reverteram o efeito antinociceptivo periférico induzido por serotonina, sugerindo que estes receptores não participam deste evento. Esta afirmação se refere apenas ao nosso modelo experimental, uma vez que Rocha-González *et al.* (2005) mostraram que SB 269970 (antagonista 5-HT<sub>7</sub>) inibe o comportamento nociceptivo induzido por formaldeído, 5-HT ou agonistas serotoninérgicos em ratos. Em relação aos receptores 5-HT<sub>1D</sub>, embora os dados sejam escassos, alguns resultados indicam que o sumatriptano, um agonista 5-HT<sub>1B/1D</sub> reduz dor inflamatória (Bingham *et al.*, 2001; Nikai *et al.*, 2008) e inflamação neurogênica (Carmichael *et al.*, 2008). Além disso, estudos mostram que

o BRL15572 reverteu o efeito antinociceptivo de GR46611 (um agonista dos receptores 5-HT<sub>1B/1D</sub>) em ratos (Granado-Soto *et al.* 2010).

Nossos resultados demonstram que a serotonina possui papel antinociceptivo periférico, se administrada em baixas doses, e ainda que seus receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, encontrados no DRG, participam desse mecanismo, e estão em consonância com os mecanismos moleculares gerados quando da ativação desses receptores, sendo que receptores 5-HT<sub>1B</sub> são acoplados às proteínas Gi/O promovendo então diminuição dos níveis de cálcio intracelular e a abertura de canais para potássio (Hoyer *et al.*, 1994; Hannon & Hoyer, 2008), hiperpolarizando a célula, e conseqüentemente, inibindo os neurônios presentes no DRG, o que poderia resultar numa ação direta da serotonina na inibição das fibras nociceptivas. Entretanto, os receptores 5-HT<sub>2A</sub> são acoplados às proteínas Gq e os receptores 5-HT<sub>3</sub> são receptores ionotrópicos (Xie *et al.*, 2012), sugerindo efeitos excitatórios de ambos, provavelmente por aumento da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>. Uma vez que nossos resultados demonstram um evento final inibitório mediado pelos receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>3</sub> e sabendo da transdução farmacológica excitatória destes receptores, nós acreditamos que estes receptores estariam estimulando algum grupo celular a liberar agentes endógenos que diminuiriam a excitação dos nociceptores como evento final. Dentro desta hipótese, a serotonina poderia estar induzindo células residentes, como macrófagos e queratinócitos, a liberarem substâncias analgésicas endógenas, como opioides e canabinoides.

Foi demonstrado que ao nível periférico vários agentes induzem antinocicepção ao liberar opioides endógenos (Pacheco *et al.* 2005, 2008; Romero *et al.*, 2009; Reis *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  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  são acoplados à proteína  $G_i$  e ao serem ativados diminuem o nível de AMPc intracelular, impedindo a ação dos canais para cálcio voltagem dependentes, atenuando a excitabilidade neuronal (Kieffer *et al.*, 2002).

Na presente investigação verificamos a possível participação do sistema opioide na antinocicepção periférica induzida pela serotonina. Para tentarmos esclarecer quais os mecanismos de ação envolvidos, investigamos quais receptores periféricos opioides a serotonina estaria ativando ao induzir resposta antinociceptiva. Somente o bloqueio dos receptores  $\mu$ -opioides foi capaz de reverter totalmente a ação antinociceptiva periférica da serotonina. Já o bloqueio dos receptores  $\delta$  e  $\kappa$ -opioides reverteu apenas parcialmente a ação antinociceptiva periférica da serotonina, sugerindo a participação desses receptores, mesmo que em parte, neste mecanismo de ação.

Desde 1969 estudos já mostravam que a liberação de 5-HT no corno dorsal da medula espinhal induzida pela estimulação da substância cinzenta periaquedutal causava ativação de interneurônios inibitórios, via receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, resultando em inibição dos neurônios espinhais por mecanismos dependente de opioides (Peng *et al.*, 1996). Nosso trabalho avança mostrando a participação destes receptores, por mecanismos semelhantes, agora a nível periférico. Nosso estudo não foi o único a propor uma interação entre estes sistemas fora do contexto da ativação da via descendente analgésica.

Yoshikawa *et al.*, (2009) demonstraram que em um estudo *in vivo* de microdiálise, TRK-820, um agonista dos receptores Kappa opioides, atenuou de maneira dose-dependente as alterações bioquímicas de dopamina e serotonina no córtex pré-frontal de ratos tratados com fenciclidina (alucinógeno, tem como efeitos sintomas semelhantes aos apresentados na esquizofrenia), sem afetar os seus níveis basais em ratos normais, inferindo assim que esse agonista potencialmente participa do sistema de monoaminas, melhorando comportamentos anormais relacionadas com as suas alterações, sugerindo o seu potencial terapêutico contra os sintomas da esquizofrenia.

Adriaens *et al.*, (2014) sugerem que a disponibilidade do receptor cerebral 5-HT<sub>2A</sub> em cães após exposição prolongada de morfina foi diminuída. Mesmo não tendo relação direta com o controle da dor, esses estudos fornecem evidências adicionais de que há interação entre os sistemas opioidérgico e serotoninérgico em casos de tolerância.

Kimura e colaboradores (2014) demonstraram que a administração sistêmica de morfina aumenta a liberação de 5-HT no corno dorsal da medula através de ativação dos neurônios serotoninérgicos na medula ventromedial rostral. O pré-tratamento intratecal com ondansetrona, um antagonista do receptor 5-HT<sub>3</sub>, ou 5,7-diidroxitriptamina sulfato de creatinina, uma neurotoxina seletiva para os terminais serotoninérgicos, atenuou o efeito analgésico da morfina em ratos normais, mas aumentou o efeito analgésico da morfina em ratos que tiveram dor neuropática induzida.

Uma estratégia farmacológica utilizada para aumentar os efeitos de peptídeos opioides liberados endogenamente é a inibição das peptidases. A aminopeptidase *N* é uma peptidase transmembrânica com um grande domínio extracelular que contém

o sítio ativo, expressa em leucócitos e neurônios, responsável por inativar peptídeos opioides endógenos (Luan & Xu, 2007; Stein & Machelska, 2011). Nesse contexto, a fim de avaliar o envolvimento de peptídeos opioides endógenos na modulação do efeito antinociceptivo periférico da serotonina utilizamos a bestatina, inibidor da enzima aminopeptidase *N*. A administração intraplantar da bestatina potencializou o efeito antinociceptivo periférico da dose baixa de serotonina, manifestado pelo aumento do limiar nociceptivo dos animais.

Estudos prévios relataram que peptídeos opioides provenientes de células imunes podem ativar receptores opioidérgicos presentes nas terminações nervosas periféricas em pata inflamada de ratos (Stein *et al.*, 1990; Mousa *et al.*, 2001). Os peptídeos opioides endógenos têm diferentes seletividades pelos receptores opioides, sendo a  $\beta$ -endorfina particularmente seletiva para os receptores  $\mu$  e  $\delta$  opioides (Millan, 2002). Periféricamente, sabe-se que a interação entre opioides derivados de células imunes e receptores opioides localizados em terminais de neurônios sensoriais pode resultar em analgesia potente (Stein, 1995) e que o mais importante peptídeo opioide envolvido na analgesia periférica endógena seria a  $\beta$ -endorfina (Stein *et al.*, 1990). Outra fonte provável destes peptídeos são as células imunes residentes, como os queratinócitos. Esta hipótese parece viável uma vez que os queratinócitos são a principal célula residente na pele levando em consideração a quantidade de  $\beta$ -endorfina (Ibrahim e cols., 2005), e que estes teriam maquinaria para sintetizar e liberar através do aumento de cálcio (Koizumi e cols., 1991; Ibrahim e cols., 2005) a  $\beta$ -endorfina (Ibrahim e cols., 2005). Os queratinócitos expressam constitutivamente pró-opiomelocortina (POMC), que é precursora de uma variedade de peptídeos, incluindo o peptídeo opioide endógeno  $\beta$ -endorfina (Wintzen & Gilchrest, 1996). Além disto são fonte de  $\beta$ -endorfina (Ibrahim *et al.*, 2005), dinorfina



A (Tominaga *et al.*, 2007), Met e Leucina-encefalina (Slominski *et al.*, 2011) liberados mediante ativação celular.

Diante desses resultados, sugerimos o envolvimento de  $\beta$ -endorfina, encefalinas e dinorfinas, peptídeos opioides que ativam os receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  presentes no nociceptor (Millan, 2002) no mecanismo antinociceptivo periférico induzido pela serotonina, provavelmente com a participação de células imunes e/ou residentes neste contexto após a ativação destas por receptores serotoninérgicos de transdução excitatória como o 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>.

Tendo em vista esses resultados sobre a interação entre os sistemas serotoninérgico e opioidérgico e dados reportados por nosso grupo de pesquisa revelando que a ativação de receptores  $\mu$  liberaria canabinoides endógenos que contribuem para o efeito antinociceptivo dos opioides (Pacheco *et al.*, 2008; 2009) pensamos na possibilidade de haver participação de endocanabinoides no efeito antinociceptivo periférico da serotonina.

Trabalhos sugerem que canabinoides administrados por via sistêmica exercem efeito antinociceptivo mediado por receptores CB<sub>1</sub> ativando as vias descendentes serotoninérgicas (Seyrek *et al.*, 2010; Dogrul *et al.*, 2012) e noradrenérgicas (Dogrul *et al.*, 2012), envolvendo receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>7</sub> espinhais.

Além disto, Mallet *et al.*, (2008) propõe que a analgesia induzida por acetaminofeno (anti-inflamatório não esteroideal) tem a participação indireta de receptores CB<sub>1</sub> na formação do seu metabólito ativo (AM404), e posterior envolvimento de receptores serotoninérgicos espinhais supressores de dor. Rácz *et al.*, (2008) mostraram que a analgesia induzida pela anandamida em ratos

deficientes de receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, foi completamente bloqueada por ondansetrona, um antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>3</sub>. Ainda há evidências sugerindo que a anandamida modula a atividade de diversos canais iônicos, entre eles o receptor 5-HT<sub>3</sub> (Barann *et al.*, 2002) podendo alterar seletivamente as propriedades de dessensibilização do receptor. Esses resultados sugerem que a analgesia induzida pela anandamida não é exclusivamente mediada pela ativação de receptores CB<sub>1</sub> e/ou CB<sub>2</sub> (Rácz *et al.*, 2008).

Em relação às vias analgésicas ao nível periférico, a literatura aponta para um grande número de interações cruzadas. Estudos conduzidos por Romero *et al.*, (2013) demonstraram que agonistas canabinoides induzem antinocicepção periférica ativando receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> canabinoides, estimulando a liberação de noradrenalina endógena, ativando finalmente receptores adrenérgicos nos nociceptores. Em outros trabalhos, Romero *et al.* (2009) propuseram que o agonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos xilazina, poderia induzir antinocicepção periférica por ativação de células residentes que liberariam peptídeos opioides endógenos, induzindo antinocicepção. Diante desse conjunto de resultados, nosso próximo passo foi investigar se haveria interação entre os sistemas canabinoidérgico e serotoninérgico também na antinocicepção periférica induzida pela serotonina.

Desde a descoberta do receptor canabinoide acoplado a proteína G (Matsuda *et al.*, 1990; Gérard *et al.*, 1991) e a identificação de canabinoides endógenos, esse sistema tem sido estudado e implicado em diversos contextos fisiológicos. As pesquisas revelam o efeito antinociceptivo dos canabinoides através de estudos eletrofisiológicos e comportamentais *in vivo* (Hohmann *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 2001; Clapper *et al.*, 2010).

Os assim chamados “endocanabinoides”, compostos 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 pode ocorrer a partir de diversos precursores fosfolipídicos, sendo que a síntese de anandamida ocorre a partir da hidrólise do N-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NAPE) (Jin *et al.*, 2009) e a síntese de 2-AG ocorre principalmente através do diacilglicerol (DAG) (revisto por Basavarajappa, 2007). Tais sínteses só ocorrem sob demanda, a partir do aumento das concentrações intracelulares de  $Ca^{2+}$ , não ocorrendo estocagem em vesículas secretórias (Van Sickle *et al.*, 2005).

Os endocanabinoides ativam os receptores canabinoides em diversas condições fisiológicas, sendo que a maioria dessas ainda carece de detalhes ao nível molecular e celular (De Petrocellis *et al.*, 2004).

O surgimento dos antagonistas dos receptores canabinoides nos oferece uma ferramenta interessante para pesquisar esse sistema em evidência nos dias atuais. Através do antagonismo dos receptores periféricos  $CB_1$  e  $CB_2$  com AM251 e AM630, respectivamente, verificamos a reversão da antinocicepção periférica induzida pela serotonina.

Agarwal *et al.* (2007) relataram que os receptores  $CB_1$  expressos nas terminações periféricas de neurônios sensitivos primários são responsáveis pela maior parte da modulação endógena da dor exercida pelos endocanabinoides, bem como, pelo efeito antinociceptivo de canabinoides exógenos administrados por via sistêmica e intraplantar. Em relação aos receptores  $CB_2$ , assim como em nossos

trabalhos, há várias evidências da participação desses receptores na antinocicepção periférica em modelos de dor nociceptiva (Malan *et al.*, 2001) e inflamatória induzida pela carragenina (Quartilho *et al.*, 2003). O endocanabinoide palmitoiletanolamida (PEA) apresentou efeito antinociceptivo periférico no teste de formalina (Calignano *et al.*, 1998; Jaggar *et al.*, 1998) e carragenina (Romero *et al.*, 2012), sendo este efeito bloqueado por um antagonista CB<sub>2</sub>, mas não por um antagonista CB<sub>1</sub>. Estudos mostram que não só os receptores CB<sub>1</sub>, mas os CB<sub>2</sub> também estão envolvidos na inibição endógena da transmissão nociceptiva pelos endocanabinoides ao nível periférico (Calignano *et al.*, 1998). Além disso, foi observado que a ativação desses receptores em queratinócitos resulta na liberação do peptídeo opioide β-endorfina que agem em receptores μ opioides, provavelmente em neurônios aferentes primários, induzindo antinocicepção periférica (Ibrahim *et al.*, 2005).

Mais uma vez, sabendo que queratinócitos têm maquinaria também para a produção de endocanabinoides e os libera quando há aumento de cálcio intracelular (Maccarrone e cols., 2003), acreditamos ser possível que a ação da serotonina, em baixas doses, sobre os receptores serotoninérgicos de transdução excitatória como o 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> induza um aumento intracelular de cálcio com consequente liberação de anandamida e 2-AG por queratinócitos. Trabalhos demonstram que endocanabinoides são sintetizados através da ativação de receptores 5-HT<sub>2A</sub> pós-sinápticos, regulando a inibição da liberação de GABA (ácido γ-aminobutírico, um neurotransmissor inibitório) pré-sináptico e também a transmissão serotoninérgica local na amígdala basolateral. Esse mesmo trabalho também sugere que a liberação de serotonina no terminal pré-sináptico é modulada por receptores CB<sub>1</sub> (Yoshida *et al.*, 2013).

Logo após sua produção, os endocanabinoides são liberados por neurônios pós-sinápticos despolarizados e se dirigem aos terminais pré-sinápticos, onde ativam receptores canabinoides através de um mecanismo de sinalização retrógrada (Alger, 2002). Essa sinalização é finalizada através ação de transportadores presentes na membrana neuronal, que promovem o deslocamento do endocanabinoide do meio extra para o intracelular (Beltramo *et al.*, 1997; revisto por Pacher, 2006), e com posterior degradação pela ação de enzimas específicas presentes no interior dos neurônios (revisto por Di Marzo, 2008).

A anandamida é hidrolisada pela enzima ácido graxo amida hidrolase (*FAAH*, do inglês *fatty acid amide hydrolase*), localizada em neurônios pós-sinápticos (revisto por Seierstad & Breitenbucher, 2008), tendo como produtos o ácido araquidônico e a etanolamina (Di Marzo, 1994). Já o 2-AG é hidrolisado pela enzima monoacilglicerol lipase (*MAGL*), presente em neurônios pré-sinápticos (Dinh *et al.*, 2002), tendo como produtos o ácido graxo e glicerol (revisto por Guindon & Hohmann, 2009).

A anandamida liga-se preferencialmente a receptores  $CB_1$  (Pertwee & Ross, 2002) e o presente trabalho mostrou que o efeito antinociceptivo da serotonina é dependente desses receptores, sugerindo dessa forma a participação da anandamida no efeito antinociceptivo dessa amina. A fim de confirmar essa hipótese foi utilizado o VDM11, um inibidor de recaptção de anandamida (De Petrocellis *et al.*, 2000), e o MAFP, um inibidor irreversível da *FAAH* (Deutsch *et al.*, 1997), sendo que os dois potencializaram o efeito antinociceptivo da serotonina, reforçando essa hipótese.

Estudos também sugerem que o 2-AG, endocanabinóide que possui afinidade semelhante para os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (Pertwee & Ross, 2002), também está envolvido na inibição da nocicepção ao nível periférico. Estudos mostram que inibidores da MAGL apresentam efeito antinociceptivo periférico frente à hiperalgesia induzida pela formalina e capsaicina, sendo que esse efeito é mediado por receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (Spradley *et al.*, 2010; Guindon *et al.*, 2011).

Com objetivo de avaliar a possível participação do 2-AG no efeito antinociceptivo periférico da serotonina utilizamos o JZL184, um inibidor da MAGL (Long *et al.*, 2009), o qual também potencializou o efeito em questão. Considerando que a MAGL é responsável pela hidrólise seletiva do 2-AG (Dinh *et al.*, 2002), esses resultados sugerem que esse endocanabinóide também pode indiretamente estar envolvido no efeito antinociceptivo da serotonina.

A literatura ainda aponta que o receptor CB<sub>1</sub> canabinoide e  $\mu$  opioide formariam heterodímeros (Rios *et al.*, 2006) e que a sinalização intracelular ocorre através de uma proteína G comum (Hojo *et al.*, 2008). Isso poderia explicar o fato de que tanto o antagonista opioide naloxona quanto o antagonista CB<sub>1</sub> AM251 terem antagonizado o efeito antinociceptivo da serotonina em nosso modelo, podendo ser alvo de pesquisas futuras.

Recentemente foi demonstrado também para a ação antinociceptiva periférica da morfina que esta, após ativar os receptores  $\mu$  opioides através da subunidade  $\beta\gamma$  e posterior ativação da via PI3K/AKT, induziria uma ativação da enzima nNOS com consequente ativação da via NO/GMPc/K<sub>ATP</sub> no nociceptor (Cunha *et al.*, 2010).

Em se tratando de antinocicepção, ao longo dos últimos 20 anos, vários trabalhos demonstraram um mecanismo de ação periférico dependente de NO para

vários agentes analgésicos (Ferreira *et al.*, 1991; Amarante e Duarte, 2002; Maegawa e Tonussi, 2003; Ortiz *et al.*, 2005; Pacheco *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2009; Romero *et al.* 2012).

Sabendo que opioides (Rodrigues e Duarte, 2000; Pacheco *et al.*, 2005) e canabinoides (Reis *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2012) induzem antinocicepção periférica também pela ativação da via L-arginina/NO/GMPc e que a serotonina induz liberação de opioides e canabinoides endógenos, o próximo passo do presente estudo foi avaliar a participação dessa via no efeito antinociceptivo periférico da serotonina.

Com a finalidade de verificar se a serotonina leva ao aumento da síntese de NO, utilizamos o inibidor não seletivo da NOS, o N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginina (L-NOArg), um análogo da L-arginina, que inibe competitivamente a enzima NOS, bloqueando a síntese de NO (Iacopucci *et al.*, 2012). Foi observado que o L-NOArg reverteu o efeito antinociceptivo periférico da serotonina 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 (nNOS e eNOS) e a isoforma induzível (iNOS) (Reutov e Sorokina, 1998), sendo as três isoformas localizadas periféricamente em neurônios do gânglio da raiz dorsal (Papadopolou *et al.*, 2004). De acordo com os resultados obtidos, sugerimos que a serotonina administrada periféricamente ativa a nNOS. A ativação da isoenzima nNOS, e não da eNOS e iNOS, está envolvida no mecanismo antinociceptivo periférico de vários tipos de analgésicos, incluindo anandamida, morfina, SNC80 (agonista do receptor  $\delta$  opioide), acetilcolina, xilazina, dipirona, diclofenaco e palmitoiletanolamida (Romero *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2012a).

Como demonstra Chanrion *et al.*, (2007), co-expressão de nNOS com SERT (transportador de serotonina) em células HEK293 diminuiu a captação de serotonina como consequência da diminuição da expressão de SERT na superfície celular, sugerindo que a nNOS reduz a atividade de SERT *in vivo*. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que a produção de NO foi aumentada quando células co-transfectadas com nNOS e SERT foram expostas à 5-HT. Este efeito foi suprimido por inibidores da captação de 5-HT, indicando que a captação de 5-HT estimula a atividade da nNOS. Em conjunto esses dados sugerem que a interação física entre SERT e nNOS provoca recíproca modulação de atividades funcionais.

Ao examinar o efeito da ativação de receptores por segundos mensageiros no transportador de 5-HT em células de ratos com leucemia basofílica (RBL 2H3), Miller & Hoffman (1994) demonstraram que o transporte de neurotransmissores pode ser rapidamente regulado por receptores acoplados a proteína G e que essa regulação ocorre via NO e GMPc. Demonstraram ainda que a função do transportador de serotonina pode ser diferencialmente regulada por dois sistemas distintos de segundos mensageiros, indicando que alterações na atividades de transportadores via ativação de receptores pode levar a significativa mudança de concentração de serotonina nas sinapses.

O NO uma vez formado, promove a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel e conseqüentemente aumento das concentrações de GMPc (Moncada *et al.*, 1988). O aumento desse segundo mensageiro está relacionado com o efeito antinociceptivo periférico de vários analgésicos opioides (Ferreira *et al.*, 1991; Duarte *et al.*, 1992; Pacheco *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2012a). 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 pela serotonina. Portanto, os resultados sugerem que essa amina aumenta os níveis de NO, com consequente ativação da enzima guanilato ciclase solúvel e aumento dos níveis de GMPc em nosso modelo.

Após a ativação da NOS e formação de NO esse mediador é rapidamente oxidado formando dois produtos o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Kelm, 1999). Considerando que o NO é altamente instável, a quantificação dos níveis de nitrito é uma forma indireta utilizada para determinar os níveis de NO (Bryan e Grisham, 2007). No presente estudo, verificamos que a administração intraplantar de serotonina somente induziu um aumento dos níveis de nitrito em animais que receberam previamente  $\text{PGE}_2$ . Interessantemente nem  $\text{PGE}_2$  ou serotonina quando injetadas sozinhas induziram aumento dos níveis de nitrito nas amostras. Este resultado é surpreendente uma vez que esperávamos que a serotonina induziria aumento de nitrito mesmo em amostras sem  $\text{PGE}_2$ . Pelo que observamos parece que uma vez sob alguma agressão, no caso a ação da  $\text{PGE}_2$ , o tecido sofre alterações moleculares que permitem, sob a ação da serotonina, uma liberação periférica de NO. Este atual trabalho não demonstra se esta hipótese é possível, mas uma vez que o grupo tratado  $\text{PGE}_2$  com serotonina induziu aumento significativo de nitrito na amostra, fortalece, junto com os dados anteriores, a nossa hipótese de que o efeito antinociceptivo da serotonina é dependente da participação de NO.

Vários trabalhos realizados em nosso laboratório verificaram a ligação entre a participação da via NO/GMPc e a ativação dos canais para potássio na antinocicepção periférica (Soares *et al.*, 2000; Rodrigues e Duarte, 2000; Soares e Duarte, 2001). Já foi demonstrado também que o efeito antinociceptivo central de

vários agonistas do receptor 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT, buspirona, lesopitron e tandospirona) foi inibido pelas sulfoniluréias glicidona e glipizide (Robles *et al.*, 1996).

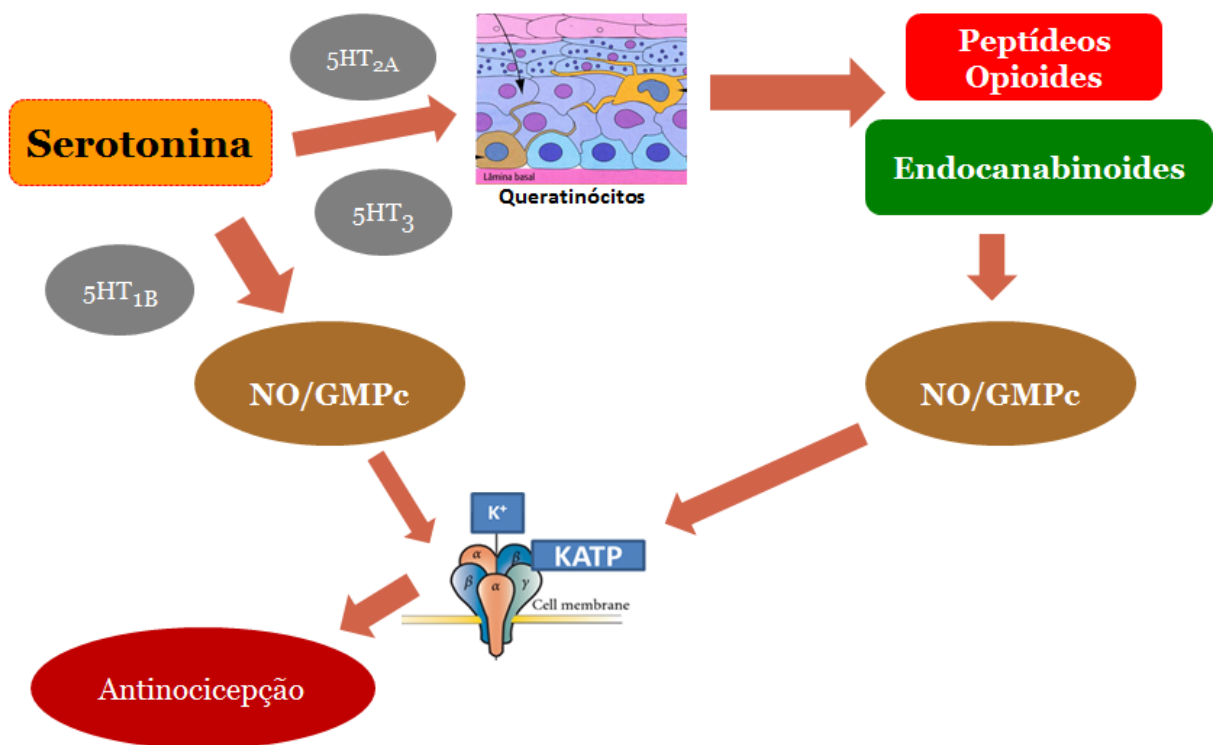
Em outro trabalho, Hajhashemi & Amin (2011) demonstraram que o pré-tratamento de animais com glibenclamida reverteu parcialmente os efeitos antinociceptivos da fluvoxamina (fármaco inibidor seletivo da recaptação de serotonina) e amitriptilina (inibidor não seletivo da recaptação de monoaminas), sugerindo que os canais para potássio sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>) têm um papel importante na a atividade analgésica dessas drogas.

No presente estudo, foi observado que o efeito antinociceptivo periférico da serotonina foi revertido pela administração local da sulfoniluréia glibenclamida, bloqueador seletivo dos canais para K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP (Nichols e Lederer, 1991), mas não pelos bloqueadores seletivos para os canais para K<sup>+</sup> dependentes de voltagem (tetraetilamônio), dos canais para K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> de baixa (dequalínio) e alta (paxilina) condutância, sugerindo o envolvimento apenas do canal K<sub>ATP</sub> no evento estudado.

Diante desses resultados sugerimos que a serotonina induza antinocicepção por mecanismos que ativam a via L-arginina/NO/GMPc/K<sub>ATP</sub>.

Em conclusão, nossos dados sugerem, pela primeira vez, a ação antinociceptiva periférica induzida pela serotonina quando administrada em baixas doses em patas pré-tratadas com PGE<sub>2</sub>, e que há interação do sistema serotoninérgico com os sistemas opioide, canabinoide e nitrérgico, além do envolvimento dos canais para potássio. Nossa hipótese é que a serotonina cause antinocicepção por ativação dos receptores 5-HT<sub>1B</sub> de transdução farmacológica

inibitória via proteína  $G_i$ , inibindo diretamente os nociceptores, e também por ativação dos receptores  $5-HT_{2A}$  e  $5-HT_3$ , com transduções excitatórias, ativando células residentes, como queratinócitos, que produzem e liberam endocanabinoides e peptídeos opioides endógenos, levando a uma hiperpolarização celular, via  $NO/GMPc/K_{ATP}$ , com consequente efeito antinociceptivo (**Figura 13**). Ressaltamos a necessidade de investigações futuras a respeito da seletividade dos peptídeos opioides e endocanabinoides envolvidos, bem como a participação efetiva dos queratinócitos neste evento.



**Figura 13 - Hipótese sobre o mecanismo antinociceptivo periférico induzido pela serotonina.** A serotonina ativa os receptores  $5-HT_{1B}$  diretamente nos nociceptores ou através dos  $5-HT_{2A}$  e  $5-HT_3$  em queratinócitos, produzindo e liberando endocanabinóides e peptídeos opióides, com consequente ativação da via  $NO/GMPc/K_{ATP}$  nos nociceptores.

## *7 Referências Bibliográficas*

### 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAENS, A.; POLIS, I.; VERMEIRE, S.; WAELBERS, T.; CROUBELS, S.; DUCHATEAU, L.; VAN DORPE, S.; EERSELS, J.; DE SPIEGELEER, B.; PEREMANS, K. The effect of prolonged exposure to morphine on canine cerebral 5-HT<sub>2A</sub> receptors measured with (123) I-R91150 SPECT. *Eur Neuropsychopharmacol.* 24(7):1133-8. 2014

AGARWAL, N.; PACHER, P.; TEGEDER, I.; AMAYA, F.; CONSTANTIN, C.E.; BRENNER, G.J.; RUBINO, T.; MICHALSKI, C.W.; MARSICANO, G.; MONORY, K.; MACKIE, K.; MARIAN, C.; BATKAI, S.; PAROLARO, D.; FISCHER, M.J.; REEH, P.; KUNOS, G.; KRESS, M.; LUTZ, B.; WOOLF, C.; KUNER, R. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nature Neuroscience*, v.10, n.7, p.870-879, 2007.

ALGER, B. E. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Progress in Neurobiology.* 68: 247-86, 2002.

ALHAIDER, A. A.; WILCOX, G. L. Differential roles of 5-hydroxytryptamine 1A and 5-hydroxytryptamine 1B receptor subtypes in modulating spinal nociceptive transmission in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 265(1):378-85. 1993.

ALVES D. P.; DUARTE I. D. G. Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. *Eur J Pharmacol* 444, 47–52. 2002.

ALVES. D. P.; SOARES, A. C.; FRANCISCHI, J. N.; CASTRO, M. S.; PEREZ, A. C.; DUARTE, I. D. Additive antinociceptive effect of the combination of diazoxide, an activator of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, and sodium nitroprusside and dibutyryl-cGMP. *Eur. J. Pharmacol.*, v.489, n.1-2, p.59-65, 2004.

ALVES DP, DA MOTTA PG, LIMA PP, QUEIROZ-JUNIOR CM, CALIARI MV, PACHECO DF, PACHECO CF, FRANCISCHI JN, DUARTE ID. Inflammation mobilizes local resources to control hyperalgesia: the role of endogenous opioid peptides. *Pharmacology* 89, 22–8. 2012.

AMARANTE, L. H.; DUARTE, I. D. G. The  $\kappa$ -opioid ( $\pm$ )-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur JPharmacol* 454, 19–23. *Pharmacol* 9, 3–8. 2002

AMIN, A. H.; CRAWFORD, T. B.; GADDUM, J. H. The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. *J Physiol*, v.126, n.3, p.596-618, Dec 10. 1954.

BARANN, M.; MOLDERINGS, G.; BRUSS, M.; BONISCH, H.; URBAN, B.W.; GOTHERT, M. Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT<sub>3A</sub> receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br. J. Pharmacol.* 137, 589–596. 2002

BARDIN, L.; LAVARENNE, J.; ESCHALIER, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain.* 86(1-2):11-8. 2000.

BASAVARAJAPPA, B. S. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein & Peptide Letters.* 14 (3): 237-46, 2007.

BASBAUM, A.I., CLANTON, C.H., FIELDS, H.L. Opiate and stimulus-produced analgesia: functional anatomy of a medulla spinal pathway. Proc. Natl. Ac. Sci. (USA) 73: 4685-4688. 1976.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. Annu Rev Neurosci. 1984;7:309-38. 1984.

BELTRAMO, M.; STELLA, N.; CALIGNANO, A.; LIN, S. Y.; MAKRIYANNIS, A.; PIOMELLI, D. Functional role of high affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. Science. 277:1094-97, 1997.

BESSION, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. Phys. Rev., v.67, n.1, p.67-186, 1987.

BINGHAM, S.; DAVEY, P.T.; SAMMONS, M.; RAVAL, P.; OVEREND, P.; PARSONS, A.A.. Inhibition of inflammation-induced thermal hypersensitivity by sumatriptan through activation of 5-HT(1B/1D) receptors. Exp. Neurol. 167:65–73. 2001.

BRODIE, B. B.; SHORE, P. A. A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. Ann N Y Acad Sci, v.66, n.3, p.631-42. 1957.

BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. Free Radic Biol Medic 43, 645-57. 2007.

BUSHLIN, I.; ROZENFELD, R.; DEVI, L. A. Cannabinoid-opioid interactions during neuropathic pain and analgesia. Curr Opin Pharmacol. 10(1):80-6. 2010

CALIGNANO, A.; LA RANA, G.; GIUFFRIDA, A.; PIOMELLI, D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. Nature, v.394, n.6690, p.277-281, 1998.

CARSTENS, E.; GILLY, H.; SCHREIBER, H.; ZIMMERMANN, M. Effects of midbrain stimulation and iontophoretic application of serotonin, noradrenaline, morphine and GABA on electrical thresholds of afferent C- and A-fibre terminals in cat spinal cord. *Neuroscience*.395-406. 1987.

CARMICHAEL, N.M.; CHARLTON, M.P.; DOSTROVSKY, J.O. Activation of the 5-HT1B/D receptor reduces hindlimb neurogenic inflammation caused by sensory nerve stimulation and capsaicin. *Pain*. 134:97–105. 2008.

CESARE, P.; MCNAUGHTON, P. Peripheral pain mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 7, 493–9. 1997.

CHAMPIER, J.; CLAUSTRAT, B.; BESANCON, R.; EYMIN, C.; KILLER, C.; JOUVET, A.; CHAMBA, G.; FEVRE-MONTANGE, M. Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets. *Life Sci*, v.60, n.24, p.2191-7. 1997

CHANRION, B.; MANNOURY, C.; BERTASO, F.; FREISSMUTH, M.; MILLAN, M.J.; BOCKAERT, J. Physical interaction between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 8119–8124. 2007

CHITOUR, D.; DICKENSON, A.H.; LE BARS, D., Pharmacological evidence for the involvement of serotonergic mechanisms in diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). *Brain Res*. 236(2):329-37. 1982.



CLAPPER, J.R.; MORENO-SANZ, G.; RUSSO, R.; GUIJARRO, A.; VACONDIO, F.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; SANCHINI, S.; SCIOLINO, N.R.; SPRADLEY, J.M.; HOHMANN, A.G.; CALIGNANO, A.; MOR, M.; TARZIA, G.; PIOMELLI, D. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci.* v. 13, p. 1265-1279, 2010.

CLARK, C. T.; WEISSBACH, H.; UDENFRIEND, S. 5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties. *J. Biol. Chem.*, v.210, n.1, p.139-48, 1954.

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

COLE, H. W.; BROWN, C. E.; MAGEE, D. E.; MAGEE, C.; ROUDEBUSH, R. E.; BRYANT, H. U.. Serotonin-induced paw edema in the rat: pharmacological profile. *Gen. Pharmacol.*, v.26, n.2, p.431-6, 1995.

COX, J. J.; REIMANN, F.; NICHOLAS, A. K.; THORNTON, G.; ROBERTS, E.; SPRINGELL, K.; KARBANI, G.; JAFRI, H.; MANNAN, J.; RAASHID, Y.; AL-GAZALI, L.; HAMAMY, H.; VALENTE, E. M.; GORMAN, S.; WILLIAMS, R.; MCHALE, D. P.; WOOD, J. N.; GRIBBLE, F. M.; WOODS, C. G. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature.* 444: 894-898, 2006.

CUNHA, T. M.; ROMAN-CAMPOS, D.; LOTUFO, C. M.; DUARTE, H. L.; SOUZA, G.R.; VERRI, W. A. Jr.; FUNEZ, M. I.; DIAS, Q. M.; SCHIVO, I. R.; DOMINGUES, A. C.; SACHS, D.; CHIAVEGATTO, S.; TEIXEIRA, M. M.; HOTHERSALL, J. S.; CRUZ, J. S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H.

Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.107, n.9, p.4442-4447, 2010.

DAHLSTROEM, A.; FUXE, K. Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.*, v.232, p.1-55, 1964.

DE PETROCELLIS, L.; BISOGNO, T.; DAVIS, J. B.; PERTWEE, R. G.; DI MARZO, V. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamida transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamida uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett* 483, 52–6. 2000.

DE PETROCELLIS, L.; CASCIO, M. G.; DI MARZO, V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol.* v.141(5), p.765-74, 2004.

DEUTSCH, D.G.; OMEIR, R.; ARREAZA, G.; SALEHANI, D.; PRESTWICH, G.D.; HUANG, Z.; HOWLETT, A. Methyl arachidonyl fluorophosphonate: a potent irreversible inhibitor of anandamide amidase. *Biochem Pharmacol.* 53(3):255-60. 1997.

DEVANE, W.A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R.G., STEVENSON, L.A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A., MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, v.258, p.1946-49, 1992.

DI MARZO, V.; FONTANA, A.; CADAS, H.; SCHINELLI, S.; CIMINO, G.; SCHWARTZ, J. C.; PIOMELLI, D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 372 (6507): 686-91, 1994.

DI MARZO, V. 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1392, p.153-175, 1998.

DI MARZO, V.; BIFULCO, M.; DE PETROCELLIS, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 3, 771–84. 2004.

DI MARZO, V.; DE PETROCELLIS L. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu. Rev. Med.*, v.57, p.553-574, 2006.

DI MARZO, V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nature Reviews Drug Discovery*. 7:438-55, 2008.

DINH, T.P.; FREUND, T.F.; PIOMELLI, D. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids*.121(1-2):149-58. 2002.

DINH, T. P.; CARPENTER, D.; LESLIE, F. M.; FREUND, T. F.; KATONA, I.; SENSI, S. L.; KATHURIA, S.; PIOMELLI, D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 10819-24, 2002.

DOAK, G.J., SAWYNOK, J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience*.939-49. 1997

DOGRUL, A.; SEYREK, M.; YALCIN, B.; ULUGOL, A. Involvement of descending serotonergic and noradrenergic pathways in CB1 receptor-mediated antinociception. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 38(1):97-105. 2012.

DUARTE, I. D.; DOS SANTOS, I. R.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H.. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol*, v.217, p.225-227, 1992.

DUARTE, I. D.; FERREIRA, S. H.. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, v.221, n.1, p.171-4, 1992.

ERSPAMER, V.; ASERO, B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*, v.169, n.4306, p.800-1. 1952.

FEIN, A. Nociceptors and the perception of pain. In. University of Connecticut Health Center. 153 p., 2012.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nature New Biology* 204: 200-203, 1972.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M.; DE ABREU CASTRO, M. S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins*, v.16, n.1, p.31-7, 1978.

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, 1979b.

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. *Eur. J. Pharmacol*, v.201, p.121-122, 1991.

FIELDS, H. L., BASBAUM, A. I., CLANTON, C. H., ANDERSON, S. D. Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. *Brain Res.* 126(3):441-53. 1977.

FIELDS, H. L. Sources of variability in the sensation of pain. *Pain* 33: 195-200. 1988.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: *Melzack & Wall Text Book of Pain*, pg. 243-257. 1999.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I.; HEINRICHER, M. M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: *Textbook of Pain*, 5<sup>a</sup> ed, Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 125–42. 2006.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res. Bull.*, v.48, p.129-41, 1999.

GERARD, C. M.; MOLLEREAU, C.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem. J.*, v. 279, p.129-34, 1991.

GIORDANO, J.; ROGERS, L. V. Peripherally administered serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists reduce inflammatory pain in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, v.170, n.1-2, p.83-6, 1989.

GRANADOS-SOTO, V.; ARGUELLES, C. F.; ROCHA-GONZALEZ, H. I.; GODINEZ-CHAPARRO, B.; FLORES-MURRIETA, F. J.; VILLALON, C. M. The role of peripheral 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> and 5-HT<sub>1F</sub> serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats. *Neuroscience*, v.165, n.2, p.561-8, Jan 20. 2010.

GREEN, A. F.; YOUNG, P. A. A comparison of heat and pressure analgesiometric methods in rats. *Brit. J. Pharmacol.*, v.6, p.572-585, 1951.

GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. The Endocannabinoid System and Pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, v.8, n.6, p.403-421, 2009.

GUINDON, J.; GUIJARRO, A.; PIOMELLI, D.; HOHMANN, A. G. Peripheral antinociceptive effects of inhibitors of monoacylglycerol lipase in a rat model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol.* 163(7):1464-78. 2011.

GUZZO, L. S. Mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo periférico dos diterpenos do café: cafestol e caveol. 2012. Tese (Doutorado em Farmacologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

HAJHASHEMI, V.; AMIN, B. Effect of glibenclamide on antinociceptive effects of antidepressants of different classes. *Clinics.* 66(2):321-5. 2011.

HANNON, J.; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res*, v.195, n.1, p.198-213, Dec 16. 2008.

HARDISTY, R. M.; STACEY, R. S. 5-Hydroxytryptamine in normal human platelets. *J Physiol*, v.130, n.3, p.711-20. 1955.

HAWS, C. M.; HEINRICHER, M. M.; FIELDS, H. L. Alpha-adrenergic receptor agonists, but not antagonists, alter the tail-flick latency when microinjected into the rostral ventromedial medulla of the lightly anesthetized rat. *Brain Res*.533(2):192-5. 1990.

HOHMANN, A. G.; HERKENHAM, M. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience* v.92(4) p. 1171-1175, 1999.

HOJO, M.; SUDO, Y.; ANDOY, MINAMI, K.; TAKADA, M.; MATSUBARA, T.; KANAIDE, M.; TANIYAMA, K.; SUMIKAWA, K.; UEZONO, Y.  $\mu$ -Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: electrophysiological and FRET assay analysis. *JPharmacol Sci* 108, 308–19. 2008.

HOLDCROFT, A.; JAGGAR, S. *Core Topics in Pain*. New York: Cambridge University Press. 345p. 2005.

HOWLETT, A. C.; BARTH, F.; BONNER, T. I.; CABRAL, G.; CASELLAS, P.; DEVANE, W. A.; FELDER, C. C.; HERKENHAM, M.; MACKIE, K.; MARTIN, B. R.; MECHOULAM, R.; PERTWEE, R. G.. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.*, v.54, p.161-202, 2002.

HOYER, D.; CLARKE, D. E.; FOZARD, J. R.; HARTIG, P. R.; MARTIN, G. R.; MYLECHARANE, E. J.; SAXENA, P. R.; HUMPHREY, P. P. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.*, v.46, n.2, p.157-203, 1994.

HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R.. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.71, n.4, p.533-54, 2002.

HUMPHREY, J. H.; JAQUES, R. The histamine and serotonin content of the platelets and polymorphonuclear leucocytes of various species. *J Physiol*, v.124, n.2, p.305-10, May 28. 1954.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci*, v.2, n.2, p.83-91. 2001.

IACOPUCCI, A. P.; MELLO, R. O.; BARBOSA-SILVA, R.; MELO-THOMAS, L. L. NOarg-induced catalepsy can be influenced by glutamatergic neurotransmission mediated by NMDA receptors in the inferior colliculus. *Behavioural Brain Research*, v.234, n.2, p.149-154, 2012.

IASP (International Association for the Study of Pain), 1979. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org>>. Acesso em: 15 maio de 2015.

IBRAHIM, M. M.; PORRECA, F.; LAI, J.; ALBRECHT, P.J.; RICE, F.L.; KHODOROVA, A.; DAVAR, G.; MAKRIYANNIS, A.; VANDERAH, T.W.; MATA, H.P.; MALAN JR, T. P. CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *PNAS*, v.102, n.8, p.3093-3098, 2005.



INDO, Y.; MARDY, S.; MIURA, Y.; MOOSA, A.; ISMAIL, E. A.; TOSCANO, E.; ANDRIA, G.; PAVONE, V.; BROWN, D. L.; BROOKS, A.; ENDO, F.; MATSUDA, I. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): novel mutations of the TRKA (NTRK1) gene, a putative uniparental disomy, and a linkage of the mutant TRKA and PKLR genes in a family with CIPA and pyruvate kinase deficiency. *Human Mutation*. 18: 308-18, 2001.

JAGGAR, S.I., HASNIE. F.S., SELLATURAY, S., RICE, A.S. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain*. 76(1-2):189-99. 1998.

JANEWAY, T.; RICHARDSON, H. & PARK, E. Experiments on the vasoconstrictor action of blood serum. *Arch Intern Med*, v.21, p.565–571. 1918.

JENSEN, K.; TUXEN, C.; PEDERSEN-BJERGAARD, U.; JANSEN, I.; EDVINSSON, L.; OLESEN, J. Pain, wheal and flare in human forearm skin induced by bradykinin and 5-hydroxytryptamine. *Peptides*, v.11, n.6, p.1133-8. 1990.

JIN, X. H.; UYAMA, T.; WANG, J.; OKAMOTO, Y.; TONAI, T.; UEDA, N. cDNA cloning and characterization of human and mouse Ca(2+)-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1791: 32-8. 2009

JONES, S. L. Anatomy of pain. In: Sinatra, R. S.; Hord, A. H.; Ginsberg, B.; Preble, L. *Acute Pain: Mechanisms & Management*. St Louis: Mosby-Year Book. 1992

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 413. 2001.

KASSUYA, C. A.; FERREIRA, J.; CLAUDINO, R. F.; CALIXTO, J. B. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Br J Pharmacol.* 150(6):727-37. Epub 2007.

KAWABATA, A.; NISHIMURA, Y.; TAKAGI, H.. L-leucyl-L-arginine, naltrindole and D-arginine block antinociception elicited by L-arginine in mice with carrageenin-induced hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, v.107, n.4, p.1096-101, 1992.

KAWABATA, A. Prostaglandin E2 and pain--an update. *Biol Pharm Bull.*34(8):1170-3. 2011.

KELLY, S.; CHAPMAN. V. Selective cannabinoid CB1 receptor activation inhibits spinal nociceptive transmission in vivo. *J Neurophysiol.* v.86, p. 3061-4, 2001.

KELM, M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1411, 273–89. 1999

KESIM, M.; DUMAN, E. N.; KADIOGLU, M.; YARIS, E.; KALYONCU, N. I.; ERCIYES, N. The different roles of 5-HT(2) and 5-HT(3) receptors on antinociceptive effect of paroxetine in chemical stimuli in mice. *J Pharmacol Sci*, v.97, n.1, p.61-6. 2005.

KIEFFER, B. L.; GAVERIAUX-RUFF, C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol*; v. p. 285-306, 2002.

KIM, H. W.; KWON, Y. B.; HAN, H. J.; YANG, I. S.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. Antinociceptive mechanisms associated with diluted bee venom acupuncture (apipuncture) in the rat formalin test: involvement of descending adrenergic and serotonergic pathways. *Pharmacol Res.* 2:183-8. 2005

KIMURA, M.; OBATA, H.; SAITO, S. Peripheral nerve injury reduces analgesic effects of systemic morphine via spinal 5-hydroxytryptamine 3 receptors. *Anesthesiology*. 121(2):362-71. 2014.

KO, M. L., KING M. A., GORDIN T. L., CRISP T. The effects of aging on spinal neurochemistry in the rat. *Brain. Res. Bull.* 42:95-8. 1997.

KOIZUMI, H.; YASUI, C.; FUKAYA, T.; OHKAWARA, A.; UEDA, T. Beta-adrenergic stimulation induces intracellular Ca<sup>++</sup> increase in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 96:234-7. 1991.

KUMAZAWA, T. Functions of the nociceptive primary neurons. *Jpn J Physiol* 40, 1–14. 1990.

LAMBERT, D. M.; FOWLER, C. J. The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J. Med. Chem.*, v.48, n16, p.5059-87, 2005.

LANGFORD, D. J.; BAILEY, A. L.; CHANDA, M. L.; CLARKE, S. E.; DRUMMOND, T. E.; ECHOLS, S.; GLICK, S.; INGRAO, J.; KLASSEN-ROSS, T.; LACROIX-FRALISH, M.L.; MATSUMIYA, L.; SORGE, R.E.; SOTOCINAL, S.G.; TABAKA, J.M.; WONG, D.; VAN DEN MAAGDENBERG, A.M.; FERRARI, M.D.; CRAIG, K.D.; MOGIL, J.S. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods*. 7(6):447-9. 2010.

LAWSON, S. N. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C, A $\delta$  or A $\alpha$ / $\beta$  fibres. *Experimental Physiology*. 87(2): 239-244, 2002.

LICHTMAN, A. H.; COOK, S. A.; MARTIN, B. R.. Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.276, p.585-93, 1996.

LIMA, D.; ALMEIDA, A. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. *Progress in Neurobiology*. 66: 81-108, 2002.

LIU, X.Y.; WU, S.X.; WANG, Y.Y.; WANG, W.; ZHOU, L.; LI, Y.Q. Changes of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by bee venom-induced inflammatory pain. *Neurosci Lett* 375:42–46. 2005.

LONG, J. Z.; LI, W.; BOOKER, L.; BURSTON, .J. J.; KINSEY, S. G.; SCHLOSBERG, J. E.; PAVÓN, F. J.; SERRANO, A. M.; SELLEY, D. E.; PARSONS, L. H.; LICHTMAN, A. H.; CRAVATT, B. F. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol*. (1):37-44. 2009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, A. L.; FARR, A. L.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193:265-275, 1951.

LUAN, Y.; XU, W. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Current Medicinal Chemistry*, v. 14, n.6, p. 639-647, 2007.

MACCARRONE, M.; DI RIENZO, M.; BATTISTA, N.; GASPERI, V.; GUERRIERI, P.; ROSSI, A.; FINAZZI-AGRÒ, A. The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. *J Biol Chem*. 278:33896-903. 2003.

MAEGAWA, F.A.; TONUSSI, C.R. The L-arginine/nitric oxide/cyclic-GMP pathway apparently mediates the peripheral antihyperalgesic action of fentanyl in rats. *Braz J Med Biol Res* 36, 1701–7. 2003.

MALAN, T. P. JR.; IBRAHIM, M. M.; DENG, H.; LIU, Q.; MATA, H.P.; VANDERAH, T.; PORRECA, F.; MAKRIYANNIS, A. CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain*. 93(3):239-45. 2001.

MALDONADO, R.; VALVERDE, O. Participation of the opioid system in cannabinoid-induced antinociception and emotional-like responses. *Eur Neuropsychopharmacol*. 13(6):401-10. 2003.

MALLET, C.; DAULHAC, L.; BONNEFONT, J.; LEDENT, C.; ETIENNE, M.; CHAPUY, E.; LIBERT, F.; ESCHALIER A. Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain*. 139(1):190-200. 2008.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C.; BONNER, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, v. 346, p. 561-64. 1990.

MAZZARI, S.; CANELLA, R.; PETRELLI, L.; MARCOLONGO, G.; LEON, A. N-(2-hydroxyethyl) hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol*. 300(3):227-36. 1996.

MCISAAC, W.; PAGE, I. H. The metabolism of serotonin (5-hydroxytryptamine). *J Biol Chem*, v.234, n.4, p.858-64, Apr. 1959.

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

MELZACK, R.; WALL, P. D.. Pain mechanisms: a new theory. *Science*, v.19, n.150, p.971-979, 1965.

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

MEYER, R. A.; MATTHIAS, R.; CAMPBELL, J. N.; RAJA, N. S. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: Wall, P. D, Melzack, R. editors. *Textbook of pain*. 5<sup>th</sup> edition. Edinburgh, UK: Elsevier Churchill Livingstone; 3-34 p. 2006.

MICHAELSON, I. A.; WHITTAKER, V. P. The subcellular localization of 5-hydroxytryptamine in guinea pig brain. *Biochem Pharmacol*, v.12, p.203-11. 1963.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*. 57:1-164, 1999.

MILLAN, M. J.. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol*, v.66, p.355-474, 2002.

MILLER, K. J.; HOFFMAN, B. J. Adenosine A3 receptors regulate serotonin transport via nitric oxide and cGMP. *J Biol Chem* 269:27351–27356. 1994.

MOHAMMAD-ZADEH, L. F.; MOSES, L.; GWALTNEY-BRANT, S. M.. Serotonin: a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, v.31, n.3, p.187-99, 2008.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A.. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, v.43, p.109-142, 1991.

MOUSA, S. A.; ZHANG, Q.; SITTE, N.; JI, R-R.; STEIN, C.  $\beta$ -Endorphin-containing memory-cells and  $\mu$ -opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *Journal of Neuroimmunology*, v.115, n.1-2, p.71-78, 2001.

NASCIMENTO, E. B. Jr.; Avaliação do papel da 5-hidroxitriptamina (5HT) no processamento periférico da resposta nociceptiva, 2011. Teses (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.2011.

NICHOLS, C. G.; LEDERER, W. J. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology*, v.261, n.6 Pt 2, p. H1675-H1690, 1991.

NICHOLSON, R.; SMALL, J.; DIXON, A. K.; SPANSWICK, D.; LEE, K. Serotonin receptor mRNA expression in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 337:119–122. 2003.

NIKAI, T.; BASBAUM, A.I.; AHN, A.H. Profound reduction of somatic and visceral pain in mice by intrathecal administration of the anti-migraine drug, sumatriptan. *Pain*. 139:533–540. 2008.

NOGUCHI, T.; NISHINO, M.; KIDO, R. Tryptophan 5-hydroxylase in rat intestine. *Biochem J*, v.131, n.2, p.375-80. 1973.

OKAMOTO, K.; IMBE, H.; TASHIRO, A.; KUMABE, S.; SENBA, E. Blockade of peripheral 5HT<sub>3</sub> receptor attenuates the formalin-induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat. *Neurosci. Lett.*, v.367, n.2, p.259-63. 2004.

OLIVEIRA, C.C. Avaliação dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da fração hidroalcoólica e da substância isolada, peltatosídeo, provenientes das folhas de *Annona crassiflora* Mart. em camundongos. Belo Horizonte, 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 2015.

ORTIZ, M.I.; CASTRO-OLGUÍN, J.; PEÑA-SAMANIEGO, N.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G. Probable activation of the opioid receptor-nitric oxide-cyclic GMP-K<sup>+</sup> channels pathway by codeine. *Pharmacol Biochem Behav* 82, 695–703. 2005.

PACHECO, D. F.; DUARTE I. D. G. Delta-opioid receptor agonist SNC80 induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Eur J Pharmacol.* v.512(1), p. 23-82, 2005.

PACHECO, D.; KLEIN, A.; PEREZ, C.; PACHECO, C. M.; FRANCISCHI, J. N.; DUARTE, I. D. G.. The  $\mu$ -opioid receptor agonist morphine, but not agonists at  $\delta$  or  $\kappa$ -opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.*, v.154, p.1143-1149, 2008.

PACHECO, D. F.; KLEIN, A.; PEREZ, A. C.; PACHECO, C. M. F.; FRANCISCHI, J. N. REIS, G. M. L.; DUARTE, I. D. G. Central antinociception induced by  $\mu$ -opioid receptor agonist morphine, but not  $\delta$ -or  $\kappa$ -, is mediated by cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol* 158, 225–31. 2009

PACHECO, D. F.; PACHECO, C. M.; DUARTE, I. D. G. Peripheral antinociception induced by  $\delta$ -opioid receptors activation, but not  $\mu$ - or  $\kappa$ -, is mediated by Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels. *Eur J Pharmacol* 15, 255–9. 2012.



PACHER, P.; BATKAI, S.; KUNOS, G.. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Ver.*, v.58, p.389-462, 2006.

PAPADOPOLOU, S., HARTMANN, P., LIPS, K.S., KUMMER, W., HABERBERGER, R.V. Nicotinic receptor mediated stimulation of NO-generation in neurons of rat thoracic dorsal root ganglia. *Neuroscience Letters*, v.361, n.1-3, p.32-35, 2004.

PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience*, v.102, n.4, p.937-44. 2001.

PENG, Y. B.; LIN, Q.; WILLIS, W. D.. The role of 5-HT<sub>3</sub> receptors in periaqueductal gray-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.276, n.1, p.116-24, 1996.

PERTWEE, R. G. Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert Opin Investig Drugs*. 1553-71. 2000.

PERTWEE, R. G.; ROSS, R. A. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66, 101–21. 2002.

PIERCE, P. A.; XIE, G. X.; PEROUTKA, S. J.; LEVINE, J. D. Dual effect of the serotonin agonist, sumatriptan, on peripheral neurogenic inflammation. *RegAnesth*, v.21, n.3, p.219-25. 1996.

PIERCE, P. A.; XIE, G. X.; LEVINE, J. D.; PEROUTKA, J. 5-hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70:553–559. 1996a

PIOMELL, D. The endocannabinoid system: a drug discovery perspective. *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, v.6, p.672-679, 2005.

PROUDFIT, H. K. Pharmacologic evidence for the modulation of nociception by noradrenergic neurons. *Progr. Brain. Res.*, v.77, p.357-370, 1988.

QUARTILHO, A.; MATA, H. P.; IBRAHIM, M. M.; VANDERAH, T. W.; PORRECA, F.; MAKRIYANNIS, A.; MALAN, P. Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB<sub>2</sub> cannabinoid receptors. *Anesthesiology*, v.99, n.4, p.955-960, 2003.

RÁCZ, I.; BILKEI-GORZO, A.; MARKERT, A.; STAMER, F.; GÖTHERT, M.; ZIMMER, A. Anandamide effects on 5-HT(3) receptors in vivo. *Eur J Pharmacol.* 596(1-3):98-101. 2008.

RANDALL, L. D.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, v.113, p.223-249, 1957.

RANG, H. P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. *Br. Med. Bull.* 47: 534-48. 1991.

RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A.; PAGE, I. H. Crystalline Serotonin. *Science*, v.108, n.2804, p.329-30. 1948a.

RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A.; PAGE, I. H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem*, v.176, n.3, p.1243-51.1948b.

RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A.; PAGE, I. H. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J Biol Chem*, v.174, n.2, p.735-41. 1948c.

REBOUÇAS, E. C.; SEGATO, E.N.; KISHI, R.; FREITAS, R. L.; SAVOLDI, M.; MORATO, S.; COIMBRA, N. C. Effect of the blockade of mu1-opioid and 5HT2A-serotonergic/alpha1-noradrenergic receptors on sweet-substance-induced analgesia. *Psychopharmacology*. 179(2):349-55. 2005.

REID, G. & BICK, M. Pharmacologically active substances in serum. *Aust J Exp Biol Med Sci*, v.20, p.33–46. 1942.

REID, G.; RAND, M. Pharmacological actions of synthetic 5-hydroxytryptamine (serotonin, thrombocytin). *Nature*, v.169, n.4306, p.801-2. 1952.

REIS, G. M.; PACHECO, D.; PEREZ, A. C.; KLEIN, A.; RAMOS, M. A.; DUARTE, I. D. G. Opioid receptor and NO/cGMP pathway as a mechanism of peripheral antinociceptive action of the cannabinoid receptor agonist anandamide. *Life Sci*. v. 85, p. 351-356. 2009.

REIS, G. M.; RAMOS, M. A.; PACHECO, D. F.; KLEIN, A.; PEREZ, A. C.; DUARTE, I. D. G. Endogenous cannabinoid receptor agonist anandamide induces peripheral antinociception by activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Life Sciences*, v. 88, n.15-16, p.653-657. 2011.

REUTOV, V. P.; SOROKINA, E. G. NO-synthase and nitrite-reductase components of nitric oxide cycle. *Biochemistry* 63, 874–84. 1998.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*, v.164, n.3878, p.444-445, 1969.

RIOS, C.; GOMES, I.; DEVI, L. A.  $\mu$  opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br J Pharmacol* 148, 387–95. 2006.

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

ROBLES, L. I.; BARRIOS, M.; DEL POZO, E.; DORDAL, A.; BAEYENS, J. M. Effects of K<sup>+</sup> channel blockers and openers on antinociception induced by agonists of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Eur J Pharmacol*. 81-8. 1996.

ROCHA-GONZÁLEZ, H.I.; MENESES, A.; CARLTON, S.M.; GRANADOS-SOTO, V. Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors in the formalin test. *Pain* 117:182–192. 2005.

RODRIGUES, A. R. A.; DUARTE, I. D. G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *British Journal of Pharmacology*, v.129, n.1, p.110-114, 2000.

ROMERO, T. R. L.; DUARTE, I. D. G.  $\alpha$ 2-Adrenoceptor agonist xylazine induces peripheral antinociceptive effect by 3 activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat. *Eur. J. Pharmacol*, v.613, n.1-3, p.64-67, 2009.

ROMERO, T. R.; PEREZ, A. C.; DE FRANCISCHI, J. N.; DUARTE, I. D. G. Probable involvement of alpha(2C)-adrenoceptor subtype and endogenous opioid peptides in the peripheral antinociceptive effect induced by xylazine. *Eur J Pharmacol*. 2009.

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

ROMERO, T. R.; RESENDE, L. C.; DUARTE, I. D. G. The neuronal NO synthase participation in the peripheral antinociception mechanism induced by several analgesic drugs. *Nitric Oxide*, v.25, n.4, p.431-435, 2011.

ROMERO, T. R. L.; GALDINO, G. S.; SILVA, G. C.; RESENDE, L. C.; PEREZ, A. C.; CORTES, S. F.; DUARTE, I. D. G. Involvement of the L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in peripheral antinociception induced by N-palmitoyl-ethanolamine in rats. *Journal of Neuroscience Research*, v. 90, n.7, 1474-1479, 2012a.

ROMERO, T. R. L.; DUARTE, I. D. G. N-Palmitoyl-ethanolamine (PEA) induces peripheral antinociceptive effect by ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel activation. *Journal of Pharmacological Sciences*, v.118, n.2, p.156-160, 2012b.

ROMERO, T. R.; RESENDE, L. C.; GUZZO, L. S.; DUARTE, I. D. G. CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonists induce peripheral antinociception by activation of the endogenous noradrenergic system. *Anesth Analg*.116(2):463-72. 2013.

SACHS, D.; VILLARREAL, C. F.; CUNHA, F. Q.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H. The role of PKA and PKC $\epsilon$  pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. *Br J Pharmacol* 156, 826–34. 2009.

SANTOS, C. M. F.; FRANCISCHI, J.N.; LIMA-PAIVA, P.; SLUKA, K. A. ; RESENDE, M. A. . Effect of transcutaneous electrical stimulation on nociception and edema induced by peripheral serotonin. *International Journal of Neuroscience*, 2013.

SASAKI, M.; ISHIZAKI, K.; OBATA, H.; GOTO, F. Effects of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test. *Eur J Pharmacol*, v.424, n.1, p.45-52. 2001.

SASAKI, M.; OBATA, H.; SAITO, S.; GOTO, F. Antinociception with intrathecal alpha-methyl-5-hydroxytryptamine, a 5-hydroxytryptamine 2A/2C receptor agonist, in two rat models of sustained pain. *Anesth Analg*. 96:1072–1078. 2003.

SASAKI, M.; OBATA, H.; KAWAHARA, K.; SAITO, S.; GOTO, F. Peripheral 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonism attenuates primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia after thermal injury in rats. *Pain*, v.122, n.1-2, p.130-6. 2006.

SANDERS-BUSH, E.; HAZELWOOD, L. 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) and Dopamine. In: BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. (Eds.). *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12th ed. New York: McGraw-Hill. cap. 13, p. 335-361. 2011.

SANDLER, M.; REVELEY, M. A.; GLOVER, V. Human platelet monoamine oxidase activity in health and disease: a review. *J Clin Pathol*, v.34, n.3, p.292-302. 1981.

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

SEIERSTAD, M.; BREITENBUCHER, J. G. Discovery and development of fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 51: 7327-43, 2008.

SEYREK, M.; KAHRAMAN, S.; DEVECI, M.S; YESILYURT, O.; DOGRUL, A. Systemic cannabinoids produce CB<sub>1</sub>- mediated antinociception by activation of

descending serotonergic pathways that act upon spinal 5-HT(7) and 5-HT(2A) receptors. *Eur J Pharmacol.* 649:183-94. 2010.

SHERRINGTON, C. S. *The integrative action of the nervous system.* New York: CScribner and Sons. 1906.

SLOMINSKI, A. T.; ZMIJEWSKI, M. A.; ZBYTEK, B.; BROZYNA, A. A., GRANESE, J.; PISARCHIK, A.; SZCZESNIEWSKI, A.; TOBIN, D. J. Regulated proenkephalin expression in human skin and cultured skin cells. *The Journal of Investigative Medicine*, v.131, n.3, p.613-622, 2011.

SMITH, H.S. Peripherally-acting opioids. *Pain Physician.* v. 2, p. 121-132, 2008.

SOARES, A. C.; LEITE, R.; TATSUO, M. A.; DUARTE, I. D. G. Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Eur. J. Pharmacol.*, v.400, v.1, p.67-71, 2000.

SOARES, A. C.; DUARTE, I. D. G. Dibutyl-*cyclic* GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K(+) channels in the rat PGE2-induced hyperalgesic paw. *Br. J. Pharmacol.*, v.134, p.127-131, 2001.

SOMMER, C. Is serotonin hyperalgesic or analgesic? *Curr Pain Headache Rep.* 10(2):101-6. 2006.

SORKIN, L. S.; MCADOO, D. J.; WILLIS, W. D. Raphe magnus stimulation-induced antinociception in the cat is associated with release of amino acids as well as serotonin in the lumbar dorsal horn. *Brain Res.* 618(1):95-108. 1993

SPRADLEY, J. M.;, GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. Inhibitors of monoacylglycerol lipase, fatty-acid amide hydrolase and endocannabinoid transport differentially

suppress capsaicin-induced behavioral sensitization through peripheral endocannabinoid mechanisms. *Pharmacol Res.*62(3):249-58. 2010.

STEIN, C.; HASSAN, A. H.; PRZEWŁOCKI, R.; GRAMSCH, C.; PETER, K.; HERZ, A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.87, n.15, p.5935-3939, 1990.

STEIN, C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *The New England Journal of Medicine*, v.332, n.25, p.1685-1690, 1995.

STEIN, C.; LANG, L. J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr Opin.* 2009.

STEIN, C., MACHELSKA, H. Modulation of peripheral sensory neurons by the immune system: Implications for pain therapy. *Pharmacological Reviews*, v.63, n.4, p.860-881, 2011.

SUFKA, K. J.; SCHOMBURG, F. M.; GIORDANO, J..Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.41, n.1, p.53-6, 1992.

TABER, R. I.; LATRANYI, M. B. Antagonism of the analgesic effect of opioid and non-opioid agents by p-chlorophenylalanine (PCPA). *Eur. J. Pharmacol.*, v.75, n.4, p.215-222, 1981.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. *Neuroscience*, v.48, n.2, p.485-90, 1992.

TOH, C. C. Release of 5-hydroxytryptamine (serotonin) from the dog's gastrointestinal tract. *J Physiol*, v.126, n.2, p.248-54, Nov 29. 1954.



TOKUNAGA, A., SAIKA, M., SENBA, E. 5-HT<sub>2A</sub> receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. *Pain*. 76(3):349-55. 1998.

TOMINAGA, M.; OGAWA, H.; TAKAMORI, K. Possible roles of epidermal opioid systems in pruritus of atopic dermatitis. *The Journal of Investigative Medicine*, v.127, n.9, p.2228-2235, 2007.

TONG, J. H.; KAUFMAN, S. Tryptophan hydroxylase. Purification and some properties of the enzyme from rabbit hindbrain. *J Biol Chem*, v.250, n.11, p.4152-8. 1975.

TWAROG, B. M.; PAGE, I. H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol*, v.175, n.1, p.157-61. 1953.

TYCE, G. M. Origin and metabolism of serotonin. *J Cardiovasc Pharmacol*, v.16 Suppl 3, p.S1-7. 1990.

VAN SICKLE, M. D.; DUNCAN, M.; KINGSLEY, P. J.; MOUIHATE, A.; URBANI, P.; MACKIE, K.; STELLA, N.; MAKRIYANNIS, A.; PIOMELLI, D.; DAVISON, J. S.; MARNETT, L. J.; DI MARZO, V.; PITTMAN, Q. J.; PATEL, K. D.; SHARKEY, K. A. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors. *Science*. 310: 329-332, 2005.

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

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog. Neurobiol.* v.64, p. 327-63, 2001.

VELOSO, C. C. Avaliação farmacológica de extratos de *Maytenus imbricata* Mart. ex. reissek em modelos de inflamação, dor e obesidade. Belo Horizonte, 2014. Tese (Doutorado em Farmacologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; JOHNSTON, P.R.; VENABLE, A.L.; MCKENZIE, K.K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed Proc* 46,118–26. 1987.

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

WATKINS, L. R.; MAYER, D. J. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. *Science* 216: 1185-1192. 1982.

WEI, H.; CHEN, Y.; HONG, Y. The contribution of peripheral 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor to carrageenan-evoked hyperalgesia, inflammation and spinal Fos protein expression in the rat. *Neuroscience*, v.132, n.4, p.1073-82. 2005.

WINTZEN, M., GILCHREST, B.A. Proopiomelanocortin, its derived peptides, and the skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, v.106, n. 1, p.3-10, 1996.

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

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

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

WU, S.; ZHU, M.; WANG, W.; WANG, Y.; LI, Y.; YEW, D. T. Changes of the expression of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by complete Freund's adjuvant-induced inflammation. *Neurosci Lett*, v.307, n.3, p.183-6, Jul 20. 2001.

XIE, D.J.; UTA, D.; FENG, P. Y.; WAKITA, M.; SHIN, M.C.; FURUE, H.; YOSHIMURA, M. Identification of 5-HT receptor subtypes enhancing inhibitory transmission in the rat spinal dorsal horn in vitro. *Mol Pain*. 8:58. 2012.

YOSHIDA, T.; KANO, M.; WATANABE, M.; YOSHIOKA, M. The interaction between serotonergic and cannabinoidergic modulations involved in the fear extinction. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 33(3):95-9. 2013.

YOSHIKAWA, S.; HAREYAMA, N.; IKEDA, K.; KUROKAWA, T.; NAKAJIMA, M.; NAKAO, K.; MOCHIZUKI, H.; ICHINOSE, H. Effects of TRK-820, a selective kappa opioid receptor agonist, on rat schizophrenia models. *Eur J Pharmacol*. 606(1-3):102-8. 2009.

ZEITZ, K. P.; GUY, N.; MALMBERG, A. B.; DIRAJLAL, S.; MARTIN, W. J.; SUN, L.; BONHAUS, D. W.; STUCKY, C. L.; JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. The 5-HT<sub>3</sub> subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci*, v.22, n.3, p.1010-9. 2002.

ZIEHER, L. M.; DE ROBERTIS, E. Subcellular localization of 5-hydroxytryptamine in rat brain. *Biochem Pharmacol*, v.12, p.596-8. 1963.

ZUCKER, M. A study of the substances in blood serum and platelets which stimulate smooth muscle. *Am J Physiol*, v.142, p.12–26. 1944.

## Anexo I



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 50 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Estudo sobre a participação de mediadores inflamatórios na modulação endógena da dor periférica.", que tem como responsável thiago roberto lima romero, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 04/06/2013. Este certificado expira-se em 04/06/2018.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 50 / 2013, related to the Project entitled "Participation of inflammatory mediators in the peripheral endogenous pain modulation", under the supervision of thiago roberto lima romero, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 04/06/2013. This certificate expires in 04/06/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 04/06/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@ppq.ufmg.br](mailto:cetea@ppq.ufmg.br)