

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ELIAS BORGES DO NASCIMENTO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA 5-HIDROXITRIPTAMINA (5-HT) NO  
PROCESSAMENTO PERIFÉRICO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA**

Belo Horizonte

2011

ELIAS BORGES DO NASCIMENTO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA 5-HIDROXITRIPTAMINA (5-HT) NO  
PROCESSAMENTO PERIFÉRICO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Márcio M. Coelho.

Belo Horizonte

2011

N244a Nascimento Júnior, Elias Borges do  
Avaliação do papel da 5-hidroxitriptamina (5-HT) no  
processamento periférico da resposta nociceptiva / Elias Borges do  
Nascimento Júnior – 2011.  
79 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Márcio M. Coelho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas.

1. Serotonina – Teses. 2. Neuroreguladores – Teses. 3. Dor  
– Teses. 4. 5-hidroxitriptamina (5-HT) – Teses. 5. Receptores  
serotoninérgicos periféricos – Teses. 6. Farmacologia – Teses. I.  
Coelho, Márcio de Matos. II. Universidade Federal de Minas Gerais.  
Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 615.1

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elias e Zuzinha, minha irmã Saile e cunhado Eudes, meus tios Marley e Rose, Ribamar e Solimar e a toda minha família pelo amor, pelo apoio e por sempre estarem presentes;

Aos amigos que aqui me acolheram e se tornaram minha família;

Ao Antônio Carlos e Graziely, pelo incentivo e por terem dividido comigo todas as etapas e emoções desse doutorado desde o seu início;

Ao Márcio, amigo e orientador, pela paciência que beira a santidade e pela contribuição imensurável em minha formação, que transcende aos ensinamentos acadêmicos;

Ao João Gabriel, Adriana, Marcela, Wallace e Leandro, pelo aprendizado que me proporcionaram e por terem me ajudado de forma responsável na condução desse estudo;

Ao Batista e Adelaide, pelo trabalho indispensável que desempenham na universidade e pela amizade engrandecedora;

Ao Breno Mello, Thiago Romero e Éder Moraes, pelas orientações e disponibilidade em experimentos fundamentais para a execução desse projeto;

Ao Dr. Bernd Fiebich e amigos do *Neurochemisches Labor I* (Brigitte, Lena, Johannes, Christian, Harsh e Vikram) em Freiburg, Alemanha, pela receptividade, pela oportunidade concedida e por terem sido protagonistas de um capítulo importante e especial da minha história;

A todos os meus professores, por tudo o que me ensinaram, incluindo o gosto pela docência.

## RESUMO

A 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) é uma amina vasoativa liberada principalmente por plaquetas (em humanos), mastócitos (em roedores) e células endoteliais. Exerce papel regulador do músculo liso no sistema cardiovascular e do trato gastrointestinal, participa da agregação plaquetária e atua como neurotransmissor do sistema nervoso central. Embora relacionada a uma série de processos fisiológicos e suas disfunções, os mecanismos e sítios de ação da 5-HT carecem de elucidação. Ferramentas farmacológicas e terapêuticas têm sido descobertas por meio da inibição seletiva de diferentes subtipos de receptores de 5-HT, encontrados em diferentes tecidos e envolvidos em condições dolorosas e inflamatórias. Apesar da existência de informações sobre o papel da 5-HT em nocicepção, a maior parte dos estudos está focada em seu papel no sistema nervoso central, enquanto que sua função em tecidos periféricos ainda não é clara. O objetivo desse estudo foi investigar o papel de 5-HT e de seus receptores no processamento periférico da resposta nociceptiva em camundongos. Inicialmente, foi demonstrada a presença de 5-HT em tecidos periféricos da pata posterior de camundongos, e que o RNAm para os receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> está presente no DRG mas não em material proveniente de patas. A administração intraplantar (i.pl.) de 5-HT (10, 20 ou 40 µg/pata; 10 µl) induziu comportamento de lambida de pata em camundongos. O pré-tratamento (-10 min; 10 µl; i.pl.) com ciproptadina (0,5 ou 5 µg; antagonista 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>), mianserina (0,1 µg; antagonista 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>6</sub>), isamoltano (0,5 ou 5 µg; antagonista 5-HT<sub>1B</sub>) ou cetanserina (0,1 ou 1 µg; antagonista 5-HT<sub>2A</sub>) reduziu de forma significativa o comportamento de lambida de pata induzido por 5-HT em camundongos. Quando administrados na pata contralateral, esses antagonistas não inibiram essa resposta, indicando que seu efeito é proveniente de ação local. BRL 15572 (1 ou 10 µg; antagonista 5-HT<sub>1D</sub>), ondansetrona (5 ou 20 µg; antagonista 5-HT<sub>3</sub>) ou SB 269970 (2,5 ou 25 µg; antagonista 5-HT<sub>7</sub>) não inibiram a resposta nociceptiva induzida por 5-HT. 5-HT (10, 20, 40, 80 µg; 20 µl; i.pl.) também induziu alodínia mecânica em camundongos. Essa resposta foi inibida pelo pré-tratamento (-10 min; 20 µl; i.pl.) com BRL 15572 (10 µg) ou SB 269970 (25 µg), mas não por isamoltano (5 µg; 20 µl; i.pl.) ou cetanserina (1 µg; 20 µl; i.pl.). Por outro lado, ondansetrona (20 µg; 20 µl; i.pl.) exacerbou a alodínia mecânica induzida por 5-HT em camundongos. Também foi investigado o efeito induzido por esses antagonistas sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos (100 µg; 20 µl; i.pl.). Nenhum dos antagonistas testados inibiu essa resposta. Entretanto, ondansetrona (20 µg; 20 µl; i.pl.) exacerbou a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos. Nossos resultados evidenciam o envolvimento de 5-HT no processamento periférico da resposta nociceptiva em camundongos pela demonstração de que (1) essa amina está presente em tecidos periféricos; (2) o RNAm para seus receptores é encontrado em DRG e (3) que antagonistas podem inibir ou exacerbam a resposta induzida por 5-HT ou carragenina. No que tange os receptores envolvidos, os resultados indicam um importante papel excitatório para os receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub>, de acordo com o modelo avaliado. Finalmente, nosso estudo representa a primeira demonstração de um papel inibitório atribuído aos receptores 5-HT<sub>3</sub> em tecidos periféricos em camundongos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Serotonina; 5-hidroxitriptamina; 5-HT; receptores serotoninérgicos periféricos; dor; nocicepção; camundongos

## ABSTRACT

5-Hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) is a cell-derived vasoactive amine, released primarily by platelets (in humans), mast cells (in rodents) and endothelial cells. It is a regulator of smooth muscle in the cardiovascular and gastrointestinal systems, an enhancer of platelet aggregation, and a neurotransmitter in the central nervous system. Although 5-HT is implicated in the regulation of a number of physiological processes and their malfunction, including those related to inflammation, the exact sites and mechanisms of its action are poorly defined. Pharmacological as well as therapeutic tools have been discovered by selectively targeting 5-HT receptor subtypes, which have been described in different tissues and demonstrated to be involved in painful and inflammatory conditions. The aim of this study was to investigate the role played by 5-HT and its receptors in the peripheral processing of the nociceptive response of mice. Initially, 5-HT was found in peripheral tissues (hind paw) and mRNA for 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> was found in the dorsal root ganglion, but not in the paw. Intraplantar (i.pl.) injections of 5-HT (10, 20 or 40 µg/paw; 10 µl) induced a nociceptive response in mice characterized by paw licking behavior. Pre-treatment (-10 min; 10 µl; i.pl.) with cyproheptadine (0.5 or 5 µg; 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> antagonist), mianserine (0.1 µg; 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>6</sub> antagonist), isamoltane (0.5 or 5 µg; 5-HT<sub>1B</sub> antagonist) or ketanserine (0.1 or 1 µg; 5-HT<sub>2A</sub> antagonist) significantly reduced the paw licking behavior induced by 5-HT. When injected at the contralateral paw, these antagonists did not reduce paw licking behavior induced by 5-HT, indicating that their effect results from local action. BRL 15572 (1 or 10 µg; 5-HT<sub>1D</sub> antagonist), ondansetron (5 or 20 µg; 5-HT<sub>3</sub> antagonist) or SB 269970 (2.5 or 25 µg; 5-HT<sub>7</sub> antagonist) did not inhibit the nociceptive response induced by 5-HT. 5-HT (10, 20, 40, 80 µg; 20 µl; i.pl.) also induced mechanical allodynia. This response was inhibited by pre-treatment (-10 min; 20 µl; i.pl.) with BRL 15572 (10 µg) or SB 269970 (25 µg), but not by isamoltane (5 µg; 20 µl; i.pl.) or ketanserine (1 µg; 20 µl; i.pl.). On the other hand, ondansetron (20 µg; 20 µl; i.pl.) increased mechanical allodynia induced by 5-HT. We also investigated the effects induced by these antagonists on the mechanical allodynia induced by carrageenan (100 µg; 20 µl; i.pl.). None of the antagonists inhibited this response. However, ondansetron (20 µg; 20 µl; i.pl.) increased mechanical allodynia induced by carrageenan. Our results provide support to the involvement of 5-HT in the peripheral nociceptive processing by demonstrating that (1) the amine is present in peripheral tissues; (2) mRNA for many of its receptors is found in the dorsal root ganglion and (3) antagonists inhibit or increases the response induced by 5-HT or carrageenan. Regarding the receptors involved, the results indicate an important excitatory role for 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors, depending on the nociceptive model evaluated. Finally, our study provides the first evidence of the inhibitory role of 5-HT<sub>3</sub> receptors at peripheral tissues in mice.

**KEYWORDS:** Serotonin; 5-hydroxytryptamine; 5-HT; peripheral serotonergic receptors; pain; nociception; mice

## LISTA DE FIGURAS

1	Síntese de 5-HT.....	14
2	Classificação, subtipos e mecanismos de transdução dos receptores de 5-HT.....	17
3	Aparato para avaliação do comportamento de lambida de pata.....	29
4	Algesímetro.....	31
5	Expressão de receptores 5-HT <sub>1B</sub> e $\beta$ -actina em tecido de pata de ratos.....	33
6	Expressão de receptores 5-HT <sub>1D</sub> e $\beta$ -actina em tecido de pata de ratos.....	34
7	Expressão de receptores 5-HT <sub>3</sub> e $\beta$ -actina em tecido de pata de ratos.....	34
8	Expressão de receptores 5-HT <sub>7</sub> e $\beta$ -actina em tecido de pata de ratos.....	34
9	Análise da expressão de genes codificadores de receptores de serotonina em gânglios da raiz dorsal e patas de camundongos por qPCR.....	35
10	Comportamento de lambida de pata induzido por 5-HT em camundongos.....	36
11	Efeito induzido por ciproptadina sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT em camundongos.....	38
12	Efeito induzido por mianserina sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT em camundongos.....	39
13	Efeito induzido por isamoltano sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT em camundongos.....	40
14	Efeito induzido por DMSO 2 ou 4% (A) ou BRL 15572 (B) sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT em camundongos.....	41
15	Efeito induzido por cetanserina sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT em camundongos.....	42
16	Efeito induzido por ondansetrona sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT em camundongos.....	43
17	Efeito induzido por SB 269970 sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT em camundongos.....	44
18	Curso temporal da sensibilização induzida por diferentes doses de 5-HT sobre o limiar para retirada de pata frente ao estímulo mecânico em camundongos.....	45
19	Efeito induzido por isamoltano sobre a alodínia mecânica induzida por 5-HT em camundongos.....	47
20	Efeito induzido por BRL 15572 sobre a alodínia mecânica induzida por 5-HT em camundongos.....	48
21	Efeito induzido por cetanserina sobre a alodínia mecânica induzida por 5-HT em camundongos.....	49
22	Efeito induzido por ondansetrona sobre a alodínia mecânica induzida por 5-HT em camundongos.....	50
23	Efeito induzido por SB 269970 sobre a alodínia mecânica induzida por 5-HT em camundongos.....	51
24	Curso temporal da sensibilização induzida por carragenina sobre o limiar para retirada de pata frente ao estímulo mecânico em camundongos.....	52
25	Efeito induzido por isamoltano sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos.....	54
26	Efeito induzido por BRL 15572 sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos.....	55
27	Efeito induzido por cetanserina sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos.....	56
28	Efeito induzido por ondansetrona sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos (A). Efeito induzido por ondansetrona sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (3h) em camundongos (B).....	57
29	Efeito induzido por SB 269970 sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos.....	58

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
1.1	Dor e nocicepção.....	8
1.2	Serotonina (5-HT).....	12
1.2.1	<u>Aspectos históricos</u> .....	12
1.2.2	<u>Síntese, armazenamento, liberação e metabolismo</u> .....	14
1.2.3	<u>Receptores: localização e efeitos</u> .....	16
1.2.4	<u>5-HT e nocicepção</u> .....	18
2	JUSTIFICATIVA.....	21
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	Objetivos específicos.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1	Animais.....	23
4.2	Drogas.....	23
4.3	Determinação da concentração de 5-HT em tecidos de pata de camundongos.....	24
4.4	Western Blot.....	24
4.4.1	<u>Preparo das amostras</u> .....	24
4.4.2	<u>Quantificação de proteínas</u> .....	25
4.4.3	<u>Eletroforese</u> .....	25
4.5	Reação de qPCR.....	26
4.5.1	<u>Preparo das amostras</u> .....	26
4.5.2	<u>Extração de RNA</u> .....	26
4.5.3	<u>Análise da expressão de receptores por PCR em tempo real</u> .....	27
4.6	Modelos Experimentais.....	29
4.6.1	<u>Comportamento de lambida de pata induzido por 5-HT em camundongos</u> .....	29
4.6.2	<u>Alodínia mecânica induzida por 5-HT ou carragenina</u> .....	30
5	PROTOCOLOS.....	31
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
7	RESULTADOS.....	33
7.1	Determinação da concentração de 5-HT em tecidos de pata de camundongos.....	33
7.2	Expressão de receptores de 5-HT em tecido de pata de ratos.....	33
7.3	Expressão de genes codificadores de receptores de 5-HT em camundongos.....	35
7.4	Comportamento de lambida de pata induzido por 5-HT em camundongos.....	36
7.5	Efeito induzido por antagonistas serotoninérgicos sobre o comportamento de lambida de pata induzido por 5-HT em camundongos.....	37
7.6	Alodínia mecânica induzida por 5-HT em camundongos.....	45
7.7	Efeito induzido por antagonistas serotoninérgicos sobre a alodínia mecânica induzida por 5-HT em camundongos.....	46
7.8	Alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos.....	52
7.9	Efeito induzido por antagonistas serotoninérgicos sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos.....	53
7.10	Resumo dos efeitos induzidos pelos antagonistas.....	59
8	DISCUSSÃO.....	60
9	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dor e nocicepção

A dor, definida pela *International Association for the Study of Pain (IASP)*, é uma experiência desagradável que envolve aspectos sensoriais, emocionais e cognitivos, estando associada a uma lesão real ou potencial. De uma forma geral, a resposta nociceptiva se inicia com a ativação de um grupo especial de neurônios sensoriais por estímulos nocivos térmicos, mecânicos ou químicos. Esses neurônios, também chamados nociceptores, conduzem informações para estruturas localizadas na medula espinhal ou no cérebro. Os corpos celulares desses neurônios estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (DRG), nodosos ou trigeminais, dependendo da parte do corpo que inervam. Os nociceptores diferem de outros grupos de neurônios sensoriais, principalmente, em relação ao limiar para ativação. Em situações normais, nas quais não há lesões de nervos ou processo inflamatório associado, os nociceptores apresentam limiar de ativação bem mais elevado do que aquele dos demais neurônios sensoriais. Durante o processo inflamatório ou lesão neurológica pode ocorrer diminuição do limiar para ativação dos nociceptores e o desenvolvimento de alodínia ou hiperalgesia. Para revisões sobre o assunto, *vide* CATERINA & JULIUS (2001), LEWIN *et al.* (2004), MILLAN (1999), RAJA *et al.* (1999) e SNIDER & McMAHON (1998).

Os nociceptores podem ser classificados quanto ao diâmetro de seus axônios, mielinização e velocidade de condução do potencial de ação. Os nociceptores denominados tradicionalmente como fibras C apresentam axônios de pequeno diâmetro, não mielinizados e conduzem o potencial de ação em menor velocidade, enquanto aqueles denominados fibras A $\delta$  apresentam axônios de maior diâmetro, mielinizados e maior velocidade de condução (JULIUS & BASBAUM, 2001; MILLAN, 1999). Quanto aos neurotransmissores produzidos e liberados, as fibras C podem ser classificadas em duas populações. Uma população contém peptídeos pró-inflamatórios como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e é regulada pelo fator de crescimento de nervo (NGF). A outra população, não peptidérgica, pode ser identificada por meio de métodos imunohistoquímicos pela presença de enzimas específicas. Essas duas populações

apresentam, também, diferenças nas projeções para o corno dorsal da medula espinhal. Apesar dessas diferenças estruturais e de conteúdo de neurotransmissores, acredita-se que não existem diferenças marcantes em relação aos tipos de estímulos que as ativam (SNIDER & McMAHON, 1998). Os nociceptores também podem ser classificados quanto ao aspecto funcional como sensíveis a estímulos térmicos, mecânicos, químicos ou de caráter polimodal. Apesar de todas as combinações de sensibilidade serem encontradas, os nociceptores polimodais, que respondem a todos os tipos de estímulos, são os mais comuns (HUNT & MANTYH, 2001).

Além da sensibilidade aos estímulos térmicos e mecânicos, os nociceptores podem ser ativados ou ter seu limiar para ativação reduzido na presença de vários mediadores químicos liberados durante o processo inflamatório. Como resultado dessas alterações, pode ocorrer comportamento nociceptivo espontâneo, hiperalgesia ou alodínia. Parte dos nociceptores sensíveis aos estímulos químicos normalmente é insensível aos estímulos térmicos e mecânicos. Esses nociceptores, chamados de silenciosos, são ativados apenas durante condições que induzem alterações marcantes do microambiente químico local, como aquelas associadas ao processo inflamatório (HUNT & MANTYH, 2001; XU *et al.*, 2000). Os mediadores inflamatórios também contribuem para as alterações vasculares que resultam no edema. Tais mediadores, atuando de maneira isolada, em combinações ou em seqüência, amplificam a resposta inflamatória e influenciam sua evolução (COLLINS, 1999).

Os mediadores inflamatórios originam-se do plasma ou das células. Os mediadores oriundos do plasma geralmente são encontrados em formas precursoras que devem ser ativadas por clivagens proteolíticas, a fim de adquirir suas propriedades biológicas. Os mediadores oriundos das células normalmente estão armazenados em grânulos intracelulares, que precisam ser secretados, ou são sintetizados em resposta ao estímulo inflamatório (COLLINS, 1999; RYAN & MAJNO, 1977).

No plasma, existem três sistemas principais que produzem mediadores que contribuem para as manifestações da resposta inflamatória. O sistema do complemento compreende várias proteínas que são encontradas em maior

concentração no plasma. Esse sistema pode ser ativado pelo complexo antígeno-anticorpo, bem como por produtos bacterianos e componentes de outros sistemas de proteínas do plasma. Os componentes desse sistema induzem aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia e opsonização e têm papel importante na imunidade inata e adaptativa para defesa contra microorganismos (BARRINGTON *et al.*, 2001; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

O sistema da coagulação também é composto por várias proteínas do plasma. Os fibrinopeptídeos são mediadores inflamatórios importantes e estão relacionados ao aumento dos efeitos das cininas em músculos lisos, à indução do extravasamento de plasma e à quimiotaxia dos neutrófilos. Os fragmentos biologicamente ativos liberados durante a proteólise da fibrina aumentam a permeabilidade vascular na pele e também induzem a migração dos neutrófilos (RYAN & MAJNO, 1977; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

O terceiro conjunto de mediadores de origem plasmática é representado pelas cininas, que são peptídeos que induzem vários efeitos vasculares e ativam ou sensibilizam nociceptores. A formação desses peptídeos depende da interação de proteínas do plasma (fator XII, pré-caliceína e cininogênio de alto ou de baixa massa molecular) com superfícies carregadas negativamente, como o colágeno e as membranas basais. O principal agente efetor do sistema das cininas é a bradicinina, um peptídeo com nove resíduos de aminoácidos que foi descoberto em 1949 por Rocha e Silva e colaboradores.

Mediadores inflamatórios de natureza protéica também contribuem para a indução dos sinais e sintomas da inflamação. Vários estudos demonstraram que as citocinas interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induzem sensibilização dos nociceptores e edema de pata em vários modelos experimentais (BUCKLEY *et al.*, 1991; DAVIS & PERKINS, 1994; DOUGLASS *et al.*, 1996; FUKUOKA *et al.*, 1994; HRUBEY *et al.*, 1991; PERKINS *et al.*, 1995). Da mesma forma, essas respostas podem ser induzidas por outros mediadores inflamatórios de natureza protéica como a SP, as neurocininas A e B, o NGF e o CGRP (ALVES *et al.*, 1999; AMANN *et al.*, 1995; BILEVICIUTE *et al.*, 1998; CHU *et al.*, 2000; INOUE *et al.*, 1996; LAM & YIP, 2000; WAJIMA *et al.*, 2000). Entre os mediadores de

natureza não protéica, o ATP (HAMILTON *et al.*, 1999; ZIGANSHINA *et al.*, 1996) e os aminoácidos excitatórios, como o glutamato (BEIRITH *et al.*, 2002; CAIRNS *et al.*, 2002), também contribuem para a indução dos sinais e sintomas da inflamação.

Os mediadores de origem celular contribuem de forma marcante para a indução de vários sinais e sintomas associados à inflamação. Esses mediadores pertencem a diferentes grupos químicos (aminas, lípidos, aminoácidos, proteínas), podendo ser encontrados pré-formados e armazenados em grânulos intracelulares ou serem produzidos sob demanda. Os seus efeitos resultam da interação com enzimas ou receptores específicos.

Entre os mediadores de origem celular, a histamina, uma amina formada a partir da histidina, tem importante papel na indução de alterações que se estabelecem de forma rápida, uma vez que está presente em grânulos e é rapidamente liberada por exocitose durante o processo inflamatório. Quase todos os tecidos contêm histamina, sendo os mastócitos a principal fonte (BROWN & ROBERTS II, 2003). A histamina interage com receptores específicos (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>) encontrados em diferentes tecidos. A liberação imediata da histamina faz com que essa amina seja considerada o principal mediador responsável pelo aumento da permeabilidade vascular na fase inicial do processo inflamatório (COLLINS, 1999).

Outro importante grupo de mediadores inflamatórios de origem celular, de natureza lipídica, inclui o fator de ativação plaquetária (FAP) e os eicosanóides, que são representados pelas prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) e leucotrienos (LTs) (RANG *et al.*, 2001). Diversos eicosanóides contribuem para o desenvolvimento de vários sinais e sintomas da resposta inflamatória. Estudos conduzidos em animais experimentais demonstraram que a injeção da PGE<sub>2</sub> induz vasodilatação local (WILLIAMS, 1979), o que aumenta o edema induzido por outros mediadores inflamatórios (WILLIAMS, 1982). Apesar da injeção intraplantar (i.pl.) da PGE<sub>2</sub> geralmente não causar comportamento nociceptivo espontâneo, esse eicosanóide induz alodínia mecânica e térmica (CHEN, *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 1978) e também aumenta a sensibilidade a outros estímulos inflamatórios (WHELAN *et al.*, 1991). As diferenças entre as respostas induzidas pela PGE<sub>2</sub> e pelos outros eicosanóides, bem como o uso dos agonistas e antagonistas seletivos, permitiram

identificar vários receptores para PGs: DP, EP, FP, IP e TP (DONG *et al.*, 1986; KEITH & SALAMA, 1987; KENNEDY *et al.*, 1982). Há evidências de que as alterações periféricas (vasodilatação, sensibilização de nociceptores *etc*) e centrais (febre, anorexia *etc*) induzidas pela PGE<sub>2</sub> podem resultar da interação desse eicosanóide com vários subtipos dos receptores EP (ARMSTRONG *et al.*, 1995; KOBAYASHI & NARUMIYA, 2002).

## **1.2 Serotonina (5-HT)**

Entre os mediadores de origem celular, um que apresenta importante papel na mudança fenotípica dos nociceptores é a 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina, encontrada em vertebrados, celenterados, tunicados, moluscos, artrópodes, grãos, frutas e em venenos de vespas e escorpiões (SANDERS-BUSH & HAZELWOOD, 2011).

### **1.2.1 Aspectos históricos**

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 gastrointestinal que induzia contração de musculatura lisa, denominada por ele de enteramina (ERSPAMER & ASERO, 1952). Posteriormente, em 1952, o mesmo pesquisador demonstrou que a enteramina e serotonina eram a mesma substância (REID & RAND, 1952). Muitos experimentos que utilizaram a indolalquilamina recém-descoberta mostraram que tal substância era capaz de induzir contração de diferentes preparações de musculatura lisa de carótida, jejuno, útero e membrana nictitante de várias espécies, podendo ser citadas ratos, cães, gatos, bois e ovelhas (REID & BICK, 1942; ZUCKER, 1944; REID & RAND, 1952).

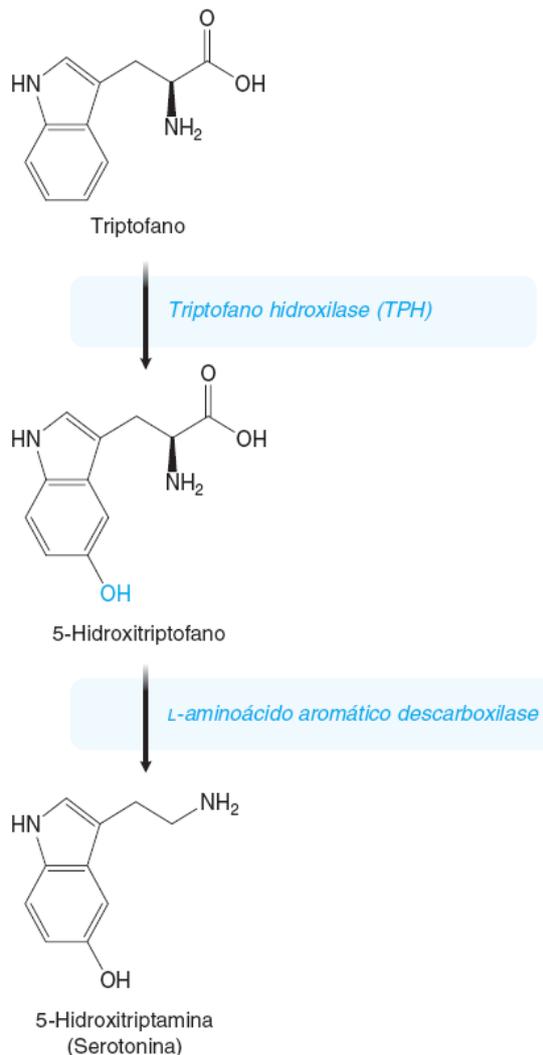
Anteriormente a essas observações, já era conhecida a melhor capacidade do soro de causar contração de musculatura lisa quando comparado com o plasma (JANEWAY *et al.*, 1918). Tal fato sustentou a idéia de que a 5-HT seria armazenada e liberada durante o processo de coagulação, em detrimento de estar 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 (HUMPHREY & JAQUES, 1954) e suspeitava-se de que pudesse desempenhar algum papel na hemostasia.

Após a descoberta original da 5-HT, muitos pesquisadores conduziram estudos paralelos para definir a sua localização assim como sua função. 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). Dahlstrom & 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. Já era evidente que 5-HT desempenhava papel importante em vertebrados e logo após sua descoberta muitos estudos identificaram várias de suas funções (para uma revisão, *vide* MOHAMMAD-ZADEH *et al.*, 2008).

### 1.2.2 Síntese, armazenamento, liberação e metabolismo

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 triptofano hidroxilase. Na segunda etapa, o 5-HTP é descarboxilado originando a 5-HT (**Figura 1**). Estudos farmacológicos iniciais demonstraram que as reações de hidroxilação e descarboxilação ocorrem quase que instantaneamente na presença do triptofano (CLARK *et al.*, 1954).



**Figura 1 - Síntese de 5-HT.**

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 a kinurenina 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 prosencéfalo 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 (DAHLSTROM & 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,

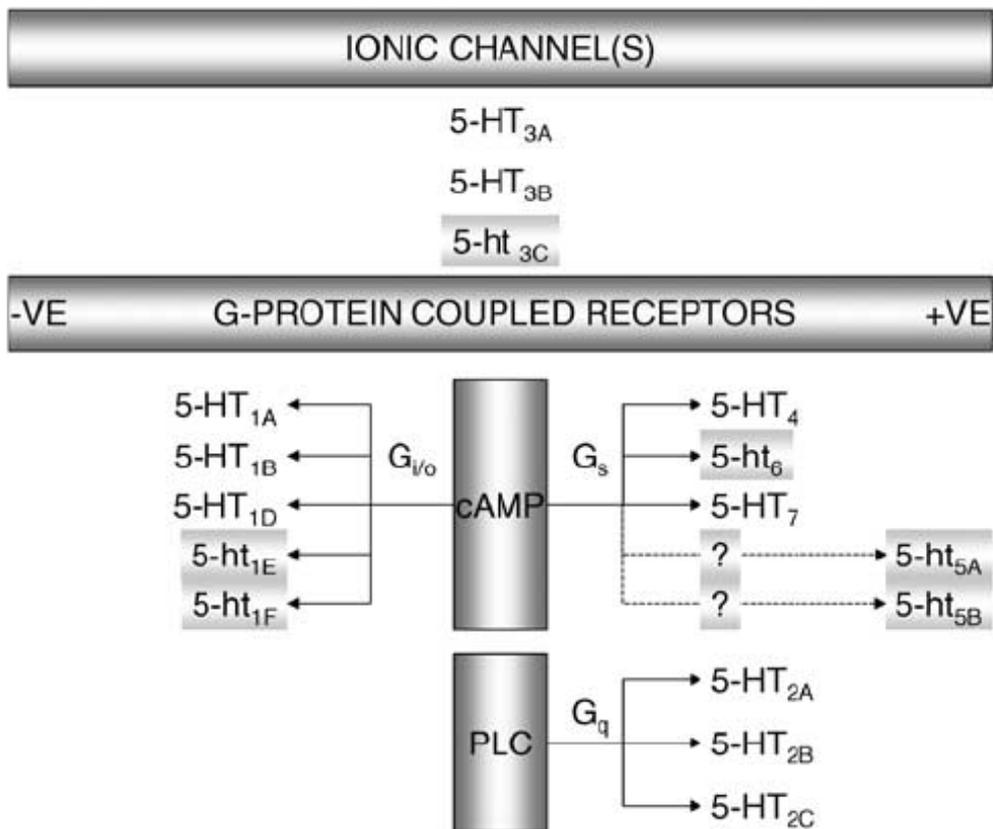
1955). Cerca de 90-95% da serotonina corporal está localizada em tecidos periféricos, a maioria armazenada em plaquetas e células enterocromafins.

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 e metabolismo (TYCE, 1990). O metabolismo pela monoamina oxidase (MAO) representa a primeira via metabólica para a 5-HT (MCISAAC & PAGE, 1959) assim como para outras aminas biogênicas, como norepinefrina, dopamina e histamina. 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).

### **1.2.3 Receptores: localização e efeitos**

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 2** 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 2 - Classificação, subtipos e mecanismos de transdução dos receptores de 5-HT.**

Em letras minúsculas, receptores cujo papel ainda não foi completamente estabelecido.

*cAMP*: 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.**

<b>Receptor</b>	<b>Distribuição tecidual</b>
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, traquéia, 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

**FONTE:** Adaptado de IUPHAR database (IUPHAR-DB). 5-Hydroxytryptamine receptors. Disponível em: <http://www.iupharb.org/PRODDATABASE/FamilyMenuForward?familyId=1>.

#### **1.2.4 5-HT e nocicepção**

No que tange o contexto nociceptivo e inflamatório, os receptores serotoninérgicos são expressos em fibras aferentes primárias, neurônios de projeção e interneurônios, o que torna a ação da 5-HT bastante complexa. 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

excitação de interneurônios inibitórios, resultando em inibição de neurônios espinhais (PENG *et al.*, 1996). 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). Nesses locais, a 5-HT liberada por estimulação elétrica ativa receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> em interneurônios inibitórios, que por sua vez inibem neurônios no corno dorsal da medula espinhal por mecanismos dependentes de opióides (PENG *et al.*, 1996). Estados ou condições patológicas associados a dor crônica podem causar diminuição do conteúdo de 5-HT nesses neurônios (SOUNVORAVONG *et al.*, 2004).

A 5-HT está associada a várias condições patológicas, incluindo aquelas associadas à inflamação (HOYER *et al.*, 2002). A 5-HT é um importante mediador inflamatório que induz sensibilização de fibras aferentes primárias nociceptivas (TAIWO & LEVINE, 1992), sendo liberada principalmente pelas plaquetas ou mastócitos (em humanos e roedores, respectivamente), além de células endoteliais (HOLZER, 1998; MILLAN, 1999).

O papel da 5-HT na nocicepção e no edema pode variar de acordo com os subtipos de receptores ativados. Vários estudos têm contribuído para elucidar o papel pró-nociceptivo de 5-HT. Esta amina biogênica, quando administrada periféricamente, induz dor em humanos (JENSEN *et al.*, 1990). Também já foi demonstrado que a injeção i.pl. de 5-HT induz edema de pata (COLE *et al.*, 1995) e resposta nociceptiva (SUFKA *et al.*, 1992; TAIWO & LEVINE, 1992) em ratos. 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>, 5HT<sub>2</sub> e 5HT<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). Foi demonstrado que receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> estão presentes em neurônios sensoriais (CHEN *et al.*, 1998) e que a sensibilização mecânica ou térmica induzida por 5-HT é inibida por antagonistas de receptores 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub> em ratos (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).

Apesar de vários estudos abordarem o papel da 5-HT no processamento da resposta nociceptiva, a maioria dos estudos avaliou o envolvimento central dessa amina (NAYEBI *et al.*, 2001; GIORDANO & GERSTMANN, 2004). O papel de 5-HT no processamento periférico da resposta nociceptiva ainda não é bem compreendido, não se sabendo em quais situações essa amina contribui para a sensibilização dos nociceptores, quais são os receptores serotoninérgicos presentes no tecido normal e no tecido que apresenta uma resposta inflamatória e com quais receptores 5-HT interage de forma a induzir as alterações fenotípicas dos nociceptores.

## 2 JUSTIFICATIVA

Os estudos que investigaram o papel da 5-HT no processamento periférico da resposta nociceptiva proporcionam informações fragmentadas e não permitem uma avaliação de forma sistemática desse assunto. De uma forma geral, de acordo com esses estudos e outros apontados por pesquisas bibliográficas, os 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> foram os mais frequentemente investigados. Nesse contexto, o presente estudo pode contribuir para uma melhor caracterização do papel dessa amina biogênica, assim como de seus receptores, no processamento periférico da resposta nociceptiva.

### **3 OBJETIVOS**

Avaliar o papel da 5-HT no processamento periférico da resposta nociceptiva em diferentes modelos experimentais por meio da determinação do seu conteúdo e da identificação de seus receptores em tecidos periféricos, bem como do uso de antagonistas seletivos ou não seletivos para tais receptores.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Determinar as concentrações de 5-HT em tecidos periféricos de pata
- Avaliar a presença de receptores serotoninérgicos 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> em tecidos periféricos de pata
- Avaliar o efeito de antagonistas não seletivos ou seletivos para os 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> sobre a resposta nociceptiva induzida por 5-HT ou carragenina

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar e camundongos Swiss machos, com massa entre 180-200 g e 25-35 g, respectivamente. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo ração e água fornecidas *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em temperatura de  $27 \pm 1$  °C, correspondente à zona de termoneutralidade para roedores. Durante a execução dos experimentos, os animais foram manipulados cuidadosamente, de forma a resultar no menor estresse comportamental possível. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para experimentação em animais (ZIMMERMANN, 1983). Cada animal foi utilizado apenas uma vez, sendo submetido a eutanásia após o experimento em câmara de CO<sub>2</sub>. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob o protocolo nº 132/2007.

### 4.2 Drogas

- Serotonina (cloridrato, Sigma, EUA) – estímulo inflamatório e nociceptivo
- Carragenina  $\lambda$  (Sigma, EUA) – estímulo inflamatório e nociceptivo
- Ciproeptadina (cloridrato, Sigma, EUA) – antagonista dos receptores 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub>
- Mianserina (cloridrato, Sigma, EUA) – antagonista dos receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>6</sub>
- Isamoltano (hemifumarato, Tocris, EUA) – antagonista dos receptores 5-HT<sub>1B</sub>
- BRL 15572 (cloridrato, Sigma, EUA) – antagonista dos receptores 5-HT<sub>1D</sub>
- Cetanserina (tartarato, Biotrend, Suíça) – antagonista dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>
- Ondansetrona (cloridrato, 2 mg/ml, Cristália, Brasil) – antagonista dos receptores 5-HT<sub>3</sub>
- SB-269970 (cloridrato, Sigma, EUA) – antagonista dos receptores 5-HT<sub>7</sub>

Todas as substâncias foram preparadas em solução salina, exceto BRL 15572, que foi dissolvido em solução de DMSO 4%.

### **4.3 Determinação da concentração de 5-HT em tecidos de pata de camundongos**

Após eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>, as patas posteriores de camundongos não tratados ou tratados com carragenina (600 µg; 20 µl; i.pl.; -3h) foram removidas na altura da articulação tíbio-tarsal. Em seguida, o material foi fragmentado com tesoura e a massa foi determinada. Foram adicionados 14 ml de TCA 5% às amostras, que foram submetidas ao Ultraturrax (haste 10 mm, 8000 rpm; IKA) por 15 min para fragmentação em partículas menores. As amostras foram homogeneizadas em agitador tipo vórtex por 70 s (Biomatic, Brasil). O extrato foi separado em centrífuga refrigerada a 0 °C por 3 min a 11250 rpm (modelo MR23i, Jouan S.A., Saint Herblain, França) e o sobrenadante filtrado em papel Whatman nº 1. Após a etapa de extração, a amostra foi filtrada em membrana HAWP em éster de celulose, com especificações de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore, Corp., Milford, MA, EUA), para posterior injeção e análise em CLAE (cromatógrafo Shimadzu, Kioto, Japão) por pareamento de íons em coluna de fase reversa, com quantificação por fluorimetria após derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído (VALE & GLÓRIA, 1997). Ao final da análise, por meio de uma curva analítica, foi calculada a recuperação de 5-HT na amostra, considerando a concentração inicial desta amina na amostra sem adição (controle).

## **4. 4 Western Blot**

### **4.4.1 Preparo das amostras**

Após eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>, amostras de tecido da superfície plantar (região central) da pata posterior de ratos foram obtidas com auxílio de um bisturi. Em seguida, com tesoura cirúrgica, as amostras foram retalhadas em fragmentos menores e adicionadas a um tubo de 1,5 ml contendo 700 µl de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 % glicerol, fosfatase (0,2 mM ortovanadato de sódio e 20 mM fluoreto de sódio). Para homogeneização, as amostras foram colocadas em um disruptor ultrassônico (Branson Sonifier II, modelo 250, 20 kHz) com haste de titânio por 1 min. Após esse procedimento, os tubos foram centrifugados a 4 °C por 30 min

a 14.000 rpm e o sobrenadante colocado em um novo tubo de 1,5 ml para mensuração da concentração de proteínas.

#### **4.4.2 Quantificação de proteínas**

Foi utilizada uma variação do método de Lowry fundamentada na utilização do ácido bicinchonínico (BCA; SMITH *et al.*, 1985). As reações colorimétricas são baseadas na formação de biureto, que é formado pela reação de íons  $\text{Cu}^{++}$  com a ligação peptídica em meio alcalino. O método de Lowry aumenta a sensibilidade do método do biureto pela adição do reagente fenólico de Folin-Ciocalteu, que é reduzido a um composto hidrossolúvel de coloração azulada (LOWRY *et al.*, 1951). Foram utilizadas placas de 96 poços e as reações foram desenvolvidas a 95 °C (30 min), sendo a densidade ótica medida a 570 nm com albumina bovina sérica (BSA; 1-40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; Sigma) como padrão.

#### **4.4.3 Eletroforese**

Antes da eletroforese, foram adicionados às amostras azul de bromofenol e DTT (concentração final 10 mM). Todas as corridas foram realizadas em gel de poliacrilamida a 12% com conteúdo de 30  $\mu\text{g}$  de proteínas por amostra. As proteínas foram então transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF; Millipore, Bedford, MA, EUA) e bloqueadas por 1 h ou 2 h em Rotiblock (Roth, Karlsruhe, Alemanha) ou leite a 5% (BioRad, München, Alemanha), respectivamente. Após esse procedimento, as membranas foram incubadas a 4°C por 12 h com os anticorpos primários (Acris Antibodies, Herford, Alemanha; 1-2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Antiactina Sigma, 1:5.000), diluídos em TBST (salina tri-tamponada, 0,1% Tween 20; Merck, Darmstadt, Alemanha) e 1% BSA (Sigma). Posteriormente, as membranas foram lavadas 3 vezes em TBST e as bandas correspondentes às proteínas foram identificadas por meio de quimioluminescência (HRP 1:25.000; GE Healthcare, Freiburg, Alemanha). Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes.

## **4.5 Reação de qPCR**

### **4.5.1 Preparo das amostras**

Os métodos utilizados para dissociação de neurônios DRG foram baseados no protocolo estabelecido por Eckert *et al.* (1997). De forma breve, após procedimento de eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>, a pele do dorso de camundongos foi removida, assim como a parte anterior do gradil costal e vísceras torácicas. Também foram removidos os corpos vertebrais, deixando expostos a medula espinhal e os nervos que chegam a ela. Nos nervos posteriores (que conduzem informações aferentes) estão localizados os Gânglios da Raiz Dorsal (DRG). Dos DRG coletados foram removidos o excesso de tecido conjuntivo e as meninges, sendo os mesmos mantidos durante o procedimento em solução de Ringer mamífero, sem adição de Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> e logo em seguida colocados num tubo de 1,5 ml contendo RNAlater (QIAGEN).

As amostras de tecido da superfície plantar (região central) da pata posterior de camundongos foram obtidas com auxílio de um bisturi. Com tesoura cirúrgica, as amostras foram retalhadas em fragmentos menores e adicionadas a um tubo de 1,5 ml contendo volume adequado de RNAlater e em seguida submetidas ao disruptor ultrassônico por 30 s.

### **4.5.2 Extração de RNA**

Os procedimentos para extração de RNA foram executados de acordo com o protocolo do kit RNeasy Mini (QIAGEN), adequado para pequenas quantidades de RNA. As amostras obtidas foram centrifugadas por 1 min a 14.000 rpm, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo sendo adicionado igual volume de etanol 70%, homogeneizando-se com a pipeta. A solução foi aplicada na coluna RNeasy, centrifugada, e o filtrado foi então descartado. O tampão RW1 foi adicionado na coluna e a mesma foi centrifugada novamente, sendo o filtrado também descartado. O tampão RPE foi aplicado e a centrifugação e remoção do

filtrado foi repetida. Por fim, água isenta de RNase fornecida pelo kit foi adicionada à coluna para eluir o RNA. Após centrifugação, o filtrado foi armazenado em freezer a -20 °C. Para quantificação das amostras, um microlitro do RNA extraído foi utilizado para a dosagem em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000; 280 nm).

#### **4.5.3 Análise da expressão de receptores por PCR em tempo real**

- ***Desenho dos oligonucleotídeos***

As sequências gênicas dos receptores de serotonina obtidas do GenBank do NCBI (Htr-1b: NM\_010482; Htr-1d: NM\_008309; Htr-2a: NM\_172812; Htr-3a: NM\_013561; Htr-7: NM\_008315), assim como a sequência de  $\beta$ -actina (NM\_007393), foram analisadas através do software PrimerQuest<sup>SM</sup> da IDT (Integrated DNA Technologies – [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)). Entre as opções de pares de oligos fornecidas pelo programa foram selecionadas aquelas cujos oligos correspondiam a sequências localizadas em diferentes exons, a fim de se evitar a amplificação de sequências derivadas de DNA genômico contaminantes após extração de RNA (**Tabela 2**). O único par de oligos que não pode ser selecionado segundo estes critérios foi o Htr-1b, já que ambos oligos correspondem a sequências localizadas no mesmo exon.

**Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados em ensaios de qPCR. Todos os pares de oligos, a exceção dos oligos do gene Htr1b, correspondem a sequências localizadas em diferentes exons.**

Gene	Código do GeneBank	Sequência	Número de nucleotídeos	Tamanho do Amplicon	Melting Temperature
Htr1b	NM_010482	TCATGCATCTCTGTGTCATCG	21	144	62.1
Htr1b	NM_010482	AGGGTGGCAACGAAATAGAG	20		61.9
Htr1d	NM_008309	GGTGGATGCTGGTGATAACA	20	144	62.0
Htr1d	NM_008309	CAAAACATTCCCCTGACCAAG	21		61.9
Htr2a	NM_172812	CCTGAAAATCATTGCGGTGTG	21	148	62.2
Htr2a	NM_172812	TGCCACAAAAGAGCCTATGAG	21		62.5
Htr3a	NM_013561	CAACTTCCCCTTTGATGTGC	20	142	61.4
Htr3a	NM_013561	CCACTCGCCCTGATTTATGAAG	22		62.8
Htr7	NM_008315	TCTGCAACGTCTTCATCGC	19	131	62.5
Htr7	NM_008315	TTTCCCATTCTGCCTCACG	19		62.2
Actb	NM_007393	ACCTTCTACAATGAGCTGCG	20	147	62.1
Actb	NM_007393	CTGGATGGCTACGTACATGG	20		61.8

- **Tratamento com DNase**

Para eliminar a possibilidade contaminação das amostras com DNA, especialmente para o gene Htr-1b, as amostras de RNA foram tratadas com DNase (TURBO DNA-free™ Kit – Applied Biosystems).

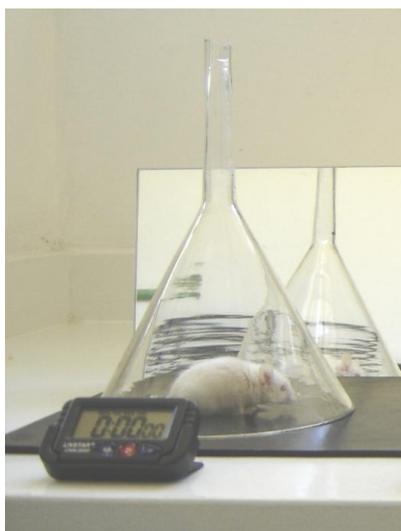
- **Reação qPCR**

Para análise da expressão dos genes codificantes para os receptores de serotonina, 15 ng das amostras de RNA tratados com DNase foram utilizados como molde para cada poço na reação de qPCR com o *Power Syber Green RNA-to-CT 1-Step Kit* (Applied Biosystems). Os experimentos foram realizados no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o método de análise comparativa ( $\Delta\Delta CT$ ) no qual os valores obtidos nas reações de beta-actina, gene constitutivamente expresso, foram utilizados como normalizadores da quantidade de RNA utilizada na análise da expressão dos demais genes. As amostras de RNA provenientes de pata e DRG foram analisadas em sextuplicatas para todos os genes.

## 4.6 Modelos Experimentais

### 4.6.1 Comportamento de lambida de pata induzido por 5-HT em camundongos

5-HT foi administrada por via i.pl. na pata posterior direita de camundongos e foi determinado o tempo durante o qual os animais permaneceram lambendo a pata (**Figura 3**). O período de avaliação dessa resposta foi estabelecido após a realização de experimentos preliminares, quando foi avaliado o intervalo no qual o comportamento investigado ocorre de forma mais intensa. No primeiro protocolo, os animais foram observados por um período de 60 min. Nos experimentos subseqüentes, o tempo de observação foi reduzido para 20 min pelo fato de que, após esse período, os animais que receberam a injeção de 5-HT apresentavam comportamento de lambida de pata muito semelhante ao dos animais que receberam a injeção de salina. Para avaliar o papel dos receptores envolvidos na resposta nociceptiva induzida por 5-HT, diferentes antagonistas foram administrados por via i.pl. 10 min antes da injeção de 5-HT. Com o objetivo de verificar se a resposta induzida pelos antagonistas apresenta caráter local, foi acrescentado aos experimentos um grupo de animais que receberam administração de 5-HT na pata ipsilateral e dos antagonistas na pata contralateral.

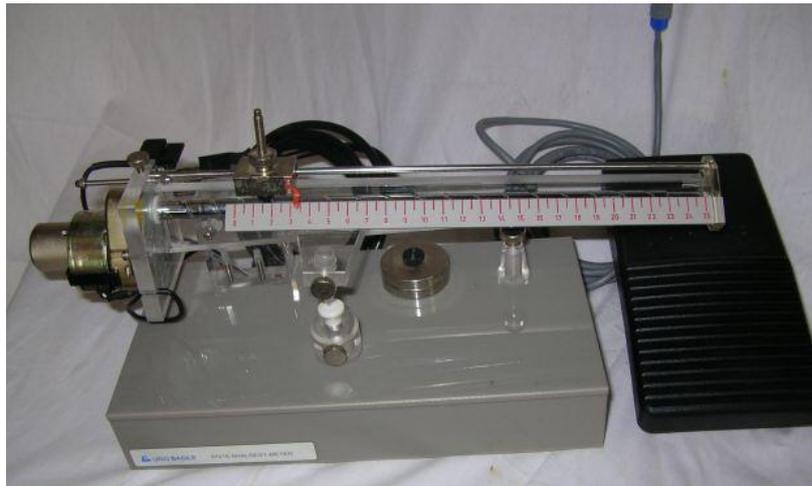


**Figura 3** – Aparato para avaliação do comportamento de lambida de pata.

#### **4.6.2 Alodínia mecânica induzida por 5-HT ou carragenina**

Para a medida do limiar nociceptivo foi utilizado o método de retirada da pata submetida à compressão, descrito originalmente para ratos por Randall & Selitto (1957) e posteriormente para camundongos por Kawabata e colaboradores (1992). Durante o teste, o animal é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada enquanto a pata é colocada e exposta à parte compressora do aparelho (algesímetro, Ugo Basile, Itália; **Figura 4**), que consiste em duas superfícies, uma plana, sobre a qual se apóia a pata do animal, e outra cônica, com área de 1,75 mm<sup>2</sup> na extremidade, por meio da qual a pressão é aplicada contra a superfície plantar. Mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador, a intensidade da pressão aumenta proporcionalmente ao deslocamento de um disco indicador sobre uma escala milimetrada, a uma taxa constante de 16 mm/s. Ao observar a resposta ou retirada da pata do animal, o experimentador retira o pé do pedal interrompendo assim o aumento de pressão imposta à pata. Nesse momento, o valor do limiar registrado na escala do aparelho corresponde ao limiar para retirada da pata, sendo expresso em gramas (g). Os animais foram ambientados ao aparelho e ao procedimento nos dias anteriores aos experimentos e cada medida foi feita pelo menos três vezes para cada animal, sendo utilizadas as médias dos valores.

No protocolo inicial, diferentes doses de 5-HT foram administradas por via i.pl. e as medidas do limiar foram realizadas a cada 5 min até 20 min. Para se verificar o papel dos receptores de 5-HT nessa resposta, os antagonistas foram administrados por via i.pl. 10 min antes da administração de 5-HT, sendo a leitura realizada 10 min após a administração de 5-HT, quando a resposta foi considerada máxima. Nos protocolos em que carragenina foi utilizada como estímulo, inicialmente as leituras foram feitas a cada hora por até 6 h após a administração de carragenina. Nos protocolos subsequentes, nos quais foram avaliados os efeitos induzidos por diferentes antagonistas sobre a resposta induzida por carragenina, as medidas foram feitas a cada hora por até 4 h.



**Figura 4 – Algesímetro.**

## **5 PROTOCOLOS**

- Determinação das concentrações de 5-HT em tecidos de pata de camundongos não tratados ou tratados com carragenina, de forma a atender um requisito para que se estabeleça o papel da 5-HT como mediador periférico da resposta nociceptiva.
- Avaliação da presença de RNAm ou dos receptores serotoninérgicos potencialmente mais relevantes para a resposta nociceptiva em amostras de tecidos obtidas de ratos ou camundongos que não foram submetidos a nenhuma intervenção. O objetivo desse protocolo é avaliar a presença de receptores serotoninérgicos em tecido periférico, de forma a atender outro requisito para que se estabeleça o papel da 5-HT como mediador periférico da resposta nociceptiva, ou seja, a presença do alvo molecular com o qual essa amina interage.

- Avaliação do efeito induzido pela injeção i.pl. de antagonistas serotoninérgicos (não seletivos e seletivos para 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>) sobre a resposta nociceptiva induzida pela 5-HT e pela carragenina. Esse protocolo tem como objetivo avaliar quais são os receptores serotoninérgicos mais importantes para a resposta nociceptiva induzida pela 5-HT e carragenina.

## **6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls ou Bonferroni. Adotou-se um nível de significância de 5%.

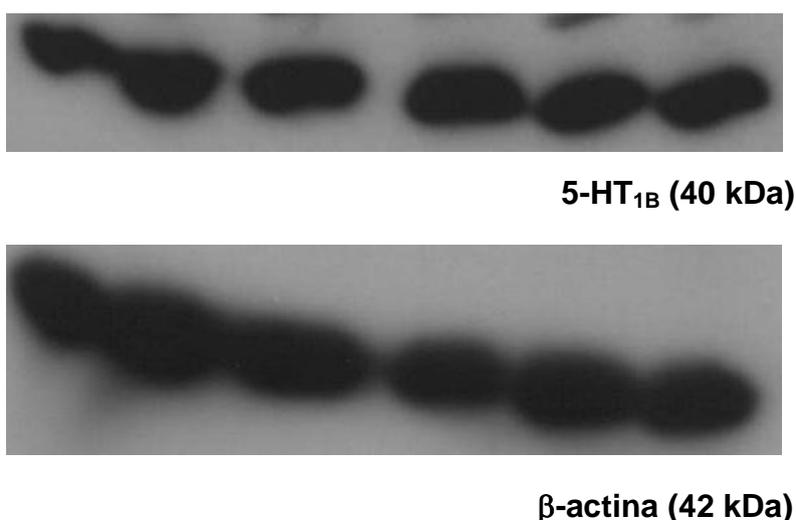
## 7 RESULTADOS

### 7.1 Determinação da concentração de 5-HT em tecidos de pata de camundongos

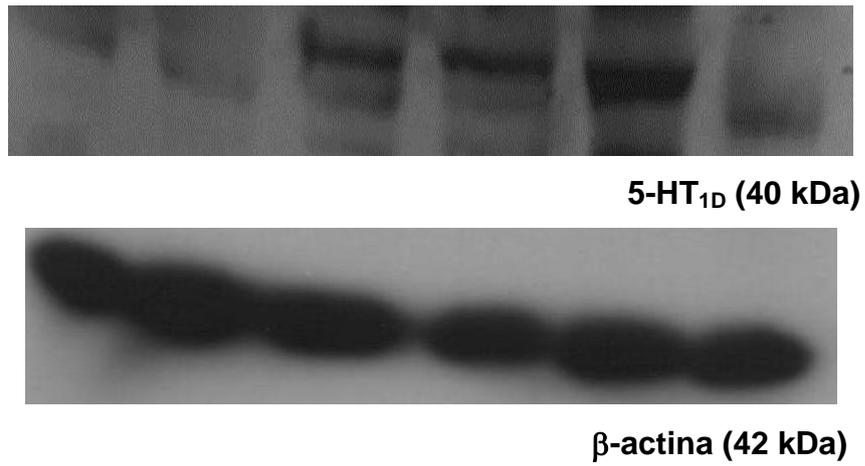
As concentrações de 5-HT presentes na pata de camundongos não tratados e tratados com carragenina foram determinadas por cromatografia, sendo o total encontrado de 0,5383  $\mu\text{g/g}$  e 0,4320  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente.

### 7.2 Expressão de receptores de 5-HT em tecido de pata de ratos

Para se avaliar a presença dos receptores serotoninérgicos em tecidos periféricos, foi utilizada a técnica de Western Blot, que permite a separação e identificação de proteínas por meio de eletroforese e pelo uso de anticorpos específicos. Anticorpos específicos para os 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> foram utilizados. As bandas correspondem a amostras provenientes de seis animais diferentes. O tempo de exposição variou de acordo com a resolução necessária para uma boa delimitação das bandas. Dos receptores investigados, apenas o receptor 5-HT<sub>2A</sub> não foi encontrado (**Figuras 5-8**).



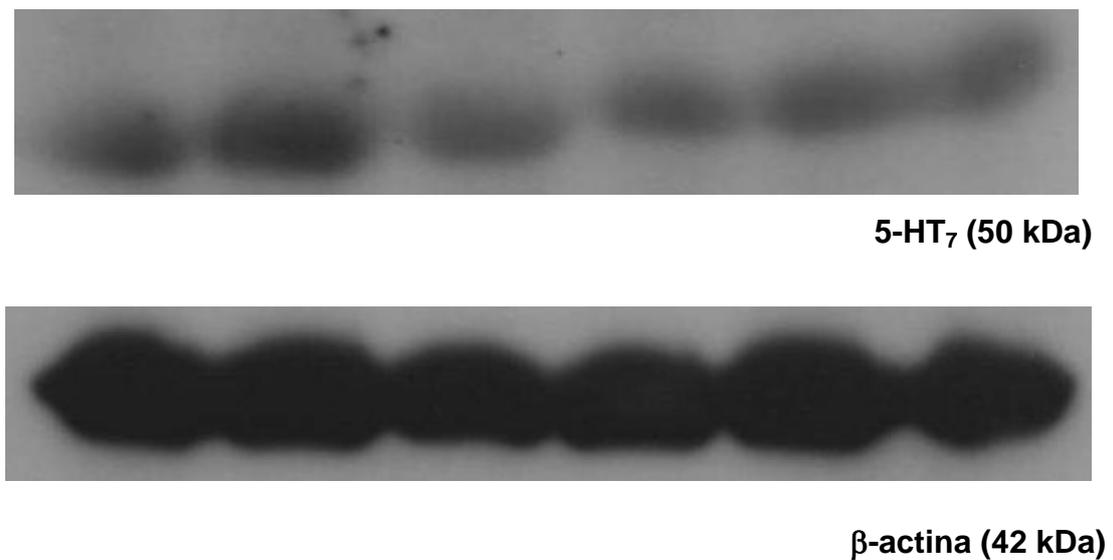
**Figura 5** - Expressão de receptores 5-HT<sub>1B</sub> e  $\beta$ -actina em tecido de pata de ratos.



**Figura 6** - Expressão de receptores 5-HT<sub>1D</sub> e β-actina em tecido de pata de ratos.



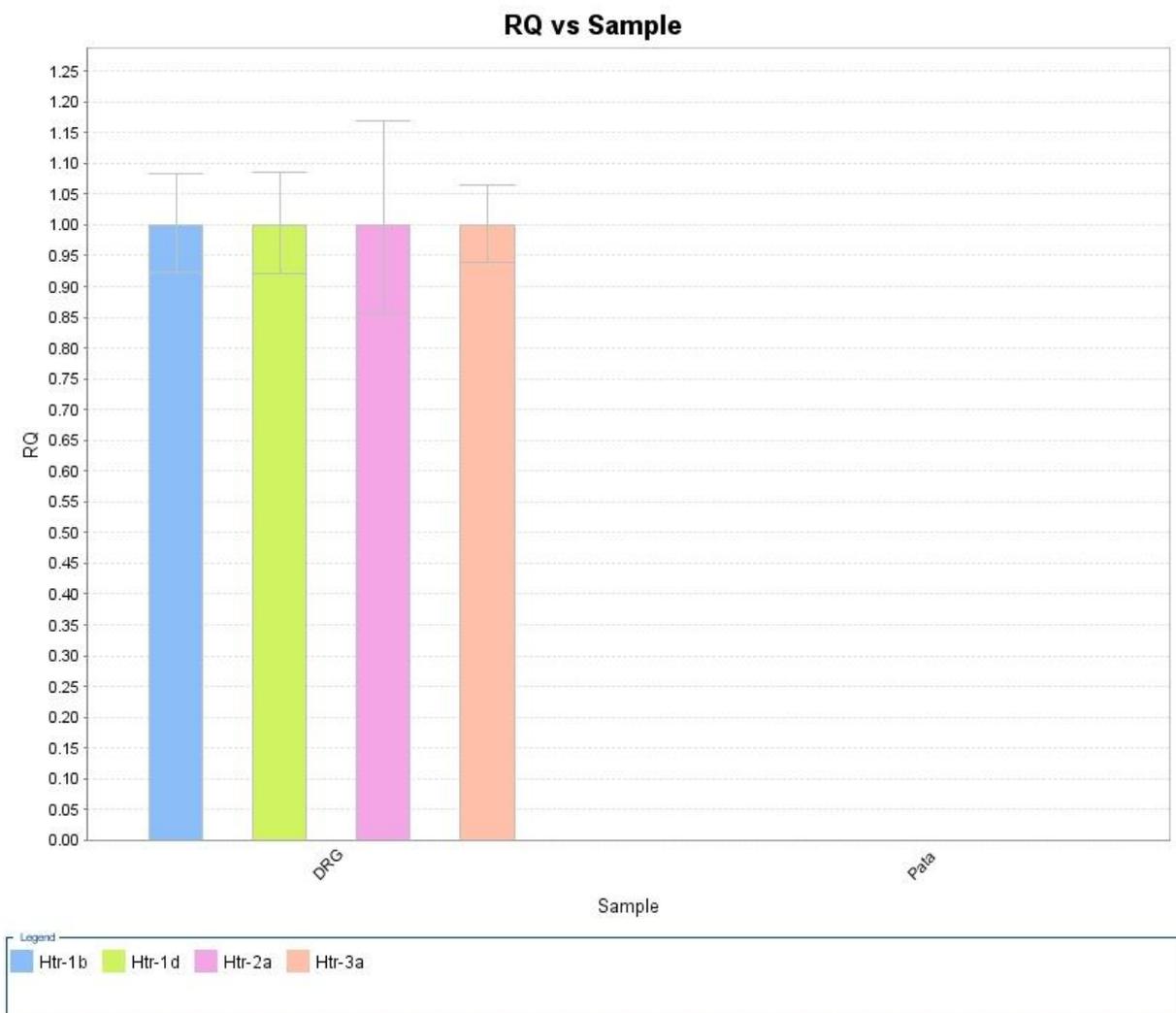
**Figura 7** - Expressão de receptores 5-HT<sub>3</sub> e β-actina em tecido de pata de ratos.



**Figura 8** - Expressão de receptores 5-HT<sub>7</sub> e β-actina em tecido de pata de ratos.

### 7.3 Expressão de genes codificadores de receptores de 5-HT em camundongos

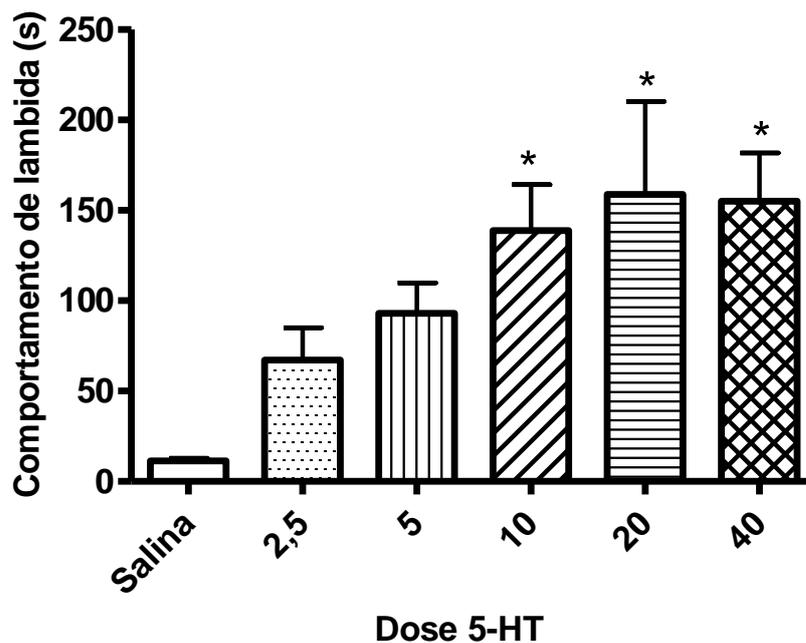
Foi investigado pela técnica de qPCR a presença de RNAm para os receptores de 5-HT para elucidar se essa expressão protéica é contínua assim como sua origem, considerando-se o fato de que os corpos celulares dos neurônios envolvidos com a transmissão nociceptiva não estão localizados em tecidos periféricos. Foi utilizado RNAm oriundo de gânglios da raiz dorsal como controle positivo. Foi observada a presença de RNAm para os receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>3</sub> apenas para as amostras provenientes de DRG, mas não para aquelas com origem em tecidos periféricos (**Figura 9**).



**Figura 9 - Análise da expressão de genes codificadores de receptores de serotonina em gânglios da raiz dorsal e patas de camundongos por qPCR.**

#### 7.4 Comportamento de lambida de pata induzido por 5-HT em camundongos

A administração i.pl. de 5-HT na pata posterior direita de camundongos induziu comportamento caracterizado pela lambida contínua da pata injetada, sendo medido o tempo durante o qual os animais permaneceram lambendo a pata. Os animais foram observados por um período de 20 min após a injeção de 5-HT. As doses de 2,5 e 5  $\mu\text{g}$  não induziram resposta que diferiu de forma estatisticamente significativa daquela induzida pelo veículo. As doses de 10, 20 e 40  $\mu\text{g}$  induziram intenso comportamento nociceptivo e não apresentaram diferenças marcantes entre si, sendo a dose de 20  $\mu\text{g}$  escolhida para utilização em protocolos subseqüentes (Figura 10).



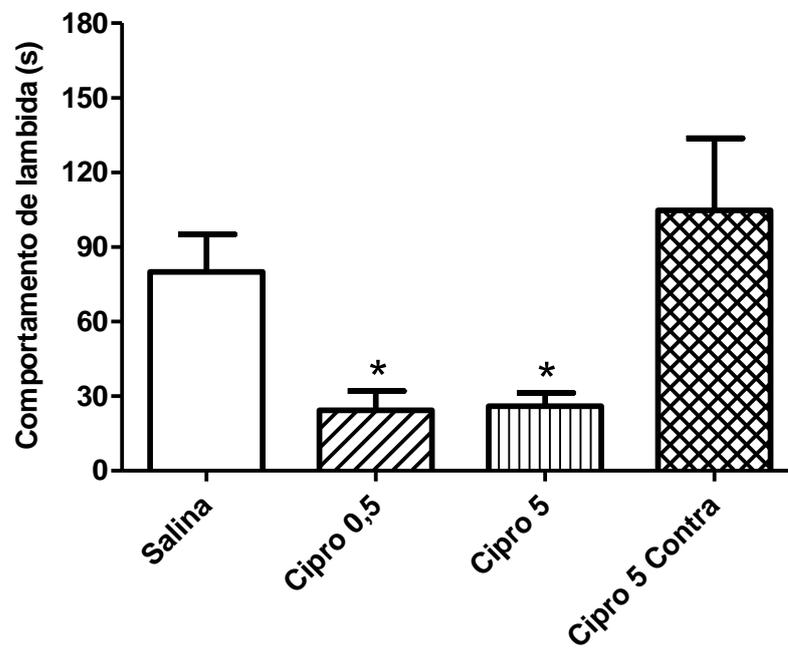
**Figura 10** – Comportamento de lambida de pata induzido por 5-HT (2,5; 5; 10; 20 ou 40  $\mu\text{g}$  / 10  $\mu\text{l}$ ; i.pl.) em camundongos. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com salina,  $P < 0,05$  ( $n=6-7$ ).

### 7.5 Efeito induzido por antagonistas serotoninérgicos sobre o comportamento de lambida de pata induzido por 5-HT em camundongos

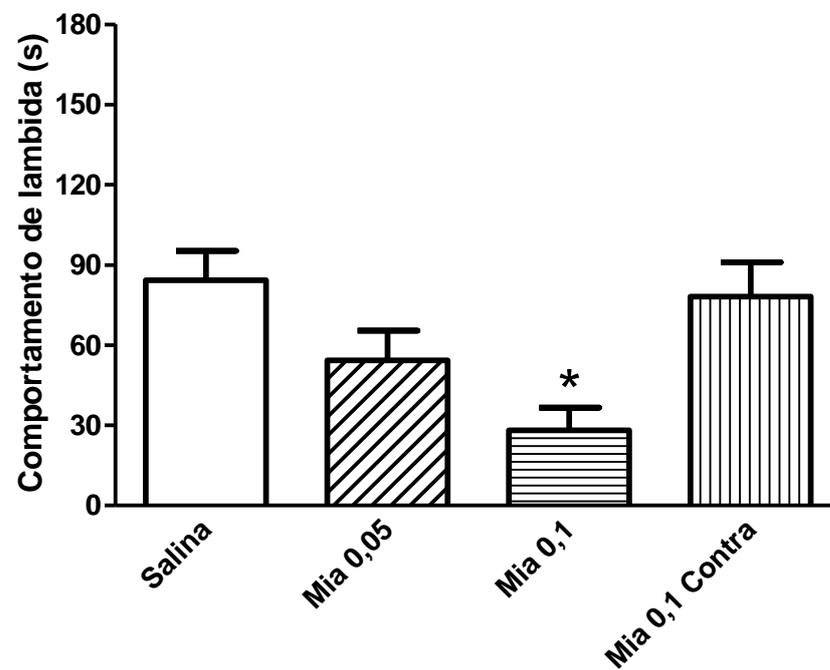
Para investigar o papel dos receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>7</sub> sobre a resposta nociceptiva induzida por 5-HT em camundongos, diferentes antagonistas, seletivos ou não, foram administrados por via i.pl. na pata posterior direita 10 min antes da injeção de 5-HT. Adicionalmente, com o objetivo de verificar se o eventual efeito antinociceptivo induzido pelos antagonistas decorre da sua interação local com alvos moleculares ou provém de mecanismos não locais, foi acrescentado ao protocolo experimental um grupo de animais nos quais foi administrada na pata contralateral a maior dose do antagonista investigado.

O pré-tratamento com ciproeptadina (0,5 ou 5 µg; **Figura 11**), mianserina (0,1 µg; **Figura 12**), isamoltano (0,5 ou 5 µg; **Figura 13**) e cetanserina (0,1 ou 1 µg; **Figura 15**) inibiu parcialmente o comportamento de lambida de pata induzido por 5-HT em camundongos. Quando administrados na pata contralateral, esses antagonistas não induziram efeito antinociceptivo, indicando que seu efeito provavelmente resulta da inibição da interação de 5-HT com seus receptores situados no local ou em tecidos adjacentes.

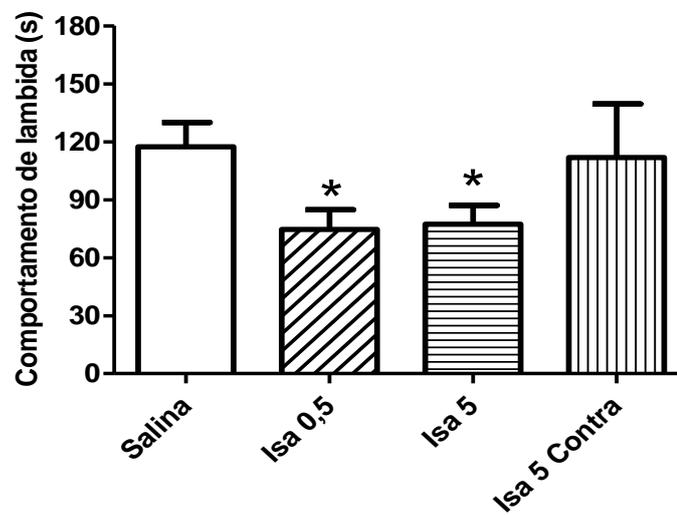
Por outro lado, os antagonistas BRL 15572 (1 ou 10 µg; **Figura 14**), ondansetrona (5 ou 20 µg; **Figura 16**) e SB 269970 (2,5 ou 25 µg; **Figura 17**) não induziram efeito antinociceptivo em camundongos.



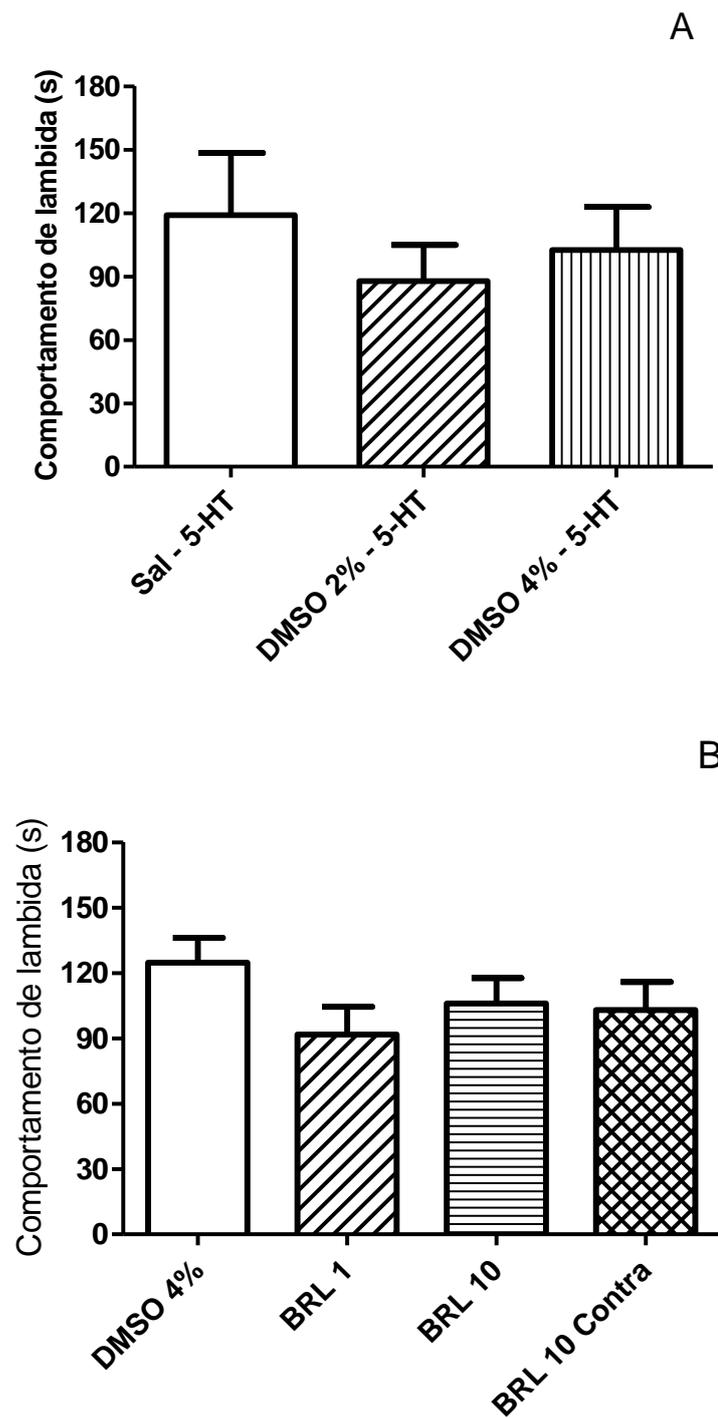
**Figura 11-** Efeito induzido por ciproheptadina (antagonista 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub>; 0,5 ou 5 µg; -10 min; 10 µl; i.pl.) sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT (20 µg; 10 µl; i.pl.) em camundongos. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com salina, P<0,05 (n=6).



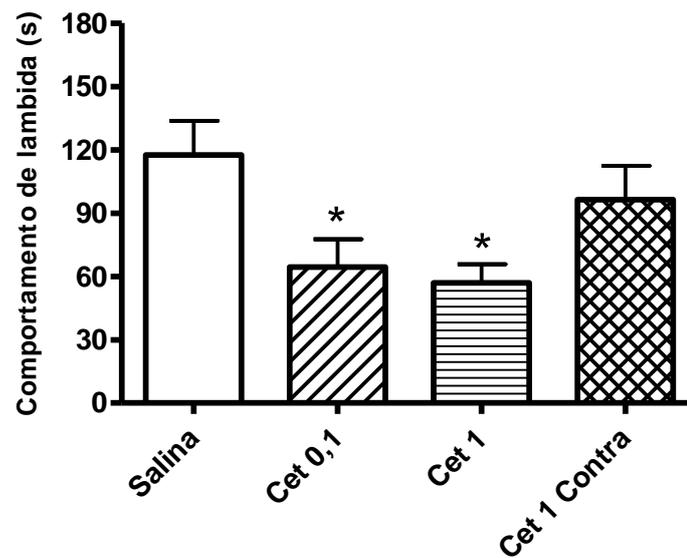
**Figura 12** - Efeito induzido por mianserina (antagonista 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>6</sub>; 0,05 ou 0,1 µg; -10 min; 10 µl; i.pl.) sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT (20 µg; 10 µl; i.pl.) em camundongos. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com salina, P<0,05 (n=10-13).



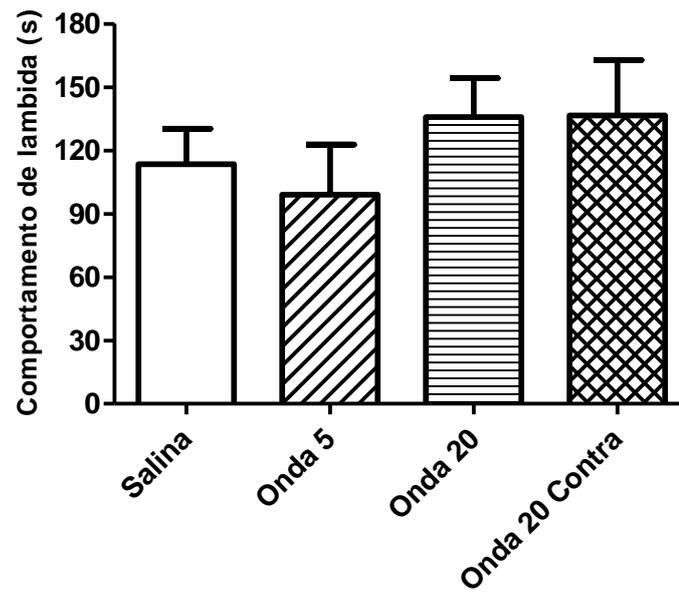
**Figura 13** - Efeito induzido por isamoltano (antagonista 5-HT<sub>1B</sub>; 0,5 ou 5 µg; -10 min; 10 µl; i.pl.) sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT (20 µg; 10 µl; i.pl.) em camundongos. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com salina, P<0,05 (n=6-8).



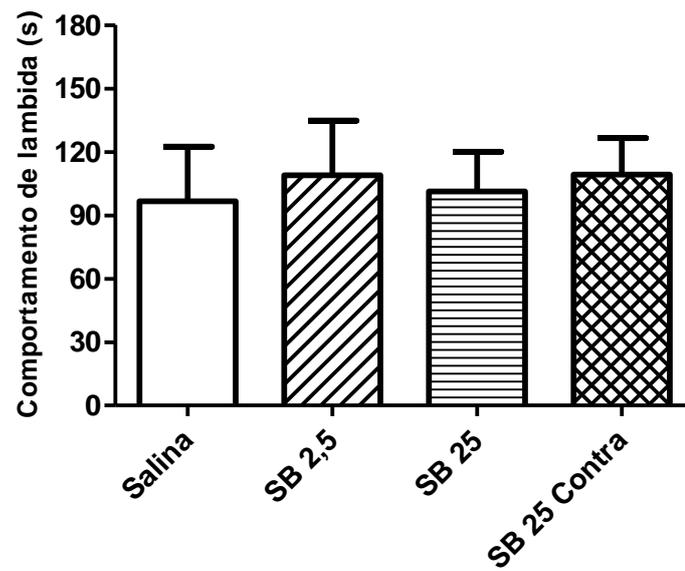
**Figura 14** - Efeito induzido por DMSO 2 ou 4% (A; -10 min; 10  $\mu$ l; i.pl.; n=4-6) ou BRL 15572 (B; antagonista 5-HT<sub>1D</sub>; 1 ou 10  $\mu$ g; -10 min; 10  $\mu$ l; i.pl.; n=8-14) sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT (20  $\mu$ g; 10  $\mu$ l; i.pl.) em camundongos.



**Figura 15** - Efeito induzido por cetanserina (antagonista 5-HT<sub>2A</sub>; 0,1 ou 1 µg; -10 min; 10 µl; i.pl.) sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT (20 µg; 10 µl; i.pl.) em camundongos. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com salina, P<0,05 (n=10-13).



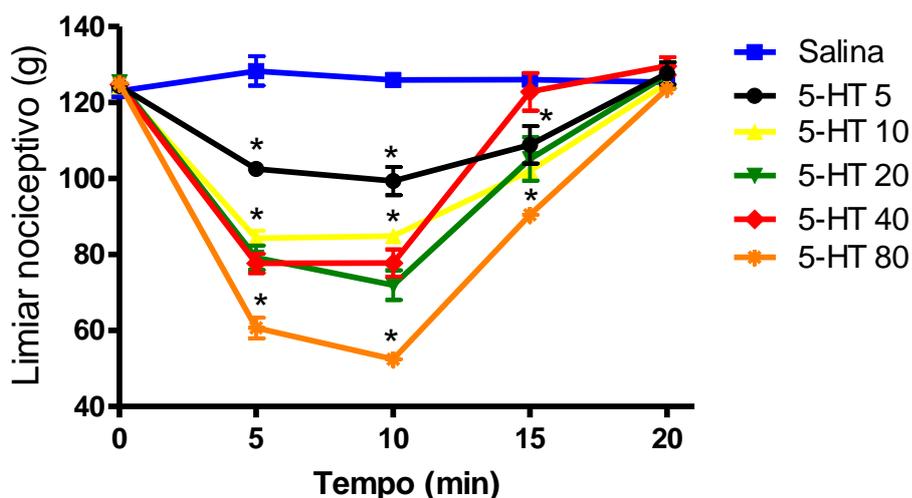
**Figura 16** - Efeito induzido por ondansetrona (antagonista 5-HT<sub>3</sub>; 5 ou 20 µg; -10 min; 10 µl; i.pl.) sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT (20 µg; 10 µl; i.pl.) em camundongos (n=6-7).



**Figura 17-** Efeito induzido por SB 269970 (antagonista 5-HT<sub>7</sub>; 2,5 ou 25 µg; -10 min; 10 µl; i.pl.) sobre o comportamento de lambida de pata induzido pela 5-HT (20 µg; 10 µl; i.pl.) em camundongos (n=6-7).

## 7.6 Alodínia mecânica induzida por 5-HT em camundongos

Diferentes doses de 5-HT foram administradas por via i.pl. na pata posterior direita de camundongos. As doses de 10, 20, 40 e 80  $\mu\text{g}$  (20  $\mu\text{l}$ ) induziram resposta nociceptiva caracterizada por alodínia mecânica, que se estabeleceu de forma rápida e durou 20 min, sendo que após esse período o valor do limiar nociceptivo dos animais retornou aos valores basais mensurados anteriormente (**Figura 18**). A sensibilização máxima ocorreu 10 min após a administração das diferentes doses de 5-HT. Considerando-se esses aspectos, a dose de 20  $\mu\text{g}$  assim como o tempo de observação de 10 min foram adotados nos protocolos subseqüentes para avaliação do efeito dos antagonistas seletivos sobre a resposta nociceptiva induzida por 5-HT.

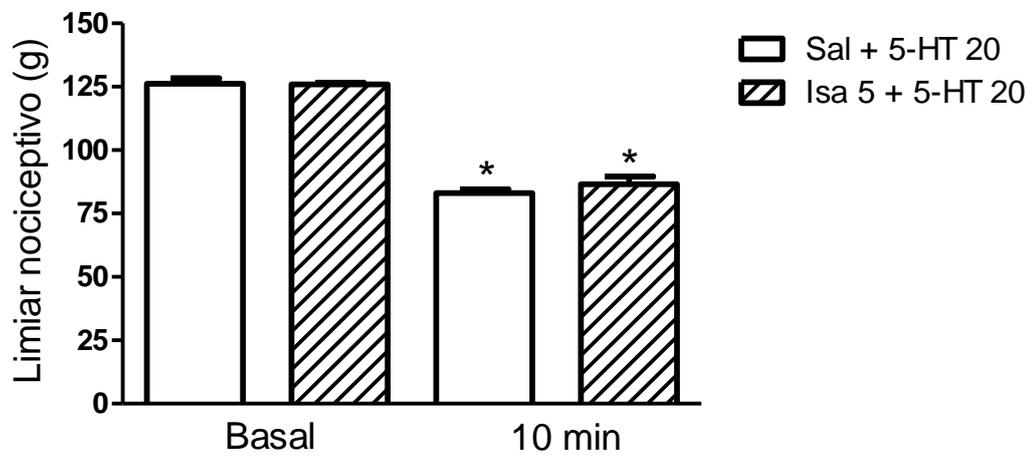


**Figura 18** – Curso temporal da sensibilização induzida por diferentes doses de 5-HT (5, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{g}$ ; 20  $\mu\text{l}$ ; i.pl.) sobre o limiar para retirada de pata frente ao estímulo mecânico em camundongos. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com salina,  $P < 0,05$  ( $n=4$ ).

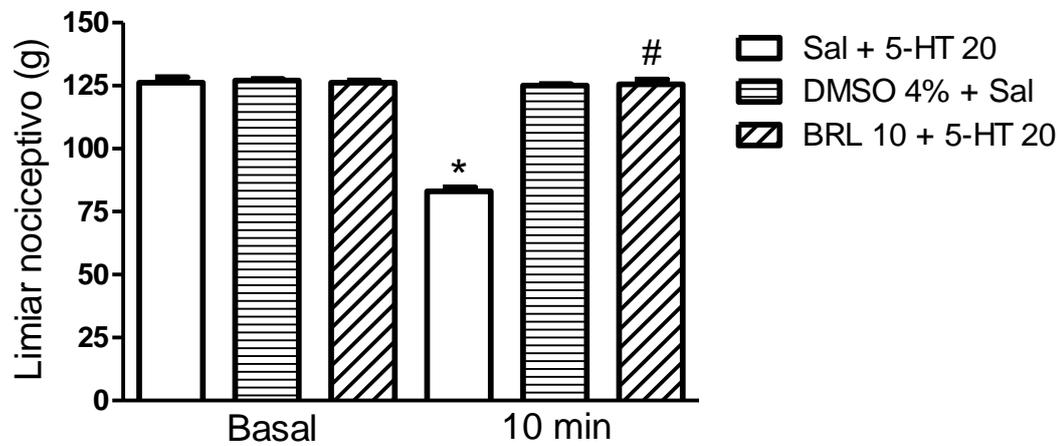
### **7.7 Efeito induzido por antagonistas serotoninérgicos sobre a alodínia mecânica induzida por 5-HT em camundongos**

Para investigar o papel 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> sobre a alodínia mecânica induzida por 5-HT em camundongos, diferentes antagonistas seletivos foram administrados por via i.pl. (20 µl) na pata posterior direita 10 min antes da injeção de 5-HT (20 µg; 20 µl). A medida do limiar nociceptivo dos animais foi feita 10 min após a administração de 5-HT, uma vez que nesse momento, segundo observado em protocolos anteriores, a sensibilização induzida por 5-HT atinge seu valor máximo. Para esses protocolos, as doses dos antagonistas utilizadas foram as doses máximas utilizadas nos protocolos nos quais se avaliou o comportamento de lambida de pata em camundongos.

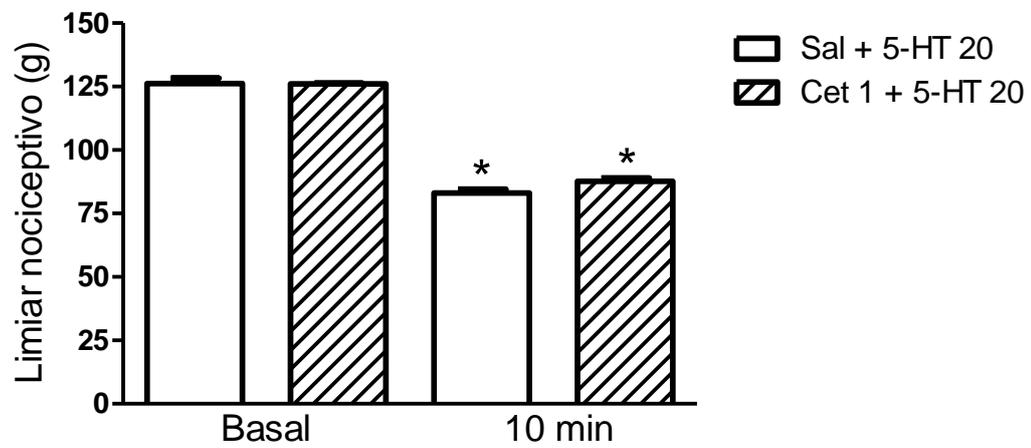
O pré-tratamento (-10 min) com BRL 15572 (10 µg; **Figura 20**) ou SB 269970 (25 µg; **Figura 23**) inibiu a alodínia mecânica induzida por 5-HT em camundongos. Por sua vez, os antagonistas isamoltano (5 µg; **Figura 19**) ou cetanserina (1 µg; **Figura 21**), não induziram efeito antinociceptivo em camundongos. Ondansetrona (20 µg; **Figura 22**), por outro lado, exacerbou a alodínia mecânica induzida por 5-HT.



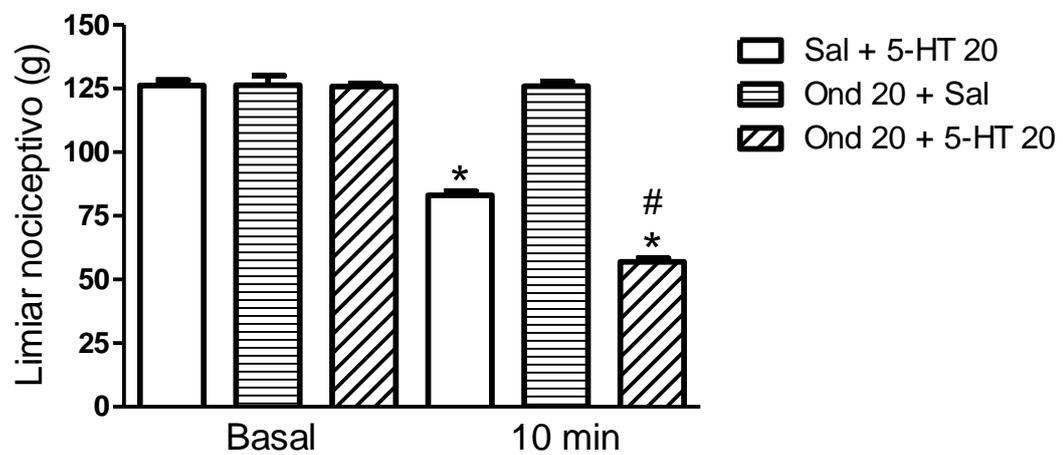
**Figura 19** – Efeito induzido por isamoltano (antagonista 5-HT<sub>1B</sub>; 5 µg; -10 min; 20 µl; i.pl.) sobre a alodínia mecânica induzida por 5-HT (20 µg; 20 µl; i.pl.) em camundongos. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo basal, P<0,05 (n=4).



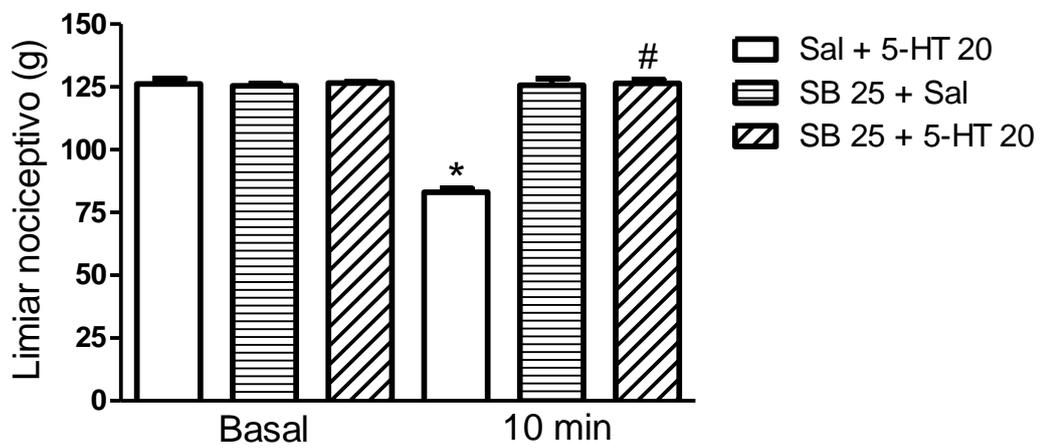
**Figura 20** – Efeito induzido por BRL 15572 (antagonista 5-HT<sub>1D</sub>; 10 µg; -10 min; 20 µl; i.pl.) sobre a alodínia mecânica induzida por 5-HT (20 µg; 20 µl; i.pl.) em camundongos. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo basal; # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com salina, P<0,05 (n=3-4).



**Figura 21** – Efeito induzido por cetanserina (antagonista 5-HT<sub>2A</sub>; 1 µg; -10 min; 20 µl; i.pl.) sobre a alodínia mecânica induzida por 5-HT (20 µg; 20 µl; i.pl.) em camundongos. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo basal; P<0,05 (n=4).



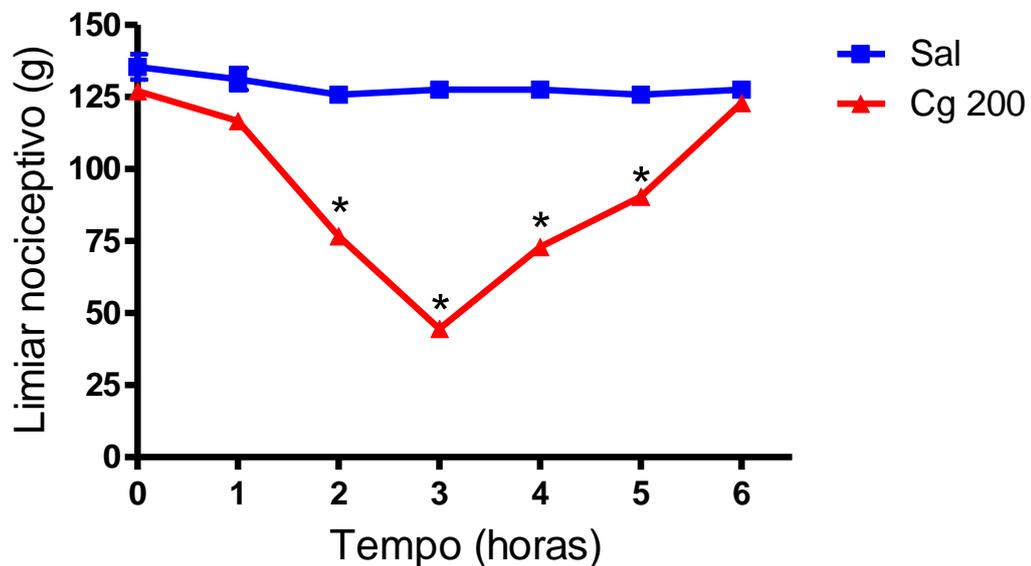
**Figura 22** – Efeito induzido por ondansetrona (antagonista 5-HT<sub>3</sub>; 20 µg; -10 min; 20 µl; i.pl.) sobre a alodínia mecânica induzida por 5-HT (20 µg; 20 µl; i.pl.) em camundongos. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo basal; # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com salina, P<0,05 (n=3-4).



**Figura 23** – Efeito induzido por SB 269970 (antagonista 5-HT<sub>7</sub>; 25 µg; -10 min; 20 µl; i.pl.) sobre a alodínia mecânica induzida por 5-HT (20 µg; 20 µl; i.pl.) em camundongos. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo basal; # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com salina, P<0,05 (n=3-4).

### 7.8 Alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos

Carragenina (200 µg; 20 µl) foi administrada por via i.pl. na pata posterior direita de camundongos. A alodínia mecânica resultante foi mensurada a cada hora e teve duração de 6h, sendo que após esse período o valor do limiar nociceptivo dos animais retornou aos valores basais mensurados anteriormente (**Figura 24**). A sensibilização máxima ocorreu 3 h após a administração de carragenina.

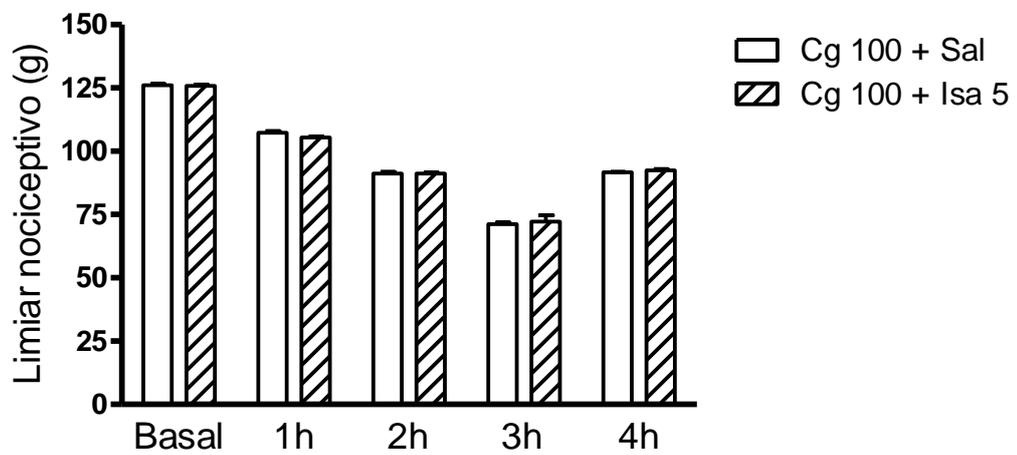


**Figura 24** – Curso temporal da sensibilização induzida por carragenina (200 µg; 20 µl; i.pl.) sobre o limiar para retirada de pata frente ao estímulo mecânico em camundongos. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com salina,  $P < 0,05$  (n=4).

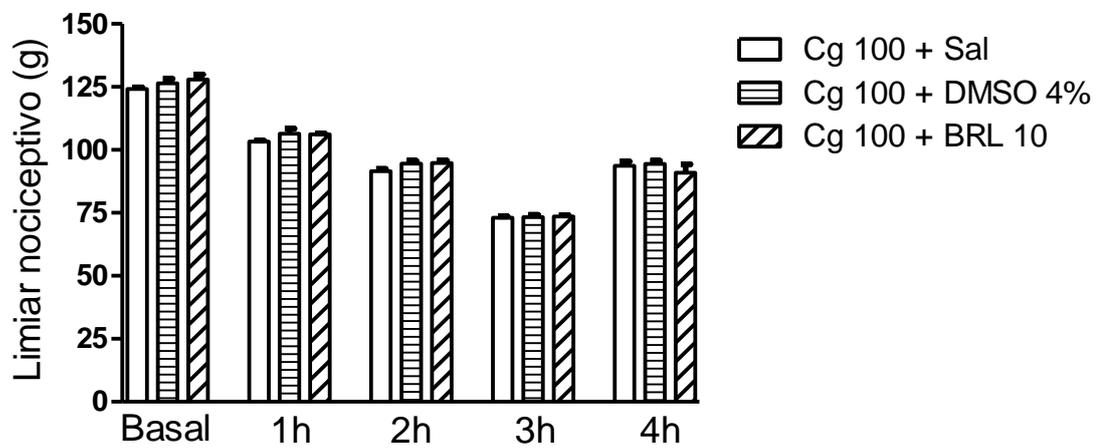
### 7.9 Efeito induzido por antagonistas serotoninérgicos sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos

Para se avaliar o papel 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> sobre a resposta nociceptiva induzida por carragenina (100 µg; 20 µl), antagonistas seletivos foram administrados por via i.pl. (20 µl) 10 min antes da leitura realizada a cada hora, por um período total de observação de 4 h. Nesse caso, para cada medida feita em 1, 2, 3 ou 4 horas após a administração de carragenina, diferentes grupos de animais foram utilizados, de forma que cada grupo recebeu administração dos antagonistas apenas uma vez. Nesses protocolos, a dose de carragenina utilizada (100 µg) foi escolhida para permitir a verificação da ocorrência de aumento ou diminuição do limiar nociceptivo após a administração do antagonista. O período de observação de 4 h foi estabelecido porque contempla a sensibilização máxima (3h) e após esse período já ocorre reversão da sensibilização induzida por carragenina. Para os antagonistas que promoveram efeito sobre a resposta induzida por carragenina e com o objetivo de verificar se essa resposta é ou não de caráter local, um protocolo adicional foi desenvolvido com animais que receberam administração de carragenina nas patas ipsi e contralaterais, sendo o antagonista administrado na pata contralateral e a leitura feita na pata ipsilateral. Nesses protocolos, a mensuração da alodínia mecânica foi realizada 3 h após a administração de carragenina, período no qual ocorre a sensibilização máxima induzida por esse agente.

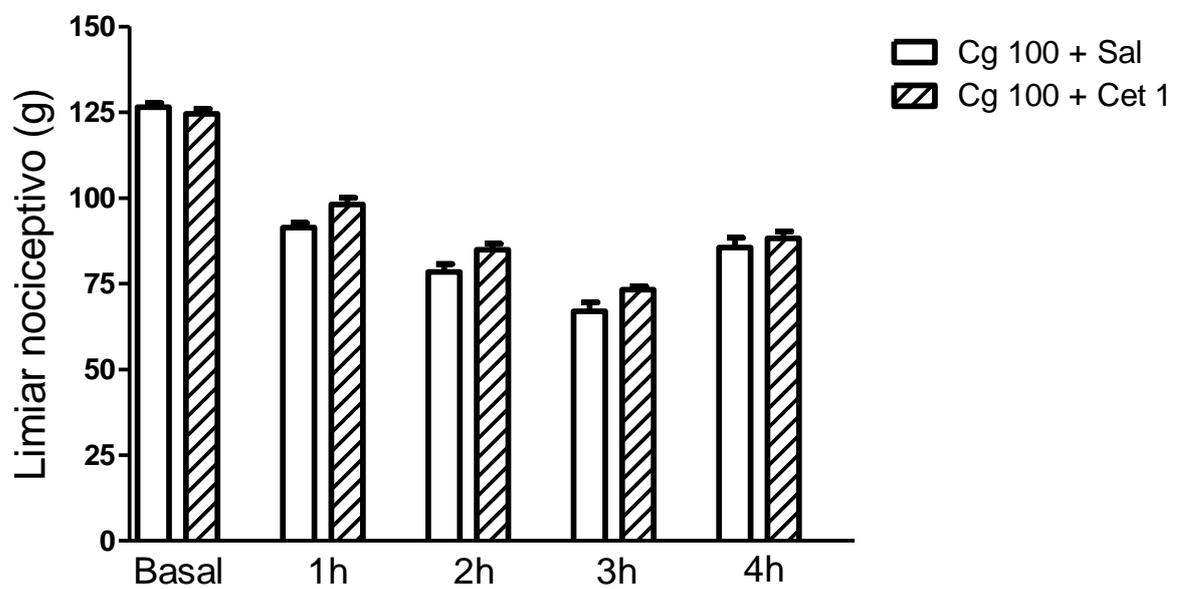
O pré-tratamento (-10 min; 20 µl; i.pl.) com isamoltano (5 µg; **Figura 25**), BRL 15572 (10 µg; **Figura 26**) cetanserina, (1 µg; **Figura 27**) ou SB 269970 (25 µg; **Figura 29**), nas doses utilizadas, não inibiu a alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos. Por outro lado, ondansetrona (20 µg; **Figura 28**), exacerbou a alodínia mecânica induzida por carragenina.



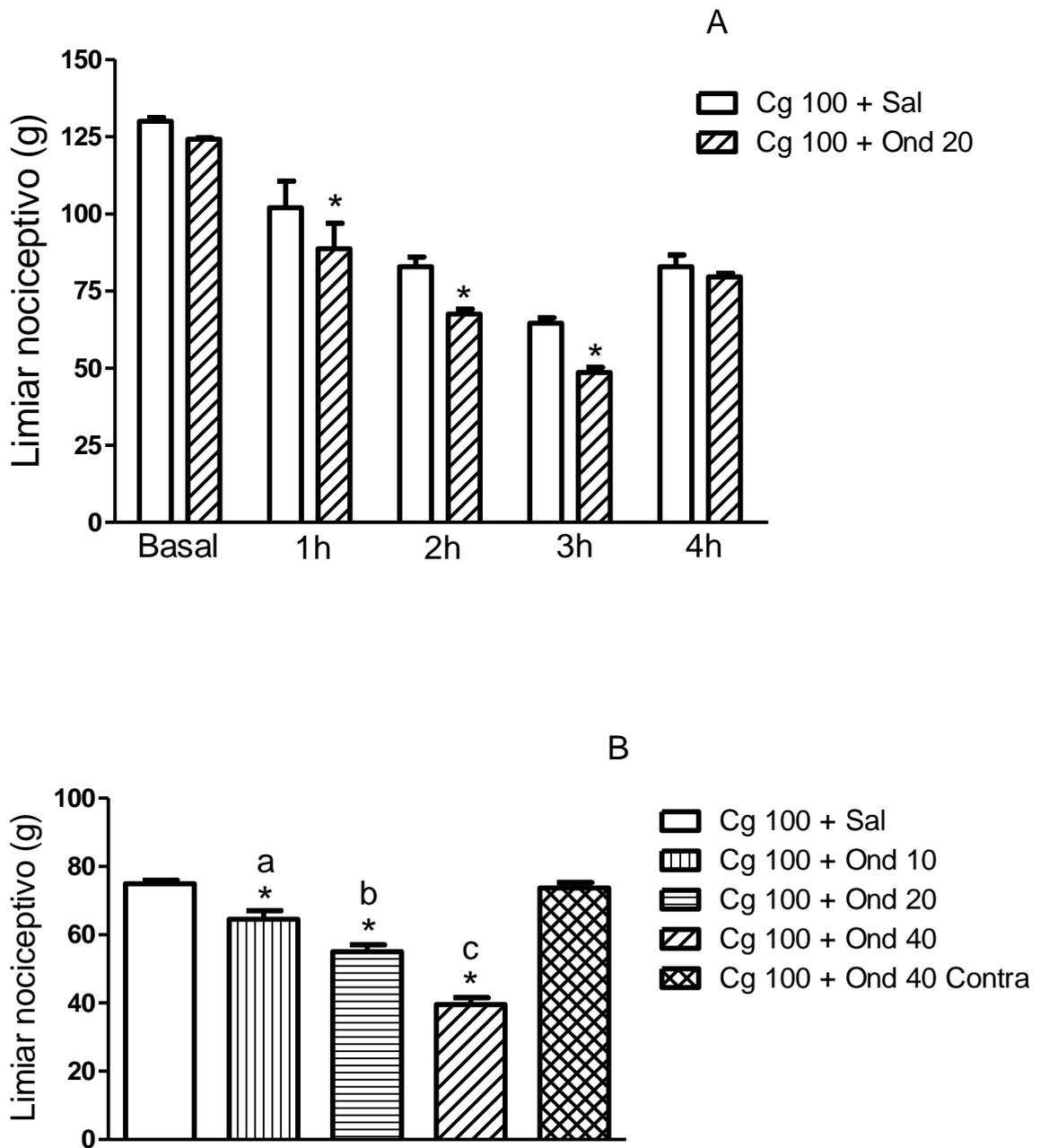
**Figura 25** – Efeito induzido por isamoltano (antagonista 5-HT<sub>1B</sub>; 5 µg; -10 min; 20 µl; i.pl.) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (100 µg; 20 µl; i.pl.) em camundongos. (n=3-4). Todos os grupos apresentaram valores de limiares basais entre 125-130 g.



**Figura 26** – Efeito induzido por BRL 15572 (antagonista 5-HT<sub>1D</sub>; 10 µg; -10 min; 20 µl; i.pl.) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (100 µg; 20 µl; i.pl.) em camundongos. (n=3-4). Todos os grupos apresentaram valores de limiares basais entre 125-130 g.

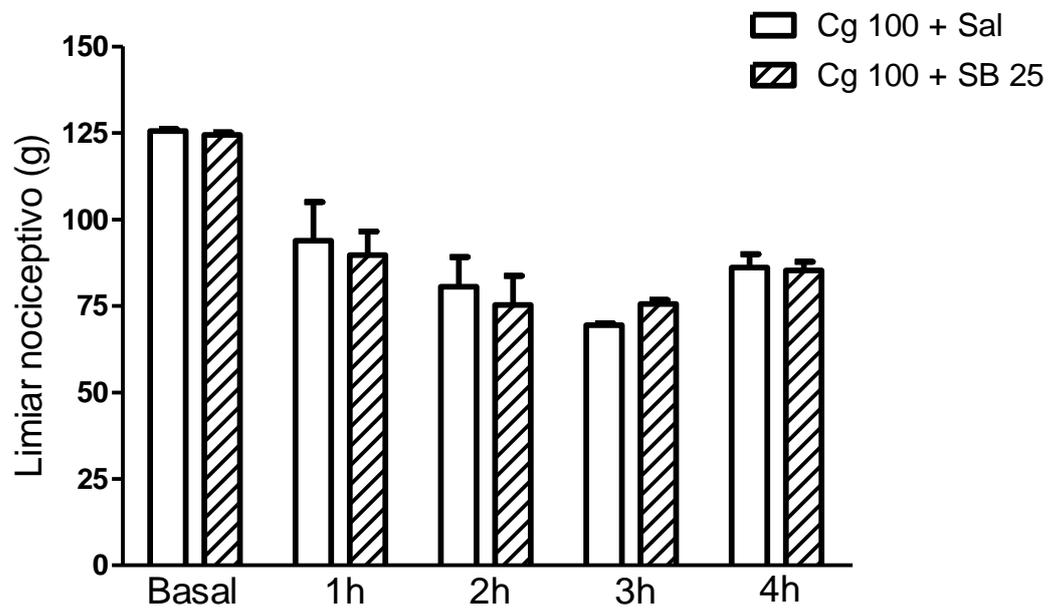


**Figura 27** – Efeito induzido por cetanserina (antagonista 5-HT<sub>2A</sub>; 1 µg; -10 min; 20 µl; i.pl.) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (100 µg; 20 µl; i.pl.) em camundongos. (n=3-4). Todos os grupos apresentaram valores de limiares basais entre 125-130 g.



**Figura 28** – Efeito induzido por ondansetrona (antagonista 5-HT<sub>3</sub>; 20 µg; -10 min; 20 µl; i.pl.) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (100 µg; 20 µl; i.pl.) em camundongos (A).

Efeito induzido por ondansetrona (10, 20 ou 40 µg; -10 min; 20 µl; i.pl.) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (100 µg; 20 µl; i.pl.; 3h) em camundongos (B). \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com salina; a ≠ b ≠ c; P<0,05 (n=3-4). Todos os grupos apresentaram valores de limiares basais entre 125-130 g.



**Figura 29** – Efeito induzido por SB 269970 (antagonista 5-HT<sub>7</sub>; 25 µg; -10 min; 20 µl; i.pl.) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (100 µg; 20 µl; i.pl.) em camundongos. (n=3-4).

### 7.10 Resumo dos efeitos induzidos pelos antagonistas

Figura	Parâmetro avaliado/Estímulo	Antagonista/Receptor/Dose	Resultado
11	Comportamento de lambida 5-HT	Ciproeptadina (antagonista 5-HT <sub>1</sub> e 5-HT <sub>2</sub> ); 0,5 ou 5 µg	<b>Inibição</b>
12	Comportamento de lambida 5-HT	Mianserina (antagonista 5-HT <sub>2</sub> e 5-HT <sub>6</sub> ); 0,05 ou 0,1 µg	<b>Inibição</b>
13	Comportamento de lambida 5-HT	Isamoltano (antagonista 5-HT <sub>1B</sub> ) 0,5 ou 5 µg	<b>Inibição</b>
14	Comportamento de lambida 5-HT	BRL 15572 (antagonista 5-HT <sub>1D</sub> ) 1 ou 10 µg	Sem alteração
15	Comportamento de lambida 5-HT	Cetanserina (antagonista 5-HT <sub>2A</sub> ) 0,1 ou 1 µg	<b>Inibição</b>
16	Comportamento de lambida 5-HT	Ondansetrona (antagonista 5-HT <sub>3</sub> ) 5 ou 20 µg	Sem alteração
17	Comportamento de lambida 5-HT	SB 269970 (antagonista 5-HT <sub>7</sub> ) 2,5 ou 25 µg	Sem alteração
19	Limiar nociceptivo 5-HT	Isamoltano (antagonista 5-HT <sub>1B</sub> ) 5 µg	Sem alteração
20	Limiar nociceptivo 5-HT	BRL 15572 (antagonista 5-HT <sub>1D</sub> ) 10 µg	<b>Aumento</b>
21	Limiar nociceptivo 5-HT	Cetanserina (antagonista 5-HT <sub>2A</sub> ) 1 µg	Sem alteração
22	Limiar nociceptivo 5-HT	Ondansetrona (antagonista 5-HT <sub>3</sub> ) 20 µg	<b>Redução</b>
23	Limiar nociceptivo 5-HT	SB 269970 (antagonista 5-HT <sub>7</sub> ) 25 µg	<b>Aumento</b>
25	Limiar nociceptivo Carragenina	Isamoltano (antagonista 5-HT <sub>1B</sub> ) 5 µg	Sem alteração
26	Limiar nociceptivo Carragenina	BRL 15572 (antagonista 5-HT <sub>1D</sub> ) 10 µg	Sem alteração
27	Limiar nociceptivo Carragenina	Cetanserina (antagonista 5-HT <sub>2A</sub> ) 1 µg	Sem alteração
28	Limiar nociceptivo Carragenina	Ondansetrona (antagonista 5-HT <sub>3</sub> ) 10, 20 ou 40 µg	<b>Redução</b>
29	Limiar nociceptivo Carragenina	SB 269970 (antagonista 5-HT <sub>7</sub> ) 25 µg	Sem alteração

## 8 DISCUSSÃO

A maioria dos estudos que têm investigado o papel da 5-HT no processamento periférico da resposta nociceptiva têm fornecido 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 nesse fenômeno.

Nesse estudo, foi observada a presença de 5-HT e de vários de seus receptores em tecidos periféricos, assim como de RNAm correspondente para tais receptores. Também foi observado que a administração i.pl. de 5-HT em camundongos resulta em resposta nociceptiva caracterizada pelo comportamento de lambida da pata injetada e alodínia mecânica, e que os antagonistas ciproeptadina, mianserina, isamoltano, BRL 15572, cetanserina e SB 269970 inibem essas respostas. Por outro lado, foi demonstrado que ondansetrona exacerba a alodínia mecânica induzida por 5-HT ou carragenina.

No presente estudo, foi demonstrada a presença de 5-HT em tecidos periféricos (patas posteriores) de camundongos. É importante mencionar que a avaliação realizada tem caráter principalmente qualitativo, isto é, demonstração da presença da amina no tecido analisado. Muito provavelmente, o conteúdo encontrado é inferior ao conteúdo real de 5-HT presente na pata dos animais, uma vez que o processo de extração apresenta deficiências inerentes, não sendo capaz de remover toda a amina presente no tecido. Além disso, os valores encontrados correspondem ao conteúdo total de 5-HT no tecido, não se podendo fazer afirmações quanto à sua origem, ou seja, se é proveniente da liberação e presente no meio extracelular ou se é proveniente do conteúdo vesicular intracelular. Apesar de não ser possível definir a origem da 5-HT encontrada, a demonstração da sua presença em tecidos periféricos atende a um dos requisitos para o envolvimento dessa amina no processo investigado.

A presença dos receptores para 5-HT em tecidos periféricos também atende a um dos requisitos básicos para se atribuir um papel direto para essa amina no fenômeno biológico investigado. Em outras palavras, é necessário que o alvo molecular com o qual a substância em questão interage esteja presente e seja identificado,

possibilitando sua modulação farmacológica. Chen *et al.* (1998) demonstraram em cultura de neurônios sensoriais de ratos a presença dos receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> e do RNAm para esses e outros receptores, como 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5A</sub> e 5-HT<sub>5B</sub>.

Wu *et al.* (2001) mostraram por RT-PCR que o RNAm para os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5A</sub> e 5-HT<sub>7</sub> está presente em neurônios DRG, e que o adjuvante completo de Freund aumenta os níveis de RNAm para 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> e 5-HT<sub>7</sub> em ratos. Com essa mesma técnica, Liu e colaboradores (2005) mostraram posteriormente que os níveis de RNAm para os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> aumentam após a administração de veneno de abelha em ratos. Além disso, Wang e colaboradores (2003) mostraram que ocorre um aumento ipsilateral dos níveis de RNAm para receptores 5-HT<sub>1A</sub> em gânglios da raiz dorsal após a administração subcutânea de veneno de abelha em ratos. Esses achados são compatíveis com o fenômeno de modulação positiva ou aumento da expressão de receptores observado para substâncias de papel notadamente importante na resposta nociceptiva ou inflamatória.

Corroborando os achados obtidos nesses estudos, nossos resultados mostraram a presença dos receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>7</sub> em tecidos periféricos de ratos. Nesse caso, a identificação e o aumento da expressão de receptores para 5-HT sob diferentes situações apontam para um papel importante desempenhado por essa amina na resposta nociceptiva ou inflamatória periférica induzida por vários estímulos. Entretanto, é necessário ressaltar que a maioria das informações consolidadas a respeito do envolvimento de 5-HT e de seus receptores em aspectos periféricos da resposta nociceptiva provém de estudos conduzidos em ratos, enquanto que informações sobre esse assunto envolvendo camundongos como espécie alvo da investigação ainda são muito escassas. A investigação da base neuroquímica do processamento nociceptivo em camundongos torna-se ainda mais importante na atualidade, uma vez que camundongos transgênicos e deficientes estão cada vez mais disponíveis para investigações fisiológicas e farmacológicas. Assim, o presente estudo representa uma importante contribuição

ao demonstrar a presença de RNAm para os receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>3</sub> em DRG, mas não na pata de camundongos.

O desenho experimental desse protocolo levou em consideração as características morfológicas dos DRG, constituídos por neurônios pseudounipolares que possuem terminações periféricas, corpo celular não adjacente a essas terminações e projeções para o corno dorsal da medula espinhal. Considerando o fato de que o corpo celular não está presente na periferia, seria compatível com essa argumentação a ausência de RNAm nos fragmentos de tecidos de pata analisados, sendo encontradas apenas as proteínas ou receptores expressos e localizados na membrana das células. De fato, os resultados encontrados pela qPCR mostraram a presença de RNAm para os receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>3</sub> apenas em DRG, mas não em tecido de pata de camundongos. Esses resultados sugerem indiretamente que os receptores de 5-HT encontrados em tecidos periféricos estão localizados em nociceptores, e que a resposta induzida por 5-HT decorre, em primeira instância, de sua interação com esses receptores.

Tendo sido demonstrada a presença dos receptores para 5-HT em tecidos periféricos de ratos assim como de RNAm para esses receptores em DRG de camundongos, o presente estudo investigou nestes animais os efeitos induzidos pela administração local de 5-HT bem como a modulação farmacológica induzida por diferentes antagonistas para receptores dessa amina em diferentes modelos.

Em camundongos, a administração i.pl. de 5-HT induziu resposta nociceptiva intensa, caracterizada pelo comportamento de lambida da pata injetada. De forma análoga, 5-HT também induz alterações indicativas de comportamento nociceptivo, como o comportamento de chacoalhar a pata em ratos (TAMBELI *et al.*, 2006). Nesse mesmo estudo, foi observado que a resposta induzida por 5-HT em doses superiores às utilizadas em nosso estudo apresenta duração de 30 min, com resposta máxima ocorrendo já aos 6 min. Esses resultados apresentam semelhança com os obtidos no presente estudo, onde a administração de 5-HT em camundongos induziu resposta nociceptiva com duração de 20 min, com resposta máxima observada aos 10 min. De forma conjunta, esses resultados sugerem que a

resposta direta induzida por 5-HT tem curta duração, provavelmente associada à sua rápida biotransformação, recaptação ou difusão para tecidos adjacentes.

Também já foi demonstrado em ratos que a injeção i.pl. de 5-HT induz edema de pata (COLE *et al.*, 1995) e resposta nociceptiva (SUFKA *et al.*, 1992; TAIWO & LEVINE, 1992). A capacidade de indução de resposta nociceptiva por 5-HT abrange várias espécies, incluindo as mais evoluídas, já tendo sido relatado que 5-HT, quando administrada perifericamente, induz dor em humanos (JENSEN *et al.*, 1990). A complexidade das respostas induzidas por 5-HT acompanha a complexidade evolutiva das espécies, possivelmente associada a um maior número de alvos moleculares com os quais 5-HT possa interagir ou de processos biológicos nos quais essa amina possa estar envolvida (GILLETTE, 2006).

A rapidez do estabelecimento da resposta nociceptiva induzida por 5-HT provavelmente resulta da ativação direta de nociceptores. É possível que essa interação resulte em alterações da permeabilidade da membrana neuronal a diferentes íons, com aumento das correntes de sódio e cálcio.

De fato, além da presença de receptores para 5-HT identificados em fibras aferentes primárias, incluindo 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> e 5-HT<sub>7</sub> (TAIWO & LEVINE, 1992; ABBOTT *et al.*, 1996; DOAK & SAWYNOK, 1997; MEUSER *et al.*, 2002; OKAMOTO *et al.*, 2002; ERNBERG *et al.*, 2000; SOMMER, 2004), também já é conhecida a capacidade dessa amina de causar ativação e sensibilização de fibras aferentes primárias (RUEFF & DRAY, 1992; KRESS & REEH, 1996), assim como despolarização de neurônios DRG isolados (HOLZ & ANDERSON, 1984; HOLZ *et al.*, 1985; MALONE *et al.*, 1991). Nesse contexto, é provável que entre os receptores para 5-HT já identificados, os receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> atuem de forma mais direta e imediata para a ativação de fibras aferentes primárias, uma vez que esses receptores permitem rápido influxo de íons como Na<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup>, o que contribui para a ativação/despolarização de fibras aferentes primárias e estabelece relação direta com as alterações comportamentais mostradas nesse estudo ou em outros já publicados (TODOROVIC & ANDERSON, 1990; TODOROVIC *et al.*, 1997).

No presente estudo, foi demonstrado que ciproptadina, mianserina, isamoltano e cetanserina inibiram o comportamento de lambida de pata induzido por 5-HT, sugerindo um papel importante dos receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>6</sub> nessa resposta.

O papel dos receptores 5-HT<sub>1</sub> na resposta nociceptiva periférica ainda não é completamente caracterizado e alguns estudos apontam para uma função inibitória ou antinociceptiva para esses receptores. 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. 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). Esses resultados sugerem um papel inibitório desempenhado por esses receptores em diferentes situações, e estão em consonância com os mecanismos moleculares dos segundos mensageiros gerados quando da ativação desses receptores, uma vez que os mesmos são acoplados às proteínas G<sub>i/o</sub> que promovem a abertura de canais de potássio (HOYER *et al.*, 1994; HANNON & HOYER, 2008).

Entretanto, a despeito de algumas evidências sugerindo um papel antinociceptivo para os receptores 5-HT<sub>1</sub>, o presente estudo mostrou que os mesmos receptores também podem ter função pró-nociceptiva, uma vez que isamoltano, um antagonista 5-HT<sub>1B</sub>, inibiu o comportamento de lambida de pata e que BRL 15572, um antagonista 5-HT<sub>1D</sub>, inibiu a hiperalgesia mecânica induzidos por 5-HT em camundongos. Alguns estudos sugerem que esses receptores também possam exercer papel excitatório, já tendo sido demonstrado que a ativação de 5-HT<sub>1B/1D</sub> pode estar associada a produção de fosfato de inositol e aumento das concentrações intracelulares de Ca<sup>+2</sup>, o que induz contração de musculatura lisa vascular em diferentes tecidos (EBERSOLE *et al.*, 1993; ZGOMBICK *et al.*, 1993; DICKENSON & HILL, 1995; WURCH & PAUWELS, 2000). Esses resultados sugerem que os mecanismos moleculares e segundos mensageiros gerados após a

ativação dos receptores 5-HT<sub>1</sub> podem variar em diferentes tecidos e espécies, o que contribui para a diversidade de resultados encontrados na literatura.

Também foi mostrado no presente estudo que cetanserina, um antagonista seletivo 5-HT<sub>2A</sub>, inibe o comportamento de lambida de pata induzido por 5-HT. Em concordância com esse resultado, vários outros estudos também já evidenciaram o papel desses receptores no processamento periférico da resposta nociceptiva, já tendo sido demonstrado que esse mesmo antagonista reduz a hiperalgesia térmica ou mecânica em ratos induzidas por vários estímulos, incluindo 5-HT, apenas quando administrados na pata ipsilateral (TOKUNAGA *et al.*, 1998; WEI *et al.*, 2005; HONG *et al.*, 2006). Além disso, a injeção na pata ipsi, mas não na pata contralateral de sarpogrelato, outro antagonista seletivo desses receptores, também apresentou atividade em ratos nos modelos das respostas nociceptivas induzidas por formaldeído e calor (OBATA *et al.*, 2000; SASAKI *et al.*, 2006). De forma conjunta, esses resultados indicam que os receptores 5-HT<sub>2A</sub> desempenham papel pró-algésico e são importantes para o estabelecimento da resposta nociceptiva induzida por vários estímulos. Adicionalmente, considerando-se que nesses estudos os efeitos induzidos por cetanserina e sarpogrelato resultaram de sua administração local e não sistêmica, ressalta-se o envolvimento dos receptores 5-HT<sub>2</sub> em aspectos periféricos dos eventos investigados.

O envolvimento dos receptores 5-HT<sub>3</sub> na resposta nociceptiva periférica ainda não foi completamente estabelecido e sua investigação tem gerado resultados controversos, já tendo sido observado que antagonistas 5-HT<sub>3</sub> inibem o comportamento nociceptivo e a alodínia mecânica induzidos por formaldeído e 5-HT em ratos (DOAK & SAWYNOK, 1997; PARADA *et al.*, 2001; TAMBELI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Em outros estudos, entretanto, já foi mostrado que agonistas 5-HT<sub>3</sub> não induzem hiperalgesia térmica ou mecânica assim como tropisetron (antagonista 5-HT<sub>3</sub>) não inibe a resposta nociceptiva induzida por 5-HT em ratos (TAIWO & LEVINE, 1992; TOKUNAGA *et al.*, 1998). Em consonância a esses resultados, Doi-Saika e colaboradores (1997) mostraram que não há aumento ipsilateral na expressão de cFos espinhal após administração periférica de agonistas 5-HT<sub>3</sub>, assim como tropisetron não inibe o aumento dessa expressão induzido por 5-HT.

No presente estudo, foi observado que ondansetrona, um antagonista 5-HT<sub>3</sub>, não inibiu o comportamento de lambida de pata, mas exacerbou a alodínia mecânica induzida por 5-HT ou carragenina em camundongos, sugerindo que nessa espécie, os receptores 5-HT<sub>3</sub> também possam contribuir para a antinocicepção. Várias razões ajudam a esclarecer essa divergência, podendo a mesma ser atribuída às diferenças entre os estímulos, as doses administradas, espécies utilizadas e ao fato de que, ao contrário dos nossos protocolos, em muitos estudos mencionados os antagonistas foram co-administrados ao estímulo, o que pode contribuir para interpretações heterogêneas. Em nossos protocolos, a administração dos antagonistas ocorreu 10 min antes da injeção de 5-HT, intervalo para que ocorra a difusão do antagonista bem como sua eventual ligação aos receptores disponíveis. Em nossa interpretação, com essa abordagem é possível discorrer com mais isenção sobre o papel dos receptores investigados sobre a resposta nociceptiva induzida por 5-HT uma vez que os receptores foram previamente bloqueados pelos antagonistas e assim sua influência sobre o evento biológico em questão é investigada de forma mais objetiva, com menos variações ou interferências.

Embora não abordem diretamente aspectos periféricos da resposta nociceptiva, outros estudos mostram que os receptores 5-HT<sub>3</sub> também apresentam papel antinociceptivo. 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 de um antagonista 5-HT<sub>3</sub>. Adicionalmente, em camundongos, já foi demonstrado no modelo de contorções abdominais que o efeito antinociceptivo de paroxetina é reduzido por ondansetrona, reforçando o papel inibitório dos receptores 5-HT<sub>3</sub> sobre esse evento (KESIM *et al.*, 2005). Em outras palavras, os resultados encontrados no presente estudo representam a primeira demonstração de efeitos inibitórios ou de modulação negativa sobre aspectos periféricos da resposta nociceptiva atribuídos aos receptores 5-HT<sub>3</sub> em camundongos. Estes resultados indicam que um papel inibitório sobre o processamento da resposta nociceptiva pode ser atribuído a receptores 5-HT<sub>3</sub> tanto periféricos quanto centrais.

O papel dos receptores 5-HT<sub>7</sub> na resposta nociceptiva periférica também é pouco conhecido e ainda está sob crescente investigação. Esses receptores já foram identificados em neurônios sensoriais (CHEN *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2001; SOMMER, 2004) e seu sistema de sinalização intracelular resulta em aumento de AMPc. 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 nosso estudo, embora esse mesmo antagonista não tenha inibido o comportamento de lambida de pata, foi observada inibição da alodínia mecânica induzida por 5-HT em camundongos, o que corrobora resultados prévios de outros pesquisadores e sugere de forma conjunta que esses receptores desempenham papel predominantemente excitatório ou pró-algésico sobre a resposta nociceptiva periférica.

Além do mais, considerando-se que 5-HT induz resposta por interação local com múltiplos receptores, é provável que, na presença de apenas um antagonista seletivo, 5-HT interaja com outros receptores de perfil excitatório, induzindo assim a resposta nociceptiva observada. O fato de alguns antagonistas seletivos inibirem de forma isolada a resposta induzida por 5-HT em um modelo específico indica que a influência dos receptores investigados sobre a resposta em questão suplanta a de outros receptores, o que justifica sua investigação e caracterização em diferentes modelos experimentais.

A exemplo de resultados conflitantes em função de múltiplas possibilidades investigativas e da ubiquidade de 5-HT em diferentes células e tecidos, a resposta nociceptiva induzida por 5-HT é bastante complexa e pode ser causada por ação direta, como ativação ou sensibilização de nociceptores, mas também por mecanismos indiretos. Recentemente, foi demonstrado que administração periférica de 5-HT induz migração celular e que a resposta nociceptiva e hiperalgesia mecânica induzidas por essa amina são inibidas por fucoidano, indometacina, antagonistas adrenérgicos e dopaminérgicos, sugerindo o envolvimento de eicosanóides, norepinefrina e dopamina na resposta induzida por 5-HT (TAMBELLI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O mecanismo pelo qual 5-HT induz migração de neutrófilos ainda não é conhecido, mas pode envolver a liberação de citocinas e quimiocinas por macrófagos ativados por 5-HT, visto que expressam receptores para essa amina (JACKSON *et al.*, 1988; SEIDE *et al.*, 2004; KUBERA *et al.*, 2005). Por outro lado, é possível que 5-HT, por meio da interação com seus receptores de perfil excitatório, como 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, possa induzir a liberação de norepinefrina em terminações pós-ganglionares simpáticas, que por sua vez ativaria os receptores para as catecolaminas contribuindo dessa forma para a resposta nociceptiva induzida por 5-HT.

## 9 CONCLUSÃO

Concluindo, o presente estudo demonstrou a presença de 5-HT e de RNAm para alguns de seus receptores em tecidos periféricos assim como o comportamento de lambida de pata e alodínia mecânica induzidos por 5-HT em camundongos. Além disso, foi demonstrado que a resposta nociceptiva induzida por 5-HT ou carragenina pode ser inibida ou exacerbada por diferentes antagonistas, sugerindo um importante papel para os receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> nos eventos investigados. Finalmente, nossos resultados representam a primeira evidência de um papel inibitório atribuído aos receptores 5-HT<sub>3</sub> no processamento periférico da resposta nociceptiva em camundongos. Os resultados mostram que 5-HT, interagindo com seus receptores diretamente em fibras aferentes primárias nociceptivas ou em células inflamatórias adjacentes, é importante para a resposta nociceptiva em diferentes condições. Assim, a caracterização e a avaliação farmacológica da resposta nociceptiva periférica induzida por 5-HT é essencial para que se possa ter um melhor entendimento da contribuição dessa amina nesse processo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F. V.; HONG, Y.; BLIER, P. Activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. *Neuropharmacology*, v.35, n.1, p.99-110, Jan. 1996.
- ALVES, R. V.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Receptor subtypes involved in tachykinin-mediated edema formation. *Peptides*, v.20, n.8, p.921-7. 1999.
- AMANN, R.; SCHULIGOI, R.; LANZ, I.; DONNERER, J. Histamine-induced edema in the rat paw--effect of capsaicin denervation and a CGRP receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*, v.279, n.2-3, p.227-31, Jun 12. 1995.
- 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.
- ARMSTRONG, R. A.; MARR, C.; JONES, R. L. Characterization of the EP-receptor mediating dilatation and potentiation of inflammation in rabbit skin. *Prostaglandins*, v.49, n.4, p.205-24, Apr. 1995.
- BARRINGTON, R.; ZHANG, M.; FISCHER, M.; CARROLL, M. C. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol Rev*, v.180, p.5-15, Apr. 2001.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res*, v.924, n.2, p.219-28, Jan 11. 2002.
- BILEVICIUTE, I.; STENFORS, C.; THEODORSSON, E.; LUNDEBERG, T. Unilateral injection of calcitonin gene-related peptide (CGRP) induces bilateral oedema formation and release of CGRP-like immunoreactivity in the rat hindpaw. *Br J Pharmacol*, v.125, n.6, p.1304-12, Nov. 1998.
- BONNET, M.; LESPINATS, G.; BURTIN, C. Evidence for serotonin (5HT) binding sites on murine lymphocytes. *Int J Immunopharmacol*, v.9, n.5, p.551-8. 1987.
- 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, Mar 14. 1957.
- BROWN, N.J. & ROBERTS II, J. Histamina, bradicinina e seus antagonistas. In: *GOODMAN & GILMAN, As bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. cap. 25, p. 485-501.
- BUCKLEY, T. L.; BRAIN, S. D.; COLLINS, P. D.; WILLIAMS, T. J. Inflammatory edema induced by interactions between IL-1 and the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. *J Immunol*, v.146, n.10, p.3424-30, May 15. 1991.

CAIRNS, B. E.; GAMBAROTA, G.; SVENSSON, P.; ARENDT-NIELSEN, L.; BERDE, C. B. Glutamate-induced sensitization of rat masseter muscle fibers. *Neuroscience*, v.109, n.2, p.389-99. 2002.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*, v.24, p.487-517. 2001.

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.

CHEN, J. J.; VASKO, M. R.; WU, X.; STAEVA, T. P.; BAEZ, M.; ZGOMBICK, J. M.; NELSON, D. L. Multiple subtypes of serotonin receptors are expressed in rat sensory neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther*, v.287, n.3, p.1119-27, Dec. 1998.

CHEN, X.; TANNER, K.; LEVINE, J. D. Mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors by prostaglandin E2 in the rat. *Neurosci Lett*, v.267, n.2, p.105-8, May 28. 1999.

CHU, D. Q.; CHOY, M.; FOSTER, P.; CAO, T.; BRAIN, S. D. A comparative study of the ability of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin(13 - 52) to modulate microvascular but not thermal hyperalgesia responses. *Br J Pharmacol*, v.130, n.7, p.1589-96, Aug. 2000.

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

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, Mar. 1995.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Eds.). *Robbins pathologic basis of disease*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 1999. cap. 3, p. 50-88.

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*, p.SUPPL 232:1-55. 1964.

DAVIS, A. J.; PERKINS, M. N. The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. *Br J Pharmacol*, v.113, n.1, p.63-8, Sep. 1994.

DICKENSON, J. M.; HILL, S. J. Coupling of an endogenous 5-HT<sub>1B</sub>-like receptor to increases in intracellular calcium through a pertussis toxin-sensitive mechanism in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol*, v.116, n.7, p.2889-96, Dec. 1995.

DOI-SAIKA, M.; TOKUNAGA, A.; SENBA, E. Intradermal 5-HT induces Fos expression in rat dorsal horn neurons not via 5-HT<sub>3</sub> but via 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *Neurosci Res*, v.29, n.2, p.143-9, Oct. 1997.

DOAK, G. J.; SAWYNOK, J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience*, v.80, n.3, p.939-49, Oct. 1997.

DONG, Y. J.; JONES, R. L.; WILSON, N. H. Prostaglandin E receptor subtypes in smooth muscle: agonist activities of stable prostacyclin analogues. *Br J Pharmacol*, v.87, n.1, p.97-107, Jan. 1986.

DOUGLASS, J.; DHAMI, D.; BULPITT, M.; LINDLEY, I. J.; SHUTE, J.; CHURCH, M. K.; HOLGATE, S. T. Intradermal challenge with interleukin-8 causes tissue oedema and neutrophil accumulation in atopic and non-atopic human subjects. *Clin Exp Allergy*, v.26, n.12, p.1371-9, Dec. 1996.

EBERSOLE, B. J.; DIGLIO, C. A.; KAUFMAN, D. W.; BERG, K. A. 5-Hydroxytryptamine<sub>1</sub>-like receptors linked to increases in intracellular calcium concentration and inhibition of cyclic AMP accumulation in cultured vascular smooth muscle cells derived from bovine basilar artery. *J Pharmacol Exp Ther*, v.266, n.2, p.692-9, Aug. 1993.

ECKERT, S. P.; TADDESE, A.; MCCLESKEY, E. W. Isolation and culture of rat sensory neurons having distinct sensory modalities. *J Neurosci Methods*, v.77, n.2, p.183-90, Dec 1. 1997.

ERNBERG, M.; LUNDEBERG, T.; KOPP, S. Pain and allodynia/hyperalgesia induced by intramuscular injection of serotonin in patients with fibromyalgia and healthy individuals. *Pain*, v.85, n.1-2, p.31-9, Mar. 2000.

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, May 10. 1952.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M.; DE ABREU CASTRO, M. S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Prostaglandins*, v.16, n.1, p.31-7, Jul. 1978.

FUKUOKA, H.; KAWATANI, M.; HISAMITSU, T.; TAKESHIGE, C. Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 beta in the rat. *Brain Res*, v.657, n.1-2, p.133-40, Sep 19. 1994.

GILLETTE, R. Evolution and Function in Serotonergic Systems. *Integr Comp Biol*, v. 46, n. 6, p. 838–846, Jul 25. 2006.

GIORDANO, J.; GERSTMANN, H. Patterns of serotonin- and 2-methylserotonin-induced pain may reflect 5-HT<sub>3</sub> receptor sensitization. *Eur J Pharmacol*, v.483, n.2-3, p.267-9, Jan 12. 2004.

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, Oct 24. 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.

HAMILTON, S. G.; WADE, A.; MCMAHON, S. B. The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat. *Br J Pharmacol*, v.126, n.1, p.326-32, Jan. 1999.

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, Dec 29. 1955.

HOLZ, G. G. T.; ANDERSON, E. G. The actions of serotonin on frog primary afferent terminals and cell bodies. *Comp Biochem Physiol C*, v.77, n.1, p.13-21. 1984.

HOLZ, G. G. T.; SHEFNER, S. A.; ANDERSON, E. G. Serotonin depolarizes type A and C primary afferents: an intracellular study in bullfrog dorsal root ganglion. *Brain Res*, v.327, n.1-2, p.71-9, Feb 18. 1985.

HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmacol*, v.30, n.1, p.5-11, Jan. 1998.

HONG, Y; JI, H; WEI, H. Topical ketanserin attenuates hyperalgesia and inflammation in arthritis in rats. *Pain*, v.124, n.1-2, p.27-33, Sep. 2006.

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, Jun. 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, Apr. 2002.

HRUBEY, P. S.; HARVEY, A. K.; BENDELE, A. M.; CHANDRASEKHAR, S. Effects of anti-arthritic drugs on IL-1 induced inflammation in rats. *Agents Actions*, v.34, n.1-2, p.56-9, Sep. 1991.

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, Feb. 2001.

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Involvement of tachykinin receptors in oedema formation and plasma extravasation induced by substance P, neurokinin A, and neurokinin B in mouse ear. *Inflamm Res*, v.45, n.7, p.316-23, Jul. 1996.

JACKSON, J. C.; WALKER, R. F.; BROOKS, W. H.; ROSZMAN, T. L. Specific uptake of serotonin by murine macrophages. *Life Sci*, v.42, n.17, p.1641-50. 1988.

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, Nov-Dec. 1990.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v.413, n.6852, p.203-10, Sep 13. 2001.

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, Dec. 1992.

KEITH, R. A.; SALAMA, A. I. Individual variations of prostanoid agonist responses in rabbit aorta: evidence for the independent regulation of prostanoid receptor subtypes. *Br J Pharmacol*, v.92, n.1, p.133-48, Sep. 1987.

KENNEDY, I.; COLEMAN, R. A.; HUMPHREY, P. P.; LEVY, G. P.; LUMLEY, P. Studies on the characterisation of prostanoid receptors: a proposed classification. *Prostaglandins*, v.24, n.5, p.667-89, Nov. 1982.

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, Jan. 2005.

KOBAYASHI, T.; NARUMIYA, S. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v.68-69, p.557-73, Aug. 2002.

KRESS, M.; REEH, P. W. More sensory competence for nociceptive neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.93, n.26, p.14995-7, Dec 24. 1996.

KUBERA, M.; MAES, M.; KENIS, G.; KIM, Y. K.; LASON, W. Effects of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Psychiatry Res*, v.134, n.3, p.251-8, Apr 30. 2005.

LAM, F. F.; YIP, A. L. Unique gradual and sustained vasodilator response to substance P in the rabbit knee joint. *Eur J Pharmacol*, v.400, n.2-3, p.327-35, Jul 21. 2000.

LEWIN, G. R.; LU, Y.; PARK, T. J. A plethora of painful molecules. *Curr Opin Neurobiol*, v.14, n.4, p.443-9, Aug. 2004.

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*, v.375, n.1, p.42-6, Feb 25. 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v.193, n.1, p.265-75, Nov. 1951.

MALONE, H. M.; PETERS, J. A.; LAMBERT, J. J. Physiological and pharmacological properties of 5-HT<sub>3</sub> receptors--a patch clamp-study. *Neuropeptides*, v.19 Suppl, p.25-30, Jul. 1991.

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

MEUSER, T.; PIETRUCK, C.; GABRIEL, A.; XIE, G. X.; LIM, K. J.; PIERCE PALMER, P. 5-HT<sub>7</sub> receptors are involved in mediating 5-HT-induced activation of rat primary afferent neurons. *Life Sci*, v.71, n.19, p.2279-89, Sep 27. 2002.

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

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, v.57, n.1, p.1-164, Jan. 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, v.66, n.6, p.355-474, Apr. 2002.

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

NAYEBI, A. R.; HASSANPOUR, M.; REZAZADEH, H. Effect of chronic and acute administration of fluoxetine and its additive effect with morphine on the behavioural response in the formalin test in rats. *J Pharm Pharmacol*, v.53, n.2, p.219-25, Feb. 2001.

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

OBATA, H.; SAITO, S.; ISHIZAKI, K.; GOTO, F. Antinociception in rat by sarpogrelate, a selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, is peripheral. *Eur J Pharmacol*, v.404, n.1-2, p.95-102, Sep 15. 2000.

OKAMOTO, K.; IMBE, H.; MORIKAWA, Y.; ITOH, M.; SEKIMOTO, M.; NEMOTO, K.; SENBA, E. 5-HT<sub>2A</sub> receptor subtype in the peripheral branch of sensory fibers is

involved in the potentiation of inflammatory pain in rats. *Pain*, v.99, n.1-2, p.133-43, Sep. 2002.

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, Sep 2. 2004.

OLIVEIRA, M. C.; PELEGRINI-DA-SILVA, A.; PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H. 5-HT acts on nociceptive primary afferents through an indirect mechanism to induce hyperalgesia in the subcutaneous tissue. *Neuroscience*, v.145, n.2, p.708-14, Mar 16. 2007.

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, Jan. 1996.

PERKINS, M. N.; KELLY, D.; DAVIS, A. J. Bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor mechanisms and cytokine-induced hyperalgesia in the rat. *Can J Physiol Pharmacol*, v.73, n.7, p.832-6, Jul. 1995.

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

RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: *Textbook of Pain*, ed. WALL, P.D.; MELZACK, R., p. 11-57. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

RANDALL, L.O.; SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, v.111, n.4, p.409-19, Sep 1. 1957.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap.12, p.164-188.

RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A.; PAGE, I. H. Crystalline Serotonin. *Science*, v.108, n.2804, p.329-30, Sep 24. 1948. (a)

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, Dec. 1948. (b)

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, Jun. 1948. (c)

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, May 10. 1952.

ROCHA, E. S. M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol*, v.156, n.2, p.261-73, Feb. 1949.

ROCHA-GONZALEZ, 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*, v.117, n.1-2, p.182-92, Sep. 2005.

RUEFF, A.; DRAY, A. 5-Hydroxytryptamine-induced sensitization and activation of peripheral fibres in the neonatal rat are mediated via different 5-hydroxytryptamine-receptors. *Neuroscience*, v.50, n.4, p.899-905, Oct. 1992.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation. A review. *Am J Pathol*, v.86, n.1, p.183-276, Jan. 1977.

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*. 12<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 2011. cap. 13, p. 335-361.

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, Mar. 1981.

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, Jul 13. 2001.

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, May. 2006.

SEIDE, M. F.; ULRICH-MERZENICH, G.; FIEBICH, B.; CANDELARIO-JALIL, E.; KOCH, F. W.; VETTER, H. Tropicisetron inhibits serotonin-induced PGE<sub>2</sub> release from macrophage-like synovial cells in serum-free tissue culture. *Scand J Rheumatol Suppl*, v.119, p.33. 2004.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, v.18, n.3, p.385-405, Sep. 2004.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, v.150, n.1, p.76-85, Oct. 1985.

SNIDER, W. D.; MCMAHON, S. B. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, v.20, n.4, p.629-32, Apr. 1998.

SOMMER, C. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. *Mol Neurobiol*, v.30, n.2, p.117-25, Oct. 2004.

SOUNVORAVONG, S.; NAKASHIMA, M. N.; WADA, M.; NAKASHIMA, K. Decrease in serotonin concentration in raphe magnus nucleus and attenuation of morphine analgesia in two mice models of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, v.484, n.2-3, p.217-23, Jan 26. 2004.

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, Jan. 1992.

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.

TAMBELI, C. H.; OLIVEIRA, M. C.; CLEMENTE, J. T.; PELEGRINI-DA-SILVA, A.; PARADA, C. A. A novel mechanism involved in 5-hydroxytryptamine-induced nociception: the indirect activation of primary afferents. *Neuroscience*, v.141, n.3, p.1517-24, Sep 1. 2006.

TODOROVIC, S.; ANDERSON, E.G. 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors mediate two distinct depolarizing responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res*, v.511, n.1, p.71-9, Mar 12. 1990.

TODOROVIC, S.M.; SCROGGS, R.S.; ANDERSON, E.G. Cationic modulation of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in rat sensory neurons: the role of K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. *Brain Res*, v.765, n.2, p.291-300, Aug 15. 1997.

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*, v.76, n.3, p.349-55, Jun. 1998.

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, Jun 10. 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, Oct. 1953.

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

VALE, S.R.; GLÓRIA, M.B. Determination of biogenic amines in cheese. *J AOAC Int*, v.80, n.5, p.1006-12, Sep-Oct. 1997.

WAJIMA, Z.; HUA, X. Y.; YAKSH, T. L. Inhibition of spinal protein kinase C blocks substance P-mediated hyperalgesia. *Brain Res*, v.877, n.2, p.314-21, Sep 22. 2000.

WANG, W.; WU, S. X.; WANG, Y. Y.; LIU, X. Y.; LI, Y. Q. 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor is involved in the bee venom induced inflammatory pain. *Pain*, v.106, n.1-2, p.135-42, Nov. 2003.

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.

WHELAN, C. J.; HEAD, S. A.; POLL, C. T.; COLEMAN, R. A. Prostaglandin (PG) modulation of bradykinin-induced hyperalgesia and oedema in the guinea-pig paw--effects of PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub>. *Agents Actions Suppl*, v.32, p.107-11. 1991.

WILLIAMS, T. J. Prostaglandin E<sub>2</sub>, prostaglandin I<sub>2</sub> and the vascular changes of inflammation. *Br J Pharmacol*, v.65, n.3, p.517-24, Mar. 1979.

WILLIAMS, T. J. Vasoactive intestinal polypeptide is more potent than prostaglandin E<sub>2</sub> as a vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin. *Br J Pharmacol*, v.77, n.3, p.505-9, Nov. 1982.

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.

WURCH, T.; PAUWELS, P. J. Coupling of canine serotonin 5-HT(1B) and 5-HT(1D) receptor subtypes to the formation of inositol phosphates by dual interactions with endogenous G(i/o) and recombinant G(alpha15) proteins. *J Neurochem*, v.75, n.3, p.1180-9, Sep. 2000.

XU, G. Y.; HUANG, L. Y.; ZHAO, Z. Q. Activation of silent mechanoreceptive cat C and Adelta sensory neurons and their substance P expression following peripheral inflammation. *J Physiol*, v.528 Pt 2, p.339-48, Oct 15. 2000.

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, Feb 1. 2002.

ZGOMBICK, J. M.; BORDEN, L. A.; COCHRAN, T. L.; KUCHAREWICZ, S. A.; WEINSHANK, R. L.; BRANCHEK, T. A. Dual coupling of cloned human 5-hydroxytryptamine<sub>1D</sub> alpha and 5-hydroxytryptamine<sub>1D</sub> beta receptors stably expressed in murine fibroblasts: inhibition of adenylate cyclase and elevation of

intracellular calcium concentrations via pertussis toxin-sensitive G protein(s). *Mol Pharmacol*, v.44, n.3, p.575-82, Sep. 1993.

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

ZIGANSHINA, L. E.; ZIGANSHIN, A. U.; HOYLE, C. H.; BURNSTOCK, G. Acute paw oedema formation induced by ATP: re-evaluation of the mechanisms involved. *Inflamm Res*, v.45, n.2, p.96-102, Feb. 1996.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v.16, n.2, p.109-10, Jun. 1983.

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.