

Vanessa Olzon Zambelli

**Avaliação da expressão e ativação de
receptores opióides após injúria
periférica em ratos**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

Vanessa Olzon Zambelli

**Avaliação da expressão e ativação de
receptores opióides após injúria
periférica em ratos**

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia
Orientador: Dra. Yara Cury

Versão Corrigida

Versão original se encontra arquivada no Serviço de Comunicações do ICB

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Zambelli, Vanessa Olzon.

Avaliação da expressão e ativação de receptores opióides após
injúria periférica em ratos / Vanessa Olzon Zambelli. -- São Paulo,
2011.

Orientador: Yara Cury.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração:
Farmacologia. Linha de pesquisa: Dor e venenos de animais.

Versão do título para o inglês: Evaluation of expression and
activation of opioid receptors after peripheral injury in rats.

Descritores: 1. Receptores opióides 2. Opióides 3. Crotalina 4.
Analgesia 5. Dor 6. Inflamação I. Cury, Yara II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB095/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vanessa Olzon Zambelli.

Título da Tese: Avaliação da expressão e ativação de receptores opióides após injúria periférica em ratos.

Orientador(a): Yara Cury.

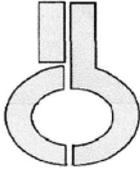
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **050** nas fls. **45** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Yara Cury** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Avaliação da expressão e ativação de receptores opióides após injúria periférica em ratos**" do qual participou(ar) o(s) alunos **Vanessa Olzon Zambelli e os pesquisadores Luiz Roberto G. de Britto, Carlos Almícar Parada**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **17.05.2007**.

São Paulo, 18 de maio de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária -Suplente
CEEA - ICB/USP



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

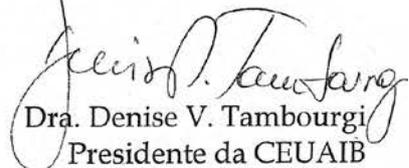
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

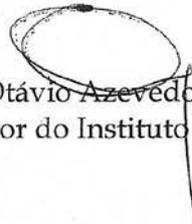
Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da expressão e ativação de receptores opióides após injúria periférica em ratos", protocolo nº 386/07, sob a responsabilidade de Yara Cury e Vanessa Olzon Zambelli, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/04/2007.

"We certify that the Research entitled Evaluation of expression and activation of opioid receptors after peripheral injury in rats, protocol nº 386/07, under the responsibility of Yara Cury e Vanessa Olzon Zambelli, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 04/10/2007".

São Paulo, 10 de abril de 2007.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Ao Julio

Meu marido, meu grande amor e amigo.

Por ser mais que um companheiro, por amar tanto a ciência, por me amar tanto. Pelo apoio incondicional, pelo incentivo, paciência e compreensão. Por ser como você é. Te amo.

Aos melhores pais do mundo Alfredo e Cecília

Pela herança mais importante, o amor. Por acreditarem nos meus sonhos e me apoiarem em todas as decisões. Por estarem ao meu lado SEMPRE! Por se preocuparem com a minha felicidade em todas as etapas da minha vida. Dedico este trabalho e a minha vida a vocês, eternamente.

Aos meus irmãos Eduardo, Renata, Juliana e Hucky

Por todo o carinho e compreensão.

Pelo amor mais puro e verdadeiro que existe entre nós.

Amo vocês.

À Yara

Por tantos anos de ensinamento e amizade. Pelo despertar do amor pela ciência. Por me ensinar que com amor e serenidade podemos vencer obstáculos e alcançar nossos sonhos. Obrigada pela confiança. Pelo incentivo. Minha querida mãe científica. Tenho orgulho de ser sua “filha”.

À minha segunda família

Querida Jaize (em memória e para sempre no coração), Dirceu, Gi e Marcos, por me receberem de forma tão especial na família Ferreira.

Aos amigos

Pelo imenso espaço que ocupam na minha vida:

*Às minhas irmãs loira e morena. **Vanzinha**, minha Gutcha querida... obrigada por estar ao meu lado em todas as horas da minha vida, pelos bom dias de cada dia. **Ing**, amiga fiel. Sempre ao meu lado. As palavras certas em todos os momentos. Amigas, amo vocês pra sempre.*

Cá, Maru, Rô, Camis, Gi, Samy, Lili, Pat, Kiko, Rê Dias, Lú, Wil, Mani, Lê, Fran e Bianca. Por fazerem parte da família Butantan de forma tão especial. Amigos que levarei pra sempre no coração e que deram mais brilho ao nosso Buts todos esses anos.

Às amigas de todas as horas, queridíssimas Aninha e Ju. Pela alegria, amizade e ajuda que tornam o nosso laboratório tão especial...

Aos técnicos mais queridos Sandroca, Tânia e Clau. Obrigada por toda a ajuda e pelo carinho que cuidam do nosso laboratório.

Aos integrantes mais recentes e também especiais... Cesar, Le Crecco, Elis, Lais, Natalia, Paola, Paula, Caru, Julian.

Aos amigos da fisiopatologia Bianca, Carol, Thiaguinho, Flavinho, Cris, Júnior e ao Jorge, obrigada pela amizade.

Às minha amigas de loooonga data... Cris, Ana, Paty... tantos anos, tantas mudanças... e nós... sempre amigas. Amo vocês.

Ao Tim, Patzy, Gustas e aos amigos do "esporte USP" pelas infinitas risadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Parada, pelas discussões e colaboração neste trabalho.

À Dra. Gisele Picolo e ao Dr. Rui Curi, pelas discussões e sugestões nos exames de ingresso e qualificação.

À Vanessa Pacciari Gutierrez, pela colaboração nos experimentos de comportamento.

Ao Dr. Julio Ferreira, Dra. Patricia Chakur Brum e Telma Cunha pela colaboração nos ensaios de PCR.

À Ana Carolina de Oliveira Fernandes, pela colaboração nos ensaios de ELISA.

À Juliana Carvalho, pelo apoio técnico nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto por disponibilizar seu laboratório todos estes anos.

À Dra. Daria Mochly-Rosen, pelo estágio em seu laboratório na Universidade de Stanford. Pela lição de vida e humildade.

Aos amigos do laboratório da Dra. Mochly-Rosen, em especial ao Danilo, Suresh, Lihan, Gouri, Eric, Marie-Helene.

Ao Adilson, pela imensa ajuda todos esses anos.

A Selma, Julieta, Camila, Luciana e Celso do departamento de Pós-Graduação do ICB

A Neusinha, por toda a ajuda.

Aos alunos, funcionários e pesquisadores do laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, em especial à Diva e a Rê Giorgi, pela amizade e carinho.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto Butantan e do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Ao Biotério Central do Instituto Butantan, em especial à Fátima, pelo fornecimento dos animais.

Agradeço ao apoio financeiro da FAPESP, pela bolsa de doutorado (07/00135-2) e pelo auxílio à pesquisa (07/03404-4).

“A ciência moderna analisou o mundo exterior; suas penetrações no Universo objetivo são profundas; isso será sua honra e sua glória; mas nada sabe ainda do universo invisível e do mundo interior. É esse o império ilimitado que lhe resta conquistar. Saber por que laços o homem se liga ao conjunto, descer às sinuosidades misteriosas do ser, onde a sombra e a luz se misturam, como na caverna de Plutão, percorrer-lhe os labirintos, os redutos secretos, auscultar o eu normal e o eu profundo, a consciência e a subconsciência; não há estudo mais necessário. Enquanto as Escolas e as Academias não o tiverem introduzido em seus programas, nada terão feito pela educação definitiva da Humanidade”.

Léon Denis

**Este trabalho foi realizado no
Laboratório Especial de Dor e
Sinalização do Instituto Butantan.**

RESUMO

ZAMBELLI, V. O. **Avaliação da expressão e ativação de receptores opióides após injúria periférica em ratos.** 2011. 180 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A crotalfina, um peptídeo inicialmente identificado e isolado do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, induz potente efeito antinociceptivo, em diferentes modelos de dor aguda e crônica. Este efeito é de longa duração e mediado pela ativação de receptores opióides periféricos do tipo κ - (modelo da hipernocicepção induzida pela prostaglandina E_2/PGE_2) ou κ - e δ - (modelo da constrição crônica do nervo isquiático/CCI). Contudo, a eficácia e a longa duração analgésica deste peptídeo são observadas apenas na vigência de lesão tecidual/inflamação. Diversas evidências experimentais tem mostrado que a eficácia antinociceptiva periférica de fármacos opióides é aumentada na presença de lesão tecidual, contudo, os mecanismos envolvidos neste fenômeno não são conhecidos. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar alguns dos mecanismos envolvidos no aumento da eficácia analgésica da crotalfina na vigência de inflamação ou lesão tecidual. Os ensaios experimentais utilizando rt-PCR, *western blotting* e ELISA demonstraram que a injeção de PGE_2 (100 ng/pata) em ratos, aumenta a expressão gênica e protéica de receptores opióides do tipo μ e κ e diminui a expressão de receptores do tipo δ , no gânglio da raiz dorsal (DRG) e nervo da pata (NP), quando comparado com animais *naive*. A CCI aumentou a expressão de receptores opióides do tipo μ no DRG e NP, e do tipo δ , no DRG. Por outro lado, este procedimento reduziu a expressão dos receptores opióides do tipo κ . Apesar das alterações na expressão de receptores opióides, a PGE_2 e CCI, *per se*, não causaram alterações conformacionais no sítio N-terminal destes receptores, indicando que a inflamação ou lesão tecidual não ativam estes receptores. Por outro lado, os agonistas de receptores opióides e a crotalfina acarretaram maior ativação de receptores opióides na vigência de sensibilização pela PGE_2 ou CCI. Estudos de sinalização intracelular demonstraram que a crotalfina adicionada ao meio de cultura de células do DRG, ativa a via das MAP quinases (ERK1/2 e JNK). Contudo, a ativação destas vias de sinalização é detectada apenas na vigência de sensibilização induzida pela pré-incubação destas células com PGE_2 . A ativação das MAP quinases pela crotalfina é dependente de receptores opióides do tipo κ e da proteína quinase $C\zeta$. Estes resultados indicam que a expressão e ativação de receptores opióides periféricos são regulados diferentemente pela presença de injúria aguda ou crônica. As diferenças na expressão dos receptores opióides do tipo κ e δ , na vigência de injúria aguda ou crônica, pode contribuir para a ativação distinta de receptores opióides pela crotalfina, na presença de PGE_2 e CCI.

Palavras chave: Receptores Opióides. Opióides. Crotalfina. Analgesia. Dor. Inflamação.

ABSTRACT

ZAMBELLI, V. O. **Evaluation of expression and activation of opioid receptors after peripheral injury in rats.** 2011. 180 p. Ph.D. thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Crotalphine (CRP), a peptide first identified and isolated from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, induces potent antinociceptive activity, mediated by activation of peripheral κ - (prostaglandin E₂-induced hypernociception) or κ - and δ - (chronic constriction injury of rat sciatic nerve/CCI) opioid receptors. However, the high efficacy and long-lasting activity of this peptide is only observed in the presence of tissue lesion/inflammation. Several data have shown that the peripheral antinociceptive efficacy of opioid drugs is enhanced in the presence of tissue injury, but the mechanisms involved in this phenomenon are not well known. Therefore, this study aimed to characterize some of the mechanisms involved in the increase of the antinociceptive efficacy of CRP caused by inflammation/tissue injury. Studies using rt-PCR, western blotting and ELISA assays demonstrated that intraplantar injection of PGE₂ (100 ng/paw) in rats, increases the genic and proteic expression of μ - and κ -opioid receptors and decreases the expression of δ -opioid receptors in the dorsal root ganglia (DRG) and nerve paw (NP), when compared to naïve rats. CCI up-regulates the expression of μ -opioid receptors in DRG and NP and of δ -opioid receptors in DRG. In contrast, κ -opioid receptors were down-regulated by CCI. Despite these changes in receptor expression, PGE₂ and CCI, *per se*, did not cause receptor conformational changes, characteristic of activation, indicating that the tissue inflammation/lesion do not activate these receptors. On the other hand, activation of opioid receptors caused by CRP was enhanced in NP slices under PGE₂ or CCI sensitization or in DRG cells incubated with PGE₂. Studies on the intracellular signaling pathways triggered by CRP demonstrated that, in DRG cell culture, the peptide activates ERK1/2 and JNK MAPKs. However, this activation is only observed when the cells were pre-incubated with PGE₂. Activation of MAPKs by CRP is dependent on activation of κ -opioid receptors and PKC ζ . These results indicate that peripheral opioid receptor expression and activation are distinctly regulated by the presence of acute or chronic injury. The different patterns of expression of κ - and δ - opioid receptors caused by acute and chronic injury may contribute to the activation of distinct opioid receptors by CRP, in the presence of PGE₂ and CCI.

Keywords: Opioid Receptors. Opioids. Crotalphine, Analgesia. Pain. Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Nome
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina bovina sérica
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCI	Constricção crônica do nervo isquiático
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
CFA	Adjuvante completo de Freund
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitocina
CRF	Crotalina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRG	Gânglio da raiz dorsal
EPM	Erro padrão das médias
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERK1	Quinase regulada por sinal extracelular 1
ERK2	Quinase regulada por sinal extracelular 2
FO	Falso operado
FONM	Falso operado não manipulado
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
HCl	Ácido clorídrico

JNK	Quinase N-Terminal C-Jun
KCl	Cloreto de potássio
MAPK	Proteína-quinase ativada por mitógeno
MF	Medida final
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MI	Medida inicial
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NO	Óxido nítrico
Nor-BNI	nor-Binaltorfinina
NOS	Óxido nítrico sintase
NP	Nervo da pata
PBS	Solução tampão fosfato
PFA	Paraformaldeído
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PI ₃ K	Fosfoinosítideo-3-quinase
PK	Proteína-quinase
PKA	Proteína-quinase A
PKC	Proteína-quinase C
PKC _γ	Proteína-quinase C gama
PKC _ε	Proteína-quinase C epsilon
PKC _τ	Proteína-quinase C teta
PKC _λ	Proteína-quinase C lambida
PKC _ζ	Proteína-quinase C zeta
PKC _α	Proteína-quinase C alfa

PKC β I	Proteína-quinase C beta I
PKC β II	Proteína-quinase C beta II
PKC δ	Proteína-quinase C delta
PKC η	Proteína-quinase C eta
PKG	Proteína-quinase G
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Sal	Salina
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide do tipo1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Seqüência de aminoácidos da crotalfina.....	47
Figura 2- Teste de pressão de patas.....	57
Figura 3- Filamentos de von Frey.....	58
Figura 4- Esquema do reconhecimento da alteração conformacional de receptores pelo anticorpo conformação específica.....	64
Figura 5- Efeito do DAMGO (A), DPDPE (B) ou U 50,488 (C) sobre o limiar nociceptivo dos animais.....	73
Figura 6- Efeito do DAMGO, DPDPE ou U 50,488 sobre o limiar nociceptivo, na presença de sensibilização por prostaglandina E2 (PGE2).....	74
Figura 7- Efeito do CTOP, ICI-174864 e Nor-BNI na antinocicepção local induzida pelo DAMGO, DPDPE ou U50,488, respectivamente...	76
Figura 8- Efeito da crotalfina (CRF) sobre o limiar nociceptivo de animais <i>naive</i>	78
Figura 9- Efeito antinociceptivo da crotalfina (CRF) na presença de sensibilização por Prostaglandina E ₂ (PGE ₂).....	79
Figura 10- Curva tempo resposta do efeito antinociceptivo local da crotalfina (CRF).....	81
Figura 11- Efeito da naloxona na antinocicepção local acarretada pela crotalfina (CRF) no modelo de hipernocicepção induzida por PGE ₂	84

Figura 12- Efeito do CTOP, ICI 174,864 e Nor-BNI na antinocicepção local acarretada pela crotalina (CRF) no modelo de hipernocicepção induzida por PGE₂ – administração concomitante ao CRF.....	85
Figura 13- Efeito do CTOP, ICI 174, 864 e Nor- BNI na antinocicepção local acarretada pela crotalina (CRF) no modelo de hipernocicepção induzida por PGE₂ – administração posterior ao CRF.....	86
Figura 14- Avaliação da hipernocicepção e alodinia induzidas pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos.....	89
Figura 15- Efeito antinociceptivo do DAMGO, nas dose de 5 e 15 µg/pata na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos.....	90
Figura 16- Efeito antinociceptivo local do DPDPE, nas doses de 20 e 60 µg/pata na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos.....	91
Figura 17- Efeito antinociceptivo local do U-50,488, na dose de 10 e 30 µg/pata na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos.....	92
Figura 18- Efeito antinociceptivo local da crotalina (CRF) na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos....	94
Figura 19- Efeito da crotalina (CRF) sobre o limiar nociceptivo dos animais falso-operados (FO) e falso-operados que não tiveram o nervo isquiático manipulado (FONM).....	95
Figura 20- Participação de receptores opióides no efeito antinociceptivo local do crotalina (CRF) na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos.....	97

Figura 21- Efeito antinociceptivo local da associação de DPDPE (20 µg/pata) e U-50,488 (10 µg/pata) na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI).....	98
Figura 22- Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) (A) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) (B) sobre a expressão gênica de receptores opióides do tipo µ no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos.....	100
Figura 23- Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) (A) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) (B) sobre a expressão gênica de receptores opióides do tipo κ no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos.....	101
Figura 24- Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) (A) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) (B) sobre a expressão gênica de receptores opióides do tipo δ no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos.....	102
Figura 25- Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na expressão protéica de receptores opióides no tipo µ no nervo da pata e no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos.....	105
Figura 26- Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na expressão protéica de receptores opióides no tipo κ no nervo da pata e gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos.....	106
Figura 27- Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na expressão protéica de receptores opióides no tipo δ no nervo da pata e gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos.....	107

Figura 28- Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na ativação de receptores opióides do tipo μ no nervo da pata e no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos.....	112
Figura 29- Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na ativação de receptores opióides do tipo κ no nervo da pata e no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos.....	113
Figura 30- Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na ativação de receptores opióides do tipo δ no nervo da pata e no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos.....	114
Figura 31- Efeito da administração intraplantar de DAMGO (5 μg/pata) (A), U 50,488 (10 μg/pata) (B) e DPDPE (20 μg/pata) (C) na ativação de receptores opióides do tipo μ (A), κ (B) e δ (C) no nervo da pata de ratos, na presença ou ausência de prostaglandina E₂ (PGE₂).....	116
Figura 32- Efeito da administração intraplantar de Crotalina (CRF) (0.0006 μg/pata) na ativação de receptores opióides do tipo μ (A), κ (B) e δ (C) no nervo da pata de ratos, na presença ou ausência da constrição crônica do nervo isquiático de ratos (CCI).....	117
Figura 33- Efeito da administração intraplantar de DAMGO (5 μg/pata) (A), U 50,488 (10 μg/pata) (B) e DPDPE (20 μg/pata) (C) na ativação de receptores opióides do tipo μ (A), κ (B) e δ (C) no nervo da pata de ratos, na presença ou ausência da constrição crônica do nervo isquiático de ratos (CCI).....	119

Figura 34- Efeito da administração intraplantar de Crotalfina (CRF) (0.0006 µg/pata) na ativação de receptores opióides do tipo µ (A), κ (B) e δ (C) no nervo da pata de ratos, na presença ou ausência da constrição crônica do nervo isquiático de ratos (CCI).....	120
Figura 35- Efeito da prostaglandina E₂ sobre a ativação de receptores opióides pelo DAMGO (A), U 50,488 (B) e DPDPE (C).....	123
Figura 36- Efeito da prostaglandina E₂ sobre a ativação de receptores opióides do tipo µ (A) κ (B), δ (C) pela crotalfina (CRF).....	124
Figura 37- Efeito da crotalfina (CRF) (A) e do U 50,488 (B) sobre a concentração de GMP cíclico intracelular em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG).....	126
Figura 38- Efeito da crotalfina (A) e do U 50,488 (B) sobre a fosforilação da Akt em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG).....	128
Figura 39- Efeito da crotalfina sobre a fosforilação da ERK1/2 em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG).....	131
Figura 40- Efeito do U 50,888 sobre a fosforilação da Erk1/2 em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG).....	132
Figura 41- Efeito da crotalfina sobre a fosforilação da JNK1/2 em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG).....	133

Figura 42- Efeito do U 50,488 (B) sobre a fosforilação da JNK1/2 em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG).....	134
Figura 43- Participação da PKCζ no efeito da crotalina sobre a fosforilação da ERK1/2 em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG).....	135
Figura 44- Participação da PKCζ no efeito da crotalina sobre a fosforilação da JNK1/2 em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG).....	136
Figura 45- Efeito da crotalina sobre a mobilização de cálcio induzida por capsaicina (A e B) e Prostaglandina E₂ (PGE₂) (C e D) em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG).....	138

SUMÁRIO

1	Introdução.....	25
1.1	Dor- considerações gerais.....	27
1.2	Agentes indutores de hipernocicepção	33
1.2.1	<i>Hipernocicepção aguda.....</i>	33
1.2.2	<i>Hipernocicepção persistente.....</i>	35
1.3	Opióides.....	37
1.3.1	<i>Alterações na expressão e funcionalidade de receptores opióides na vigência de sensibilização prévia.....</i>	43
1.4	A crotalfina.....	46
2	Objetivos.....	50
3	Materiais e Métodos.....	52
3.1	Animais.....	53
3.2	Tratamentos Farmacológicos.....	53
3.3	Indução de hipernocicepção por prostaglandina E2 (PGE ₂).....	55
3.4	Indução da dor neuropática.....	56
3.5	Avaliação da sensibilidade dolorosa.....	56
3.5.1	<i>Determinação da hipernocicepção.....</i>	56
3.5.2	<i>Determinação da alodinia.....</i>	57
3.6	Caracterização do efeito antinociceptivo de agonistas seletivos de receptores opióides μ , κ e δ opióides.....	59
3.6.1	<i>Na vigência de hipernocicepção por PGE₂.....</i>	59
3.6.2	<i>Na vigência de hipernocicepção e alodinia por CCl.....</i>	60
3.7	Determinação da expressão gênica de receptores opióides.....	60
3.7.1	<i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (real time RT-PCR).....</i>	61

3.8	Determinação da expressão proteica de receptores opióides.....	62
3.9	Determinação da ativação (alteração conformacional) de receptores opióides.....	64
3.9.1	<i>ELISA em cortes do nervo da pata e DRG.....</i>	64
3.9.2	<i>ELISA em cultura de células do DRG.....</i>	65
3.10	Dosagem das concentrações de GMP cíclico intracelular.....	66
3.11	Determinação da fosforilação da Akt, ERK1/2 e JNK pela crotalfina ou U 50,488 (agonista de receptor opióide do tipo κ).....	67
3.12	Avaliação da participação da PKC ζ sobre a ativação de MAPKs induzida pela crotalfina.....	68
3.13	Avaliação do efeito da crotalfina sobre o influxo de cálcio induzido pela capsaicina e prostaglandina E ₂	68
3.14	Análise estatística.....	69
4	Resultados.....	70
4.1	Estudos <i>in vivo</i> de avaliação da sensibilidade nociceptiva.....	71
4.1.1	<i>Efeito antinociceptivo do DAMGO, DPDPE e U-50488, agonistas de receptor opióide do tipo μ, δ e δ, respectivamente, na presença ou ausência de sensibilização por Prostaglandina E₂ (PGE₂).....</i>	71
4.1.2	<i>Efeito dos antagonistas seletivos de receptores opióides sobre a antinocicepção causada pelos respectivos agonistas no modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂).....</i>	75
4.1.3	<i>Efeito antinociceptivo da crotalfina na presença ou ausência de sensibilização por Prostaglandina E₂ (PGE₂).....</i>	77
4.1.4	<i>Curva tempo-resposta do efeito antinociceptivo local da crotalfina.....</i>	80
4.1.5	<i>Avaliação da participação de receptores opióides no efeito antinociceptivo local da crotalfina no modelo de hipernocicepção induzida por Prostaglandina E₂ (PGE₂).....</i>	82
4.1.5.1	<i>Efeito da naloxona</i>	82

4.1.5.2 Efeito do CTOP, ICI 174, 864 e Nor- BNI na antinocicepção induzida pela crotalina no modelo da hipernocicepção induzida pela prostaglandina E ₂ (PGE ₂).....	83
4.1.6 Efeito antinociceptivo local do DAMGO, DPDPE e U-50,488, agonistas de receptor opióide do tipo μ, δ e κ, respectivamente, na vigência de dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI).....	87
4.1.6.1 Efeito do DAMGO.....	87
4.1.6.2 Efeito do DPDPE.....	88
4.1.6.3 Efeito do U- 50,488.....	88
4.1.7 Efeito antinociceptivo da crotalina na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos.....	93
4.1.8 Efeito antinociceptivo da crotalina em animais falso operados e não manipulados.....	93
4.1.9 Avaliação da participação de receptores opióides no efeito antinociceptivo local da crotalina no modelo de constrição crônica do nervo isquiático (CCI).....	96
4.1.10 Avaliação da eficácia da administração conjunta de agonistas seletivos de receptores δ (DPDPE) e κ (U 50, 488) sobre a hipernocicepção e alodinia induzidas pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI).....	96
4.2 Efeito da sensibilização por prostaglandina E₂ ou constrição crônica do nervo sobre a expressão e ativação de receptores opióides no gânglio da raiz dorsal e do nervo da pata.....	99
4.2.1 Efeito da PGE₂ e da CCI na expressão gênica de receptores opióides no gânglio da raiz dorsal (DRG).....	99
4.2.2 Efeito da prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na expressão protéica de receptores opióides no nervo da pata.....	103
4.2.2.1 Receptor opióide do tipo μ	103
4.2.2.2 Receptor opióide do tipo κ	103
4.2.2.3 Receptor opióide do tipo δ	104
4.2.3 Efeito da prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do	

<i>nervo isquiático (CCI) sobre a ativação (alterações conformacionais) de receptores opióides no nervo da pata e no gânglio da raiz dorsal (DRG)..</i>	109
4.2.3.1 Receptor opióide do tipo μ	109
4.2.3.2 Receptor opióide do tipo κ	110
4.2.3.3 Receptor opióide do tipo δ	110
4.2.4 Efeito dos agonistas seletivos de receptores opióides μ, κ e δ e da crotalfina sobre a ativação de receptores opióides no nervo da pata obtido de animais injetados com prostaglandina E_2 (PGE_2) ou submetidos à constrição crônica do nervo isquiático (CCI)	115
4.2.4.1 Efeito dos agonistas seletivos e da crotalfina, na vigência de sensibilização por PGE_2	115
4.2.4.2 Efeito dos agonistas seletivos e da crotalfina, na vigência de sensibilização por constrição crônica do nervo isquiático.....	118
4.3 Ensaio <i>in vitro</i> utilizando cultura de células obtidas do gânglio da raiz dorsal (DRG) da medula espinha de ratos <i>naive</i>.....	121
4.3.1 Efeito da prostaglandina E_2 (PGE_2) sobre a ativação de receptores opióides pelos seus agonistas.....	121
4.3.2 Efeito da crotalfina (A) e U 50,488 (B) sobre a concentração de GMP cíclico (GMPc) intracelular em cultura primária de células do DRG..	125
4.3.3 Efeito da crotalfina sobre a ativação da Akt em células do gânglio da raiz dorsal (DRG), na vigência ou ausência de sensibilização por PGE_2.....	127
4.3.4 Efeito da crotalfina sobre a ativação da ERK1/2 e JNK em células do gânglio da raiz dorsal (DRG), na vigência ou ausência de sensibilização por PGE_2.....	129
4.3.5 Efeito da crotalfina sobre o influxo de cálcio induzido pela capsaicina e prostaglandina E_2 (PGE_2).....	137
5 Discussão.....	139
6 Conclusão.....	159

1 Introdução

Os receptores opióides são proteínas transmembrânicas que pertencem à superfamília dos receptores acoplados a proteínas G, estando presentes tanto no sistema nervoso central quanto em tecidos periféricos (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001). Estes receptores medeiam a analgesia induzida por fármacos com atividade opióide. Os opióides são amplamente utilizados no tratamento de dores de diferentes origens, incluindo dores de origem inflamatória e neuropática. Dados da literatura têm mostrado que fármacos com atividade opióide possuem eficácia analgésica periférica aumentada na vigência de resposta inflamatória (STEIN et al., 1989). Os mecanismos responsáveis por este aumento na eficácia analgésica envolvem alterações da expressão/ exposição e/ ou funcionalidade de receptores opióides (HASSAN et al., 1993; ANTONIJEVIC et al., 1995; ZOLLNER et al., 2003). Contudo, este fenômeno é ainda pouco compreendido.

Aumento na atividade antinociceptiva, na vigência de inflamação/lesão tecidual foi recentemente detectada para a crotalfina, um peptídeo inicialmente isolado e caracterizado do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (KONNO et al., 2008). Os estudos experimentais mostraram que a crotalfina induz potente atividade antinociceptiva em diferentes modelos de dor aguda e persistente. Esta atividade é de longa duração (2 a 5 dias) e mediada pela ativação de receptores opióides do tipo κ (modelos de nocicepção aguda) ou κ e δ (modelos de dor neuropática e câncer) (KONNO et al., 2008; GUTIERREZ et al., submetido; BRIGATTE e CURY, em fase de elaboração). Contudo, a longa duração da ação antinociceptiva da crotalfina é detectada apenas na presença de lesão tecidual (constricção crônica do nervo isquiático) ou de estímulos como a carragenina ou prostaglandina E_2 , uma vez que na ausência destes estímulos o efeito é observado por um período de apenas 5 horas (PEREIRA e CURY, em fase de elaboração). Apesar dos dados mostrando que a eficácia, a duração e o tipo de receptor opióide envolvido no efeito antinociceptivo da crotalfina são dependentes de sensibilização neuronal e do modelo experimental (nocicepção aguda ou crônica) utilizado, não foram ainda determinados os mecanismos pelos quais o processo de sensibilização aguda ou crônica interfere com a eficácia antinociceptiva do peptídeo e/ou o tipo de receptor opióide envolvido neste efeito.

1.1 Dor- considerações gerais

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP)(descrita em 1979 e mantida até 2011), “a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a lesão real ou potencial dos tecidos”, sendo sempre subjetiva. Cada indivíduo aprende a utilizar este termo através de experiências anteriores. Para os neurocientistas, os estímulos que causam dor são, em geral, estímulos capazes de causar lesão tecidual (MERSKEY, 1994). Contudo, a percepção da dor é dependente de experiências emocionais, motivacionais e psicológicas. Assim, utilizamos o termo nocicepção para definir os processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo (LOESER e TREEDE, 2008), enquanto que a dor envolve, além da nocicepção, o componente emocional, geralmente desagradável, da dor (LOESER, 1980). Desta forma, a nocicepção está presente na maioria dos casos dolorosos, contudo, pode ocorrer dor sem nocicepção e nocicepção sem dor.

A transmissão da nocicepção está associada à atividade elétrica de algumas fibras nervosas aferentes primárias. Estas fibras possuem terminações sensoriais livres, denominadas nociceptores, presentes nos tecidos periféricos, as quais são capazes de transduzir e codificar os estímulos nociceptivos (LOESER e TREEDE, 2008). Os neurônios que constituem estas fibras são pseudounipolares, contendo um axônio dirigido à periferia, um corpo celular presente no gânglio da raiz dorsal da medula espinal (DRG) e um axônio dirigido ao sistema nervoso central (medula espinal), onde ocorre a primeira sinapse do sistema de transmissão da dor. Os estímulos nociceptivos são caracterizados como aqueles capazes de gerar lesão tecidual potencial ou real e ativar nociceptores (LOESER e TREEDE, 2008). Os nociceptores são normalmente ativados por estímulos de alta intensidade, tanto mecânicos, quanto térmicos e/ou químicos.

Os neurônios aferentes primários desempenham três funções principais no que diz respeito à nocicepção: 1- detecção do estímulo nociceptivo ou nocivo (transdução); 2- condução do impulso da periferia para a medula espinal; 3- transferência desses impulsos para neurônios secundários e interneurônios presentes em lâminas específicas do corno dorsal da medula espinal (transmissão sináptica)(CAVIEDES e HERRANZ, 2002). Da medula espinal, as informações

nociceptivas são conduzidas ao tronco cerebral, tálamo e córtex cerebral, onde ocorre a percepção da dor (SCHAIBLE e RICHTER, 2004; WOOLF, 2004).

Muitas fibras aferentes nociceptivas são desprovidas de mielina e, portanto possuem baixa velocidade de condução (fibras C). As fibras C são também caracterizadas como nociceptores polimodais, uma vez que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. As fibras nociceptivas mielinizadas, denominadas A δ , conduzem mais rapidamente os impulsos elétricos. Estudos de eletrofisiologia permitiram a subdivisão dos nociceptores A δ em duas classes: tipo I (nociceptores mecânicos de alto limiar) que respondem bem a estímulos mecânicos e químicos, mas que respondem apenas a temperaturas relativamente altas (>50 °C); fibras A δ do tipo II possuem menor limiar de ativação pelo calor, mas apresentam limiar muito alto para estímulos mecânicos (BASBAUM et al., 2009).

É importante salientar que, além das fibras C, existe um grupo adicional de nociceptores não-mielinizados, sensíveis a estímulos térmicos e insensíveis a estímulos mecânicos, denominados receptores "silenciosos" (silent nociceptors). Estes nociceptores tem essa denominação porque se tornam responsivos a estímulos mecânicos na vigência de lesão tecidual (SCHMIDT et al., 1995). Estas fibras são, provavelmente, modificadas pela presença de mediadores inflamatórios, tornando-se mais ativas (BASBAUM et al., 2009). Os receptores "silenciosos" são encontrados na pele, articulações e em órgãos viscerais (SCHAEFFER JR et al., 1988; SCHEMELZ et al., 1994).

As aferências das fibras nociceptivas primárias terminam nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinal, formando conexões sinápticas com os neurônios de segunda ordem que se projetam a centros supra-espinais (BELMONTE e CERVERO, 1996; JULIUS e BASBAUM, 2001; CAVIEDES e HERRANZ, 2002). A medula espinal foi dividida em 10 lâminas por critérios anatômicos e eletrofisiológicos, sendo que a lâmina I é a mais superficial à partir da região dorsal (REXED, 1954; TODD e KOERBER, 2006). As fibras A δ , por exemplo, se projetam para as lâminas I e V, enquanto que as fibras C se projetam para as lâminas I e II. Ainda, a lâmina V recebe, indiretamente, projeções de fibras C denominados neurônios de faixa dinâmica ampla ("wide dynamic range"/WDR), que são capazes de responder a várias intensidades de estímulos, incluindo estímulos nocivos e não-nocivos.

Após a propagação da informação nociceptiva dos neurônios de primeira ordem para os de segunda ordem, a informação nociceptiva sofre modulações (inibitórias e/ou excitatórias) e os neurônios de projeção levam a informação nociceptiva, por diferentes vias ascendentes, para estruturas do tronco encefálico e diencefalo (MILLAN, 1999). Dentre as principais projeções supraespinais da via nociceptiva estão os tratos espinomesencefálico, espino-reticular, espino-hipotalâmico e espinotalâmico, sendo este último o mais importante na condução do impulso nociceptivo. A via espinotalâmica projeta-se para os núcleos talâmicos específicos (ventral pósterolateral (VPL) e ventral pósteromedial (VPM), envolvidos com os componentes discriminativos da sensibilidade dolorosa e para os núcleos talâmicos inespecíficos (centromedial, centrolateral, látero-central e intralaminares), relacionados com os componentes afetivos da dor. No tálamo ocorre a recepção, integração e transferência da informação nociceptiva para o córtex cerebral, onde a informação pode ser somatotopicamente organizada (CRAIG et al., 1999). Baseando-se em critérios funcionais, as principais regiões corticais envolvidas na resposta dolorosa são os córtices sensorial primário (S-I), secundário (S-II) e motor (ou giro pré-central) (BROMM e TREEDE, 1987; TEIXEIRA, 1994; SCHNITZLER e PLONER, 2000; TODD e KOERBER, 2006; BASBAUM et al., 2009)..

Durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, por exemplo, as fibras nociceptivas, particularmente as do tipo C, são sensibilizadas e, por conseqüência, podem ser ativadas por estímulos de menor intensidade, acarretando hipernocicepção ou alodinia (KIDD e URBAN, 2001; DWORKIN et al., 2003), os sintomas ou sinais mais importantes de um processo inflamatório. O termo hiperalgesia é aplicado para o aumento da sensibilidade à dor (LOESER e TREEDE, 2008) e está relacionada à caracterização deste fenômeno em seres humanos. O termo alodínia é utilizado quando ocorre a sensação de dor frente a um estímulo não nociceptivo. Cabe ressaltar que os termos hiperalgesia e hipernocicepção aplicam-se à diminuição do limiar de dor em humanos. Assim, como é avaliada a nocicepção em animais, a diminuição do limiar nociceptivo é denominada hipernocicepção.

Várias substâncias sintetizadas e/ou liberadas durante o processo inflamatório, como por exemplo, prótons extracelulares, citocinas, bradicinina, prostaglandina, endotelinas, aminas simpáticas, entre outros, podem interferir com a atividade dos neurônios nociceptivos primários (NAKAMURA e FERREIRA, 1987; FERREIRA; ROMITELLI; DE NUCCI, 1989; PIOVEZAN et al., 1997; JULIUS e BASBAUM, 2001;

SCHAIBLE e RICHTER, 2004; BASBAUM et al., 2009). Os mediadores hiperalgésicos podem atuar via receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), como a prostaglandina E₂, bradicinina, substância P e CGRP; receptores tirosina quinase, como interleucina 1 β (IL1- β) e fator de crescimento neural (NGF); canais iônicos sensíveis à acidez (ASIC), como prótons, entre outros. A ativação destes receptores ou canais, com conseqüente ativação de intermediários celulares regulatórios (segundos mensageiros), podem regular a permeabilidade da membrana neuronal e a concentração iônica celular (BEVAN, 1999; REICHLING e LEVINE, 1999; BASBAUM et al., 2009). A sensibilização dos neurônios nociceptivos primários é decorrente, em parte, do incremento das concentrações intracelulares de AMPc, ativação de proteínas quinase, como PKA, induzindo a fosforilação de canais iônicos e aumento do influxo de Ca²⁺ intracelular. A conseqüência destes efeitos metabólicos é a despolarização parcial da membrana neuronal, facilitando a geração e a transmissão de impulsos nervosos (FERREIRA, 1994; ENGLAND et al., 1996; CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999). Alguns mediadores hiperalgésicos elevam as concentrações intracelulares de AMPc, enquanto outros, sensibilizam nociceptores por mecanismos independentes da formação direta do AMPc. Estes mecanismos incluem a geração de prostanóides e a ativação da proteína quinase C (PKC)(BEVAN, 1999). A ativação da PKC acarreta a fosforilação e o aumento da atividade de canais iônicos permeáveis a Ca²⁺ e Na⁺, como receptores TRPV1 e canais de sódio dependentes de voltagem (LORENZETTI e FERREIRA, 1996; MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001).

A família das PKCs é constituída de serina/treonina quinases, com ampla homologia no sítio catalítico (região C-terminal). Estas isoenzimas estão envolvidas em eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos hormonais, neuronais e fatores de crescimento específicos. A família das PKCs é constituída por 12 isoformas, classificadas em três diferentes subfamílias, de acordo com a afinidade do domínio regulatório (região N-terminal) pelo substrato ativador. As isoformas clássicas (PKC α , PKC β I, PKC β II, PKC γ) são reguladas por Ca²⁺, fosfatidilserina, diacilglicerol (DAG) e éster de forbol (PMA). As isoformas novas (PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ) são reguladas por fosfatidilserina, DAG e PMA, ou seja, não são ativadas por Ca²⁺. Por fim, as isoformas atípicas (PKC ξ , PKC τ , PKC λ) são reguladas por ceramida e fosfatidilinositol 3,4,5-fosfato. As diferentes isoformas de PKC estão

distribuídas em diversos tecidos, demonstrando diferenças funcionais de acordo com sua localização intracelular (MOCHLY-ROSEN e KAUVAR, 1998). No DRG, foram encontrados cinco isoformas de PKC ($PKC\beta_i$, $PKC\beta_{ii}$, $PKC\delta$, $PKC\epsilon$, $PKC\zeta$), sendo que a $PKC\epsilon$ tem sido descrita como importante quinase nos processos de sensibilização do nociceptor. Das cinco isoformas observadas em neurônios sensitivos, duas delas, a $PKC\beta_i$ e $PKC\beta_{ii}$, estão localizadas na membrana plasmática da célula, em estado de repouso e não são ativadas após sensibilização por bradicinina. As demais isoformas, $PKC\delta$, $PKC\epsilon$, $PKC\zeta$, estão uniformemente distribuídas no citoplasma das células, quando em repouso, sendo que apenas a $PKC\epsilon$ transloca-se para a membrana plasmática na presença de bradicinina (CESARE et al., 1999). Outra isoforma importante para os processos nociceptivos é a $PKC\gamma$. Estudos demonstram que esta isoforma está localizada preferencialmente na lamina II da medula espinal, onde está expressa em interneurônios excitatórios, tendo importante papel nos fenômenos de sensibilização central (MALMBERG et al., 1997; POLGAR et al., 1999).

Além das PKCs, quinases como as da via das proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs), são relevantes em processos nociceptivos. A ativação desta via, pela fosforilação de resíduos de tirosina e treonina, pode ocorrer independentemente da ativação da PKC ou PKA (DINA et al., 2003). Esta via de sinalização é composta por 3 membros: quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), quinase N-terminal c-Jun (JNK) e a p-38 MAPK (JI e WOOLF, 2001). Dai et al. 2002 demonstraram a participação das MAPKs, mais especificamente das ERKs, em processos hiperalgésicos.

Independentemente do mecanismo de sinalização intracelular, o aumento na expressão e fosforilação de canais iônicos, em membranas de neurônios periféricos, constitui o principal fator responsável pelo aumento da excitabilidade da membrana destas células (WOOLF, 2000). Entre os principais canais iônicos responsáveis pela geração de potenciais de ação na membrana de neurônios nociceptivos estão os canais de sódio dependentes de voltagem (VANEGAS e SCHAIBLE, 2000; SAEGUSA; MATSUDA; TANABE, 2002; WOOLF, 2004). Diversos tipos de canais de sódio estão expressos em neurônios sensitivos, incluindo canais sensíveis à tetrodotoxina (TTX), como os $Na_v1.1$, $Na_v1.6$ e $Na_v1.7$ e resistentes à TTX, como os $Na_v1.8$ e $Na_v1.9$. A contribuição dos canais $Na_v1.7$ e $Na_v1.8$ em fenômenos

nociceptivos tem sido descrita (COX et al., 2006; DIB-HAJJ, S. D.; YANG, Y.; WAXMAN S.G., 2008). Os canais do tipo $Na_v1.7$ estão mais expressos na vigência de resposta inflamatória e, juntamente com os canais $Na_v1.8$ contribuem para a hipernocicepção térmica inflamatória e também para a resposta aguda frente a um estímulo nocivo (AKOPIAN et al., 1999; NASSAR et al., 2004). O canais $Na_v1.8$ são também importantes para a transmissão do estímulo induzido pelo frio (ZIMMERMANN et al., 2007). Além dos canais de sódio, os de cálcio também apresentam importante papel em processos nociceptivos. Os principais canais de cálcio envolvidos em processos nociceptivos são os canais de cálcio do tipo N, P/Q e T. Os canais de cálcio do tipo P/Q estão expressos nas terminações sinápticas nas lâminas II-IV do corno dorsal da medula espinal e estão envolvidos em dores como as enxaquecas (VAN DER VRIES et al. 2010). Os canais do tipo N e T estão expressos em fibras C e tem a expressão aumentada na vigência de neuropatias (CAO, 2006; SWAYNE e BOURINET, 2008; MESSINGER et al., 2009; ZAMPONI et al., 2009).

O corno dorsal da medula espinal é um sítio importante no processo de transmissão e modulação da informação nociceptiva da periferia para o SNC (AIMONE e YAKSH, 1989; YAKSH, 1999). Neste sítio medular, o principal neurotransmissor excitatório envolvido na nocicepção é o glutamato. Além do glutamato, os neuropeptídeos, como a substância P, neurocinina A e o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP), tem papel importante no processo nociceptivo, atuando como neuromoduladores da transmissão nociceptiva (KIDD e URBAN, 2001; SCHAIBLE e RICHTER, 2004). Estes neurotransmissores e neuromoduladores agem em receptores específicos presentes na membrana pós-sináptica. A ativação e a modulação dos receptores NMDA tem papel importante na indução e manutenção da sensibilização dos neurônios medulares (Sensibilização Central) (SCHAIBLE e RICHTER, 2004). Contudo, a liberação de neuropeptídeos, de fatores neurotróficos e de prostaglandinas, além da ativação de células da glia (astrócitos e microglia) neste sítio medular, também contribui para a gênese do processo de Sensibilização Central (BESSION, 1999; WOOLF, 2000; SCHAIBLE e RICHTER, 2004; WIESELER-FRANK, J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R., 2004).

A transmissão nociceptiva na medula espinal é modulada por tratos descendentes excitatórios e inibitórios, os quais podem atuar em fibras aferentes primárias, ou ter ação em fibras pós-sinápticas ou em interneurônios presentes no

cornos dorsais da medula espinal (COUSINS e COHEN, 2005). Os múltiplos tratos descendentes inibitórios se originam de núcleos presentes no tronco cerebral. Neurotransmissores como acetilcolina, GABA, glicina e opióides modulam a atividade destes tratos descendentes inibitórios (MILLAN, 2002). A nocicepção é, portanto, um processo gerado na periferia e modulado no SNC. Alterações no controle descendente da nocicepção podem também provocar sensibilização central e, conseqüentemente, estados hiperalgésicos.

A caracterização dos mediadores químicos e dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na gênese da dor tem contribuído para o avanço no conhecimento da fisiopatologia dos processos nociceptivos e de seu controle, bem como para a caracterização de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos analgésicos. Esse avanço no conhecimento tem sido possível por meio da utilização de diferentes modelos experimentais *in vivo* de avaliação da nocicepção. Estes modelos têm favorecido o estudo das dores manifestas e da hipernocicepção tanto de origem inflamatória quanto neuropática.

1.2 Agentes indutores de hipernocicepção

1.2.1 Hipernocicepção aguda

Vários agentes indutores de hipernocicepção têm sido utilizados experimentalmente, dentre eles, a carragenina, um agente inflamatório e a prostaglandina E₂ (PGE₂), um mediador inflamatório. O aumento da sensibilidade à dor (hipernocicepção) causado pela carragenina, é caracterizado por um componente periférico, resultante da sensibilização dos nociceptores, e por um componente central, com a participação de circuitos centrais de dor (FERREIRA; LORENZETTI; CORRÊA, 1978). A mediação química desta hipernocicepção envolve a liberação seqüencial de mediadores nociceptivos. Em ratos, esta cascata inicia-se com a formação de bradicinina (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993), que estimula a liberação do fator de necrose tumoral alfa - TNF α (CUNHA et al., 1992), que por sua vez induz a secreção de interleucina-6 e interleucina-1 β (FERREIRA et al., 1988). Estas citocinas estimulam a formação de produtos da ciclooxigenase, resultando principalmente na produção de PGE₂ (NAKAMURA e FERREIRA, 1987).

O TNF- α é também capaz de induzir a liberação de quimiocinas (interleucina-8/CXCL8 em humanos, CINC-1 em ratos) (CUNHA et al., 1991; LORENZETTI et al., 2002), as quais estimulam a liberação/produção de aminas simpatomiméticas. Prostanóides e aminas simpatomiméticas representam os mediadores finais responsáveis pelo desenvolvimento do quadro hipernociceptivo induzido pela carragenina. Cabe ressaltar que em camundongos, existe diferença na hierarquia de liberação de citocinas. Assim, foi demonstrado que não só o TNF- α , mas também a quimiocina derivada de queratinócitos, KC/CXCL1 são as primeiras citocinas liberadas pela carragenina, sendo sucedidas pela secreção de IL-1 β . O KC/CXCL1, além de acarretar a liberação de prostaglandinas, age também via liberação de aminas simpatomiméticas (CUNHA et al., 2005).

Diferentemente da carragenina, as prostaglandinas da série E₂ (PGE₂) são conhecidas por sua capacidade de sensibilizar diretamente os nociceptores, durante a inflamação (WILLIS e CORNELSEN, 1973; FERREIRA e NAKAMURA, 1979a; TAIWO et al., 1989). Este efeito das PGE₂ decorre da sua interação com receptores EP presentes na membrana dos neurônios (SOUTHALL e VASKO, 2001). A estimulação de receptores EP resulta na ativação de complexas vias de sinalização intracelular, que dependem do receptor ativado e das células estudadas. Receptores EP dos subtipos EP2, EP3 e EP4 são descritos como acoplados a adenilil ciclase (AC) (SUGIMOTO et al., 1992; COLEMAN et al., 1994; REGAN et al., 1994), sendo que a ativação de EP2 e EP4 acarreta aumento dos níveis do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPc). A ativação de EP3 pode aumentar ou diminuir a atividade da AC, dependendo da isoforma do receptor ativado (COLEMAN et al., 1994).

Dados experimentais tem mostrado que a ativação da isoforma EP3C, presente em DRGs, induz aumento de AMPc (SOUTHALL e VASKO, 2001). Os DRGs expressam tanto RNAm para síntese quanto as proteínas EP1, EP2, EP3 e EP4 (SOUTHALL e VASKO, 2001). A adição de PGE₂ em cultura de DRGs, com conseqüente ativação de seus receptores, pode gerar tanto AMPc (HINGTGEN et al., 1995), como resultado da ativação da AC, quanto fosfatos de inositol, como resultado da ativação da enzima fosfolipase C (PLC) (SMITH et al., 1998). O passo subsequente ao aumento nos níveis de AMPc é a ativação de uma proteína quinase (PK) dependente de AMPc, a PKA (FERREIRA e NAKAMURA, 1979a; TAIWO e

LEVINE, 1991; ALEY e LEVINE, 1999; KASSUYA et al., 2007). Os receptores do subtipo EP1 estão acoplados à via de sinalização da fosfolipase C, com conseqüente hidrólise de fosfatidilinositol-bifosfato, o que resulta na liberação de inositol trifosfato (IP₃) e diacil-glicerol (DAG) (WATABE et al., 1993). O DAG, altamente lipossolúvel, encontra-se associado à membrana plasmática, podendo ativar uma proteína quinase C (PKC). De fato, a sensibilização acarretada pela PGE₂ tem sido associado à ativação de PKCε (ALEY et al., 2000; PARADA et al., 2003; KASSUYA et al., 2007). Adicionalmente, têm sido descritos mecanismos alternativos de sinalização para a PGE₂, independentes da geração de AMPc ou fosfatos de inositol (WATABE et al., 1993). Estudos *in vivo* têm associado a ativação de receptores EP3 à de ERK1/2 (KASSUYA et al., 2007). Foi também observado que a ativação de receptores EP4 por PGE₂, em cultura de células embrionárias de rim humano, acarreta a fosforilação de ERK1/2, via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (FUJINO et al., 2003). De modo geral, a ativação deste receptor EP resulta na despolarização da membrana celular e transmissão do impulso nociceptivo (FERREIRA, 1994). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a PGE₂ aumenta a excitabilidade neuronal por suprimir as correntes de potássio (EVANS et al., 1999) e/ou aumentar a atividade canais de sódio resistentes a tetrodotoxina (ENGLAND; BEVAN; DOCHERTY, 1996; GOLD et al., 1996).

1.2.2 Hipernociceção persistente

Nas últimas décadas, vários modelos experimentais têm sido propostos para o estudo de dor persistente, incluindo a dor de câncer (SCHWEI et al., 1999; LUGER et al., 2002; SASAMURA et al., 2002; SHIMOYAMA et al., 2002; KURASHI et al., 2003; ZHANG et al., 2003; LEE et al., 2005; SHIMOYAMA et al., 2005) e a dor neuropática (BENNETT e XIE, 1988; SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990; KIM e CHUNG, 1992). Estes modelos tem favorecido o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese da dor persistente, bem como possibilitado o estudo de fármacos com atividade antinociceptiva neste tipo de dor.

Dores neuropáticas em humanos são resultantes, muitas vezes, de injúria de nervo periférico. Este tipo de dor é caracterizado pela presença de dor espontânea em queimação, acompanhada de hiperalgesia e alodinia (NAKAMURA e FERREIRA, 1987; DWORKIN et al., 2003).

A persistência de uma lesão nervosa (excitação constante dos nervos lesados) pode induzir alterações no Sistema Nervoso Periférico, resultando em sensibilização, o que contribui para o desenvolvimento da dor neuropática (SELTZER et al., 1991; GRACEY; LYNCH; BENNETT; DEVOR, 1994; MAO et al., 1995; PORRECA et al., 1999; CAVIEDES e HERRANZ, 2002; DWORKIN et al., 2003). Neste caso, observa-se aumento nos níveis de canais de sódio voltagem-dependente $Na_v1.8$ nos nociceptores, ativação de microglia no corno dorsal da medula espinal e reorganização do sistema nervoso simpático que passa a ativar as vias nociceptivas (MCLACHLAN et al., 1993; JOSHI et al., 2006). Estas alterações facilitam o desenvolvimento da sensibilização central e neurodegeneração sináptica (ITO; OBATA; SAITO, 2009). Adicionalmente, estudos demonstram que os estímulos capazes de induzir dor persistente, estimulam também a liberação de mediadores inflamatórios na medula espinal, fenômeno que pode contribuir também para a cronificação do processo nociceptivo (VOSCOPOULOS e LEMA, 2010).

O tratamento da dor neuropática é freqüentemente ineficaz. Contudo, quando se considera a complexidade dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento deste tipo de dor, torna-se compreensível a dificuldade encontrada na clínica para o controle deste processo. Os modelos experimentais usualmente empregados para o estudo da dor neuropática, incluem modelos de dor neuropática induzida por diabetes *mellitus* e dor originária da injúria parcial de nervos periféricos ou espinais (BENNETT e XIE, 1988; SELTZER; DUBNER; SHIR; KIM e CHUNG, 1992). A injúria parcial de nervos pode ser produzida por constrictões crônicas do nervo isquiático de ratos (BENNETT e XIE, 1988). A hipernocicepção causada pela constrição pode iniciar entre 24 horas a 5 dias após a indução da lesão, com respostas máximas ao final da segunda semana, e que persistem por até 2 meses (BENNETT e XIE, 1988). As alterações estruturais envolvem degeneração de todas as fibras A e a maioria das fibras C (BASBAUM et al., 1991; CARLTON et al., 1991).

Dentre os medicamentos utilizados clinicamente para o tratamento da dor neuropática, as principais classes de analgésicos são: opióides, como o tramadol; anti-depressivos, como os tricíclicos; anti-convulsivantes, como a gabapentina e pré-gabalina; antagonistas de receptores NMDA, como a ketamina e antiinflamatórios não-esteroidais (COLLINS et al. 2010; TZELLOS et al., 2008). Usualmente, a combinação de dois ou mais fármacos possibilita a maior eficácia no controle deste tipo de dor (MAO; GOLD; BACKONJA, 2010).

1.3 Opióides

O ópio, do grego “opion”, diminutivo de “opós” (suco), era obtido a partir do extrato das sementes da papoula. Registros antigos descrevem que os sumérios (habitantes da região onde é atualmente, o Iraque), no final do terceiro milênio (A.C.), cultivavam a papoula e teriam isolado o ópio. O poder hipnótico e euforizante da papoula determinou a denominação de “planta da alegria” (BROWNSTEIN, 1993). Em 1806, Serturmer isolou o ingrediente ativo do ópio e o denominou Morfina.

Assim, o termo opióide aplica-se à qualquer substância que produz efeitos semelhantes aos da morfina e que são bloqueados por antagonistas do tipo naloxona (FOLEY e INTURRISI, 1987; REISINE et al., 1996). Os opióides induzem analgesia em seres humanos e em animais, por ação em receptores específicos, alterando a resposta neuronal a estímulos nociceptivos (YAKSH, 1999).

Atualmente, são conhecidas pelo menos 5 famílias de receptores opióides, os quais são denominados pela União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR), receptores do tipo do tipo MOP ou *mu* (μ), KOP ou *kappa* (κ) e DOP ou *delta* (δ), *epsilon* (ϵ) e *sigma* (σ) (KIEFFER e EVANS, 2009). Em 1996, foi proposta uma nova nomenclatura para estes receptores, a qual não foi completamente aceita, sendo que atualmente, ainda são amplamente utilizados os símbolos gregos para nomear estes receptores (DHAWAN et al., 1996). Outros receptores opióides já foram caracterizados e vem sendo alvos de estudos, entretanto, não estão ainda completamente caracterizados (JUNIEN e WETTSTEIN, 1992). A síntese destes receptores é regulada por três diferentes genes, os quais apresentam extensa homologia estrutural entre si (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001). Uma sexta classe de receptores, denominada nociceptina/orfanina FQ (NOP), cujo ligante natural é a nociceptina, tem sido proposta como integrante da família dos receptores opióides (BARLOCCO et al., 2000).

Os principais efeitos analgésicos dos opióides são mediados pelos receptores μ , κ e δ . O tipo de receptor envolvido neste efeito depende da natureza do estímulo nocivo, bem como das condições patológicas do organismo (JUNIEN e WETTSTEIN, 1992).

No Sistema Nervoso Central, os receptores opióides estão amplamente distribuídos em regiões como tálamo, córtex cerebral, amígdala, núcleo acumbens,

substância negra, formação reticular mesencefálica e substância cinzenta periaquedutal mesencefálica, além de serem encontrados na medula espinal (YAKSH, 1999). A distribuição dos receptores opióides no córtex varia de acordo com a porção cortical e laminar. Os receptores μ estão localizados preferencialmente nas camadas I, V e VI, os receptores δ , nas camadas II, III, V e VI, de maneira mais difusa, enquanto os receptores κ estão presentes nas camadas III, V, e VI do córtex anterior cingulado (LEWIS et al., 1987). Na medula espinal, os receptores μ , na proporção de 70%, estão distribuídos predominantemente nas camadas superficiais do corno dorsal, principalmente na substância gelatinosa (ATWEH e KUHAR, 1977; DAVIDSON et al., 2000). Os receptores κ (7%) e δ (23%) estão também distribuídos nas camadas superficiais do corno dorsal, em vários segmentos da medula espinal (QUIRION, 1984; DAVIDSON et al., 2000). Os receptores δ encontram-se preferencialmente nos segmentos cervicais, apresentando baixa densidade de ligação em regiões lombo-sacrais, diferindo do padrão dos sítios de ligação κ , concentrados nestas regiões (GOUARDERES; CROS; QUIRION, 1985).

A presença de opióides endógenos em tecidos periféricos, tem sido reconhecida. Estes receptores são detectados em neurônios aferentes primários, gânglios autonômicos, nervos entéricos e na medula adrenal (NORTH e EGAN, 1983). No DRG, estes receptores estão expressos em neurônios de pequeno, médio e grande diâmetro (MANSOUR et al., 1994; COGGESHALL et al., 1997).

Wittert e et al. (1996) (WITTERT et al., 1996) mostraram que, além de serem encontrados no sistema nervoso (BODNAR e KLEIN, 2005), os três principais receptores para opióides estão presentes no intestino, nas glândulas adrenais, rins, pulmões, baço, testículos, ovários, útero, estômago, fígado e coração de ratos. A detecção de receptores opióides na periferia sugere que peptídeos opióides endógenos têm importante papel na regulação de processos fisiológicos.

Cada tipo de receptor é dividido em múltiplos subtipos (HARRISON et al., 1998; NARITA et al., 2001). A subdivisão desses receptores tem sido feita com base na capacidade de antagonistas específicos exercerem ação em um receptor e não em outro. Assim, o receptor μ foi dividido em μ_1 e μ_2 , o receptor δ , em δ_1 e δ_2 e o receptor κ em quatro subtipos, κ_{1-4} (JENSEN, 1997; ELIAV et al., 1999; NARITA et al., 2001; PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001).

Os ligantes endógenos destes receptores foram identificados como encefalinas, dinorfinas, endorfinas e endomorfina (REISINE et al., 1996; PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001). As encefalinas apresentam alta afinidade pelos receptores δ . Estudos anatômicos têm sugerido co-distribuição entre encefalinas e os receptores δ , em muitas regiões do Sistema Nervoso. Estes mesmos opióides endógenos têm também alta afinidade por receptores μ . Da mesma forma que o observado para receptores δ , há correlação entre a distribuição de receptores μ e a presença de RNAm para encefalinas. Receptores κ possuem afinidade elevada por dinorfina A, indicando ser este é o ligante endógeno deste receptor. A beta-endorfina liga-se a receptores μ e δ , sugerindo que, em tecidos periféricos, onde as endorfinas são mais abundantes que as encefalinas ou dinorfinas, as beta-endorfinas sejam o ligante endógeno destes receptores.

Os receptores μ são os responsáveis pela maioria dos efeitos analgésicos dos opióides e por alguns dos mais importantes efeitos colaterais, como depressão respiratória, euforia, dependência física e sedação. A maioria dos analgésicos opióides é representada por agonistas destes receptores (BROWNSTEIN, 1993; PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001; JONGKAMONWIWAT et al., 2003). A morfina, o protótipo dos fármacos opióides, liga-se, preferencialmente, a receptores do tipo μ , porém, infusões crônicas ou tratamento com doses elevadas deste opióide, alteram sua seletividade pelos receptores opióides, induzindo ação também em receptores κ e δ (MELCHIORRI et al., 1992; NEGRI et al., 1993; PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001). Os receptores δ são, provavelmente, mais importantes na periferia, entretanto podem, também, contribuir para a analgesia central. Os receptores κ contribuem para a analgesia central e acarretam número relativamente pequeno de efeitos indesejáveis, podendo contribuir para a sedação e disforia, mas não para a dependência física (WOOD, 1988; BOWEN et al., 2003).

Os receptores μ , κ e δ apresentam 7 domínios transmembrânicos acoplados à proteína G (GPCRs) e possuem extensa homologia estrutural entre si (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001; ZHANG et al., 2005). Por serem GPCRs, estes receptores compartilham características de outros membros desta família, como por exemplo, a ocorrência de alterações conformacionais quando ativados por seu agonista específico (CHATURVEDI et al., 2000). Além disso, a ligação do agonista a seu receptor favorece sua fosforilação por quinases específicas de

GPCRs, denominadas quinases de GPCRs (GRKs) ou por outros tipos de proteínas quinase da cascata de sinalização deste receptor, como a PKC, por exemplo. Além de contribuir para a geração do efeito biológico, a fosforilação de domínios citoplasmáticos de receptores por GRKs é um importante mecanismo regulador negativo da sinalização de GPCRs. Assim, as GRKs são responsáveis por estabelecer sítios de ligação do GPCR a proteínas chamadas arrestinas. As arrestinas são proteínas adaptadoras multifuncionais que possuem alta afinidade pelos GPCRs fosforilados (LOHSE et al., 1990; FERGUSON et al., 1996; FERGUSON, 2001). A ligação das arrestinas ao receptor, incluindo receptores opióides, favorece a internalização citoplasmática do receptor e como conseqüência, o término da resposta induzida pelo agonista, sendo que uma nova resposta só pode ser iniciada quando o receptor retorna à membrana plasmática (JOHNSON et al., 2005; ZHENG et al., 2010).

Diversos mecanismos moleculares estão envolvidos na ação analgésica dos opióides. Estes mecanismos incluem a abertura de canais de potássio, com conseqüente hiperpolarização da membrana celular e/ou a inibição do sistema de adenil ciclase, diminuindo a produção de AMPc (SCHULTZ e GROSS, 2001) e inibindo canais de cálcio voltagem-dependentes. A redução do influxo de cálcio nas fibras nervosas acarreta inibição da liberação de neurotransmissores, contribuindo para a diminuição da transmissão sináptica do impulso nervoso (DICKENSON e SULLIVAN, 1987; LAW et al., 2000).

Até a década de 1970, o efeito analgésico de fármacos opióides estava correlacionado às suas ações no Sistema Nervoso Central, como por exemplo, na substância cinzenta periaquedutal (PAG) ou ainda, na medula espinal, modulando a atividade de neurônios de segunda ordem (KUHAR et al., 1973; BASBAUM et al., 1976; FIELDS e ANDERSON, 1978; YAKSH e RUDY, 1978; YOSHIMURA e NORTH, 1983; LIGHT e WILLCOCKSON, 1999; PORRECA et al., 2002). Neste sítio medular, o efeito dos opióides parece estar relacionado à ativação de canais de potássio retificadores de entrada, ativados pela proteína G (GIRKs), presentes nos neurônios pós-sinápticos (NORTH, 1989; OCANA et al., 2004)

No final da década de 1970, Ferreira e Nakamura (1979b) demonstraram a ação antinociceptiva periférica dos opióides, uma vez que a morfina, administrada pela via intraplantar, apresentou efeito antinociceptivo sobre a hipernocicepção induzida pela carragenina ou PGE₂. Sugere-se, atualmente, que a ativação da via L-

arginina-óxido nítrico-GMPc seja a responsável pela analgesia periférica induzida por alguns opióides ou substâncias liberadoras de opióides endógenos (FERREIRA et al., 1991; GRANADOS-SOTO et al., 1995; PICOLO et al., 2003; SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004).

A participação do NO e do GMPc no efeito analgésico periférico de opióides foi evidenciada pela observação de que inibidores da enzima responsável pela síntese de NO, ou da guanilil ciclase, revertem o efeito destes fármacos, quando avaliados em modelos de hipernocicepção inflamatória aguda (FERREIRA, 1990; FERREIRA et al., 1991; GRANADOS-SOTO et al., 1997; GRANADOS-SOTO et al., 1995; AMARANTE e DUARTE, 2002) ou persistente (SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004). As enzimas responsáveis pela síntese de NO pertencem a uma família de enzimas denominadas NOS. Atualmente, são conhecidas três principais isoformas da NOS (endotelial, neuronal e induzida), sendo que as duas primeiras são consideradas constitutivas e a última é sintetizada durante processos inflamatórios. As NOS constitutivas podem ser ativadas pela entrada de Ca^{2+} intracelular, com conseqüente ligação do Ca^{2+} à calmodulina, resultando na produção de NO. Ainda, a ativação da NOS pode ocorrer por um mecanismo independente de Ca^{2+} e dependente de fosforilação pelas quinases PI_3K /proteína quinase B (AKT). Recentemente, Cunha et al., 2009, demonstraram, por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro*, que a ativação da via do NO, pela morfina e agonista de receptores opióides do tipo κ , é dependente da estimulação de PI_3K /AKT. Uma vez sintetizado, o NO é capaz estimular a enzima guanilato ciclase a catalisar a conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em GMPc.

Diversos estudos experimentais demonstram que a síntese de GMPc pelo NO, promove a abertura de canais para potássio sensíveis à ATP (K_{ATP}) (SOARES et al., 2000; SOARES e DUARTE, 2001). O GMPc é capaz de modular, diretamente ou indiretamente (via ativação da proteína quinase G, PKG), a atividade destes canais, favorecendo o efluxo de íons potássio, a hiperpolarização da célula neuronal, resultando em antinocicepção (WHITE, 1999; HAN et al., 2001; SEGAWA et al., 2001; HAN et al., 2002; SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004). A PKG é uma proteína quinase que é estimulada seletivamente, mas não exclusivamente, pelo GMPc. Uma vez estimulada, a PKG induz a inibição da atividade da fosfolipase C, do 1,4,5-inositol trifosfato e de canais de Ca^{2+} , além de estimular a atividade da Ca^{2+} ATPase e de canais de K_{ATP} (SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004).

Adicionalmente a estes mecanismos, tem sido demonstrado que, durante a ativação de receptores opióides, a subunidade $\beta\gamma$ da proteína G, acoplada ao receptor, pode ativar a via das MAP quinases (MAPKs) (POLAKIEWICZ, SCHIEFERL, DORNER et al., 1998; POLAKIEWICZ, SCHIEFERL, GINGRAS et al., 1998; LAW et al., 2000). Fármacos opióides, incluindo substâncias capazes de ativar receptores opióides do tipo κ , podem ativar as três enzimas (ERK1/2, p38 e JNK) integrantes da via de sinalização das MAPKs, em diferentes sistemas (BELCHEVA et al., 1998; BOHN et al., 2000; KAM et al., 2004a; BELCHEVA et al., 2005; BRUCHAS et al., 2006; BRUCHAS et al., 2007). Ainda, a ativação diferencial de uma ou outra destas enzimas parece ser importante para os efeitos duradouros de alguns antagonistas opióides (BRUCHAS et al., 2007). Esta via de quinases é ativada por um grande número de estímulos, desde sinais intracelulares, via interação proteína-proteína, até de cascatas de fosforilação (KARANDIKAR e COBB, 1999).

Originalmente, a ativação de MAPKs foi observada a partir da ativação de receptores tirosina quinase, entretanto, vários estudos tem evidenciado que GPCRs podem ativar diretamente estas quinases e, atualmente, esta ativação direta é amplamente estudada. Alguns GPCRs ativam os receptores tirosina quinase por fosforilação direta ou indireta, através da ativação de MAPKs (PIERCE et al., 2001). Adicionalmente, inúmeros estudos tem demonstrado que os GPCRs ativam as MAPKs através de moléculas como a Src, c-Raf e fosfolipase C (BRUCHAS e CHAVKIN, 2010).

A MAPK melhor caracterizada na sinalização dos receptores opióides, é a ERK1/2. Estudos demonstram que ocorre fosforilação desta quinase após a estimulação aguda de receptores opióides do tipo μ e κ , em células astrocíticas em cultura e de receptores δ , em linhagem de células COS-7 transfectadas com este receptor (BELCHEVA et al., 1998). Contudo, a cinética de ativação da ERK1/2 difere entre os três tipos receptores opióides. A ativação de receptores do tipo δ promove fosforilação desta quinase, via subunidade $\beta\gamma$ do GPCR e Ras (BELCHEVA et al., 1998). Em cultura imortalizada de astrócitos, observou-se que a ativação da ERK1/2 por ligantes de receptores opióides μ é mediada pela ativação de PKC ϵ , enquanto que ligantes do receptor κ requerem PI₃K, PKC ζ e cálcio (BELCHEVA et al., 2005). Estas diferenças detectadas entre os receptores da mesma classe fortalecem a

hipótese de que estas quinases são finamente reguladas e dependem do estímulo e do tipo de célula utilizada.

Além das ERKs, a via da p38 MAPK também pode ser ativada por substâncias que ativam receptores opióides do tipo κ , em diferentes células, como neurônios e em astrócitos, presentes no núcleo estriado e em astrócitos localizados na medula espinal (BRUCHAS et al., 2006; BRUCHAS et al., 2007). Os mecanismos pelos quais esta quinase controla a sinalização deste receptor são ainda desconhecidos. Estudos demonstram que esta quinase é a responsável pelo efeito do fator de crescimento neural (NGF) sobre o aumento da expressão de receptores opióides do tipo μ no DRG, bem como pelo aumento do transporte axonal destes receptores (YAMDEU et al. 2010).

Outra MAPK envolvida na sinalização de receptores opióides é a JNK. A ativação de receptores opióides do tipo δ causa fosforilação desta quinase por um mecanismo dependente da via da PI₃K/Akt em linfócitos T (SHAHABI et al., 2006). Contudo, estudos utilizando linhagens de células (SH-SY5Y e COS-7) transfectadas com cada um dos receptores opióides, demonstram que a ativação desta quinase pelos agonistas seletivos destes receptores, é independente da via PI₃quinase/Akt (KAM et al., 2004b). Bruchas et al. (2007), utilizando células HEK293 transfectadas com receptor opióide do tipo κ , mostraram que o Nor-BNI, antagonista seletivo deste receptor, bloqueia a sinalização intracelular decorrente de sua ativação, por exemplo, a inibição do AMPc, a ativação de canais de K⁺ e a ativação de ERK1/2 e p38 (PIROS et al., 1996; BOHN et al., 2000; BELCHEVA et al., 2005).

Em conjunto, estes dados sugerem que opióides ativam a cascata das MAPKs, entretanto, o papel de cada uma destas quinases, para o efeito dos opióides, não está totalmente caracterizado.

1.3.1 Alterações na expressão e funcionalidade de receptores opióides na vigência de sensibilização prévia

Diversas evidências experimentais e clínicas têm sugerido que fármacos opióides possuem eficácia aumentada na vigência de processos inflamatórios (STEIN et al., 1989; STEIN; GRAMSCH; HERZ et al., 1990; STEIN et al., 1990; STEIN et al., 1991). Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar o aumento na intensidade do efeito analgésico na presença de inflamação. Estas hipóteses

incluem aumento da síntese *de novo* de receptores opióides, aumento do transporte axonal destes receptores (HASSAN et al., 1993; MOUSA et al., 2001), além do incremento na exposição de receptores opióides na fibra nervosa sensitiva, decorrentes de alterações na barreira perineural destes neurônios, ocasionadas pela lesão ou inflamação (RECHTHAND e RAPOPORT, 1987; OLSSON, 1990).

Diversos estudos experimentais têm mostrado alterações, tanto na periferia quanto centralmente, da síntese de receptores opióides na vigência de inflamação (HASSAN et al., 1993; JI et al., 1995; SCHAFER et al., 1995; MOUSA et al., 2001; MOUSA et al., 2002; CAHILL et al., 2003). Estes estudos evidenciaram, por exemplo, aumento no número de receptores μ opióides no gânglio da raiz dorsal da medula espinal (DRG) ou em nervos periféricos da pata de ratos, três dias após a administração intraplantar de carragenina (JI et al., 1995) ou adjuvante completo de Freund (CFA) (SCHAFER et al., 1995; MOUSA et al., 2001; MOUSA et al., 2002), respectivamente. Adicionalmente, Hassan et al. (1993) observaram, em animais submetidos à constrição crônica do nervo isquiático e injetados, por via intraplantar, com CFA, acúmulo marcante de receptores μ opióides em torno da ligadura no nervo isquiático, além do acúmulo destes receptores na pata injetada com o CFA, sugerindo que a inflamação local aumenta o transporte axonal de receptores opióides no nervo isquiático e o seu acúmulo no tecido inflamado. Apesar destas evidências, não foram realizados até o presente momento, estudos investigando a expressão destes receptores nos estágios iniciais do processo inflamatório.

Adicionalmente ao aumento na expressão de receptores opióides na periferia é também observado aumento na expressão destes receptores no SNC (medula espinal), durante inflamação periférica. Assim, em modelo de inflamação articular induzida pela administração de CFA, foi detectado aumento da expressão de RNAm para os receptores opióides μ e κ , mas não δ , nas lâminas I e II da medula espinal (MAEKAWA et al., 1996). Por outro lado, quando este agente flogístico é administrado na pata de ratos, ocorre aumento da expressão de receptores opióides μ e δ na medula espinal (MOUSA et al., 2002; CAHILL et al., 2003). Em relação aos receptores δ , foi observado que este aumento é decorrente de seu recrutamento, dos estoques intracelulares, para a membrana plasmática (CAHILL et al., 2003).

Além dos estudos realizados em roedores, estudos experimentais realizados em humanos demonstram a eficácia analgésica periférica de opióides apenas na

vigência de inflamação. Nestes estudos, foi observado que o efeito analgésico da 6- β -glucoronato de morfina (M6G) é detectado apenas quando o tecido é sensibilizado pelo frio ou contração muscular. Interessantemente, os autores não detectaram efeito analgésico deste opióide na presença de injúria induzida por estimulação elétrica (TEGEDER et al., 2003). Neste tipo de injúria não é detectada resposta inflamatória, uma vez que a aplicação da eletro-estimulação não desencadeia sinais e sintomas do processo inflamatório (NAGAKURA et al., 2008).

O aumento da expressão de receptores opióides, particularmente do tipo μ , detectado na vigência de lesão tecidual, como a constrição crônica do nervo isquiático (CCI) (TRUONG et al., 2003), pode explicar a maior eficácia antinociceptiva local de drogas com atividade opióide, em comparação à observada após a administração sistêmica destas drogas. Klabi e Cahill (2007) mostraram, também em modelos de CCI, aumento na expressão de receptores δ em DRG de animais submetidos à constrição do nervo, quando comparado aos animais falso-operados. Apesar destas evidências, existem dados contraditórios na literatura mostrando que na vigência de dores crônicas, a efetividade de agonistas opióides está diminuída (TRUONG et al., 2003). Neste sentido, Zhang e et al. (1998) e Kohno e et al. (1995) evidenciaram, em estudos utilizando modelos experimentais de dor neuropática, diminuição da expressão de receptores opióides μ em neurônios do DRG. Dessa forma, os dados da literatura são controversos em relação à expressão destes receptores, bem como em relação à eficácia de fármacos opióides na vigência de inflamação/lesão tecidual. Cabe ressaltar que a maioria dos dados de literatura envolvem estudos com receptores opióides do tipo μ , uma vez que, como citado anteriormente, os principais fármacos utilizados no controle da dor atuam preferencialmente nestes receptores.

Além de interferir com a expressão gênica e protéica de receptores opióides, a inflamação ou lesão tecidual podem também aumentar a exposição destes receptores no tecido inflamado. Antonijevic et al. (1995) demonstraram que a ruptura da barreira perineural, seja por mediadores inflamatórios ou por solução hiperosmótica, é essencial para o efeito antinociceptivo de agonistas μ opióides. Estes autores propõem que a ruptura desta barreira física facilitaria o acesso do agonista opióide ao seu receptor, aumentando seu efeito antinociceptivo.

Estudos experimentais têm mostrado também que a reação inflamatória pode alterar a funcionalidade de receptores opióides e sua ligação ao agonista (ZOLLNER

et al., 2003; SHAQURA et al., 2004). Estudos utilizando células do DRG, mostraram que a inflamação induzida por CFA favorece a ligação de receptores μ opióides ao seu respectivo agonista e o acoplamento deste receptor com a proteína G, com conseqüente ampliação da sinalização intracelular. Ainda, foi mostrado em estudos *in vitro*, que a diminuição do pH do microambiente de células em cultura, altera a função de proteínas G de membranas. Estas alterações incluem a diminuição da estimulação da adenilil ciclase por proteínas G estimulatórias (Gs), acarretando a potencialização do efeito inibitório gerado por um agonista opióide, via proteína G inibitória (Gi) (SELLEY et al., 1993). Cabe ressaltar que, novamente, grande parte destes estudos envolve receptores μ opióides, sendo escassas as informações envolvendo receptores κ e δ opióides. Przewlocka et al. (1992) observaram que a adenilil ciclase de células obtidas de DRG de ratos portadores de monoartrite, são mais sensíveis à inibição por agonistas μ e δ opióides. Como conseqüência deste efeito, estes animais apresentam maior resposta antinociceptiva à injeção intratecal de opióides, quando comparado aos animais controles. Estes dados mostram novamente, que a presença de um processo inflamatório favorece a efetividade analgésica de agonistas opióides. Contudo, a maioria dos estudos envolve modelos de sensibilização crônica, sendo que o aumento da potência analgésica de opióides é também detectada nos períodos iniciais da inflamação. Assim, estudos para melhor compreender os mecanismos envolvidos neste efeito, avaliando possíveis alterações na funcionalidade destes receptores, nesta fase aguda do processo, e que possam contribuir para o aumento na atividade analgésica dos opióides, tornam-se relevantes.

1.4 A crotalina

Os estudos com a crotalina estiveram baseados em evidências, do início do século passado, que mostravam que o veneno da cascavel induz potente efeito analgésico em seres humanos (BRAZIL, 1934; 1950). Em decorrência destes dados, nosso grupo realizou estudos experimentais para confirmar e melhor caracterizar esta atividade do veneno crotálico. Estes estudos mostraram que a administração oral do veneno em camundongos ou ratos (200 – 1.600 $\mu\text{g}/\text{kg}$), induz antinocicepção mediada pela ativação de receptores opióides do tipo κ e/ou δ (GIORGI et al., 1993;

KOHNO et al., 1995; PICOLO et al., 1998; PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; PICOLO et al., 2003; PICOLO e CURY, 2004; BRIGATTE, 2005). Subseqüentemente à ativação dos receptores opióides, periféricamente ocorre ativação da via L-arginina/óxido nítrico/GMPc/PKG e abertura de canais de K⁺ dependentes de ATP, mecanismo molecular fundamental para o efeito antinociceptivo periférico do veneno (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; PICOLO e CURY, 2004). Apesar da atividade opióide, o tratamento prolongado com o veneno crotálico não induz tolerância ao efeito antinociceptivo no modelo de hipernocicepção induzida por carragenina (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000) e não acarreta o aparecimento de sintomas que caracterizem uma síndrome de abstinência (BRIGATTE et al., 2001). Foi também demonstrado que o efeito antinociceptivo do veneno crotálico é de longa duração, sendo detectado por 120 horas, quando avaliado em modelo animal de neuropatia por constrição crônica do nervo isquiático de rato (GUTIERREZ et al., 2008) e 72 horas, quando avaliado no teste da placa quente e nos modelos de hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina ou prostaglandina E₂ (PGE₂) (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; BRIGATTE et al., 2001; PICOLO e CURY, 2004).

Baseado nas propriedades antinociceptivas do veneno crotálico, procedeu-se à purificação e caracterização química do componente responsável pelo efeito antinociceptivo do veneno. Nestes estudos foi identificada a crotalfina, um peptídeo de 14 aminoácidos, contendo uma ponte dissulfídica e um ácido piroglutâmico (Figura 1).

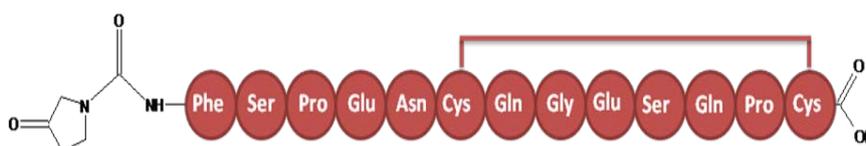


Figura 1. Seqüência de aminoácidos da crotalfina.

Estudos com a crotalfina mostraram que, da mesma maneira que o veneno bruto, esta substância é capaz de induzir antinocicepção de longa duração, mediada pela ativação de receptores opióides (KONNO et al., 2008). Curiosamente, apesar deste peptídeo apresentar efeito opióide, a sua estrutura química não se assemelha a nenhum peptídeo opióide conhecido (KONNO et al., 2008). É importante salientar que este peptídeo apresenta similaridade com a cadeia gama da crotapotina, a subunidade não tóxica da forma heterodimérica da crotoxina, a principal neurotoxina do veneno crotálico (BON et al., 1989; AIRD et al., 1990; FAURE et al., 1991).

Com base na estrutura química da crotalfina, foi possível obter o peptídeo na sua forma sintética (síntese química manual em fase sólida) (KONNO et al., 2008). Os estudos sobre a atividade antinociceptiva da crotalfina sintética mostraram que este peptídeo reproduz os dados obtidos com o veneno bruto e também com o peptídeo natural. Assim, a crotalfina sintética induz antinocicepção no modelo de hipernocicepção induzida por PGE₂, quando administrada por vias sistêmicas – oral e endovenosa – ou por via local – intraplantar (KONNO et al., 2008). Quando administrada por via oral, sua efetividade neste modelo é observada a partir da dose de 0,0016 µg/Kg. O efeito antinociceptivo deste peptídeo é também observado no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina e em modelos experimentais de dor crônica – dor de câncer e dor neuropática (BRIGATTE, 2005; GUTIERREZ et al., 2008; KONNO et al., 2008). Em todos os modelos o efeito é de longa duração (2-3 dias nos modelos de dor crônica e 5 dias no modelo de hipernocicepção inflamatória) e mediado pela ativação de receptores opióides periféricos dos tipos κ (modelos agudos) ou κ e δ (modelos crônicos) (GUTIERREZ et al., submetido).

Os estudos com a crotalfina mostraram ainda, que o tratamento prolongado com este peptídeo não acarreta o desenvolvimento de tolerância ao efeito antinociceptivo, quando avaliado em modelo de dor neuropática (GUTIERREZ et al., 2008). Diferentemente do observado com a morfina (CELERIER et al., 2000; GUIGNARD et al., 2000; COMPTON et al., 2003), a administração de crotalfina em ratos, em doses sub-analgésicas, não induz o aparecimento de hipernocicepção ou, quando administrada em doses analgésicas, não acarreta o desenvolvimento de hipernocicepção tardia, subsequente ao fim do efeito analgésico (PEREIRA e CURY, em fase de elaboração). É importante ressaltar, ainda, que a efetividade da crotalfina foi também demonstrada, recentemente, em animais fêmeas. Este é um

parâmetro importante no desenvolvimento de um novo fármaco, uma vez que várias evidências têm sugerido a existência de diferenças na sensação de dor entre homens e mulheres, bem como entre animais machos e fêmeas (BERKLEY, 1997; BINDER et al., 2000; WIESENFELD-HALLIN, 2005). Os dados obtidos pelo nosso grupo demonstram que a crotalina é mais efetiva em acarretar antinocicepção em ratas, quando comparado aos machos, além de induzir efeito de maior duração nas fêmeas (6 dias após uma única administração) (BRITTO e CURY, em fase de elaboração).

Estudos recentes mostraram que a maior potência e a longa duração de ação da crotalina são detectadas na presença de um estímulo inflamatório (carragenina), de sensibilização (PGE_2) ou de neuropatia, uma vez que na ausência destes estímulos, o efeito antinociceptivo é de menor intensidade e detectado apenas por 5 horas (PEREIRA e CURY, em fase de elaboração). Apesar destes dados, não foi determinado, até o presente momento, se as alterações observadas para as propriedades antinociceptivas da crotalina, na vigência de sensibilização prévia, estão relacionadas a alterações na expressão e/ou funcionalidade de receptores opióides. Como ressaltado anteriormente, alterações na intensidade do efeito analgésico de drogas com atividade opióide, como por exemplo a morfina, são também observadas na vigência de processos inflamatórios. Apesar de alguns mecanismos envolvidos nestas alterações já terem sido descritos (HASSAN et al., 1993; ANTONIJEVIC et al., 1995; ZOLLNER et al., 2003), estes mecanismos não são totalmente compreendidos, em particular, aqueles relacionados às alterações que ocorrem nos estágios iniciais dos processos inflamatórios. Adicionalmente, estudos mostrando a possível correlação entre a instalação de dores crônicas, como a dor neuropática, e a expressão e atividade de receptores opióides, são ainda controversos. Ainda em relação aos estudos sobre a ação da crotalina que mostram que, na presença de nocicepção aguda, o efeito antinociceptivo deste peptídeo é decorrente da ativação de receptores κ -opióides e em modelos de dor persistente, este efeito é decorrente da ativação de receptores κ - e δ -opióides, não foram ainda determinados os mecanismos pelos quais o processo de sensibilização neuronal aguda ou crônica interfere com o tipo de receptor opióide expresso ou ativado por este peptídeo.

2 Objetivos

Baseado nos dados de literatura mostrando que fármacos analgésicos do tipo opióide apresentam efeito potencializado na vigência de sensibilização prévia, o objetivo deste trabalho foi investigar as possíveis alterações na expressão e funcionalidade de receptores opióides periféricos e sua interação com agonistas seletivos ou com a crotalfina, na ausência ou na vigência de sensibilização por prostaglandina E₂ ou instalação de dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos (CCI).

Os objetivos específicos foram investigar se:

- ❖ agonistas dos receptores opióides do tipo μ , κ e δ ou a crotalfina apresentam maior efeito antinociceptivo e/ou mais prolongado em animais tratados com PGE₂ ou submetidos à CCI, quando comparado aos animais controles (*naive*);
- ❖ a administração de PGE₂ ou a CCI promovem alteração na expressão gênica e protéica de receptores opióides μ , κ e δ no nervo da pata e no gânglio da raiz dorsal (DRG) da medula espinal, quando comparado aos animais controles (*naive*);
- ❖ estes estímulos favorecem a ativação de receptores por seus respectivos agonistas e crotalfina, no nervo da pata e no gânglio da raiz dorsal (DRG) da medula espinal e também em cultura de células obtidas do DRG de animais *naive*, incubadas ou não com PGE₂;
- ❖ a sensibilização por PGE₂ interfere com as vias de sinalização ativadas pela crotalfina, em cultura de células obtidas do DRG de animais *naive*, incubadas ou não com PGE₂.

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso entre 160 a 180 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Estes animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* em sala apropriada, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ciclo claro-escuro (12:12 h), por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pela comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB- protocolo nº 386/2008) e do Instituto de Ciências Biomédicas (nº 50, fls. 45 do livro 2) e de acordo com o guia para uso de animais de experimentação em estudos da dor, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (ZIMMERMANN, 1983).

3.2 Tratamentos Farmacológicos

Para avaliar o efeito antinociceptivo de agonistas opióides ou crotalfina na vigência de sensibilização por PGE_2 ou constrição do nervo isquiático, foram utilizadas as seguintes drogas, administradas por via intraplantar, antes ou concomitantemente à PGE_2 ou no 14º dia após a ligadura do nervo isquiático.

- ✓ DAMGO [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]- acetato de encefalina, agonista seletivo de receptor opióide do tipo μ , diluído em água destilada, (5 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ ou 15 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) e administrado por via i.pl. (Sigma-Aldrich, USA) (PICOLO et al., 1998);
- ✓ U-50488, (*trans*)-3,4-dicloro-N-metil-N-[2-(1-pirrolidinil)-ciclohexil] benzenoacetamida, agonista seletivo de receptor opióide do tipo κ , diluído em salina, (10 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ ou 30 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) e administrado por via i.pl. (Sigma-Aldrich, USA) (PICOLO et al., 1998);
- ✓ DPDPE [D-Pen^{2,5}, p-Cl-Phe⁴]-encefalina, agonista seletivo de receptor opióide do tipo δ , diluído em água destilada (20 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ ou 60 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$) e administrado por via i.pl. (Sigma-Aldrich, USA) (PICOLO et al., 1998);
- ✓ crotalfina (CRF) (lote U07122A1), diluída em salina (0,0015 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$, 0,003 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ ou 0,0006 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$). O peptídeo foi obtido por síntese peptídica em

fase sólida, utilizando estratégia Fmoc (American Peptide Company Inc, EUA produto número 331065, pureza 98%, denominação CNF 021.03cc). A crotalina foi mantida a -20°C e diluída em salina estéril no momento do uso.

Dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo mostraram que o efeito antinociceptivo da crotalina, administrada pela via oral, é mediado pela ativação de receptores opióides, sendo o tipo de receptor opióide dependente do estímulo lesivo utilizado (PICOLO et al., 1998; PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; BRIGATTE, 2005; GUTIERREZ, 2005). Baseado nestes dados, investigamos os mesmos mecanismos envolvidos no efeito do peptídeo administrado pela via intraplantar. Ainda, foi analisado se o efeito observado para os agonistas específicos de receptores opióides, administrados por via i.pl., seria mediado pela ativação do seu respectivo receptor. Para tanto, utilizamos os seguintes antagonistas:

- ✓ CTOP, D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ (Sigma-Aldrich, EUA), antagonista seletivo de receptor opióide do tipo μ , diluído em água destilada e administrado por via i.pl. (20 μ g/ 50 μ L), imediatamente antes ou 165 minutos após a PGE₂ ou no 14^o dia após a CCI (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; GENDRON et al., 2007);
- ✓ Nor – BNI, norbinaltorfimina (Sigma-Aldrich, EUA) antagonista seletivo de receptor opióide do tipo κ , diluído em salina e administrado por via i.pl. (50 μ g/ 50 μ L), imediatamente antes ou 165 minutos após a PGE₂ ou no 14^o dia após a CCI (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; LOMAS et al., 2007);
- ✓ ICI 174, 864 (Sigma-Aldrich, EUA), antagonista seletivo de receptor opióide do tipo δ , diluído em água destilada e administrado por via i.pl. (10 μ g/ 50 μ L), imediatamente antes ou 165 minutos após a PGE₂ ou no 14^o dia após a CCI (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000);
- ✓ Cloridrato de Naloxona (Sigma-Aldrich, EUA), antagonista não seletivo de receptores opióides, diluído em água destilada administrado por via i.pl. (1 μ g/50 μ L), 165 minutos após a PGE₂ (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000).

Nos estudos envolvendo a avaliação da ativação de receptores opióides na ausência ou presença de sensibilização, foram utilizados:

- ✓ Prostaglandina E₂ (PGE₂), utilizada como agente sensibilizante, diluída em etanol (concentração final menor que 0,001% nos ensaios *in vitro* e 0,2% nos ensaios *in vivo*) (100 ng/50 µL nos ensaios *in vivo* ou 1 µM em cultura celular) (Sigma-Aldrich, USA)(PICOLO et al., 1998; SEGOND VON BANCHET et al., 2003; SEGOND VON BANCHET et al., 2003);
- ✓ DAMGO [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]- Acetato de encefalina, agonista seletivo de receptor opióide do tipo µ , diluído em água destilada (5 µg/50 µL nos ensaios *in vivo* ou 1 µM em cultura celular) (Sigma-Aldrich, USA) (GOLD e LEVINE, 1996; PICOLO et al., 1998);
- ✓ U-50488 (±)-*trans*-U-50488 Metanosulfonato, agonista específico de receptor opióide do tipo κ, diluído em salina (10 µg/50 µL nos ensaios *in vivo* ou 1 µM em cultura celular) (Sigma-Aldrich, USA) (PICOLO et al., 1998; BOHN et al., 2000);
- ✓ DPDPE [D-Pen^{2,5}, p-Cl-Phe⁴]-Encefalina, agonista específico de receptor opióide do tipo δ, diluído em água destilada (20 µg/50 µL nos ensaios *in vivo* ou 1 µM em cultura celular) (Sigma-Aldrich, USA) (PICOLO et al., 1998);
- ✓ crotalina (CRF) (American Peptide Co, EUA), diluída em salina (0,0006 µg/50 µL nos ensaios *in vivo* ou 1 µM em cultura celular);
- ✓ Nor-BNI, antagonista específico de receptor *kappa*, diluído em salina, utilizada na concentração de 1 µM em células do DRG;
- ✓ Peptídeo inibidor da PKCζ (PKCζ pseudosubstrato), ([C]SIYRRGARRWRKLYRAN; aminoácidos 105–121 na PKCζ). Os peptídeos foram sintetizados e doados pela Profa. Dra. Daria Mochly-Rosen, (Departamento de Química e Sistemas Biológicos, Universidade de Stanford, CA), diluídos em água e utilizados, *in vitro*, na concentração de 1 µM.

3.3 Indução de hipernociceção por prostaglandina E₂ (PGE₂)

Para a indução da hipernociceção, PGE₂ (Sigma- Aldrich, EUA) foi injetada pela via intraplantar (i.pl., volume final 100 µl). Uma solução estoque de PGE₂ foi

inicialmente preparada, dissolvendo-se 500 µg de prostaglandina em 1 mL de etanol. No momento do uso, essa solução estoque foi novamente diluída em salina estéril, para a obtenção da solução utilizada para administrar a dose de 100 ng/pata de PGE₂. Animais injetados com salina mais a proporção de etanol utilizada para diluição da PGE₂, foram inicialmente utilizados como controles (dados não mostrados).

3.4 Indução da dor neuropática

Para a indução da dor neuropática, foi realizada cirurgia no nervo isquiático, de acordo com o método descrito por Bennett e Xie (1988). Os animais foram anestesiados com halotano. O nervo isquiático foi exposto na região mediana da coxa, afastando-se o músculo bíceps femoral. Próximo à trifurcação do nervo isquiático, 7 mm de distância da trifurcação, foram realizadas 4 ligaduras (catagute cromado 4-0) frouxas ao redor do nervo, distantes entre si em aproximadamente 1 mm. As ligaduras foram realizadas ao longo do nervo, até 4-5 mm do ponto inicial. A incisão foi suturada em camadas, utilizando fio de sutura de seda número 4-0. O grupo controle foi composto por animais falso-operados, submetidos à mesma incisão que os animais operados, com a exposição do nervo isquiático, porém sem ligação ou compressão do nervo. Para a caracterização da dor neuropática, foi avaliado o desenvolvimento de hipernocicepção e alodinia.

3.5 Avaliação da sensibilidade dolorosa

3.5.1 Determinação da hipernocicepção

Para avaliação da hipernocicepção, foi utilizado o teste de pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Itália), realizado de acordo com o método descrito por RANDALL e SELITTO (1957) (**Figura 2**).

Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), foi continuamente aplicada sobre o dorso das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresentava a reação de “retirada” do membro. Neste modelo, o

limiar nociceptivo está representado como a força (g) necessária para a indução da reação.

Este teste foi aplicado antes (medida inicial) e 3 h após a administração de PGE₂ na pata. Em animais submetidos ao CCI, o teste foi aplicado antes e no 14^o dia após a ligadura do nervo isquiático. Adicionalmente, na vigência dos tratamentos farmacológicos, o teste foi aplicado no 14^o dia, também em diversos tempos após a administração das drogas.

Os resultados foram analisados por meio da comparação das médias das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, por meio da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.



Figura 2 - Teste de pressão de patas

3.5.2 Determinação da alodinia

Foi avaliada por ensaio quantitativo, em resposta a estímulo tátil aplicado às patas do rato, segundo método descrito por Chaplan et al. 1994, modificado. Neste teste, os ratos foram colocados, individualmente, em gaiolas plásticas, apoiadas sobre uma prateleira, para permitir acesso às regiões plantares das patas destes animais. Os ratos foram inicialmente, habituados às gaiolas, por uma hora, durante os 3 dias que antecederam os experimentos. No dia do ensaio, os animais foram colocados na gaiola, 20 minutos antes do início de cada medida. Para o ensaio de

alodinia, foi empregada uma série logarítmica de 10 filamentos de von Frey (Aesthesiometer Semmer-Weinstein monofilamentos, Stoelting Co., E.U.A). A calibração dos filamentos é definida como $\log_{10}(\text{mg} \times 10)$, tendo os seguintes valores (o valor em gramas está entre parênteses): 3,61 (0,407 g); 3,84 (0,692 g); 4,08 (1,202 g); 4,17 (1,479 g); 4,31 (2,041 g); 4,56 (3,630 g); 4,74 (5,495 g); 4,93 (8,511 g); 5,07 (11,749 g) e 5,18 (15,136 g). Cabe ressaltar que os filamentos com peso superior à 15,136 g não são empregados nos estudos de alodinia. Os filamentos foram aplicados, um a um, perpendicularmente, sob a área plantar da pata posterior e mantidos por um período de 8 segundos. Os ensaios foram iniciados com o filamento de 2,041 g. Na ocorrência da retirada da pata a este filamento, foi utilizado o filamento de 0,407 g. Na ausência de resposta com o filamento de 0,407g, o filamento seguinte (0,692 g) foi aplicado. Diferentemente, na presença de resposta, o mesmo filamento de 0,407 g foi aplicado novamente, 30-60s depois. O filamento capaz de elicitar a retirada da pata, duas vezes consecutivas, foi considerado como a força em gramas necessária para promover a resposta (100% de resposta). Na ausência de resposta ao filamento inicial (2,041 g), a apresentação dos filamentos foi realizada de forma ascendente, até a observação de duas respostas consecutivas para um mesmo filamento. Na ausência de resposta ao maior estímulo (15,135 g), este filamento foi considerado como valor de corte. Esta forma de apresentação dos filamentos minimiza o risco de habituação do animal à resposta (MILLIGAN et al., 2000).

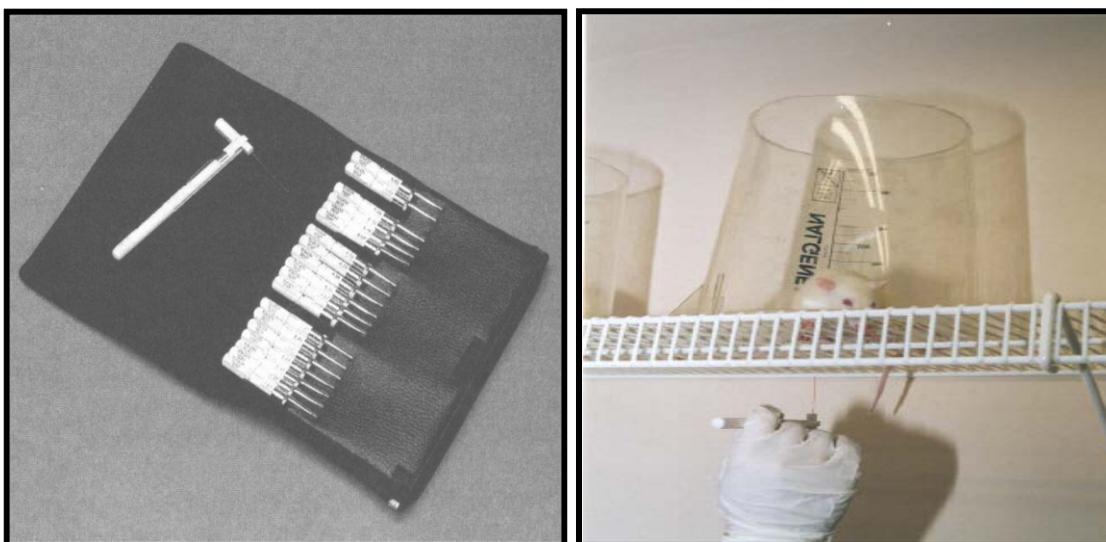


Figura 3 - Filamentos de von Frey

O valor da força (em log) para induzir 50% de resposta de retirada da pata foi calculado pela aplicação de uma função psicométrica integral Gaussiana. Esta função foi aplicada para as respostas obtidas para cada filamento de von Frey, utilizando um método de ajuste de probabilidade máxima. O limiar de resposta estimado a partir da função integral Gaussiana torna-se, desta forma, apropriado para análise estatística paramétrica. A função Gaussiana foi aplicada utilizando-se o programa PsychoFit (Universidade do Colorado, EUA) .

Este teste foi aplicado antes da cirurgia e 14 dias após a ligadura do nervo isquiático, para a determinação da instalação da alodinia. Adicionalmente, na vigência dos tratamentos farmacológicos, o teste foi aplicado, no 14^o dia, também em diversos tempos após a administração das drogas.

Os resultados foram analisados por meio da comparação das médias das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, por meio da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

3.6 Caracterização do efeito antinociceptivo de agonistas seletivos de receptores opióides μ , κ e δ opióides

3.6.1 Na vigência de hipernocicepção por PGE_2

Para a determinação do efeito antinociceptivo de agonistas opióides ou da crotalfina, os animais foram divididos nos seguintes grupos: (a) animais que receberam PGE_2 nas duas patas e o agonista apenas na pata direita, sendo que o agonista foi administrado 2 horas após a injeção de PGE_2 ; (b) animais que receberam apenas o agonista na pata direita, ou seja, não foram previamente sensibilizados por PGE_2 ; (c) animais controles que receberam PGE_2 e o veículo dos agonistas, ambos apenas na pata direita. O teste comportamental foi aplicado sempre antes e 3 horas após a injeção da PGE_2 (pico da resposta hipernociceptiva), ou o veículo correspondente (PICOLO et al., 2003).

Nestes estudos, foram também utilizados antagonistas seletivos para cada um dos receptores opióides, com o intuito de confirmar a especificidade do efeito do respectivo agonista ou da crotalfina. Neste caso, os antagonistas foram

administrados pela via intraplantar imediatamente antes ou 165 minutos após a PGE₂, conforme especificado.

3.6.2 Na vigência de hipernociceção e alodinia por CCI

Os agonistas seletivos para receptores opióides ou a crotalfina foram administrados no 14^o dia do pós-operatório, imediatamente após a avaliação da instalação da hipernociceção e da alodinia. Estes fenômenos foram avaliados novamente 1 e 3 horas após a administração dos agonistas ou da crotalfina.

3.7 Determinação da expressão gênica de receptores opióides

Para investigar se a administração plantar de PGE₂ ou a instalação de dor crônica (CCI) promovem alteração na expressão gênica de receptores opióides, foi realizado ensaio de reação em cadeia pela polimerase em tempo real (real-time PCR).

O RNA foi extraído de amostras de gânglios da raiz dorsal (DRG) L4-L6, ipsilaterais e contralaterais de animais tratados com PGE₂ ou submetidos à CCI, ou dos controles correspondentes (salina ou falso operados). Para a remoção dos DRGs, foi realizada uma incisão no dorso do animal, a camada muscular foi retirada e a medula espinal exposta após a retirada das vértebras. Os gânglios foram coletados (dos lados ipsilateral e contralateral à injúria) e imediatamente congelados em gelo seco. Para a retirada do nervo, foi removida a camada de tecido conjuntivo da pata e o nervo foi retirado até a altura da articulação do joelho. Cada amostra foi formada por um “pool” de 12 gânglios. Os experimentos foram realizados com grupos contendo 7 animais cada. Os grupos controle foram constituídos por animais normais (não submetidos a tratamentos farmacológicos ou procedimento cirúrgico) ou falso operados. As amostras foram homogeneizadas em 1 mL de Trizol (Invitrogen) e incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. Após essa fase, as amostras foram centrifugadas a 5.000 g, por 15 minutos, a 4°C. A fase sobrenadante da solução foi transferida para novos tubos. Em seguida, foram adicionados 500 µL de clorofórmio a cada amostra e os tubos submetidos a forte agitação por 30 segundos e, então, incubados a temperatura ambiente por 15

minutos. Após essa fase, as amostras foram centrifugadas a 5.000 g, por 15 minutos, a 4°C. A fase sobrenadante da solução foi transferida para novos tubos. Foram adicionados 500 µl de álcool isopropílico e os tubos foram incubados por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas novamente, a 5.000 g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo RNA lavado com 1mL de etanol 75%. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos, a 4.000 g, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos a temperatura ambiente até a secagem quase completa do RNA, o qual foi posteriormente suspenso em 40 µL de H₂O DEPC. As amostras de RNA foram analisadas por espectrofotometria (Ultrospec 2100 Pro, Amersham Pharmacia Biotec, EUA), nos comprimentos de onda de 260 a 280 nm. As amostras selecionadas para os ensaios foram aquelas em que a relação entre os comprimentos de onda (260/280nm) variaram entre 1,6-2,0.

3.7.1 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (real time RT-PCR)

Para as reações de síntese de cDNA, foram utilizadas alíquotas de 1-2 mg de RNA total obtidas de amostras dos experimentos descritos acima. Neste ensaio, foram utilizados os oligonucleotídeos primers sense e anti-sense dos genes para receptores opióides μ , δ e κ , construídos pela Invitrogen. A mistura de reação foi preparada com os seguintes reagentes: 1 µL de dNTPS mix 10 mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 4 µl de tampão de reação 5 vezes concentrada (Tris-HCL 50 mM, KCl 75 mM e MgCl 3 mM), 2 µL de DTT 100 mM, 1 µL de inibidor de RNase (RNase OUT, Invitrogen) 40 U/µL, 1 µL do iniciador OLIGO dT 0,5 µg/µL, 1 µL de enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, EUA). As etapas da reação de transcrição reversa foram as seguintes: 1) desnaturação, 65°C, 5 min; 2) síntese, 42°C, 60 min; 3) reação da inativação da enzima transcriptase reversa, 70°C, 15 min.

Para a reação de PCR em tempo real, foram utilizados os seguintes materiais: amostra de cDNA (12,5, 25 ou 50 ng), primers específicos para o gene desejado (50, 100, 200 ou 400 nM), 5 µL da mistura SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems, EUA).

Utilizando o sistema de detecção Rotor-Gene 3000 Real-time PCR (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia), foram realizados os seguintes passos da

reação em cadeia da polimerase em tempo real: 1) desnaturação a 95°C por 10 minutos, para a ativação da enzima AmpliTaq Gold; 2) 45 ciclos a 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento). As fluorescências foram lidas em detector ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems).

Os primers utilizados foram:

- **ciclofilina B:** sense TCAAGGACTTCATGATCCAG; antisense GAGCCATTGGTGTCTTTG
- **receptor μ opióide:** sense GCCATCGGTCTGCCTGTAAT; antisense GAGCAGGTTCTCCCAGTAC;
- **receptor κ opióide:** sense GTCAGAGGACAGCTTTGCAC; antisense TAGCTCAGTGAAGGTACATGC;
- **receptor δ opióide:** sense ATGGTCATGGCAGTGACC; antisense CACGCAGATCTTGGTCACAG.

3.8 Determinação da expressão proteica de receptores opióides

Para investigar se a administração plantar de PGE₂ ou a constrição crônica do nervo isquiático promovem alteração na expressão protéica de receptores opióides, estes receptores foram quantificados por ensaio de *Western Blotting*.

A expressão dos receptores foi realizada em amostras do nervo plantar e DRG (L4-L6). Inicialmente os animais foram tratados com PGE₂ ou submetidos à CCI. Três horas após a PGE₂ ou 14 dias após a CCI os animais foram eutanasiados por CO₂. Para a remoção dos DRGs, foi realizada uma incisão no dorso do animal, a camada muscular foi retirada e a medula espinal exposta após a retirada das vértebras. Os gânglios foram coletados (dos lados ipsilateral e contralateral à injúria) e imediatamente congelados em gelo seco. Para a retirada do nervo, foi removida a camada de tecido conjuntivo da pata e o nervo foi retirado até a altura da articulação do joelho. Animais controles foram constituídos por animais normais (não submetidos a tratamentos farmacológicos ou procedimento cirúrgico) ou falso

operados. Para a extração de proteína, as amostras foram homogeneizadas em tampão contendo Hepes-NaOH (1 M, PH 7,9), NaCl (1,54 M), EGTA (200 mM), Triton-X 100 (1 %) e coquetel inibidor de protease e fosfatase (1: 300, Sigma-Aldrich, EUA). As amostras foram centrifugadas a 10.000 g, por 20 min, a 4° C. Após a centrifugação, a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Alíquotas contendo 60 µg de proteína total foram fervidas em tampão Laemmli por 4 minutos e posteriormente, submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), em aparelho para minigel (Mini-Protean, EUA). Após a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad, EUA). A membrana foi bloqueada por 1 hora, em TBST (20 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, e 0,1% Tween 20) contendo 5% de BSA, seguida pela incubação com anticorpos anti-receptor opióide μ , anti-receptor opióide δ (na diluição de 1:1000, Chemicon, EUA), ou anti- receptor opióide κ (na diluição de 1:500, Santa Cruz Biotechnology, EUA). As bandas existentes nas membranas incubadas foram visualizadas por auto-radiografia pós reação de quimiluminescência. O método da quimiluminescência consiste nos seguintes passos: após incubação da membrana com o anticorpo primário, a membrana é novamente incubada por uma hora com o anticorpo anti-IgG conjugado à peroxidase em solução bloqueadora (1:2000). Em seguida, as membranas são lavadas novamente três vezes com solução TBS-T e incubadas com um mL de cada um dos dois reagentes do kit, por um minuto, e a seguir os filmes de raio-X são expostos às membranas. Esta exposição pode durar entre meio e dez minutos, dependendo da concentração de proteína da amostra e da sensibilidade do filme de raio-X. A densidade óptica das bandas foi determinada pelo programa TotalLab (Nonlinear Dynamics Ltd, EUA). A quantidade de proteína de cada amostra foi normalizada pela incubação da membrana com anticorpo para GAPDH (1:10.000) (Santa Cruz Biotechnology, EUA).

3.9 Determinação da ativação (por alteração conformacional) de receptores opióides

Com o objetivo de investigar se a sensibilização por PGE_2 na pata de ratos ou a CCI promovem alterações na atividade de receptores opióides, investigamos as possíveis alterações conformacionais que indicam ativação destes receptores. Estas alterações foram realizadas em cortes de tecido da pata e DRG e em cultura de DRG. A detecção destes receptores em sua forma ativa foi realizada por ELISA, utilizando anticorpos que reconhecem alterações estruturais, na porção N-terminal, compatíveis com a ativação destes receptores (GUPTA et al., 2007) (**Figura 4**).

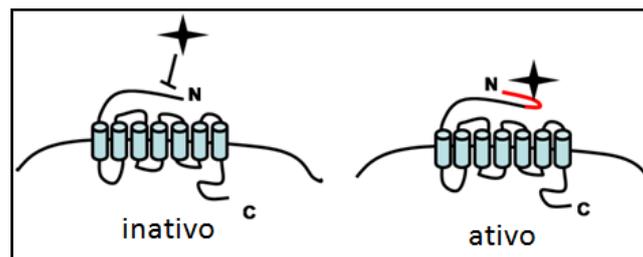


Figura 4 - Esquema do reconhecimento da alteração conformacional de receptores pelo anticorpo conformação específica

3.9.1 ELISA em cortes do nervo da pata e DRG

Para avaliar se a presença de sensibilização, *per se*, é capaz de promover ativação de receptores opióides, animais injetados com PGE_2 ou submetidos à CCI, conforme descrito anteriormente (**itens 3.2 e 3.3**), e animais *naive* foram anestesiados com halotano e submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina tamponada, seguida de solução fixadora constituída de 4% de paraformaldeído (PFA) dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Após a perfusão, os tecidos (DRG e nervo plantar) foram coletados e pós-fixados em 4% de paraformaldeído, durante 6 horas, sendo então transferidos para solução crioprotetora de sacarose a 30%, em tampão fosfato, por um período mínimo de 48

horas. Após este período, os tecidos foram emblocados em “tissue freezing medium” (TBS, Fisher, EUA). Posteriormente, foram realizados cortes de 14 μm em criostato (Leica LM 500, Alemanha). As fatias foram colocadas em lâmina silanizada e então isoladas por uma barreira hidrofóbica (Vector Laboratories, Inc., EUA), resultando em poços de 80 μL na própria lâmina. A técnica de ELISA foi utilizada para a detecção dos receptores presentes nestes cortes. O material foi bloqueado por 90 minutos em solução contendo 1% de BSA e 5% de sacarose. Após este período, os tecidos foram incubados *overnight* com anticorpos primários anti receptor- μ , δ ou κ , de conformação específica, na diluição de 1:1000 (GUPTA et al., 2007) (Proteimax Biotecnologia Ltda, Brasil) ou anticorpos primários anti receptor- μ , δ na diluição de 1:500 (Chemicon, EUA) ou κ , na diluição de 1: 250 (Santa Cruz Biotechnology, EUA), que não discriminavam o estado diferente do receptor. Após este período, as lâminas foram lavadas 3 vezes em tampão fosfato salina (PBS) e então incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (1:5000, Sigma-Aldrich, EUA) por 2 horas. A reação foi revelada pela adição de 80 μL de reagente OPD (o-fenilenediamina dihidroclorídeo) (Sigma-Aldrich, EUA), 0,5 g/mL, diluído em tampão citrato/fosfato, e 0,3 % de H_2O_2 e a reação interrompida 5 minutos após, com ácido cítrico 0,2 M. O produto da reação foi então transferido para placas de 96 poços e a absorbância determinada por leitor de ELISA (Bio-Rad, EUA), em comprimento de onda de 450 nm.

Para avaliar se a sensibilização é importante para a ativação dos receptores opióides por seus respectivos agonistas, os animais foram injetados com DAMGO (5 $\mu\text{g/pata}$, agonista de receptor μ , Sigma-Aldrich, EUA), DPDPE (20 $\mu\text{g/pata}$, agonista de receptor δ , Sigma-Aldrich, EUA), U 50,488 (10 $\mu\text{g/pata}$, agonista de receptor κ , Sigma-Aldrich, EUA) ou CRF (0,0006 $\mu\text{g/pata}$, American Peptides, EUA), na presença ou ausência de sensibilização por PGE_2 ou CCI. A ativação dos receptores opióides foi avaliada conforme descrito acima.

3.9.2 ELISA em cultura de células do DRG

Os animais *naive* foram anestesiados com halotano, sacrificados em estufa de CO_2 , e os DRGs removidos (42 a 50 gânglios por animal), dissecados e

colocados em solução *Earle's Balanced Solution* (EBSS- estéril, pH 7,4). As células foram inicialmente incubadas, a 37°C, por 50 minutos, em solução EBSS contendo 10 mg/mL de colagenase 1A. Em seguida à incubação, foi realizada centrifugação do material (1 minuto, 200 g), retirado o sobrenadante e, às células precipitadas, foi acrescentada 1 mg/mL de tripsina, seguida da incubação, por 15 minutos, a 37°C. Em seguida, foi realizada nova centrifugação, conforme descrito anteriormente, retirado o sobrenadante e acrescentado inibidor de tripsina (Inibidor de tripsina-soybean, Tipo I-S, Sigma-Aldrich, EUA, 1,5 mg/mL diluído em solução EBSS). Os DRGs foram então dissociados manualmente com pipeta Pasteur em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Invitrogen, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado, 2 mM de glutamina, 50 U/mL de penicilina e 50 mg/mL de streptomina. As células foram cultivadas em placas cobertas com poliornitina (20 µg/mL) e laminina (5 µg/mL) e mantidas em atmosfera de 5% CO₂ (37°C), com D-MEM, por 48 horas.

Para avaliar se a sensibilização com PGE₂, interfere com a atividade de receptores opióides, as células foram tratadas com 1 µM de PGE₂ por 15 minutos. Células controles foram incubadas com o diluente da PGE₂. Posteriormente aos períodos de incubação com PGE₂, as células foram incubadas também com os agonistas, a crotalina ou salina por 15 minutos, para avaliar a sensibilização interfere com o efeito dos agonistas sobre a ativação dos receptores opióides. Após este período, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído 3,7% em PBS, bloqueadas em solução contendo 1% de BSA e 5% de sacarose e incubadas *overnight* a 4 °C com os anticorpos anti-µ,- δ ou- κ de conformação específica ativada, na diluição de 1:1000 (GUPTA et al., 2007) (Proteimax Biotecnologia Ltda, Brasil). Os poços foram então lavados 3 vezes com PBS. A incubação com o anticorpo secundário e a determinação da absorbância foi realizada conforme descrito anteriormente.

3.10 Dosagem das concentrações de GMP cíclico intracelular

O GMPc foi quantificado por ensaio imunoenzimático, em células obtidas do DRG de animais *naive*, utilizando um kit para ensaio imunoenzimático (GE Healthcare, Reino Unido). A cultura de células do DRG foi realizada conforme

descrito anteriormente (item 3.9.2). As células (1×10^6 células/poço) foram incubadas com crotalina (0,1; 1 ou 10 μM) ou U 50,488 (0,1; 1 ou 10 μM), por 15 minutos. Para avaliar o efeito da sensibilização por prostaglandina E_2 (PGE_2), as células foram incubadas por 15 minutos, com PGE_2 (1 μM) e 15 minutos após, células controle foram incubadas veículo. Para avaliar a participação de receptores opióides do tipo κ no efeito da crotalina e do agonista deste receptor (U 50,488), as células foram pré-incubadas com Nor-BNI (antagonista de receptor opióide do tipo κ , Sigma-Aldrich, EUA, (0,1; 1 ou 10 μM)), por 30 minutos.

Após os tratamentos, o meio de cultura foi aspirado, sendo então adicionados 200 μL de tampão de lise (composição não fornecida pelo fabricante, GE Healthcare, Reino Unido), por 10 minutos, sob agitação. Após a lise das células, foi realizado ensaio seguindo as instruções do fabricante. O ensaio consistiu na preparação de uma curva padrão de GMPc variando de 1 a 512 fmol/poço. As amostras foram colocadas em uma placa sensibilizada com anticorpos anti-GMPc. O princípio do método baseia-se na competição entre o GMPc não marcado (amostra) e uma quantidade fixa de GMPc conjugado à peroxidase, para a ligação ao anticorpo presente na placa. A detecção do sinal foi realizada pela determinação da absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 630 nm.

3.11 Determinação da fosforilação da Akt, ERK1/2 e JNK pela crotalina ou U 50,488 (agonista de receptor opióide do tipo κ)

O possível efeito da crotalina e do U 50, 488 sobre a fosforilação das quinases ERK1/2, JNK e Akt foi avaliada, na ausência ou vigência de sensibilização por PGE_2 , por western blotting.

Para tanto, foi realizada cultura de células obtidas do DRG, obtidas de animais *naive*, conforme descrito anteriormente (item 3.7). Foram cultivadas 4×10^5 células em placas de 60 mm. Para este ensaio, foi realizado um *pool* de células obtido de 4 a 5 ratos. As células foram pré-incubadas com veículo ou PGE_2 (1 μM), adicionadas ao meio de cultura, por 15 minutos e, então, incubadas com crotalina (1 μM), U 50,488 ou salina por 15 minutos.

Para a extração de proteína, as placas foram mantidas em gelo e as células coletadas com o auxílio de uma espátula de polietileno. As células foram então

lisadas por sonicação e a extração de proteína das amostras foi realizada conforme descrito anteriormente (*item 3.7*). A expressão protéica foi avaliada por *Western Blotting*, utilizando-se os anticorpos anti- fosfo-Akt, fosfo-ERK, fosfo-JNK (na concentração de 1:1000 Cell Signaling, EUA), *overnight*, a 4°C . A quantidade de proteína de cada amostra foi normalizada pela incubação da membrana com anticorpo anti-GAPDH (1:10.000) (Santa Cruz Biotechnology, EUA), conforme descrito no *item 3.7*.

3.12 Avaliação da participação da PKC ζ sobre a ativação de MAPKs induzida pela crotalina

Para investigar se a PKC ζ está envolvida na ativação de MAPKs pela crotalina, utilizamos um peptídeo inibidor desta quinase (PKC ζ pseudosubstrato), que foi adicionado à cultura de células do DRG, obtida conforme descrito anteriormente (*item 3.8.2*). Este peptídeo foi desenvolvido pelo grupo da Dra. Daria Mochly-Rosen, Universidade de Stanford, EUA. A PKC ζ pseudosubstrato é conjugada a uma seqüência de peptídeos carreadores (TAT), que facilita a biodistribuição do peptídeo subcelularmente (BEGLEY et al., 2004). A ligação entre a TAT e o peptídeo inibidor da isoforma PKC ζ ocorre por pontes dissulfeto. Uma vez que o meio intracelular é redutor, após o complexo TAT-peptídeo penetrar na célula, a ligação entre a TAT e o peptídeo é clivada, liberando o peptídeo para o meio intracelular, havendo então a eliminação da TAT. Como controle, foi utilizada apenas a TAT.

As células foram pré-incubadas com o peptídeo inibidor desta quinase (PKC ζ pseudosubstrato), na concentração de 1 μ M ou TAT (1 μ M, controle) por 15 minutos, posteriormente incubadas com veículo ou PGE₂ (1 μ M), por 15 minutos e após este período, as células foram incubadas com crotalina (1 μ M) ou veículo, por 15 minutos. Nesta última incubação, os grupos previamente tratados com o peptídeo receberam novamente 1 μ M de inibidor ou TAT (grupo controle).

3.13 Avaliação do efeito da crotalina sobre o influxo de cálcio induzido pela capsaicina e prostaglandina E₂

A avaliação do efeito da crotalina sobre a concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) foi determinada em células do DRG utilizando a sonda fura 2-AM. As células foram cultivadas conforme descrito anteriormente (*item 3.8.2*), em lamínulas de vidro e incubadas com 1 μ M de fura -2 à 37°C, por 30 min, em câmara de CO₂. Após a incubação, a lamínula contendo as células foi transferida para uma câmara. Esta câmara foi fechada e, em seguida, foi adicionada solução Tyrode contendo 2 mM de CaCl₂, 129 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 30 mM de glicose e 25 mM de Hepes. Para a quantificação do cálcio, foram escolhidos 5 campos diferentes, contendo 5 células cada, para posterior análise em microscópio de fluorescência, (Nikon Eclipse TE2000-U). As medidas de fluorescência que refletem as elevações de cálcio intracelular, foram conduzidas a 340 e 380 nm de excitação e 510 nm de emissão, utilizando-se o programa Open Lab software (Improvision, EUA). Para a avaliação do efeito da crotalina sobre o influxo de cálcio, as células foram pré-incubadas com crotalina ou veículo por 15 minutos (tempo padronizado em ensaios anteriores) e então com capsaicina (200 nM) ou PGE₂ (10 μ M). Foram realizadas imagens seqüenciais para posterior análise pelo programa Open Lab.

3.14 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via associada ao teste de Tukey (SNEDECOR et al., 1946), ou de duas vias, seguida por Bonferroni. O índice de significância foi de $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Estudos *in vivo* de avaliação da sensibilidade nociceptiva

Na primeira etapa deste estudo avaliamos se a sensibilização prévia (aguda ou crônica) é capaz de alterar a magnitude do efeito antinociceptivo de fármacos opióides, administrados em doses que apresentam apenas efeito local. Nestes estudos, utilizamos um estímulo nociceptivo mecânico (teste de pressão de patas), na vigência ou ausência de sensibilização por prostaglandina E₂ (PGE₂) ou constrição crônica do nervo isquiático (CCI).

4.1.1 Efeito antinociceptivo do DAMGO, DPDPE e U-50488, agonistas seletivos de receptores opióides do tipo μ , δ e δ , respectivamente, na presença ou ausência de sensibilização por Prostaglandina E2 (PGE2)

A administração intraplantar de DAMGO, DPDPE ou U-50488, não alterou o limiar nociceptivo dos animais *naive*, avaliados 1 hora após os tratamentos, quando comparados com a medida inicial (Figs. 5A, 5B e 5C). O efeito destes agonistas foi também investigado na vigência de hipernocicepção induzida pela PGE₂. Nestes experimentos, a PGE₂ foi injetada em ambas as patas posteriores. Animais tratados com PGE₂ apresentaram, em ambas as patas posteriores dos animais. A administração intraplantar bilateral de PGE₂ acarretou, em ambas as patas, diminuição significativa (aproximadamente 44%) (Fig. 6 A) do limiar nociceptivo, quando comparado à medida inicial. Para a avaliação do efeito dos agonistas opióides, neste modelo de hipernocicepção, foi inicialmente realizada uma curva dose-resposta e então escolhida a dose para os estudos subsequentes. Como parâmetro, foi escolhida a dose que acarretou maior efeito antinociceptivo local sobre a hipernocicepção induzida pela PGE₂. Após a escolha da dose, realizamos a padronização do tempo de administração dos agonistas. Os agonistas foram administrados duas ou uma hora antes da PGE₂ ou concomitantemente à PGE₂, ou ainda uma ou duas horas após este agente hiperalgésico. Os resultados apresentados nas Figs. 6 e 7 correspondem à administração dos agonistas 2 horas após a PGE₂, uma vez que, dependendo do agonista, não foi detectada diferença significativa entre os demais parâmetros ou então, este foi o tempo em que foi observado maior efeito antinociceptivo.

A injeção de DAMGO (5 $\mu\text{g/pata}$), DPDPE (20 $\mu\text{g/pata}$), ou U-50488 (10 $\mu\text{g/pata}$), 2 horas após a PGE_2 , além de bloquear o efeito hipernociceptivo, promoveu aumento significativo do limiar nociceptivo dos animais, em relação à medida inicial (Figs. 6B, 6C, 6D).

As doses utilizadas apresentaram apenas efeito local, uma vez que não foi detectada alteração no efeito hiperalgésico induzido pela administração de PGE_2 na pata contralateral (Fig. 6E).

Esses dados indicam que a sensibilização induzida pela PGE_2 é importante para a expressão do efeito antinociceptivo local de agonistas de receptores opióides.

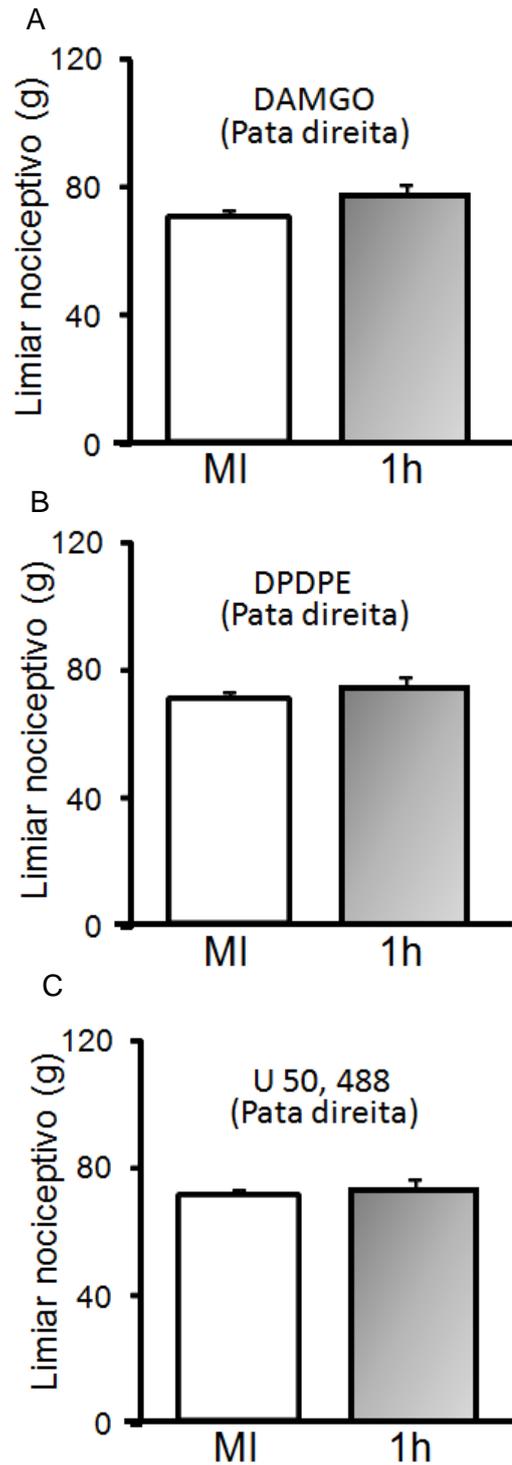


Figura 5 - Efeito do DAMGO (A), DPDPE (B) ou U 50,488 (C) sobre o limiar nociceptivo dos animais. O limiar nociceptivo, expresso em gramas, foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos, aplicado antes (MI) e 1 hora após a administração dos agonistas (pata direita). **(A)** Animais tratados com DAMGO (5 µg/pata), **(B)**: Animais tratados com DPDPE (20 µg/pata), **(C)** Animais tratados com U 50,488 (10 µg/pata). Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo.

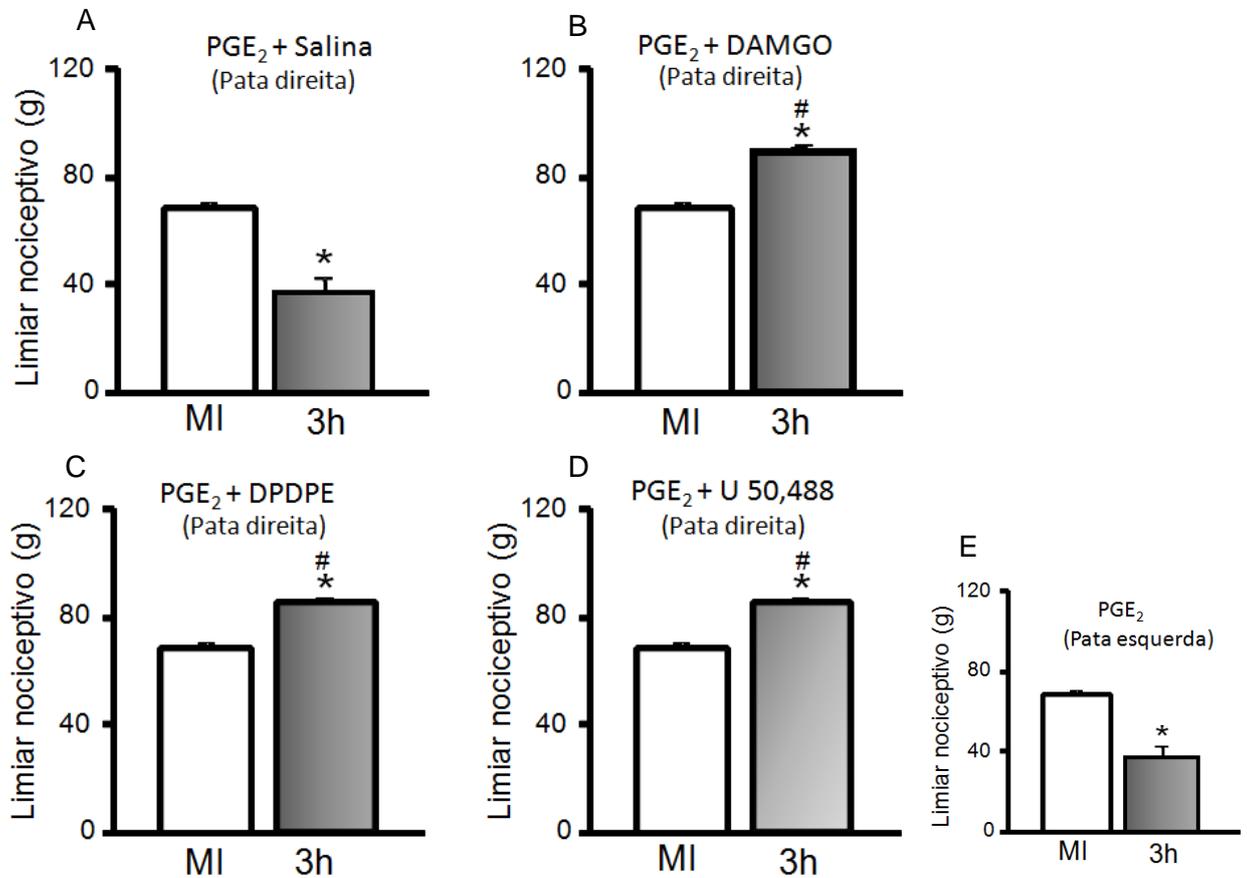


Figura 6 - Efeito do DAMGO, DPDPE ou U 50,488 sobre o limiar nociceptivo, na presença de sensibilização por prostaglandina E₂ (PGE₂). O limiar nociceptivo, expresso em gramas, foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e foi determinado antes (MI) e 3 horas após a injeção da PGE₂ (100 ng/pata). A PGE₂ foi administrada nas duas patas (direita e esquerda). **(A)** animais tratados com PGE₂ + salina (pata direita), **(B)** animais tratados com PGE₂ + DAMGO (pata direita, 5 µg/pata) **(C)** animais tratados com PGE₂ + DPDPE (pata direita, 20 µg/pata) **(D)** animais tratados com PGE₂ + U 50,488 (pata direita, 10 µg/pata). Os agonistas de receptores opióides foram administrados 2 horas após a PGE₂. **(E)** efeito da PGE₂ injetada na pata contralateral (esquerda) à administração do DAMGO, mostrando que a administração intraplantar do agonista opióide não alteraria a hipernocicepção induzida pelos PGE₂. Resultados semelhantes foram observados nos animais tratados com os outros agonistas (dados não mostrados). Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a MI, # p < 0,05 por comparação com PGE₂ + Salina (Painel A) ou PGE₂ (pata esquerda).

4.1.2 Efeito dos antagonistas seletivos de receptores opióides sobre a antinocicepção causada pelos respectivos agonistas no modelo de hipernocicepção induzida por prostaglandina E_2 (PGE_2)

Com o intuito de confirmar que o efeito antinociceptivo local dos agonistas opióides, observado no modelo de hipernocicepção induzida por PGE_2 , é dependente da atuação destes agonistas em seus respectivos receptores, utilizamos antagonistas seletivos para cada tipo de receptor opióide. O DAMGO, o DPDPE ou o U 50,488 administrados 120 minutos após a PGE_2 e seus antagonistas (CTOP, ICI-174,864 e Nor-BNI respectivamente), 15 minutos antes da avaliação da sensibilidade nociceptiva (165 minutos após a PGE_2). O teste de pressão de patas foi aplicado antes e 180 minutos após a administração da PGE_2 .

A administração de DAMGO, DPDPE e U 50,488 inibiu a hipernocicepção acarretada pela PGE_2 , bem como causou aumento do limiar nociceptivo, quando comparado à medida inicial (Figs. 7 A, B e C). O tratamento com CTOP, ICI-174, 864 ou Nor-BNI bloqueou, respectivamente, o efeito antinociceptivo do DAMGO, DPDPE e U 50,488, (Figs. 7 A, B e C).

Dados anteriores obtidos pelo nosso grupo demonstram que os antagonistas *per se*, nestas doses, não interferem com o limiar nociceptivo basal dos animais ou a hipernocicepção acarretada pela PGE_2 (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000).

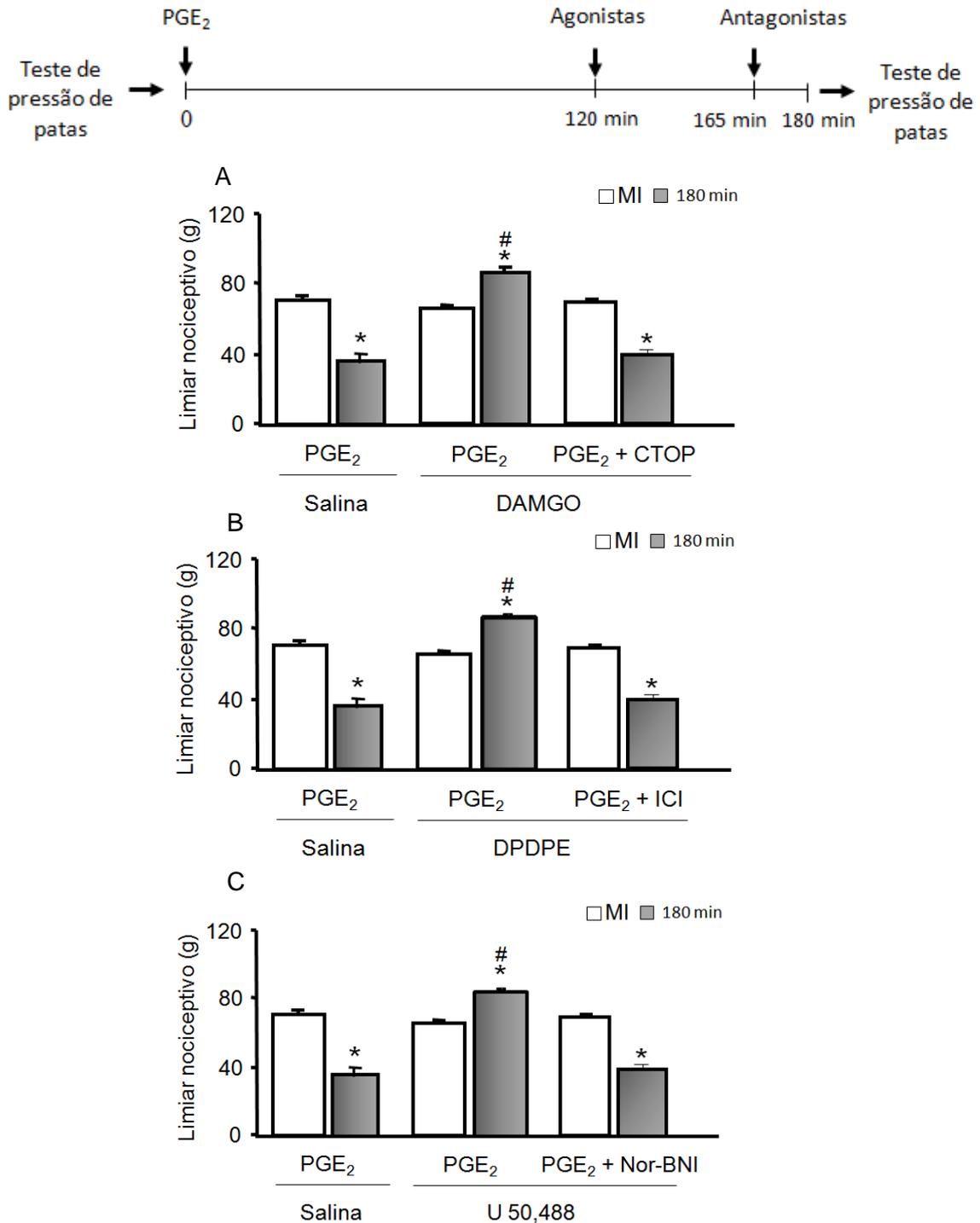


Figura 7 - Efeito do CTOP, ICI-174864 e Nor-BNI na antinociceção local induzida pelo DAMGO, DPDPE ou U50,488, respectivamente. O limiar nociceptivo, expresso em gramas foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos. Os agonistas foram injetados 120 min após a prostaglandina E₂ (PGE₂, 100 ng/pata) e os antagonistas, 165 min após a PGE₂ e o limiar nociceptivo avaliado antes (MI) e 180 min após a injeção intraplantar da PGE₂. A: Animais foram tratados com DAMGO (5 µg/pata) ou DAMGO + CTOP (20 µg/pata); B: DPDPE (20 µg/pata) ou DPDPE + ICI (10 µg/pata); C: U50, 488 (10µg/pata) ou U50,488 + Nor-BNI (50 µg/pata). Em todos os experimentos, salina foi utilizada como controle, nas mesmas condições experimentais. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a MI ou # p < 0,05 por comparação com o grupo PGE₂ + salina.

4.1.3 Efeito antinociceptivo da crotalfina na presença ou ausência de sensibilização por Prostaglandina E₂ (PGE₂)

Para a avaliação do efeito do CRF sobre o limiar nociceptivo dos animais, foi realizada inicialmente uma curva dose resposta para o peptídeo, em animais não sensibilizados com PGE₂. Os resultados mostram que as doses de 0,003 ou 0,015 µg/pata promoveram aumento do limiar nociceptivo (28% e 33%, respectivamente), quando comparado à medida inicial (Fig. 8). Contudo, animais tratados com CRF na dose de 0,0006 µg/pata, não apresentaram alteração significativa no limiar nociceptivo em relação à medida inicial (Fig. 8).

O efeito dessas mesmas doses foi avaliado no modelo de hipernocicepção induzida por PGE₂. Com o intuito de definir uma dose de crotalfina (CRF) que acarretasse antinocicepção apenas local, a PGE₂ foi injetada em ambas as patas posteriores, enquanto o CRF em apenas uma das patas. Os resultados apresentados na Figura 9 A mostram que a PGE₂ promoveu diminuição do limiar nociceptivo dos animais (46%), caracterizando o fenômeno de hipernocicepção. As doses de 0,003 ou 0,015 µg/pata de CRF, injetadas apenas em uma das patas posteriores (pata direita), reverteram a hipernocicepção induzida pela PGE₂ em ambas as patas. Ainda, nas patas tratadas com PGE₂ e crotalfina, essas doses do peptídeo acarretaram também aumento no limiar nociceptivo (55% e 70%, respectivamente), em relação à medida basal (Figs. 9 B e C). A figura 9 D mostra que a dose de 0,0006 µg/pata de CRF bloqueou a hipernocicepção induzida pela PGE₂, na pata ipsi-lateral, e também aumentou o limiar nociceptivo desta pata quando comparado com a medida inicial. Por outro lado, esta dose de CRF não interferiu com o efeito hipernociceptivo da PGE₂ na pata contralateral. Estes resultados indicam que o CRF, na dose de 0,0006 µg/pata, induz apenas efeito local e que a presença de sensibilização é importante para a maior expressão do efeito antinociceptivo local da crotalfina.

Baseado nestes resultados, a dose de 0,0006 µg/pata de CRF foi utilizada nos demais protocolos experimentais.

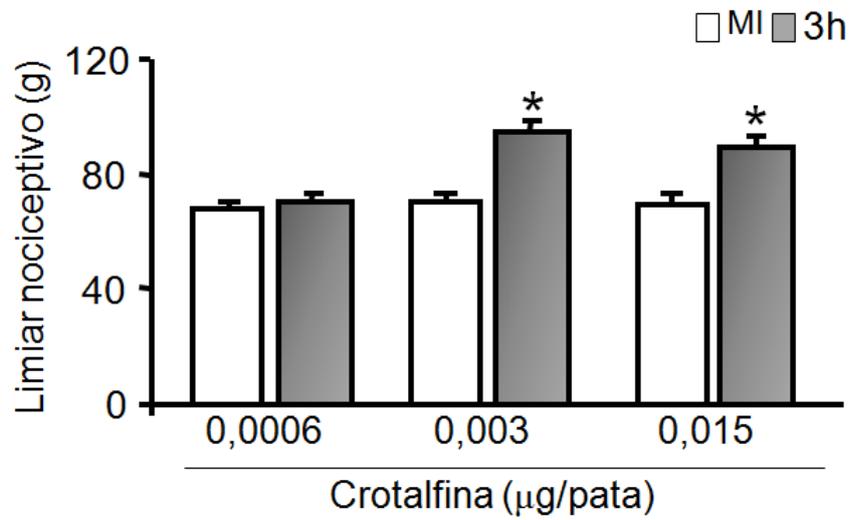


Figura 8- Efeito da crotalina (CRF) sobre o limiar nociceptivo de animais *naive*. O limiar nociceptivo, expresso em gramas, foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e foi determinado antes (MI) e 3 horas após a injeção do CRF, pela via intraplantar (pata direita). Os resultados representam a média \pm epm de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a MI.

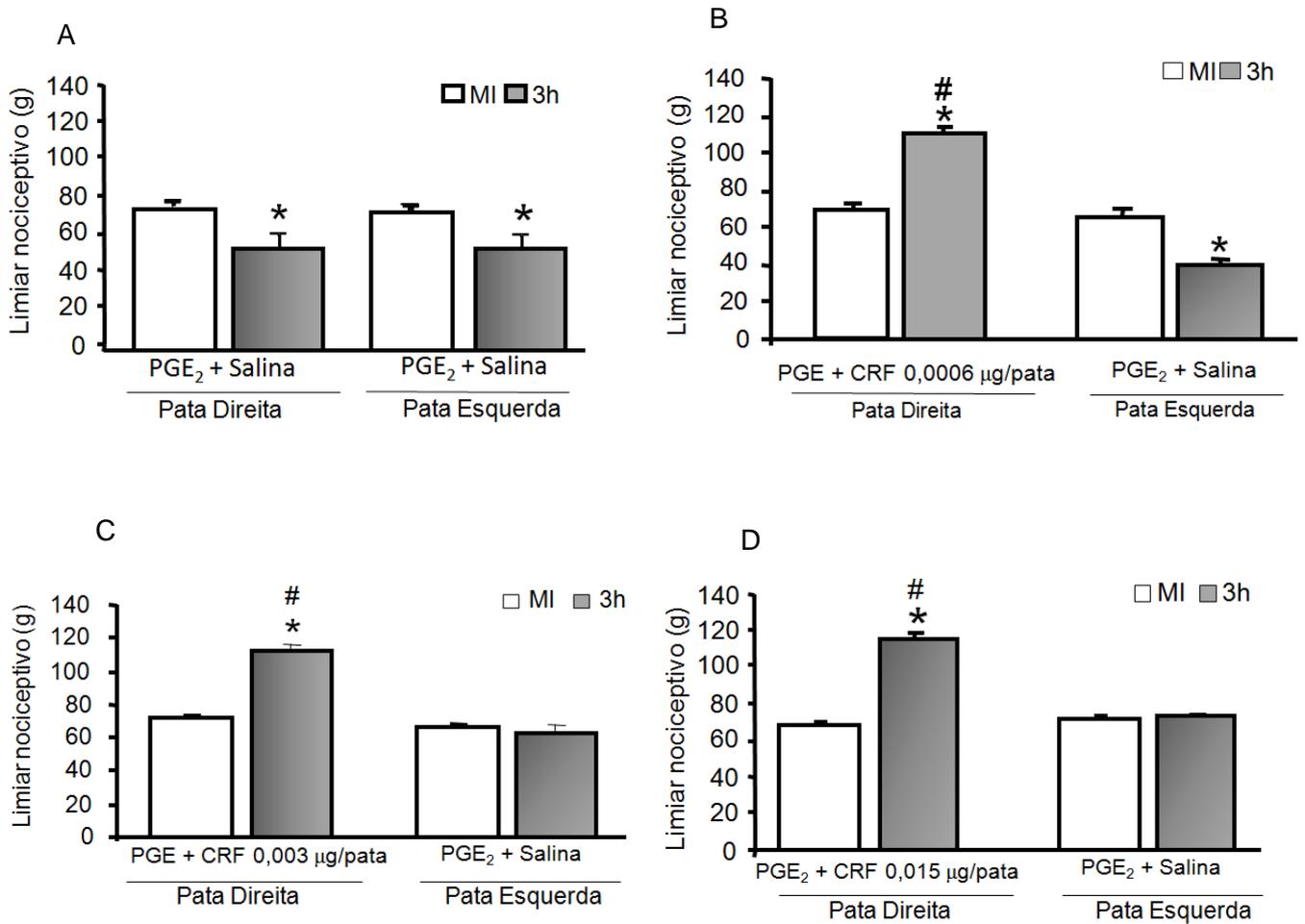


Figura 9- Efeito antinociceptivo da crotafina (CRF) na presença de sensibilização por Prostaglandina E₂ (PGE₂). O limiar nociceptivo, expresso em gramas, foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e foi determinado antes (MI) e 3 horas após a injeção da PGE₂ (100 ng/pata) na pata esquerda e pata direita. **(A)** animais tratados com PGE₂ e salina em ambas as patas. Painéis B a D: Animais tratados com PGE₂ em ambas as patas e CRF na pata direita, nas doses de **(B)** 0,0006 μg/pata, **(C)** 0,003 μg/pata e **(D)** 0,015 μg/pata, concomitantemente à PGE₂. Em todos os experimentos salina foi utilizada como controle, nas mesmas condições experimentais. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a MI ou # p < 0,05 por comparação com o grupo PGE₂ + salina.

4.1.4 Curva tempo-resposta do efeito antinociceptivo local da crotalina

Baseado em dados obtidos por nosso grupo, mostrando que o CRF, administrado pela via oral, induz antinocicepção prolongada (5 dias), no modelo de hipernocicepção induzida pela PGE₂ (GUTIERREZ et al., 2008), foi nosso objetivo avaliar a duração do efeito do CRF, administrado pela via intraplantar, na dose em que é observado apenas efeito local.

Para tanto, os animais foram tratados por via i.pl., com o CRF (0,0006 µg/pata) ou salina (controles), e avaliados 3, 72, 120 e 144 h após. Neste ensaio a PGE₂ foi administrada por via intraplantar, sempre 3 horas antes da avaliação da sensibilidade nociceptiva (medida final). Para cada tempo avaliado, foi utilizado um grupo diferente de animais. A figura 10 mostra que o efeito antinociceptivo local do CRF é detectado por até 120 horas após a administração de uma única dose do peptídeo. Além de bloquear a hipernocicepção, o CRF aumentou o limiar nociceptivo dos animais em relação à medida inicial (54%, 32% e 39%, na 3^a, 72^a e 120^a hora, respectivamente).

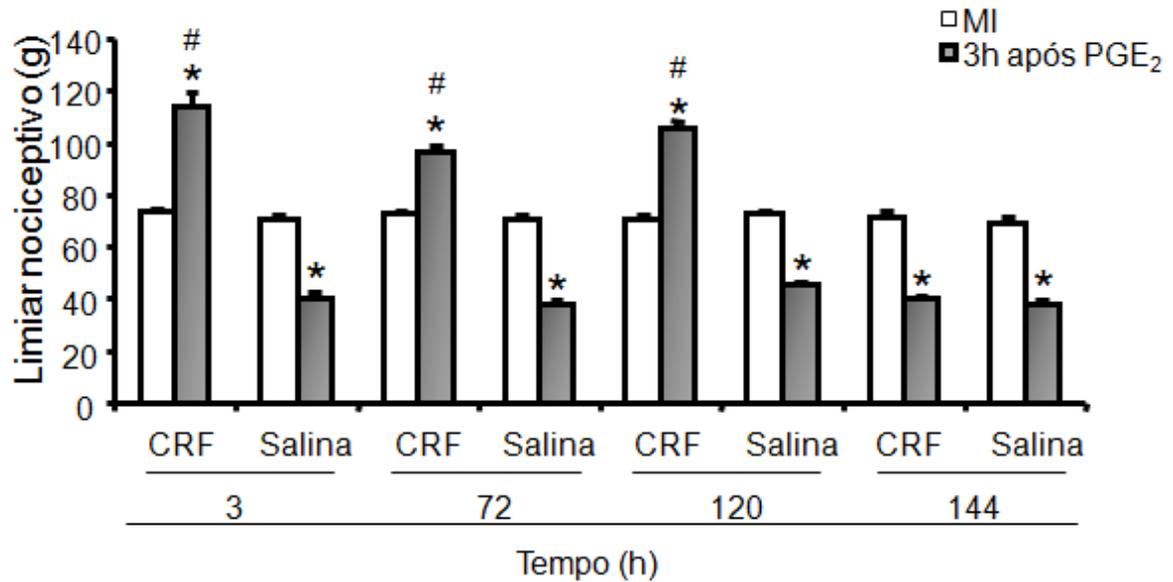


Figura 10 - Curva tempo resposta do efeito antinociceptivo local da crotalina (CRF). O limiar nociceptivo, expresso em gramas foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e foi determinado antes (MI) e 3, 72, 120 e 144 h (medida final) após o tratamento com o CRF (0,0006 μ g/pata) ou salina (grupo controle). PGE₂ (100 ng/pata), utilizada como agente hipernociceptivo foi injetada por via intraplantar, 3 horas antes da medida final. * $p < 0,05$ por comparação com a MI e # $p < 0,05$ por comparação com o grupo salina (controle).

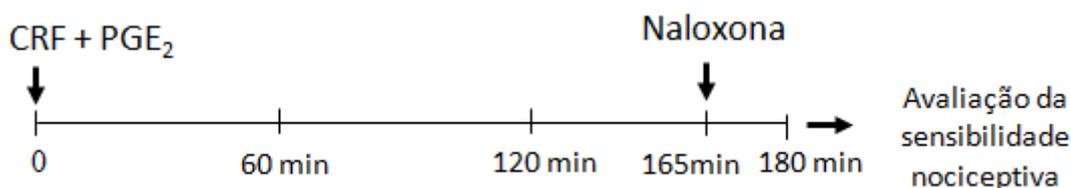
4.1.5 Avaliação da participação de receptores opióides no efeito antinociceptivo local da crotalina no modelo de hipernocicepção induzida por Prostaglandina E₂ (PGE₂)

Dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo, mostraram que o efeito antinociceptivo da crotalina, administrada pela via oral, é mediado pela ativação de receptores opióides. Baseado nestes dados, investigamos o envolvimento destes receptores no efeito local deste peptídeo.

4.1.5.1 Efeito da naloxona

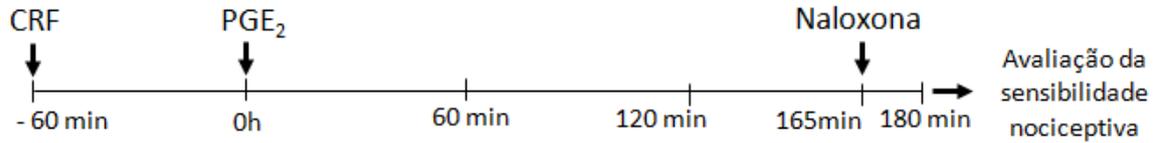
Inicialmente, utilizamos a naloxona, antagonista não seletivo de receptores opióides. Foram utilizados dois protocolos experimentais. No primeiro protocolo, a naloxona foi administrada 165 minutos após o tratamento com o CRF. Neste estudo, a PGE₂ foi administrada concomitantemente ao CRF.

Esquema experimental:



Os dados apresentados na Figura 11 A mostram que o CRF reverteu a hipernocicepção induzida pela PGE₂ e que a naloxona, administrada 165 minutos após o CRF e PGE₂, bloqueou o efeito antinociceptivo local induzido pelo peptídeo.

No segundo protocolo, o CRF foi administrado 60 minutos antes da PGE₂. A naloxona foi administrada 165 minutos após a PGE₂, o que corresponde a 225 minutos após o CRF.

Esquema experimental:

Os dados apresentados na Figura 11 B mostram que o CRF reverteu a hipernocicepção induzida pela PGE₂. Contudo, a naloxona, administrada 225 min após o CRF, não interferiu com o efeito antinociceptivo local induzido pelo CRF.

Cabe ressaltar que dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo mostram que a naloxona, nesta dose, não interfere, *per se*, com o efeito da PGE₂ (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; PICOLO, 2002).

4.1.5.2 Efeito do CTOP, ICI 174, 864 e Nor- BNI na antinocicepção induzida pela crotalina no modelo da hipernocicepção induzida pela prostaglandina E₂ (PGE₂)

Os antagonistas seletivos para receptores opióides foram injetados concomitantemente ou 165 minutos após a injeção de PGE₂. O CRF foi sempre administrado concomitantemente à PGE₂. A hipernocicepção foi avaliada 180 minutos após a PGE₂. O desenho experimental está esquematizado nas figuras 12 A e 13 A.

O CTOP, antagonista seletivo de receptor opióide do tipo μ , ou o ICI 174, 864, antagonista seletivo de receptores opióides do δ , não interferiram com o efeito antinociceptivo induzido pelo CRF, em nenhum dos protocolos experimentais (Figs. 12 B, 12 C, 13 B e 13 C). Por outro lado, o Nor-BNI, antagonista seletivo de receptor opióide do tipo κ , administrado concomitantemente com a PGE₂, bloqueou o efeito do CRF (Fig. 12 D). Porém, quando administrado 165 minutos após a administração do CRF e PGE₂, este antagonista não interferiu com o efeito antinociceptivo do CRF (Fig. 13 D).

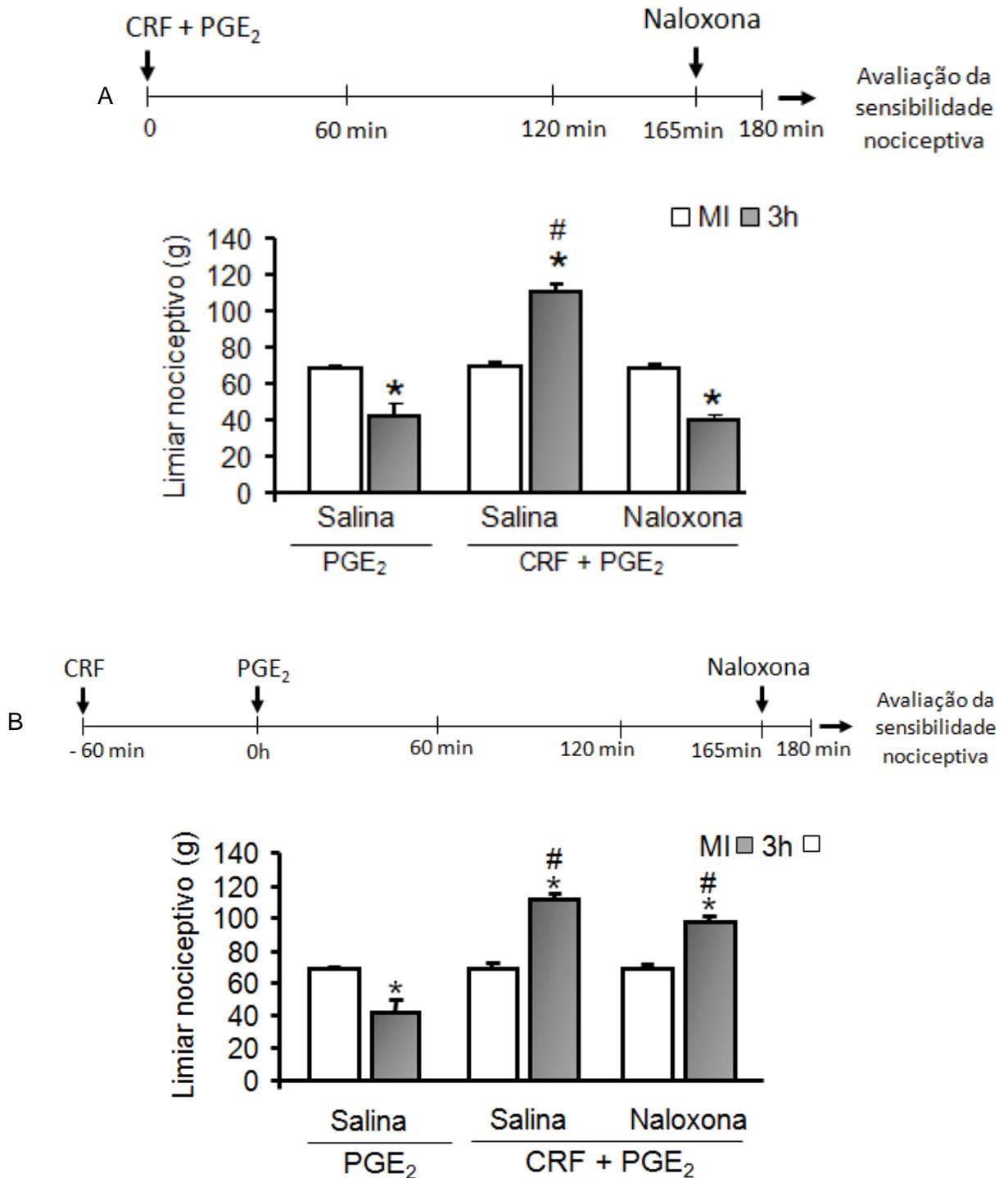


Figura 11 - Efeito da naloxona na antinociceção local acarretada pela crotalina (CRF) no modelo de hipernociceção induzida por PGE₂. O limiar nociceptivo, expresso em gramas foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e foi determinado antes (MI) e 180 minutos após a injeção intraplantar da PGE₂ (100 ng/pata). Animais foram tratados com CRF (0,0006 µg/pata) ou salina concomitantemente (A) ou 60 minutos antes da PGE₂ (B). Naloxona, 1 µg/pata, foi injetada 165 minutos após a PGE₂. Em todos os experimentos, salina foi utilizada como controle, nas mesmas condições experimentais. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a MI ou # p < 0,05 por comparação com o grupo PGE₂ + salina.

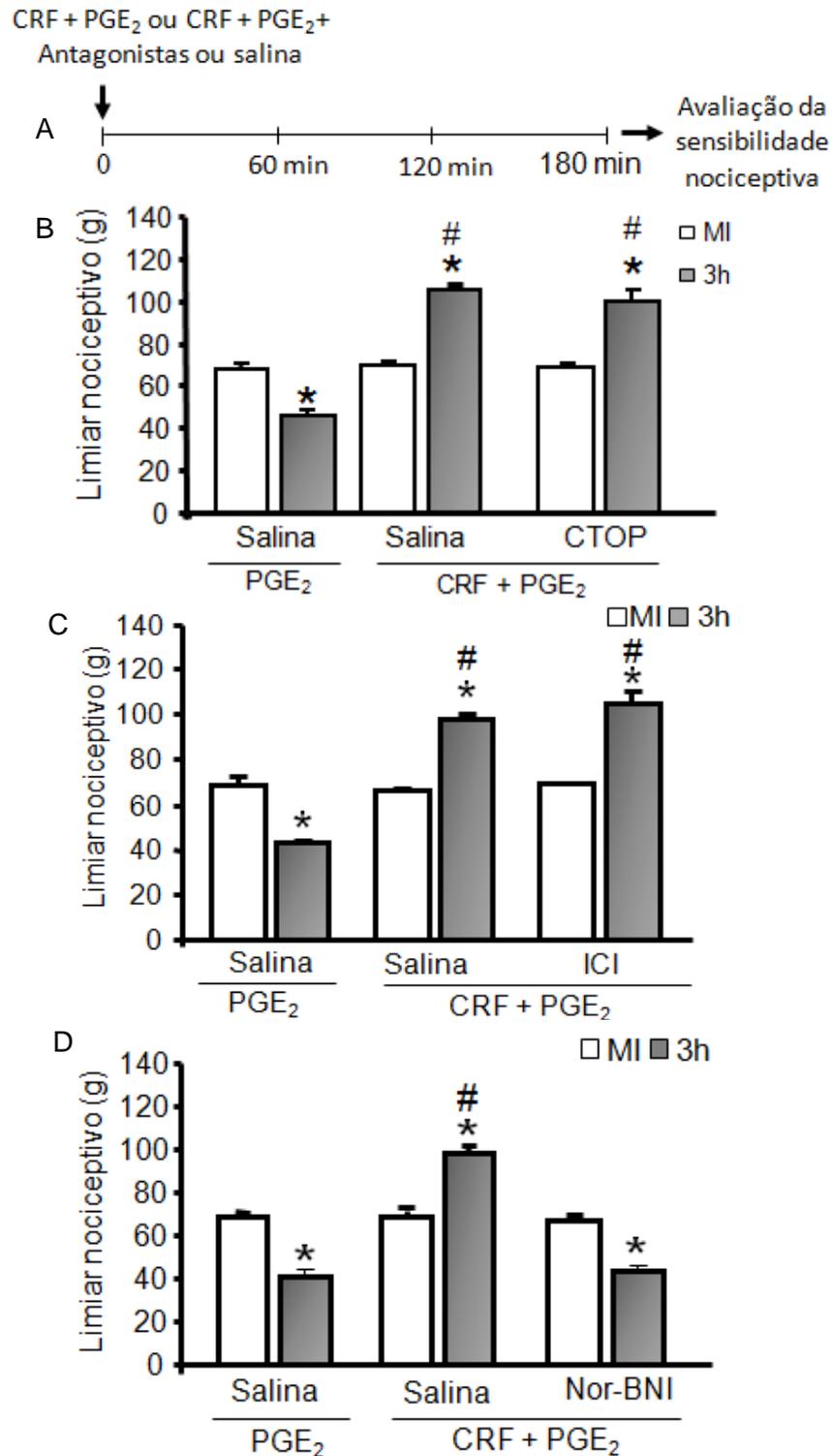


Figura 12- Efeito do CTOP, ICI 174,864 e Nor-BNI na antinociceção local acarretada pela crotalina (CRF) no modelo de hipernociceção induzida por PGE₂ – administração concomitante ao CRF. O limiar nociceptivo, expresso em gramas foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e foi determinado antes (MI) e 180 minutos após a injeção intraplantar da PGE₂ (100 ng/pata). Animais foram tratados com CRF (0,0006 µg/pata) ou salina (controle) imediatamente antes da PGE₂ (A). CTOP, 20 µg/pata (B), ICI 10 µg/pata (C) ou Nor-BNI 50µg/pata (D) foram injetados imediatamente após a PGE₂. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a MI ou # p < 0,05 por comparação com o grupo PGE₂ + salina.

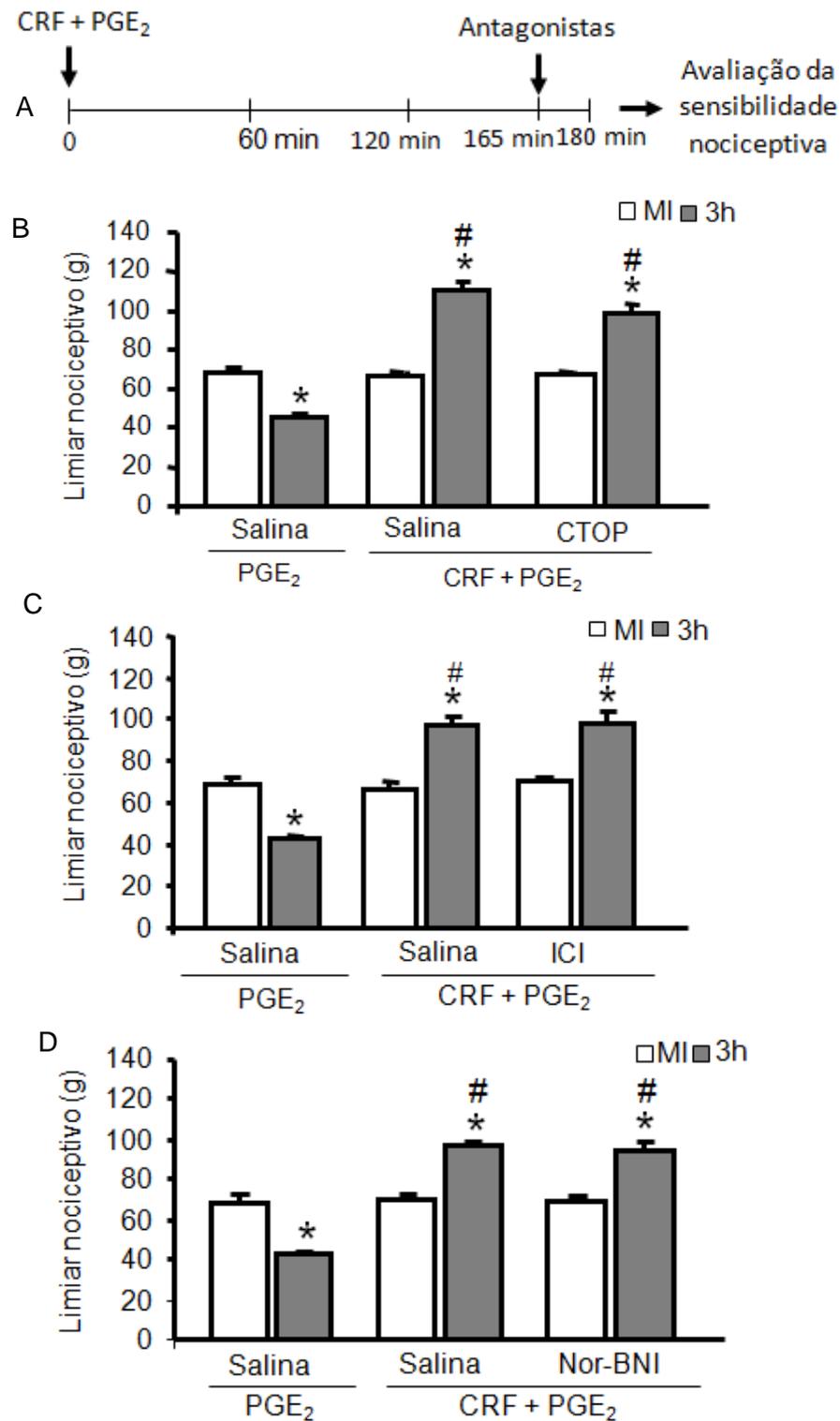


Figura 13 - Efeito do CTOP, ICI 174, 864 e Nor- BNI na antinociceção local acarretada pela crotalina (CRF) no modelo de hipernociceção induzida por PGE₂ – administração posterior ao CRF. O limiar nociceptivo, expresso em gramas foi avaliado pelo teste de pressão da pata de ratos e foi determinado antes (MI) e 180 minutos após a injeção intraplantar da PGE₂ (100 ng/pata). Animais foram tratados com CRF (0,0006 µg/pata) ou salina imediatamente antes da PGE₂. CTOP, 20 µg/pata (B), ICI 10 µg/pata (C) ou Nor-BNI 50 µg/pata (C) foram injetados 165 minutos após CRF e PGE₂. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. * p < 0,05 por comparação com a MI ou # p < 0,05 por comparação com o grupo PGE₂ + salina.

4.1.6 Efeito antinociceptivo local do DAMGO, DPDPE e U-50,488, agonistas de receptor opióide do tipo μ , δ e κ , respectivamente, na vigência de dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI)

4.1.6.1 Efeito do DAMGO

A ligadura do nervo isquiático acarretou diminuição do limiar nociceptivo dos animais, em relação à medida inicial, caracterizando o fenômeno de hipernocicepção (Fig. 14 A). Este fenômeno foi avaliado no 14^o dia do pós-operatório. A constrição do nervo isquiático provocou também diminuição na intensidade do estímulo tátil necessário para induzir a resposta de retirada da pata, quando comparado com a medida inicial (Fig. 14 B), caracterizando o fenômeno de alodinia. Animais falso-operados (FO) foram constituídos por animais submetidos à cirurgia e que tiveram o nervo isquiático manipulado, mas não amarrado. Este grupo não apresentou alterações significativas no limiar nociceptivo ou no limiar de resposta ao estímulo tátil (Fig. 14), quando comparado à medida inicial obtida antes da cirurgia.

A administração de DAMGO na dose de 5 μ g/pata inibiu parcialmente a hipernocicepção induzida pela CCI, 1 e 3 horas após sua administração (76% e 93%, respectivamente) (Fig. 15 A). Este tratamento, nestes mesmos períodos, inibiu parcialmente a alodinia (Fig. 15 B). A administração do DAMGO, na dose de 15 μ g/pata, bloqueou, 1, 3 e 5 h após o tratamento, a hipernocicepção e alodinia (Fig 15 A e B, respectivamente) causadas pela CCI. Por outro lado, a administração de salina não interferiu com os fenômenos de hipernocicepção e alodinia causados pela CCI.

Animais falso operados, tratados com DAMGO, não apresentaram alteração significativa no limiar nociceptivo em relação à medida inicial (Fig. 15 A e 15 B).

Baseados nos resultados observados para a dose de 15 μ g/pata, realizamos experimento controle em que a dose de DAMGO foi avaliada no modelo de hipernocicepção induzida pela PGE₂. Os resultados mostraram que o DAMGO, nesta dose, bloqueia a hipernocicepção apenas na pata em que foi injetado (dados não mostrados), indicando que nesta dose, o DAMGO apresenta apenas efeito local.

4.1.6.2 Efeito do DPDPE

Os resultados apresentados na figura 16A mostram que o DPDPE na pata, 20 $\mu\text{g/pata}$, inibiu parcialmente (30% e 36%, 1 e 3 h, respectivamente) a hipernocicepção causada pela CCI (Fig. 16 A). Este agonista também inibiu parcialmente (33 e 61%, 1 e 3 h, respectivamente) a alodinia induzida pela CCI (Fig. 16 B). A administração de DPDPE, na dose de 60 $\mu\text{g/pata}$, bloqueou, 1, 3 e 5 h após o tratamento, a hipernocicepção e alodinia (Fig 16 A e B, respectivamente) causadas pela CCI. Por outro lado, animais submetidos à CCI e tratados com salina (controles) apresentaram hipernocicepção e alodinia (Fig. 16 A e 16 B). Animais falso operados e tratados com DPDPE não apresentaram alteração significativa no limiar nociceptivo em relação à medida inicial (Fig. 16 A).

Baseado nos resultados observados para a dose de 60 $\mu\text{g/pata}$, realizamos experimento controle adicional. Nesse experimento, utilizamos o modelo da hipernocicepção induzida pela PGE_2 , utilizando esta dose de DPDPE. Os resultados mostraram que o DPDPE, nesta dose, bloqueia a hipernocicepção apenas na pata em que foi injetado (dados não mostrados), indicando que nesta dose, o DPDPE apresenta apenas efeito local.

4.1.6.3 Efeito do U- 50,488

O agonista de receptor κ opióide, na dose de 10 $\mu\text{g/pata}$, inibiu parcialmente a hipernocicepção (39 e 52%, 1 e 3 h respectivamente) (Fig. 17 A) e alodínia (59 e 61%, 1 e 3h, respectivamente) (Fig. 17 B) induzidas pela CCI. Por outro lado, a dose de 30 $\mu\text{g/pata}$ não interferiu com a hipernocicepção e alodinia dos animais submetidos à CCI. É importante salientar que para esta dose, foi detectado (observação visual) intenso edema na pata dos animais, 1 e 3 h após a administração do agonista, nesta dose (Figs. 17 A e B).

Animais submetidos à CCI e tratados com salina (controles) apresentaram hipernocicepção e alodinia. Animais falso operados e tratados com U-50,488 não apresentaram alterações significativas no limiar nociceptivo em relação aos valores obtidos antes da cirurgia (Fig. 17 A).

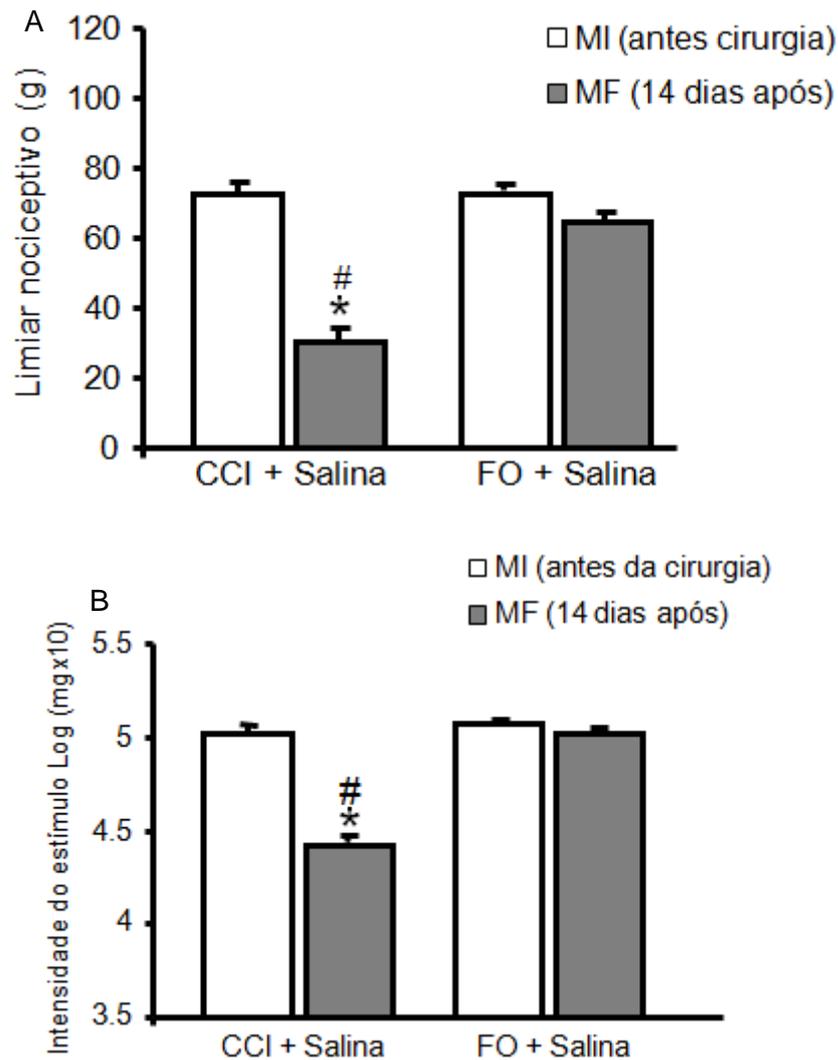


Figura 14- Avaliação da hipernocicepção e alodinia induzidas pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos. Para a determinação da sensibilidade nociceptiva foram avaliados os fenômenos de hipernocicepção (A) e alodinia (B). O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em Log (mg x 10) necessária para induzir a retirada da pata (B). A sensibilidade nociceptiva foi determinada antes da cirurgia (MI) e no 14^o dia do pós operatório (MF). Animais falso operados foram utilizados como controles * $p < 0,05$ por comparação com a MI e # $p < 0,05$ por comparação com o grupo FO + salina.

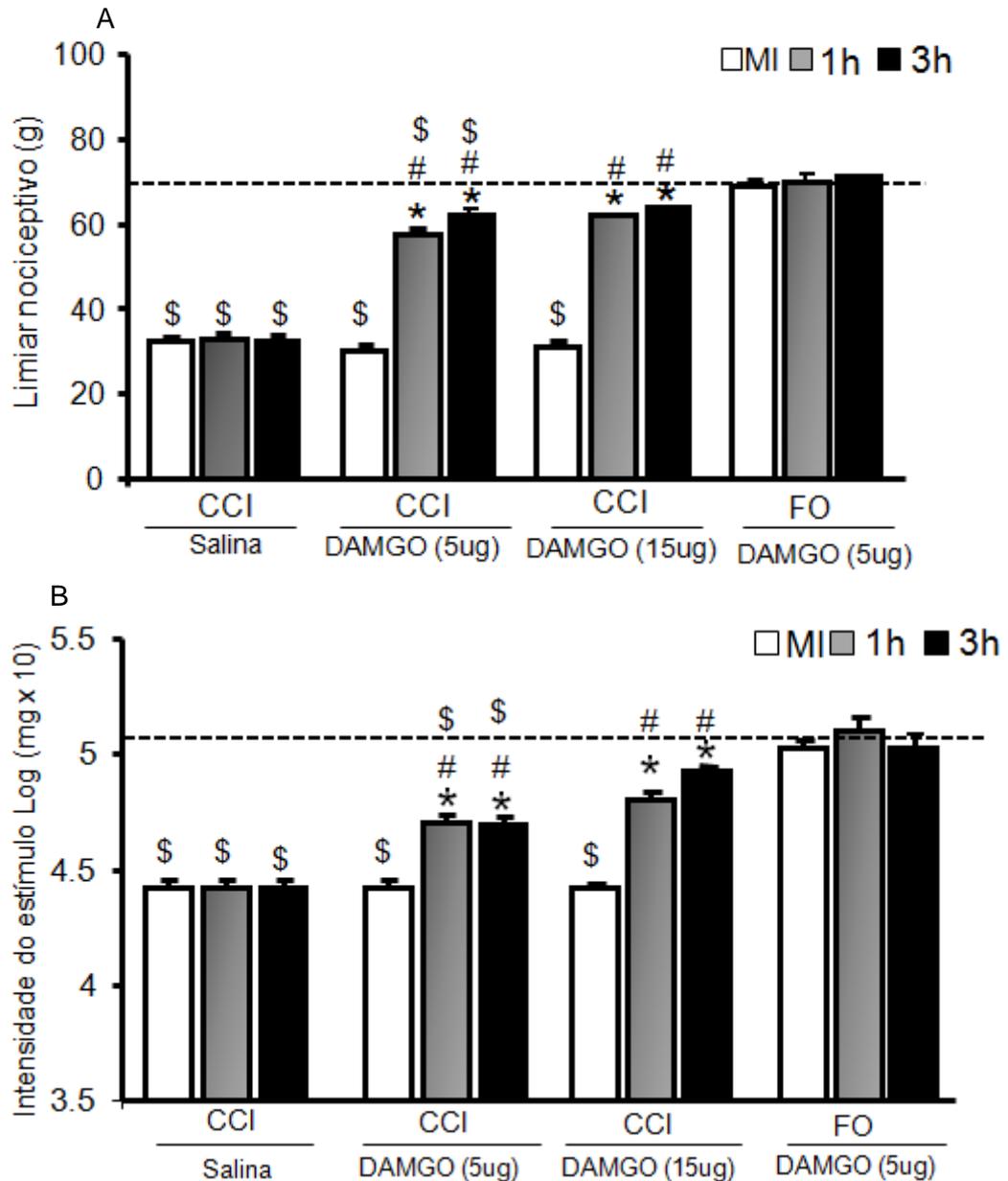


Figura 15 - Efeito antinociceptivo do DAMGO, nas dose de 5 e 15 μg /pata na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos. Para a determinação da sensibilidade nociceptiva foram avaliados os fenômenos de hipernociceção (A) e alodinia (B). O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em Log (mg x 10) necessária para induzir a retirada da pata (B). A sensibilidade nociceptiva foi determinada no 14^o dia do pós operatório imediatamente antes (medida inicial, MI) e na 1^a e 3^a horas após a administração de DAMGO ou salina (controles). Animais falso operados receberam DAMGO e tiveram a sensibilidade nociceptiva avaliada nos mesmos períodos dos animais operados. A linha tracejada representa a média do valor da medida basal, obtida antes da ligadura do nervo isquiático. * $p < 0,05$ por comparação com a MI, # $p < 0,05$ por comparação com o grupo CCI + salina, \$ por comparação com a medida obtida antes do procedimento cirúrgico.

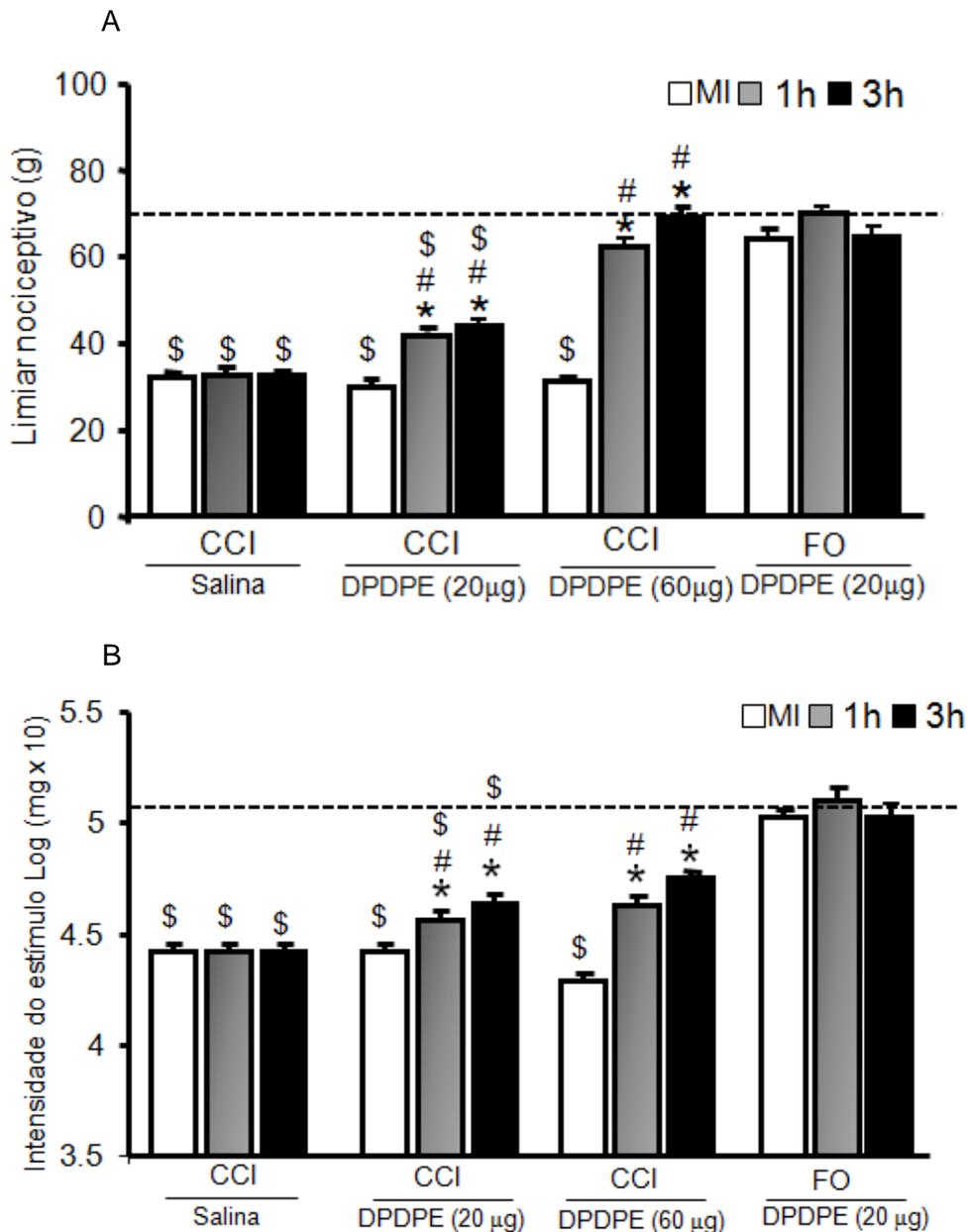


Figura 16 - Efeito antinociceptivo local do DPDPE, nas doses de 20 e 60 µg/pata na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos. Para a determinação da sensibilidade nociceptiva foram avaliados os fenômenos de hipernocicepção (A) e alodinia (B). O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em Log (mg x 10) necessária para induzir a retirada da pata (B). A sensibilidade nociceptiva foi determinada no 14^o dia do pós operatório imediatamente antes (medida inicial, MI) e na 1^a e 3^a horas após a administração de DPDPE ou salina (controles). Animais falso operados receberam DPDPE e tiveram a sensibilidade nociceptiva avaliada nos mesmos períodos dos animais operados. A linha tracejada representa a média do valor da medida basal, obtida antes da ligadura do nervo isquiático. * $p < 0,05$ por comparação com a MI (após a cirurgia e antes dos tratamentos), # $p < 0,05$ por comparação com o grupo CCI + salina, \$ por comparação com a medida obtida antes do procedimento cirúrgico.

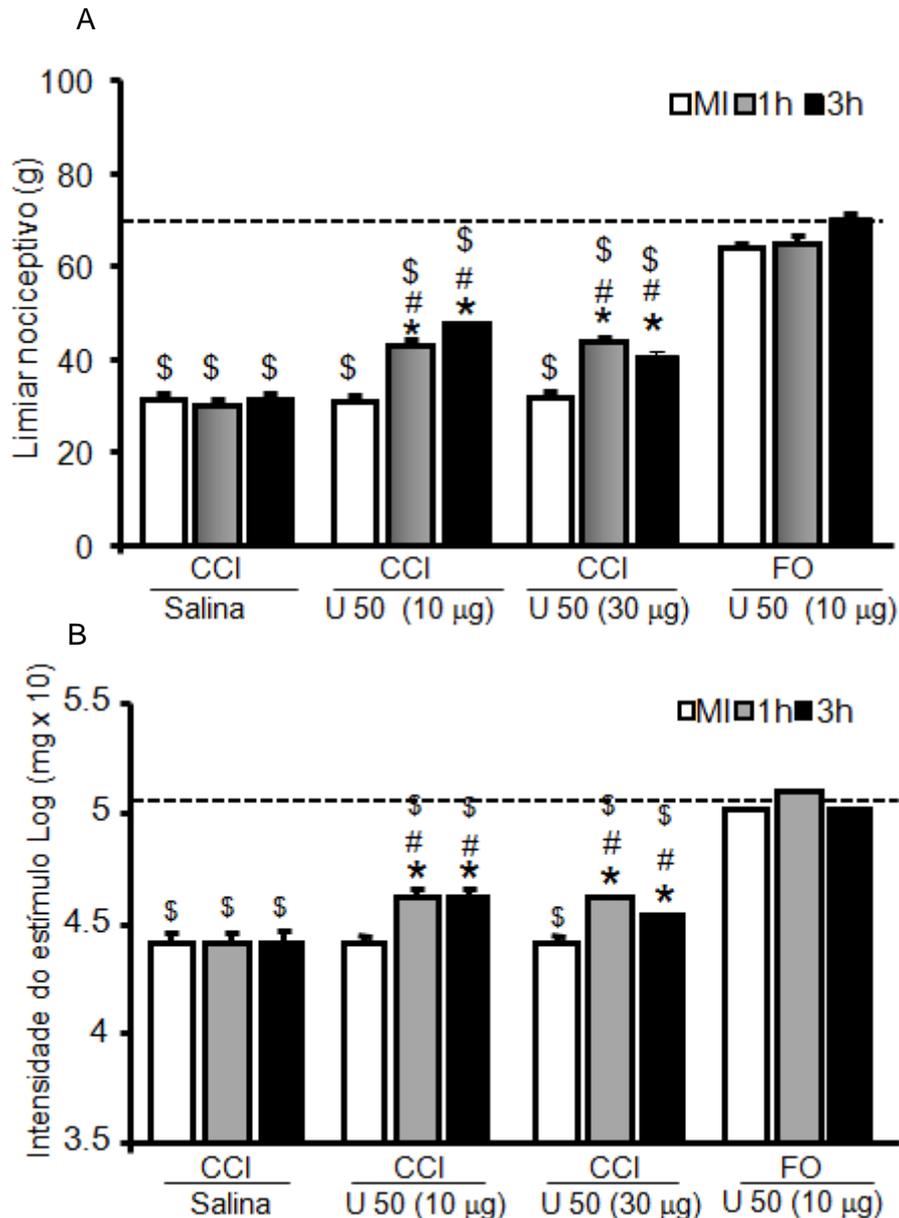


Figura 17 - Efeito antinociceptivo local do U-50,488, na dose de 10 e 30 µg/pata na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos. Para a determinação da sensibilidade nociceptiva foram avaliados os fenômenos de hipernocicepção (A) e alodinia (B). O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A) O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em Log (mg x 10) necessária para induzir a retirada da pata (B). A sensibilidade nociceptiva foi determinada no 14^o dia do pós operatório imediatamente antes (medida inicial, MI) e na 1^a e 3^a horas após a administração de U 50,488 ou salina (controles). Animais falso operados receberam U50,488 tiveram a sensibilidade nociceptiva avaliada nos mesmos períodos dos animais operados. A linha tracejada representa a média do valor da medida basal, obtida antes da ligadura do nervo isquiático.* $p < 0,05$ por comparação com a MI, # $p < 0,05$ por comparação com o grupo CCI + salina e \$ por comparação com a medida obtida antes do procedimento cirúrgico.

4.1.7 Efeito antinociceptivo da crotalina na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos

A administração intraplantar de CRF, na dose de 0.0006 µg/pata, além de reverter a hipernocicepção (Fig. 18 A) e alodinia (Fig. 18 B) induzidos pela CCI, promoveu aumento do limiar nociceptivo, quando comparado aos valores obtidos antes da cirurgia (medida inicial) (64% e 59%, 1 e 3 h após a administração de CRF, respectivamente) (Fig. 18 A). Animais controles submetidos à CCI e tratados com salina apresentaram hipernocicepção e alodinia (Fig. 18). Animais falso-operados, quando injetados com o CRF apresentaram aumento do limiar nociceptivo (59% e 52%, respectivamente), comparando-se aos valores basais obtidos antes da cirurgia (Fig. 18 A).

4.1.8 Efeito antinociceptivo da crotalina em animais falso operados e não manipulados

Como descrito acima e, diferentemente do observado para os agonistas seletivos de receptores opióides, a administração de CRF em animais falso operados (animais submetidos à cirurgia e que tiveram o nervo isquiático manipulado e exposto, mas não amarrado), acarretou aumento do limiar nociceptivo, em relação à medida inicial, em uma dose que não havia afetado, anteriormente (Fig. 8), o limiar nociceptivo de animais normais. Estes resultados sugerem que o processo de manipulação do nervo pode favorecer o efeito antinociceptivo da crotalina. Assim, realizamos um experimento adicional, em que animais foram submetidos à falsa-cirurgia, com incisão na pele e no músculo, mas sem manipulação do nervo isquiático, e tratados com a crotalina, no 14º dia do período pós-operatório. Nestas condições, o CRF não alterou significativamente o limiar nociceptivo de animais, quando comparados aos valores basais (Fig. 19).

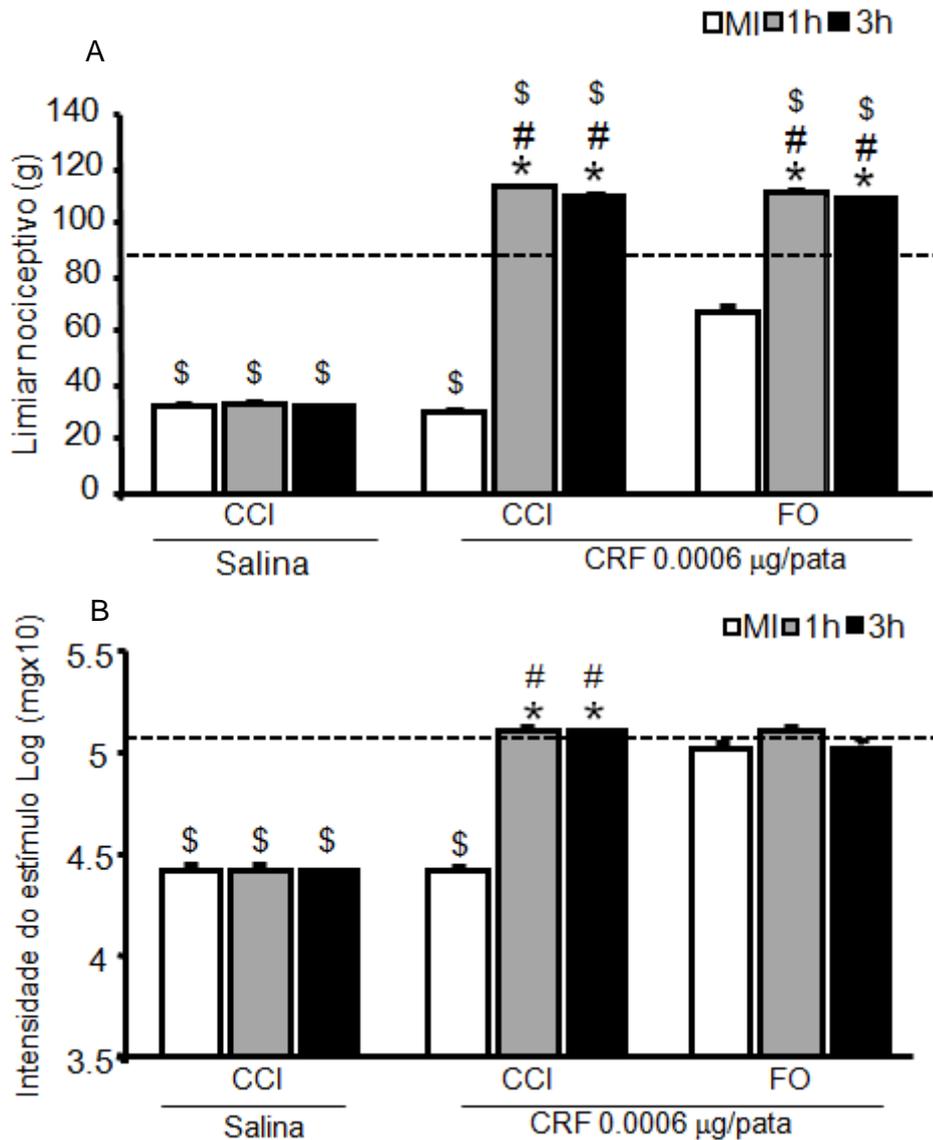


Figura 18 - Efeito antinociceptivo local do crotalina (CRF) na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos. Para a determinação da sensibilidade nociceptiva foram avaliados os fenômenos de hipernocicepção (A) e alodinia (B). O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em Log (mg x 10) necessária para induzir a retirada da pata (B). A sensibilidade nociceptiva foi determinada no 14^o dia do pós-operatório imediatamente antes (medida inicial, MI) e na 1^a e 3^a horas após a administração de CRF (0,006 µg/pata) ou salina (controles). Animais falso-operados receberam CRF e tiveram a sensibilidade nociceptiva avaliada nos mesmos períodos dos animais operados. A linha tracejada representa a média do valor da medida basal, obtida antes da ligadura do nervo isquiático. *p < 0,05 por comparação com a MI, # p < 0,05 por comparação com o grupo CCI + salina e salina e \$ por comparação com a medida obtida antes do procedimento cirúrgico.

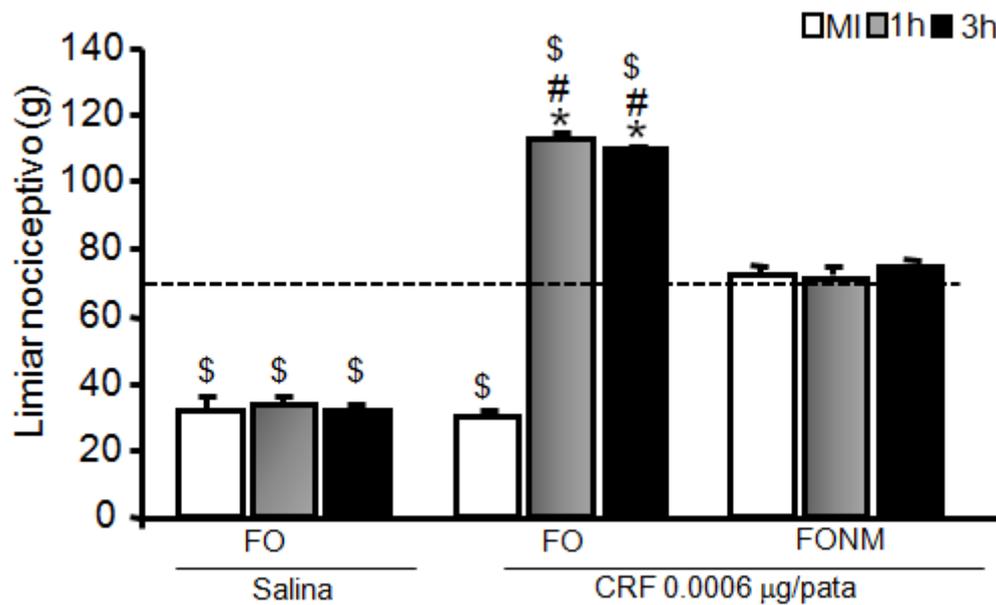


Figura 19- Efeito da crotalina (CRF) sobre o limiar nociceptivo dos animais falso operados (FO) e falso-operados que não tiveram o nervo isquiático manipulado (FONM). Para a determinação da sensibilidade nociceptiva foi avaliado o fenômeno de hipernocicepção. O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata. A sensibilidade nociceptiva foi determinada no 14^o dia do pós operatório imediatamente antes (medida inicial, MI) e na 1^a e 3^a horas após a administração de CRF (0,006 µg/pata) ou salina (controles). Animais operados e que não tiveram o nervo isquiático manipulado receberam CRF e tiveram a sensibilidade nociceptiva avaliada nos mesmos períodos dos animais operados. A linha tracejada representa a média do valor da medida basal, obtida antes da ligadura do nervo isquiático. * $p < 0,05$ por comparação com a MI, # $p < 0,05$ por comparação com o grupo CCI + salina e salina e \$ por comparação com a medida obtida antes do procedimento cirúrgico.

4.1.9 Avaliação da participação de receptores opióides no efeito antinociceptivo local da crotalina no modelo de constrição crônica do nervo isquiático (CCI)

Neste experimento, os animais foram tratados com os antagonistas seletivos dos receptores opióides do tipo μ , δ e κ .

Como mostrado na Figura 20, animais submetidos à CCI e tratados com salina (controles) apresentaram hipernocicepção (Fig. 20 A) e alodinia (Fig. 20 B). O CRF (0.0006 $\mu\text{g/pata}$) bloqueou estes fenômenos (Fig. 20 A e B).

O CTOP, antagonista seletivo de receptor opióide do tipo μ , não interferiu com o efeito antinociceptivo induzido pelo CRF (Fig. 20). Por outro lado, o ICI 174, 864, antagonista seletivo de receptores δ opióides, reverteu o efeito antinociceptivo local do CRF (Fig. 20). Ainda, o Nor-BNI, antagonista de receptor opióide do tipo κ , inibiu parcialmente este efeito (Fig. 20).

4.1.10 Avaliação da eficácia da administração conjunta de agonistas seletivos de receptores δ (DPDPE) e κ (U 50, 488) sobre a hipernocicepção e alodinia induzidas pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI)

Baseado nos resultados apresentados anteriormente (Fig. 16 e 17), mostrando que as menores doses testadas dos agonistas κ e δ não revertem, ou revertem parcialmente a hipernocicepção induzida pela CCI e uma vez que foi detectado o envolvimento de receptores opióides do tipo κ e δ no efeito antinociceptivo da crotalina no modelo da CCI, investigamos se a administração conjunta de agonistas seletivos destes receptores seria capaz de causar efeito antinociceptivo maior do que aquele observado para cada um dos agonistas administrados separadamente. Para tanto, os agonistas de receptores δ (DPDPE- 20 $\mu\text{g/pata}$) e κ (U 50, 488- 10 $\mu\text{g/pata}$) foram administrados conjuntamente e o efeito anti-hipernociceptivo e anti-alodínico avaliado 1, 3 e 5 h após. Os resultados mostraram que, comparativamente aos dados das Figs. 16 e 17, a associação dos agonistas DPDPE e U-50,488 bloqueou a hipernocicepção e alodinia dos animais, 3 horas após sua administração (Fig. 21).

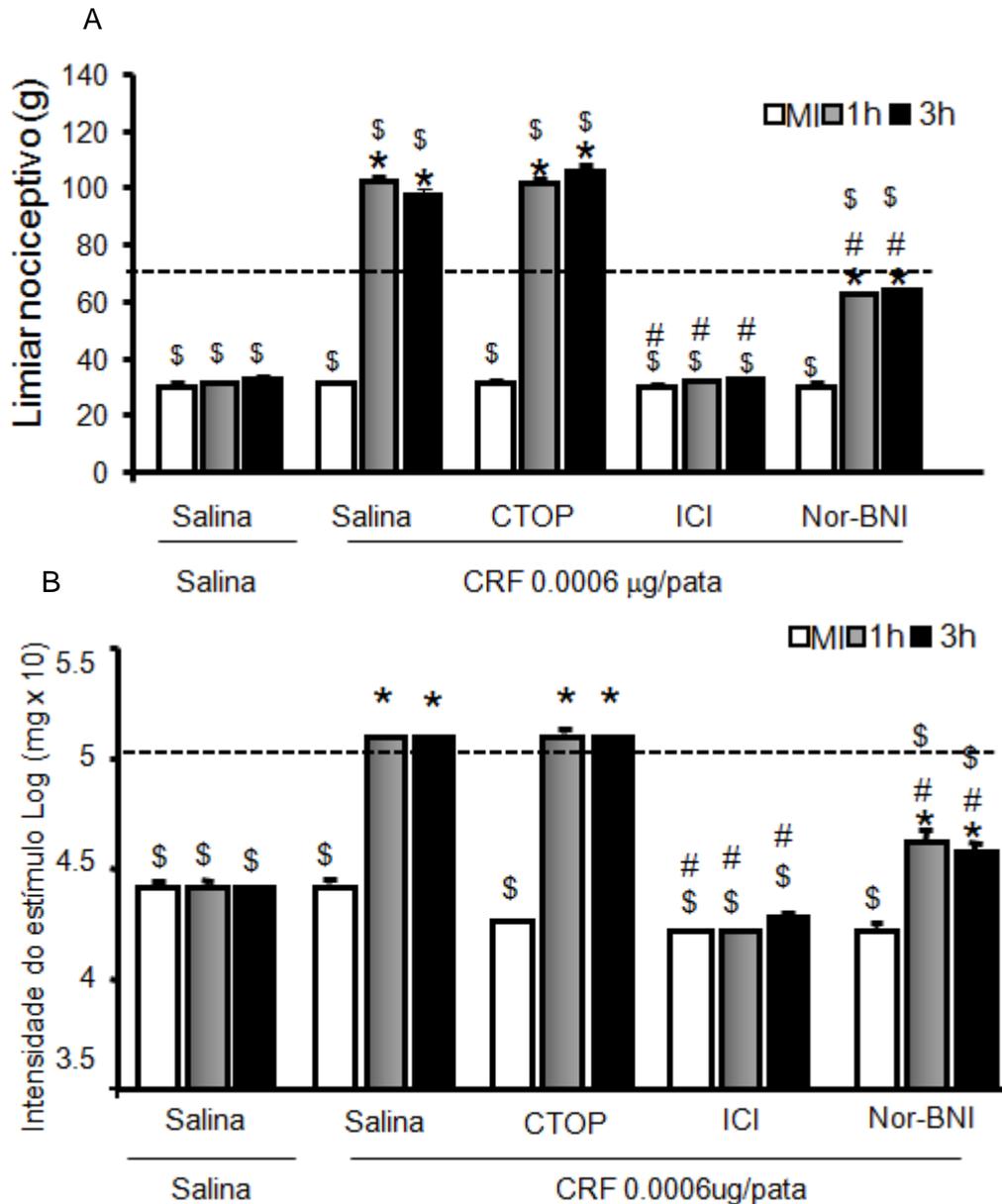


Figura 20 – Participação de receptores opióides no efeito antinociceptivo local do crotalina (CRF) na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI) de ratos. Para a determinação da sensibilidade nociceptiva foram avaliados os fenômenos de hipernocicepção (A) e alodinia (B). O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em Log (mg x 10) necessária para induzir a retirada da pata (B). A sensibilidade nociceptiva foi determinada no 14^o dia do pós operatório imediatamente antes (tempo 0) e na 1^a e 3^a horas após a administração de CRF (0,0006 µg/pata) ou salina (controles). Os antagonistas CTOP (20 µg/pata), ICI174, 864 (10 µg/pata) ou Nor-BNI (50 µg/pata), ou salina (controle) foram administrados imediatamente antes do CRF. Animais falso operados receberam CRF e tiveram a sensibilidade nociceptiva avaliada nos mesmos períodos dos animais operados. A linha tracejada representa a média do valor da medida basal, obtida antes da ligadura do nervo isquiático.* p < 0,05 por comparação com o tempo 0, # p < 0,05 por comparação com o grupo salina + CRF e \$ por comparação com a medida obtida antes do procedimento cirúrgico.

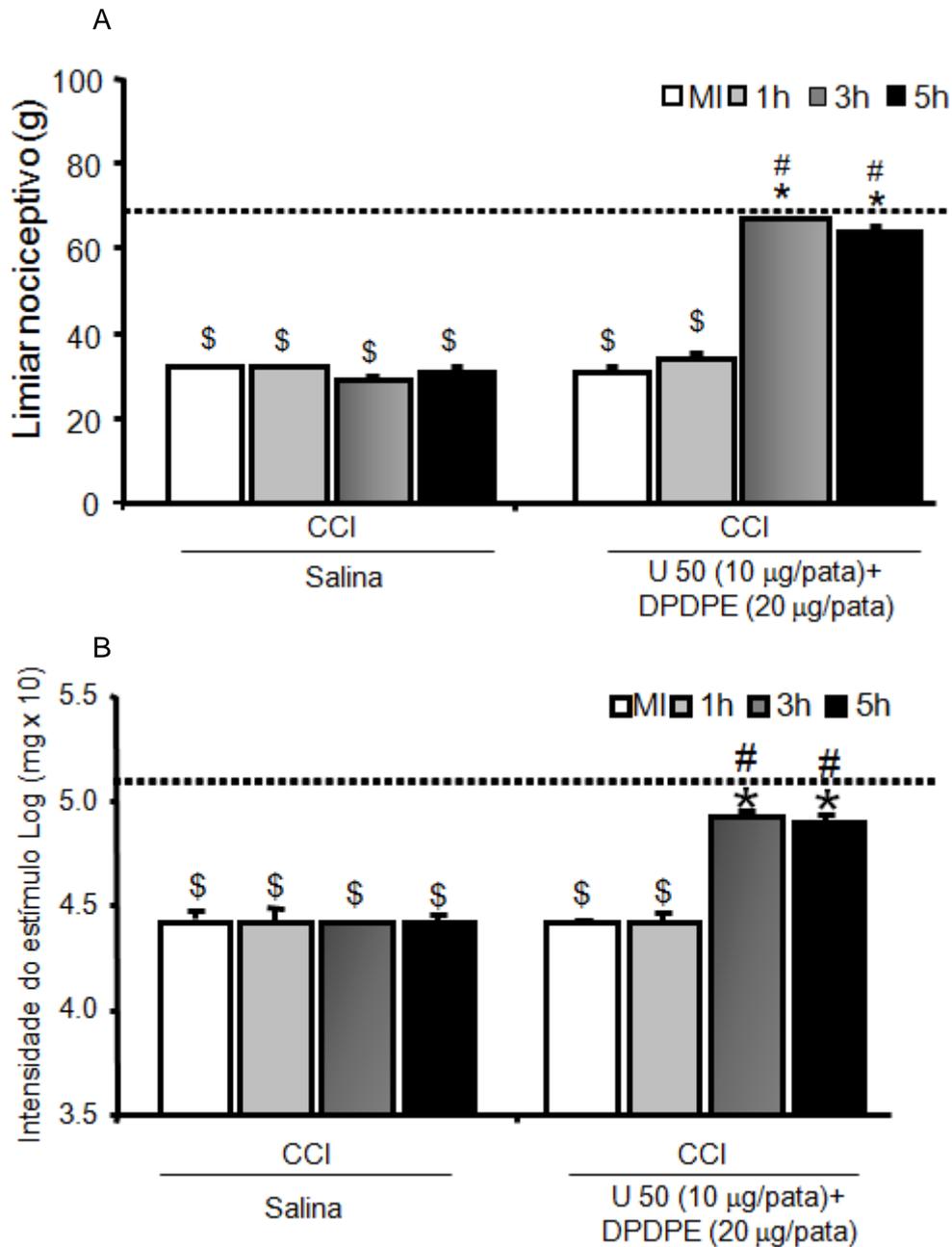


Figura 21 - Efeito antinociceptivo local da associação de DPDPE (20 µg/pata) e U-50,488 (10 µg/pata) na vigência de constrição crônica do nervo isquiático (CCI). Para a determinação da sensibilidade nociceptiva foram avaliados os fenômenos de hipernocicepção (A) e alodinia (B). O limiar nociceptivo está representado pela força (em gramas) necessária para induzir a retirada da pata (A). O limiar de resposta ao estímulo tátil está representado como a intensidade de estímulo em Log (mg x 10) necessária para induzir a retirada da pata (B). A sensibilidade nociceptiva foi determinada no 14^o dia do pós operatório imediatamente antes (medida inicial, MI) e na 1^a, 3^a e 5^a horas após a administração de U 50, 488 (10 µg/pata) + DPDPE (20 µg/pata) ou salina (controles). A linha tracejada representa a média do valor da medida basal, obtida antes da ligadura do nervo isquiático.* p < 0,05 por comparação com a MI e # p < 0,05 por comparação com o grupo CCI + salina.

4.2 Efeito da sensibilização por prostaglandina E₂ ou constrição crônica do nervo sobre a expressão e ativação de receptores opióides no gânglio da raiz dorsal e do nervo da pata

Em conjunto, os resultados apresentados indicam que o efeito antinociceptivo de agonistas opióides ou do CRF é potencializado na vigência de sensibilização. Assim, o próximo passo foi investigar as possíveis alterações na expressão e ativação de receptores opióides que pudessem contribuir para os efeitos observados. A expressão e ativação dos receptores opióides foram avaliadas no DRG e nervo da pata obtidos de animais pré-tratados com PGE₂ ou submetidos à CCI.

4.2.1 Efeito da PGE₂ e da CCI na expressão gênica de receptores opióides no gânglio da raiz dorsal (DRG)

Os resultados apresentados na Figura 22 mostram que, 3 horas após a administração de PGE₂, ocorreu aumento da expressão gênica para o receptor opióide μ , nos gânglios ipsilateral (2,7 vezes) e contralateral (2 vezes), quando comparado aos animais controle (*naive*), representados pela linha tracejada (Figs. 22 A). Da mesma forma, 14 dias após a CCI foi observado aumento da expressão de RNA mensageiro para o receptor μ , nos gânglios ipsilateral (2,6 vezes) e contralateral (0,5 vezes) (Fig. 22 B).

Em relação ao receptor κ , foi detectado aumento de sua expressão gênica, após a administração de PGE₂ (2,9 vezes, gânglio ipsilateral e 2 vezes, gânglio contralateral) (Fig. 23 A). Em animais submetidos à CCI, não foi observado alteração significativa deste receptor no DRG (Fig. 23 B).

A avaliação da expressão do RNA mensageiro para o receptor δ , mostrou aumento da expressão deste receptor no DRG, tanto em animais tratados com PGE₂ (3,1 vezes, gânglio ipsilateral) (Fig. 24 A), quanto em animais submetidos à CCI (7,5 vezes, gânglio ipsilateral, 5 vezes, gânglio contralateral) (Fig. 24 B).

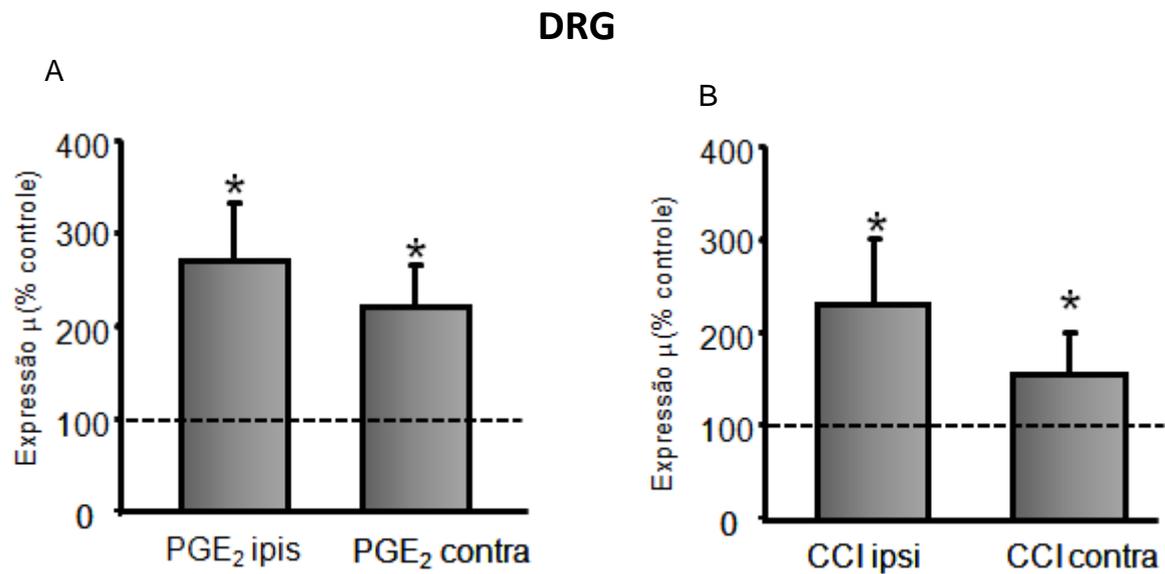


Figura 22 - Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) (A) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) (B) sobre a expressão gênica de receptores opióides do tipo μ no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos. A expressão gênica dos receptores foi avaliada por PCR em tempo real no DRG (L4-6) obtido (A) 3 horas após a administração de PGE₂ ou (B) 14 dias após a CCI. Os valores estão apresentados como porcentagem em relação aos animais *naive* (linha tracejada). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em animais *naive*. ipis: ipsilateral à sensibilização, contra: contralateral à sensibilização.

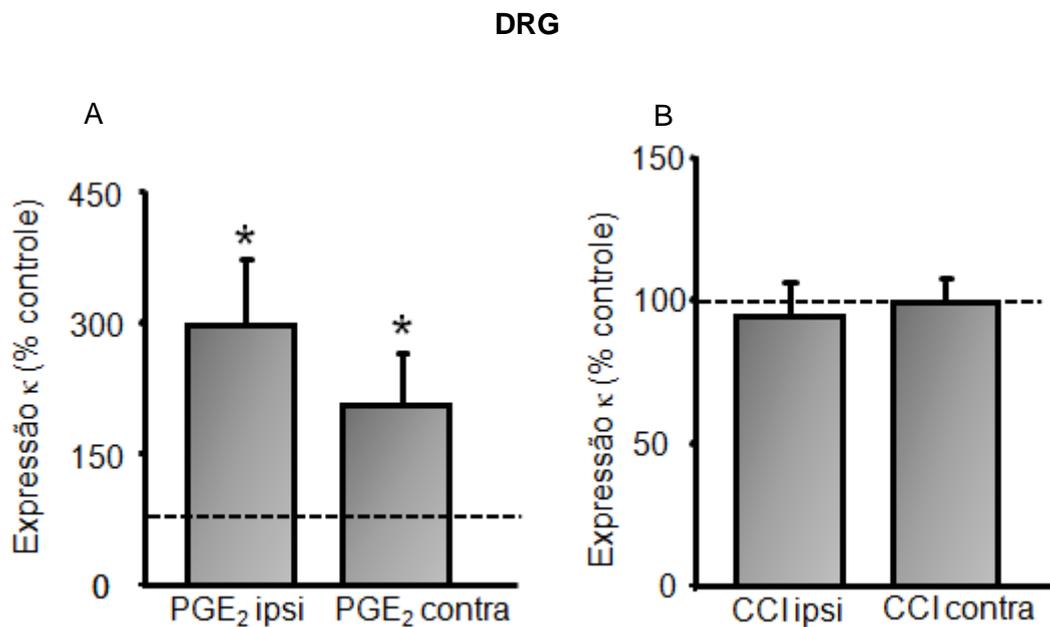


Figura 23- Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) (A) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) (B) sobre a expressão gênica de receptores opióides do tipo κ no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos. A expressão gênica dos receptores foi avaliada por PCR em tempo real no DRG (L4-6) obtido (A) 3 horas após a administração de PGE₂ ou (B) 14 dias após a CCI. Os valores estão apresentados como porcentagem em relação aos animais *naive* (linha tracejada). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em animais *naive*. ipsi: ipsilateral à sensibilização, contra: contralateral à sensibilização.

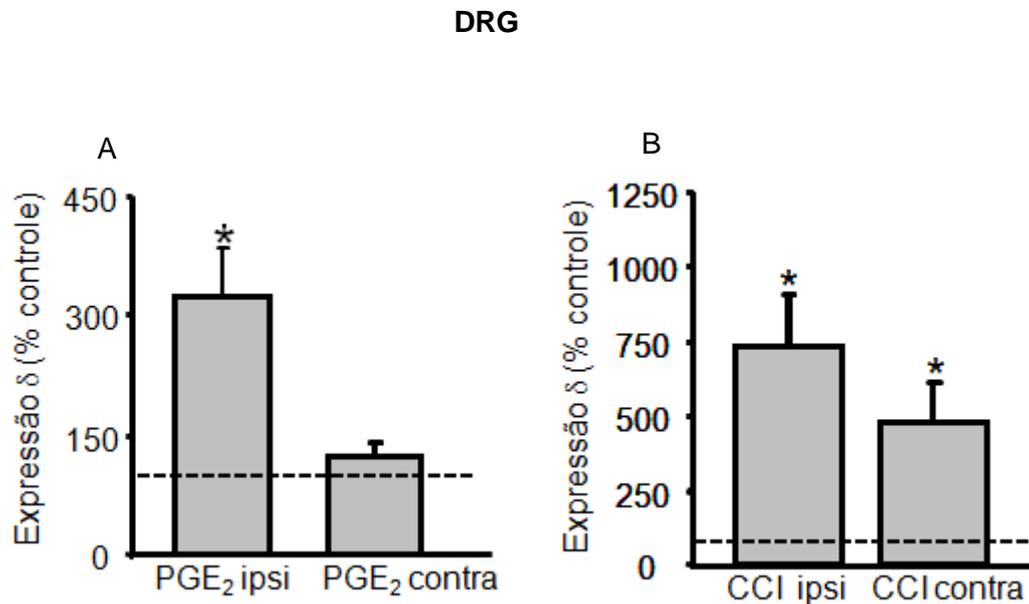


Figura 24 - Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) (A) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) (B) sobre a expressão gênica de receptores opióides do tipo δ no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos. A expressão gênica dos receptores foi avaliada por PCR em tempo real no DRG (L4-6) obtido (A) 3 horas após a administração de PGE₂ ou (B) 14 dias após a CCI. Os valores estão apresentados como porcentagem em relação aos animais *naïve* (linha tracejada). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em animais *naïve*. ipsi: ipsilateral à sensibilização, contra: contralateral à sensibilização.

4.2.2 Efeito da prostaglandina E_2 (PGE_2) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na expressão protéica de receptores opióides no nervo da pata e no gânglio da raiz dorsal (DRG)

Uma vez detectada alteração na expressão gênica para receptores opióides, na vigência de sensibilização, avaliamos a possível alteração na expressão protéica destes receptores.

4.2.2.1 Receptor opióide do tipo μ

Os resultados apresentados na Fig 25 A, indicam que a administração intraplantar de PGE_2 promove aumento da expressão de receptores opióides do tipo μ (43%), no nervo plantar ipsilateral à sua administração, quando comparado com animais *naive*. Não foram observadas alterações no nervo da pata contralateral à injeção. Adicionalmente, animais submetidos à CCI apresentaram aumento na expressão de receptores opióides do tipo μ neste tecido (27 %), quando comparado com a expressão destes receptores em animais *naive* (Fig. 25 B).

Em relação ao DRG, a administração intraplantar de PGE_2 acarretou aumento na expressão do receptor μ , na região ipsilateral (79 %) (Fig. 25 C). Ainda, foi também detectado aumento na expressão deste receptor, 14 dias após a CCI, tanto no DRG ipsilateral quanto contralateral (49% e 21 %, respectivamente) (Fig. 25 D).

Não foi detectada alteração na expressão deste receptor nos tecidos obtidos de animais falso operados, quando comparado aos animais *naive* (dados não mostrados).

4.2.2.2 Receptor opióide do tipo κ

Os resultados apresentados na Fig 26 A, mostram que a administração intraplantar de PGE_2 promoveu aumento na expressão de receptores opióides do tipo κ no nervo plantar (75 %, Fig 26 A) e no DRG (168 %, Fig 26 C), quando comparado aos animais *naive*. Não foi observada alteração na expressão protéica destes receptores na pata contralateral à injeção.

Por outro lado, animais submetidos à CCI apresentam diminuição na expressão destes receptores no nervo da pata (51%). Diferentemente, não houve alteração na expressão destes receptores no DRG, quando comparado aos animais *naive* (Figs. 26 B e 26 D).

Não foi observada alteração na expressão protéica destes receptores na pata contralateral à cirurgia. Ainda, não foi detectada alteração na expressão deste receptor nos tecidos obtidos de animais falso operados, quando comparado aos animais *naive* (dados não mostrados).

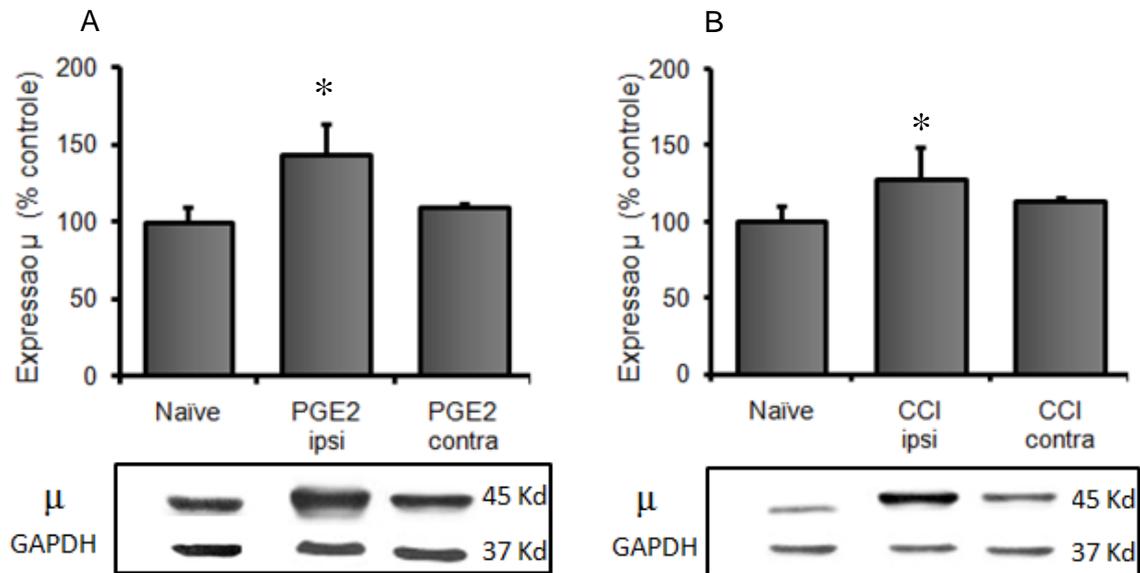
4.2.2.3 Receptor opióide do tipo δ

A injeção intraplantar de PGE₂ acarretou diminuição (30%) na expressão de receptores opióides do tipo δ , no nervo da pata (Fig. 27 A), porém não alterou a expressão deste receptor no DRG (Fig. 27 C), quando comparado aos animais *naive*. Por outro lado, a CCI induziu aumento na expressão destes receptores no DRG (35%) (Fig. 27 D), sem alterar a expressão dos receptores no nervo da pata (Fig. 27 B)

Não foi detectada alteração na expressão deste receptor nos tecidos obtidos de animais falso operados, quando comparado aos animais *naive* (dados não mostrados).

Os resultados da expressão de receptores opióides na vigência de sensibilização aguda ou crônica estão resumidos na **tabela 1**.

Nervo da Pata



DRG

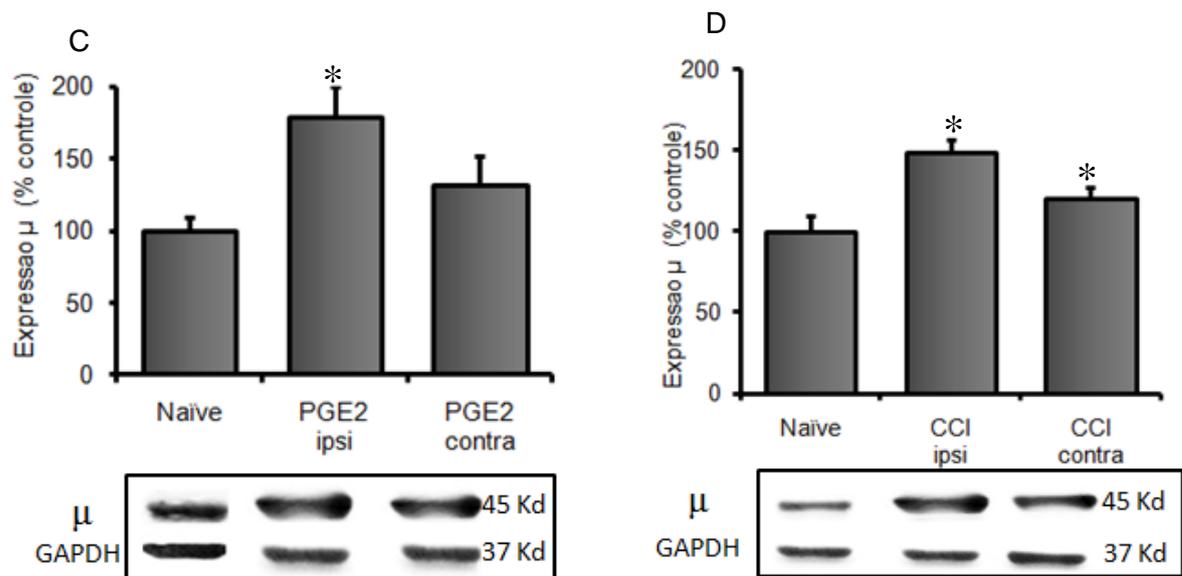


Figura 25 - Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na expressão protéica de receptores opióides no tipo μ no nervo da pata e no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos. A expressão dos receptores foi avaliada por *western blotting* do lisado total do nervo da pata (A e B) e DRG (L4-6) (C e D), obtidos 3 horas após a administração de PGE₂ ou 14 dias após a CCI. Os valores estão normalizados pela expressão de GAPDH e apresentados como porcentagem em relação aos animais *naive*. **p* < 0,05 por comparação com os valores obtidos em animais *naive*. Foram utilizados 6 animais por grupo experimental.

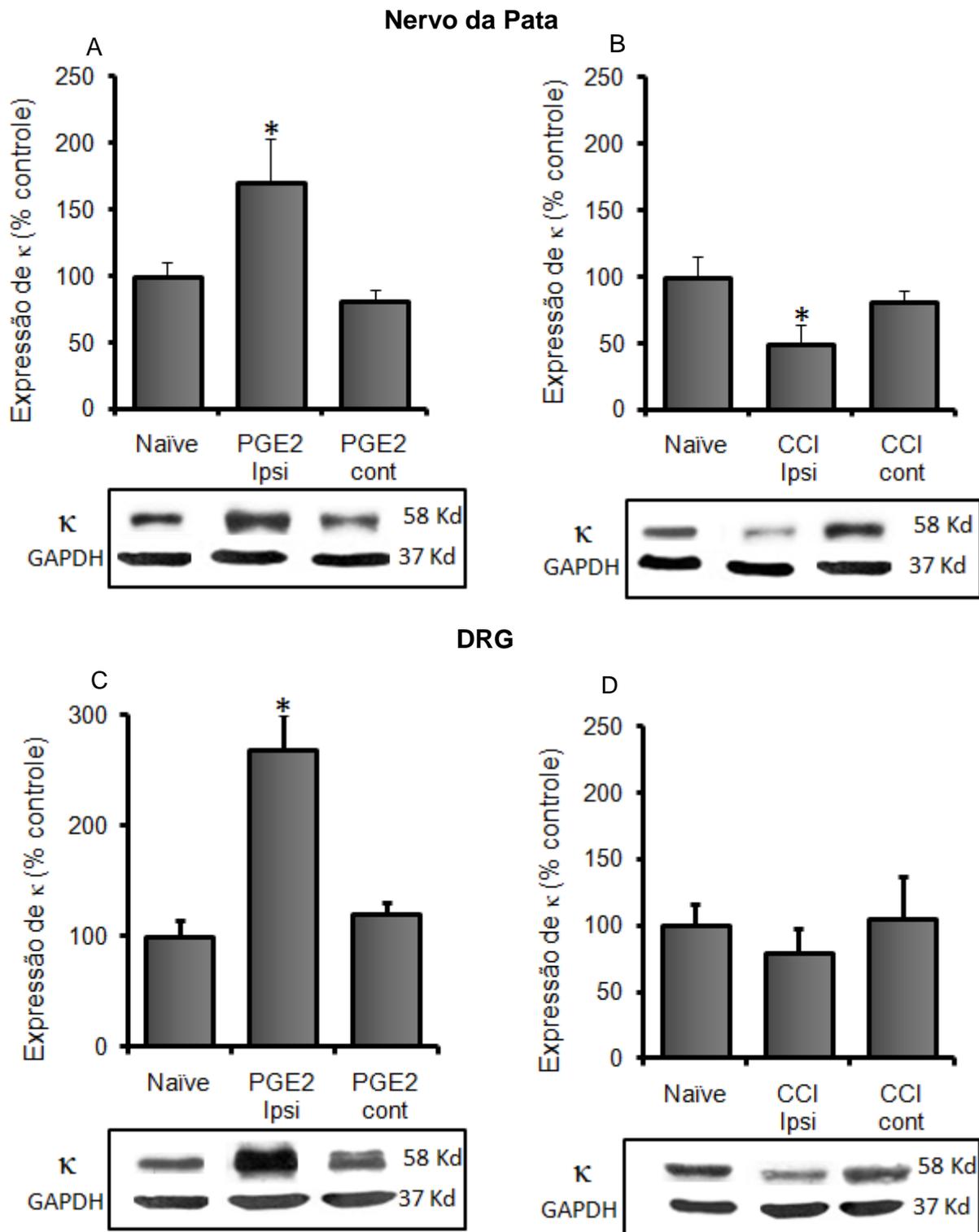


Figura 26 - Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na expressão protéica de receptores opióides no tipo κ no nervo da pata e gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos. A expressão dos receptores foi avaliada por *western blotting* do lisado total do nervo da pata (A e B) e DRG (L4-6) (C e D), obtidos 3 horas após a administração de PGE₂ ou 14 dias após a CCI. Os valores estão normalizados pela expressão de GAPDH e apresentados como porcentagem em relação aos animais *naive*. * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em animais *naive*. Foram utilizados 6 animais por grupo experimental.

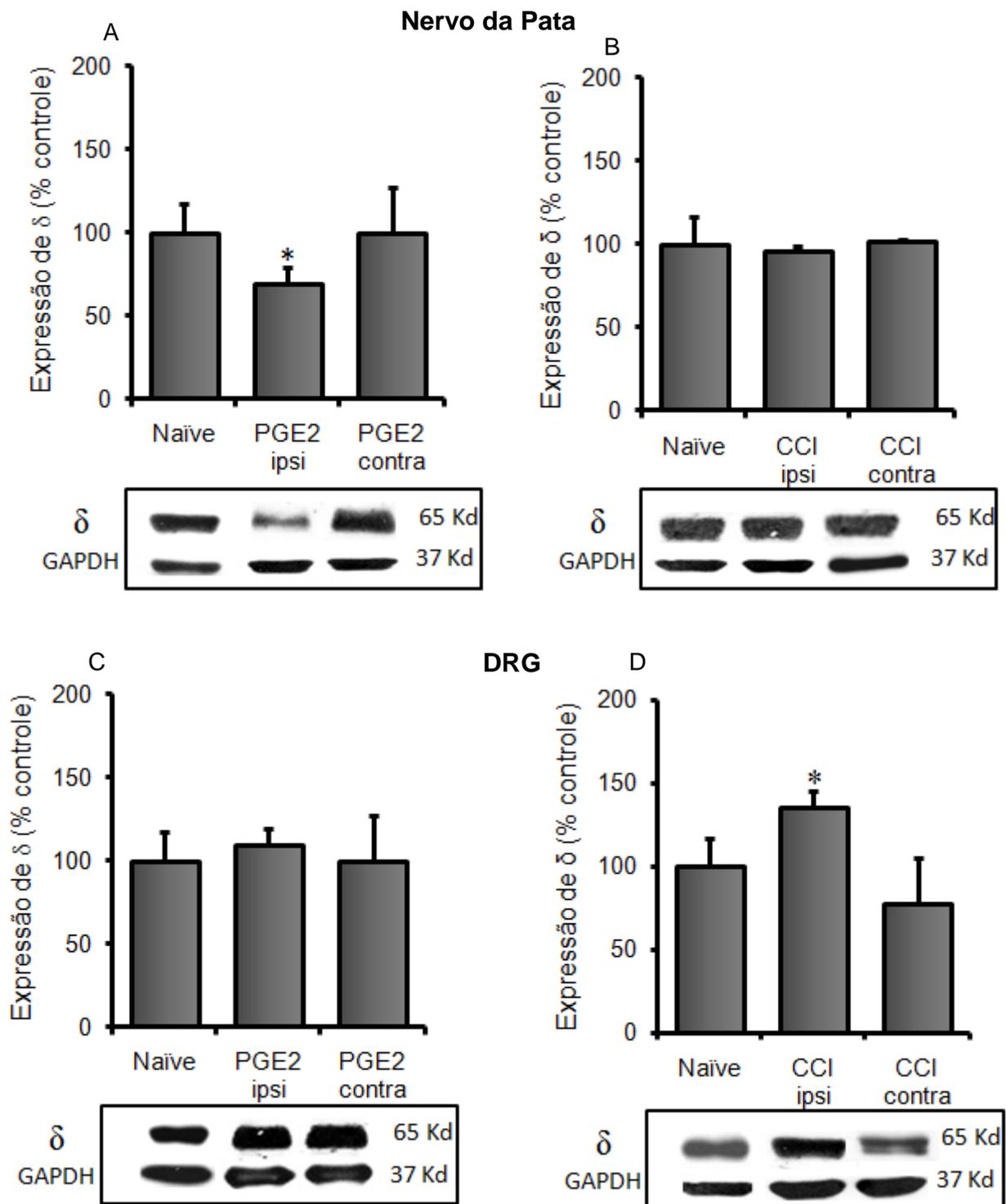


Figura 27 - Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na expressão protéica de receptores opióides no tipo δ no nervo da pata e gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos. A expressão dos receptores foi avaliada por *western blotting* do lisado total do nervo da pata (A e B) e DRG (L4-6) (C e D), obtidos 3 horas após a administração de PGE₂ ou 14 dias após a CCI. Os valores estão normalizados pela expressão de GAPDH e apresentados como porcentagem em relação aos animais *naive*. * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em animais *naive*. Foram utilizados 6 animais por grupo experimental.

Tabela 1 - Resumo dos dados obtidos na avaliação da expressão de receptores opióides no nervo da pata e DRG de animais submetidos à sensibilização induzida pela prostaglandina E₂ (PGE₂) ou pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) **(A)** comparação entre PGE₂ e CCI; **(B)** comparação entre o Nervo Pata (N. Pata) e gânglio da raiz dorsal (DRG).

A

Tipo de injúria	Receptor opióide μ		Receptor opióide κ		Receptor opióide δ	
	<i>N. Pata</i>	<i>DRG</i>	<i>N. Pata</i>	<i>DRG</i>	<i>N. Pata</i>	<i>DRG</i>
PGE₂	+ 43%	+79%	+ 75%	168%	-30%	---
CCI	+27%	+49%	-51%	---	---	+35%

B

Tipo de injúria	Receptor opióide μ		Receptor opióide κ		Receptor opióide δ	
	<i>PGE₂</i>	<i>CCI</i>	<i>PGE₂</i>	<i>CCI</i>	<i>PGE₂</i>	<i>CCI</i>
N. Pata	+ 43%	+27%	+ 75%	-51%	-30%	---
DRG	+79%	+49%	+168%	---	---	+35%

Os símbolos significam: + aumento da expressão, - diminuição e --- nenhuma alteração significativa.

4.2.3 Efeito da prostaglandina E_2 (PGE_2) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) sobre a ativação (alterações conformacionais) de receptores opióides no nervo da pata e no gânglio da raiz dorsal (DRG)

4.2.3.1 Receptor opióide do tipo μ

Os resultados obtidos até o momento mostram que a expressão dos receptores opióides pode ser diferentemente regulada, dependendo do tipo de injúria e do receptor avaliado. Assim, em continuidade a esses ensaios, foi avaliado o efeito da sensibilização por PGE_2 e CCI sobre a ativação destes receptores. Para tanto, foram utilizados anticorpos anti-receptores opióides, que reconhecem o receptor apenas na sua forma ativada, isto é, o receptor que apresenta alteração conformacional compatível com estado de ativação (Fig. 28, dados representados pela segunda barra). Como controle destes experimentos, foram utilizados os mesmos anticorpos escolhidos para os ensaios de *western blotting*, ou seja, anticorpos que reconhecem estes receptores independentemente de seu estado de ativação (Fig. 28, valores representados pela primeira barra).

Conforme apresentado na Fig. 28 A (primeira barra) e de acordo com os resultados obtidos anteriormente, nos ensaios de *western blotting*, a administração intraplantar de PGE_2 promoveu aumento da expressão de receptores opióides do tipo μ (43 %), no nervo plantar ipsilateral à sua administração, quando comparado com animais *naive*. Não foram observadas alterações no nervo da pata contralateral à injeção (dados não mostrados). Adicionalmente, animais submetidos à CCI apresentaram aumento na expressão de receptores opióides do tipo μ neste tecido (27 %), quando comparado com aos animais *naive* (Fig. 28 B).

Em relação à expressão do receptor opióide do tipo μ , no DRG, observamos que 3 h após a injeção de PGE_2 ou 14 dias após a CCI, ocorreu aumento na expressão deste receptor tanto na região ipsilateral (PGE_2 = 43 %, CCI = 46 %), quanto contralateral (PGE_2 =22%, CCI= 23 %) (Figs. 28C e D).

Por outro lado, quando utilizamos anticorpos que reconhecem o receptor μ , apenas na forma ativada, não foi detectada diferença significativa na expressão destes receptores tanto no nervo da pata quanto no DRG, quando comparado ao

material coletado dos animais controles, nas diferentes condições experimentais (Fig. 28).

4.2.3.2 Receptor opióide do tipo κ

Os resultados apresentados na Fig 29 A e C, utilizando anticorpos que reconhecem o receptor independentemente da sua forma ativada, indicam, novamente, que a administração intraplantar de PGE₂ promove aumento na expressão de receptores opióides do tipo κ , no nervo plantar (72 %, Fig 29 A, primeira barra) e no DRG (97 %, Fig 29 C, primeira barra), quando comparado aos animais *naive*. Não foi observada alteração na expressão protéica destes receptores na pata contralateral à injeção ou à cirurgia (dados não mostrados).

Por outro lado, quando foram utilizados anticorpos para a forma ativada deste receptor, não foi detectada, 3 h após a PGE₂, diferença na expressão de receptores ativados, tanto no nervo da pata quanto no DRG, quando comparados aos animais *naive* (Fig. 29 A e 29 C).

Animais submetidos à CCI apresentaram diminuição na expressão de receptores opióide do tipo κ (totais ou ativados), no nervo da pata (24%). Não foi detectada diferença significativa no gânglio da raiz dorsal, quando comparados aos animais *naive* (Figs 29 B e 29 D).

4.2.3.3 Receptor opióide do tipo δ

Animais injetados com PGE₂ apresentaram redução de 30% na expressão de receptores no nervo opióides do tipo δ no da pata, quando comparados aos animais *naive* (Fig. 30 A). Por outro lado, animais submetidos à CCI apresentaram aumento de 34% na expressão deste receptor no nervo da pata (Fig. 30 B), quando comparado aos animais *naive*. Ainda, ocorreu aumento na expressão destes receptores no DRG de animais submetidos à CCI (30%) (Fig. 30 D), quando comparado aos animais *naive*.

Quando utilizamos anticorpos que reconhecem o receptor δ em sua forma ativada, foi observada diminuição significativa nos níveis destes receptores apenas no nervo da pata de animais tratados com PGE₂, diminuição similar àquela

detectada quando da utilização dos anticorpos que reconhecem os receptores independentemente da sua forma ativada (receptores totais) (Fig. 30 A).

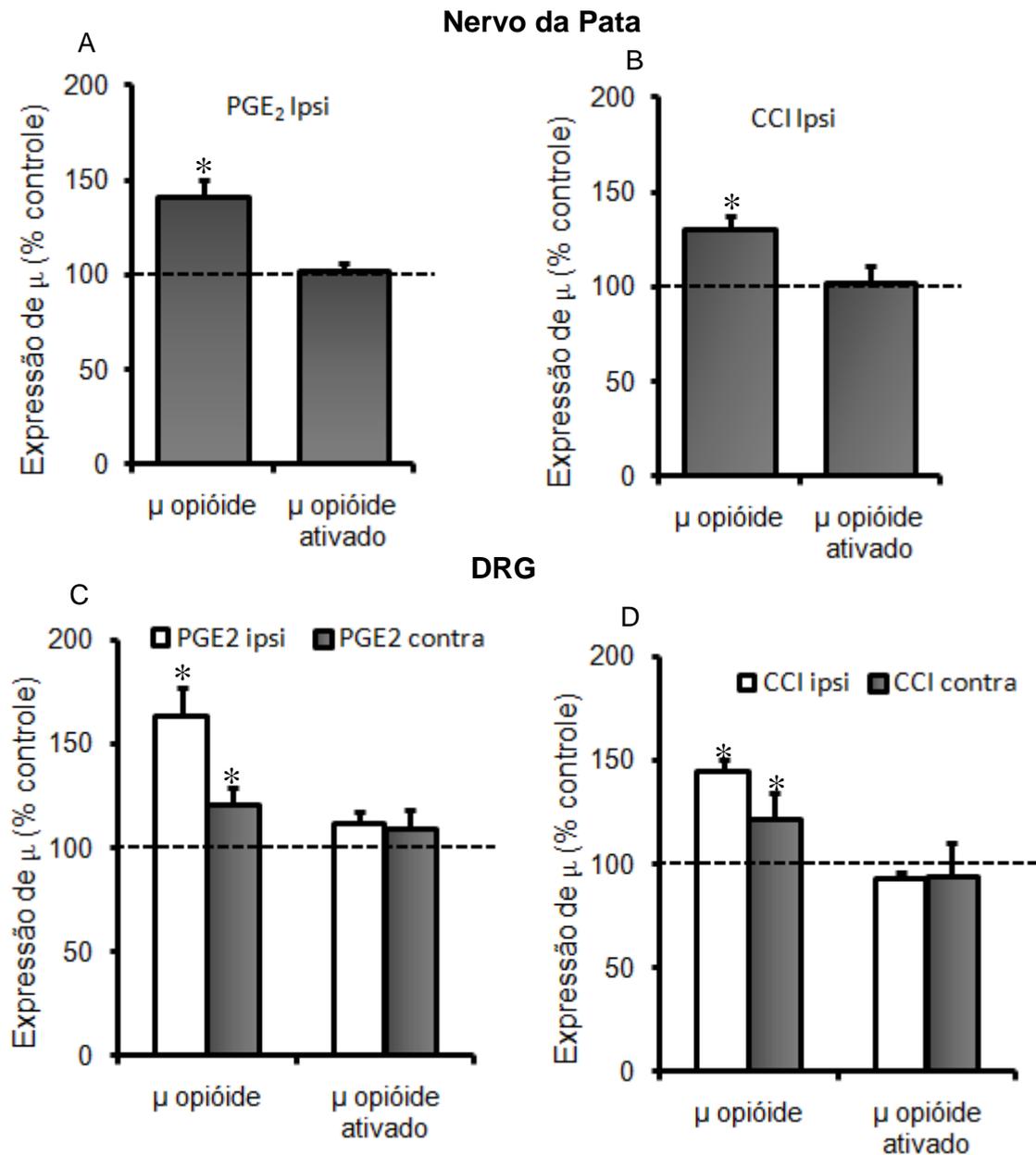


Figura 28 - Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na ativação de receptores opióides do tipo μ no nervo da pata e no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos. A ativação dos receptores foi avaliada por ELISA em cortes de tecido do nervo da pata (A e B) e DRG (L4-6) (C e D), obtidos 3 horas após a administração intraplantar de PGE₂ (100ng/para) (A e C) ou 14 dias após a CCI (B e D). Para a detecção dos receptores opióides foram utilizados anticorpos que reconhecem os receptores totais ou anticorpos que reconhecem apenas os receptores em sua forma ativa (alteração conformacional). Os valores estão apresentados como porcentagem em relação aos animais *naive* (linha tracejada). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em animais *naive*. Foram utilizados 6 animais por grupo experimental.

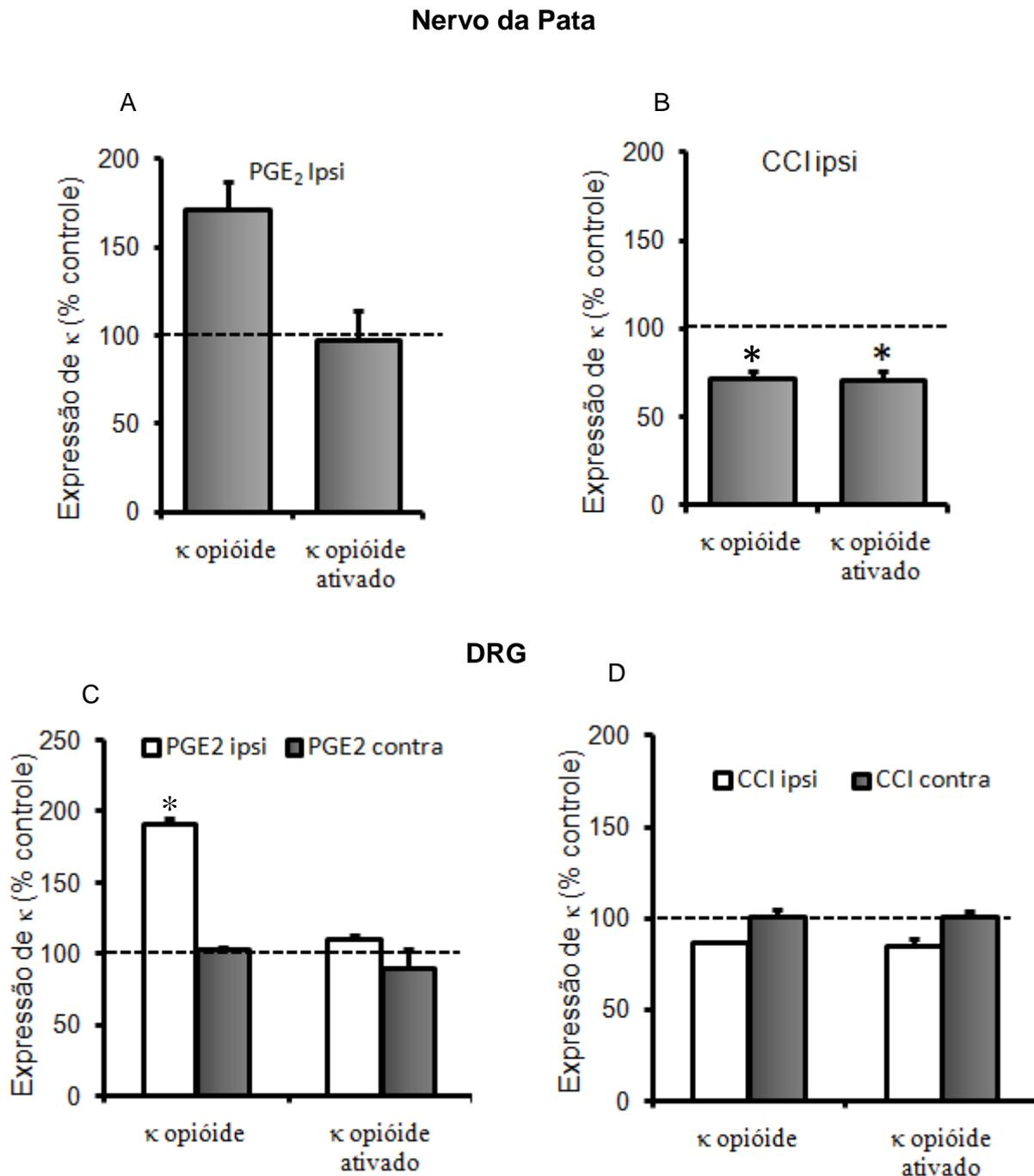


Figura 29- Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na ativação de receptores opióides do tipo κ no nervo da pata e no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos. A ativação dos receptores foi avaliada por ELISA em cortes de tecido do nervo da pata (A e B) e DRG (L4-6) (C e D), obtidos 3 horas após a administração intraplantar de PGE₂ (100 ng/ pata) (A e C) ou 14 dias após a CCI (B e D). Para a detecção dos receptores opióide foram utilizados anticorpos que reconhecem os receptores totais ou anticorpos que reconhecem apenas os receptores em sua forma ativa (alteração conformacional). Os valores estão apresentados como porcentagem em relação aos animais *naive* (linha tracejada). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em animais *naive*. Foram utilizados 6 animais por grupo experimental.

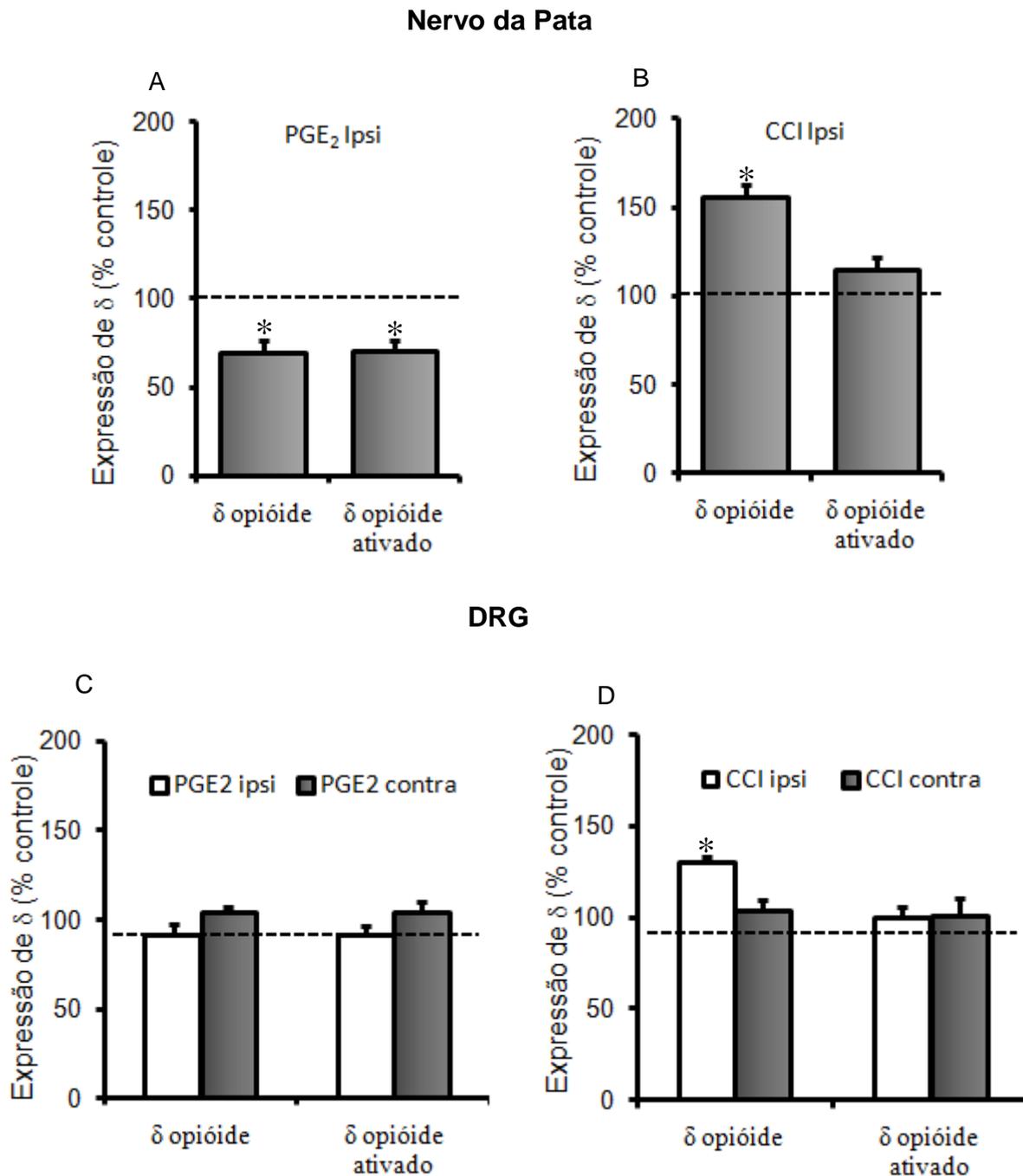


Figura 30 - Efeito da administração intraplantar de Prostaglandina E₂ (PGE₂) e da constrição crônica do nervo isquiático (CCI) na ativação de receptores opióides do tipo δ no nervo da pata e no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos. A ativação dos receptores foi avaliada por ELISA em cortes de tecido do nervo da pata (A e B) e DRG (L4-6) (C e D), obtidos 3 horas após a administração intraplantar de PGE₂ (100 ng/ pata) (A e C) ou 14 dias após a CCI (B e D). Para a detecção dos receptores opióides foram utilizados anticorpos que reconhecem os receptores totais ou anticorpos que reconhecem apenas os receptores em sua forma ativa (alteração conformacional). Os valores estão apresentados como porcentagem em relação aos animais *naive* (linha tracejada). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em animais *naive*. Foram utilizados 6 animais por grupo experimental.

4.2.4 Efeito dos agonistas seletivos de receptores opióides μ , κ e δ e da crotalfina sobre a ativação de receptores opióides no nervo da pata obtido de animais injetados com prostaglandina E_2 (PGE_2) ou submetidos à constrição crônica do nervo isquiático (CCI)

Baseado nos dados mostrando que na vigência de injúria induzida por PGE_2 ou CCI, ocorre aumento na expressão, mas não na ativação de receptores opióides, investigamos agora, se o agonista destes receptores, na presença de sensibilização, seria capaz de promover maior ativação destes receptores.

4.2.4.1 Efeito dos agonistas seletivos e da crotalfina, na vigência de sensibilização por PGE_2

A administração intraplantar de DAMGO (5 μ g/pata), em animais não sensibilizados, promoveu ativação de receptores opióides do tipo μ (23%), 1 hora após a sua administração, quando comparado aos valores obtidos nos animais *naive* (não sensibilizados). Contudo, quando o agonista foi administrado duas horas após a injeção de PGE_2 , foi detectada ativação ainda maior destes receptores (43%) (Fig. 31 A), quando comparado aos dados obtidos em animais não sensibilizados.

A administração intraplantar do agonista κ (U 50,488- 10 μ g/pata), em animais não sensibilizados, promoveu ativação de receptores opióides do tipo κ (22%), detectada 1 hora após o tratamento, quando comparado aos valores obtidos nos animais *naive*. Adicionalmente, quando o agonista foi administrado duas horas após a injeção de PGE_2 , ocorreu ativação ainda maior destes receptores (36%) (Fig. 31 B). Em relação ao agonista de receptor δ (Fig. 31 C), foi observado, 1 hora após a sua administração, ativação dos receptores opióides do tipo δ (21%). Diferentemente do observado com os demais agonistas, não foi detectada ativação do receptor δ pelo seu agonista, em animais pré-sensibilizados pela PGE_2 .

A injeção intraplantar do CRF (0,0006 μ g/pata), *per se*, não promoveu ativação significativa de receptores opióides do tipo μ , δ e κ , em animais *naive*. Entretanto, na presença de PGE_2 , ocorreu ativação de 34% para o receptor do tipo κ (Fig. 32 B), não sendo detectada porém, ativação dos receptores dos tipos μ ou δ (Fig. 32 A e 32 C), pelo peptídeo.

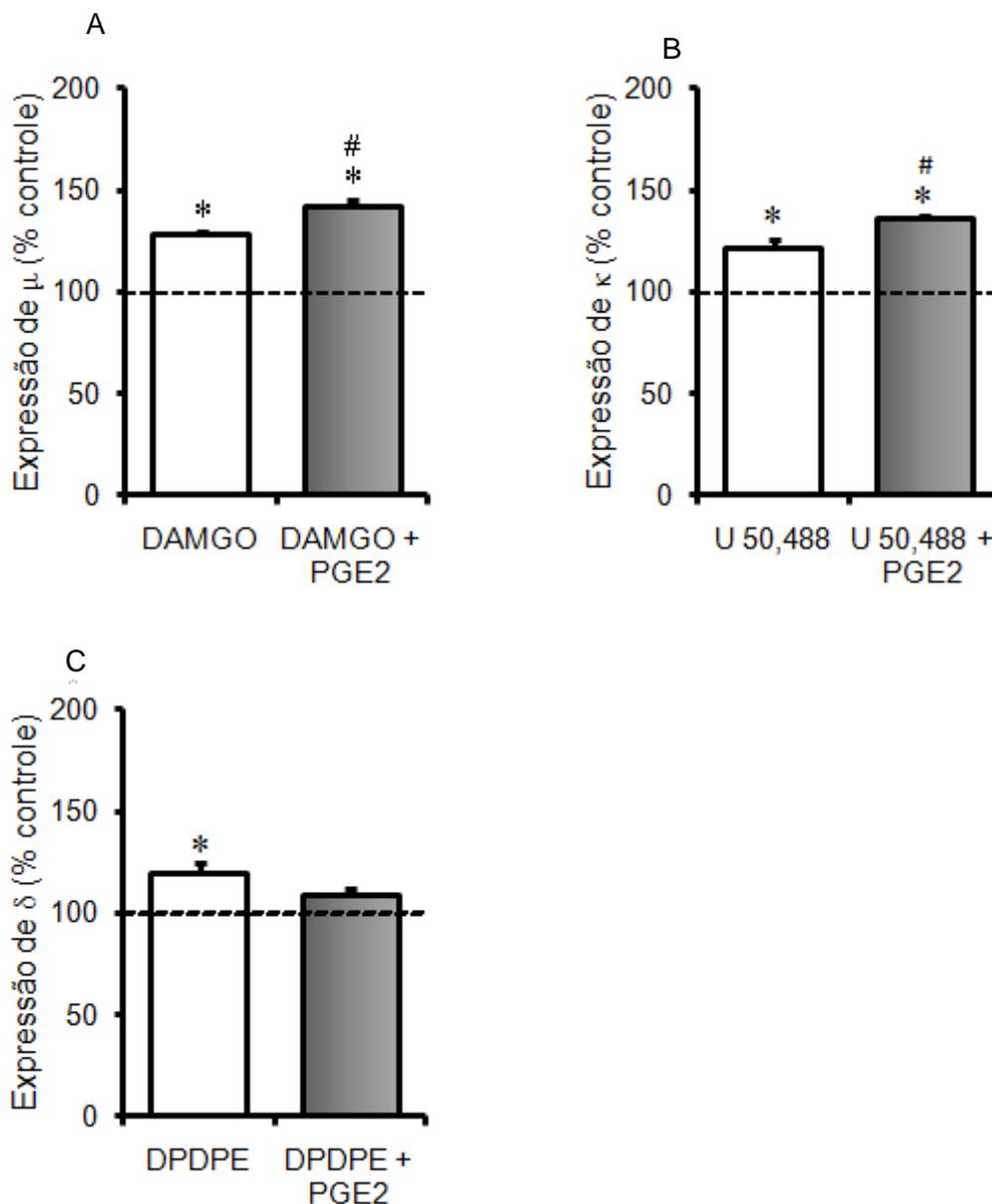


Figura 31- Efeito da administração intraplantar de DAMGO (5 μ g/pata) (A), U 50,488 (10 μ g/pata) (B) e DPDPE (20 μ g/pata) (C) na ativação de receptores opióides do tipo μ (A), κ (B) e δ (C) no nervo da pata de ratos, na presença ou ausência de prostaglandina E₂ (PGE₂). A ativação dos receptores foi avaliada por ELISA, em cortes de tecido do nervo da pata, obtidos 1 hora após o tratamento com os agonistas. Nos ensaios de sensibilização, a PGE₂ (100 ng/pata) foi administrada 2 antes dos agonistas. Foram utilizados anticorpos anti-receptor opióide que reconhecem apenas os receptores em sua forma ativa. Os valores estão apresentados como porcentagem em relação aos animais *naive* (linha tracejada). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em animais *naive* e # $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em animais tratados somente com o agonista.

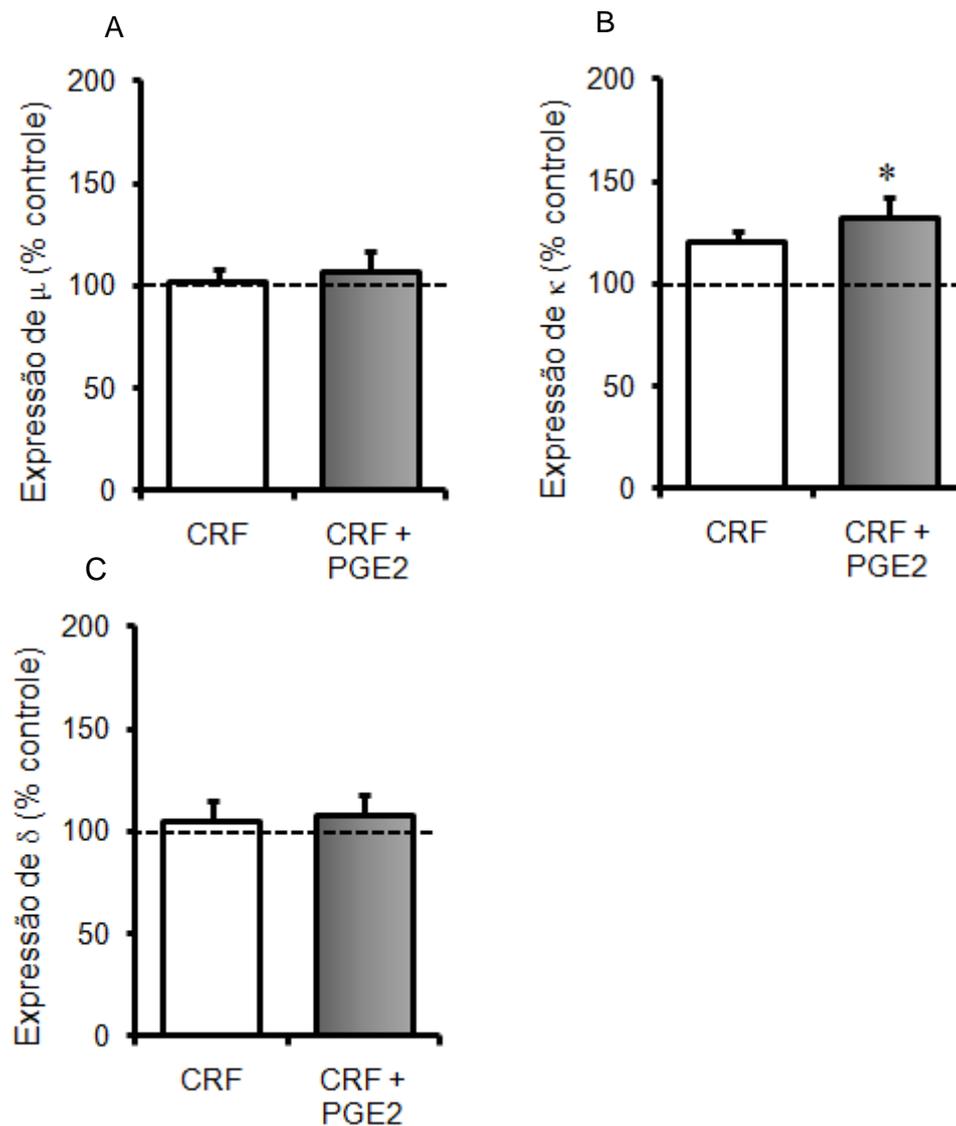


Figura 32- Efeito da administração intraplantar de Crotalina (CRF) (0.0006 $\mu\text{g/pata}$) na ativação de receptores opióides do tipo μ (A), κ (B) e δ (C) no nervo da pata de ratos, na presença ou ausência da constrição crônica do nervo isquiático de ratos (CCI). A ativação dos receptores foi avaliada por ELISA, em cortes de tecido do nervo da pata, obtidos 1 hora após o tratamento com a crotalina. Nos ensaios de sensibilização, a PGE_2 (100 ng/pata) foi administrada 2 antes da crotalina. Foram utilizados anticorpos anti-receptor opióide que reconhecem apenas os receptores em sua forma ativa. Os valores estão apresentados como porcentagem em relação aos animais *naive* (linha tracejada). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em animais *naive*.

4.2.4.2 Efeito dos agonistas seletivos e crotalfina na vigência de sensibilização por constrição crônica do nervo isquiático (CCI)

A Figura 33 mostra que a sensibilização induzida pela CCI não interferiu com a ativação de receptores opióides induzida pelo agonista μ (DAMGO, 5 $\mu\text{g/pata}$) (Fig. 33 A), κ (U 50, 488) (Fig. 33 B) ou δ (DAMGO, 20 $\mu\text{g/pata}$) (Fig. 33 C). Por outro lado, a sensibilização crônica (CCI) aumentou a ativação de receptores κ (173%) e δ (46%), pela crotalfina. Nestas mesmas condições, a crotalfina não promoveu alterações conformacionais em receptores μ , confirmando que o peptídeo, mesmo na vigência de sensibilização, não é capaz de ativar este tipo de receptor (Fig. 34).

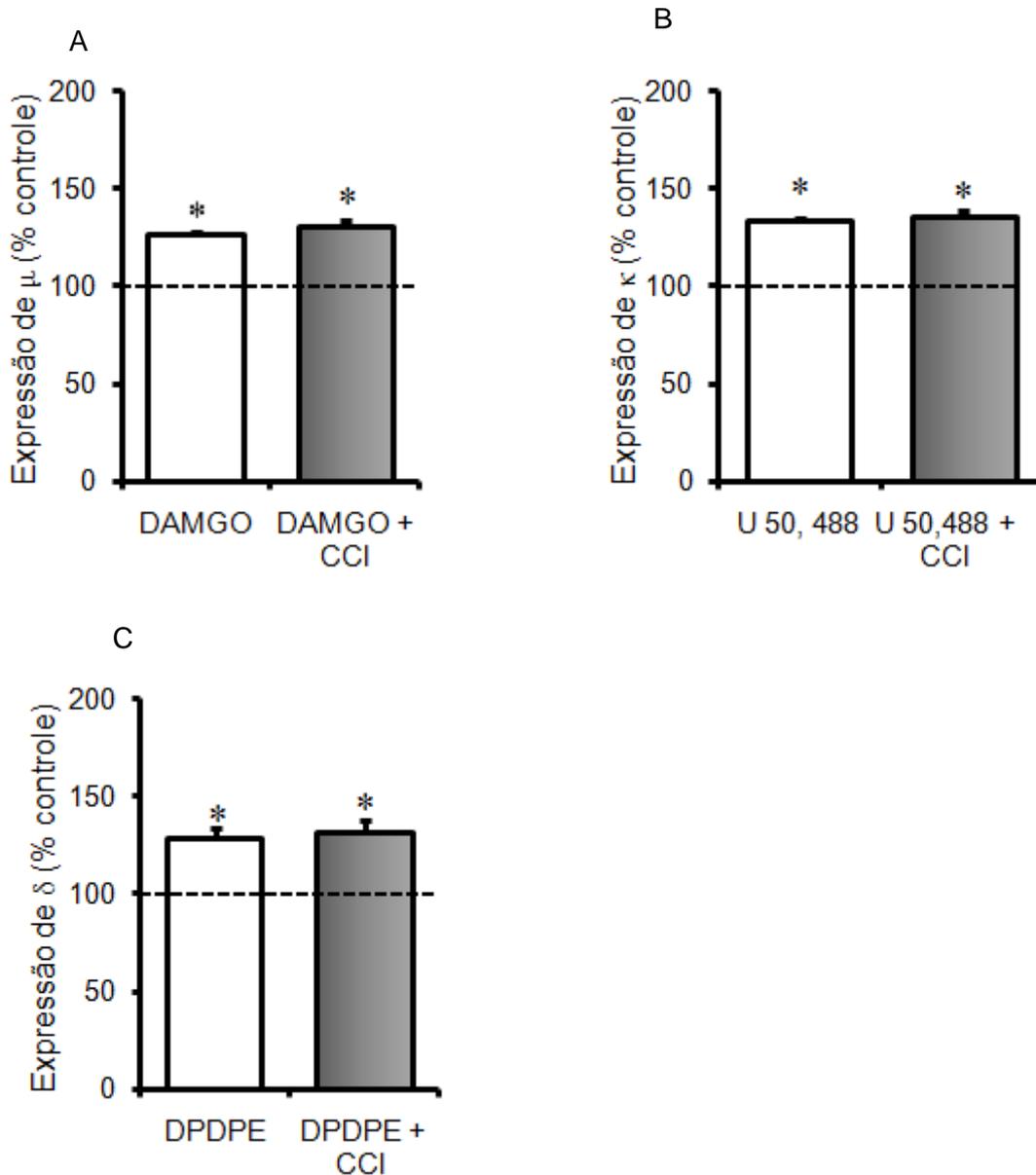


Figura 33- Efeito da administração intraplantar de DAMGO (5 $\mu\text{g/pata}$) (A), U 50,488 (10 $\mu\text{g/pata}$) (B) e DPDPE (20 $\mu\text{g/pata}$) (C) na ativação de receptores opióides do tipo μ (A), κ (B) e δ (C) no nervo da pata de ratos, na presença ou ausência da constrição crônica do nervo isquiático de ratos (CCI). A ativação dos receptores foi avaliada por ELISA, em cortes de tecido do nervo da pata, obtidos 1 hora após o tratamento com os agonistas. Nos ensaios de sensibilização, a CCI foi realizada 14 dias antes dos tratamentos com os agonistas. Foram utilizados anticorpos anti-receptor opióide que reconhecem apenas os receptores em sua forma ativa. Os valores estão apresentados como porcentagem em relação aos animais *naive* (linha tracejada). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em animais *naive*.

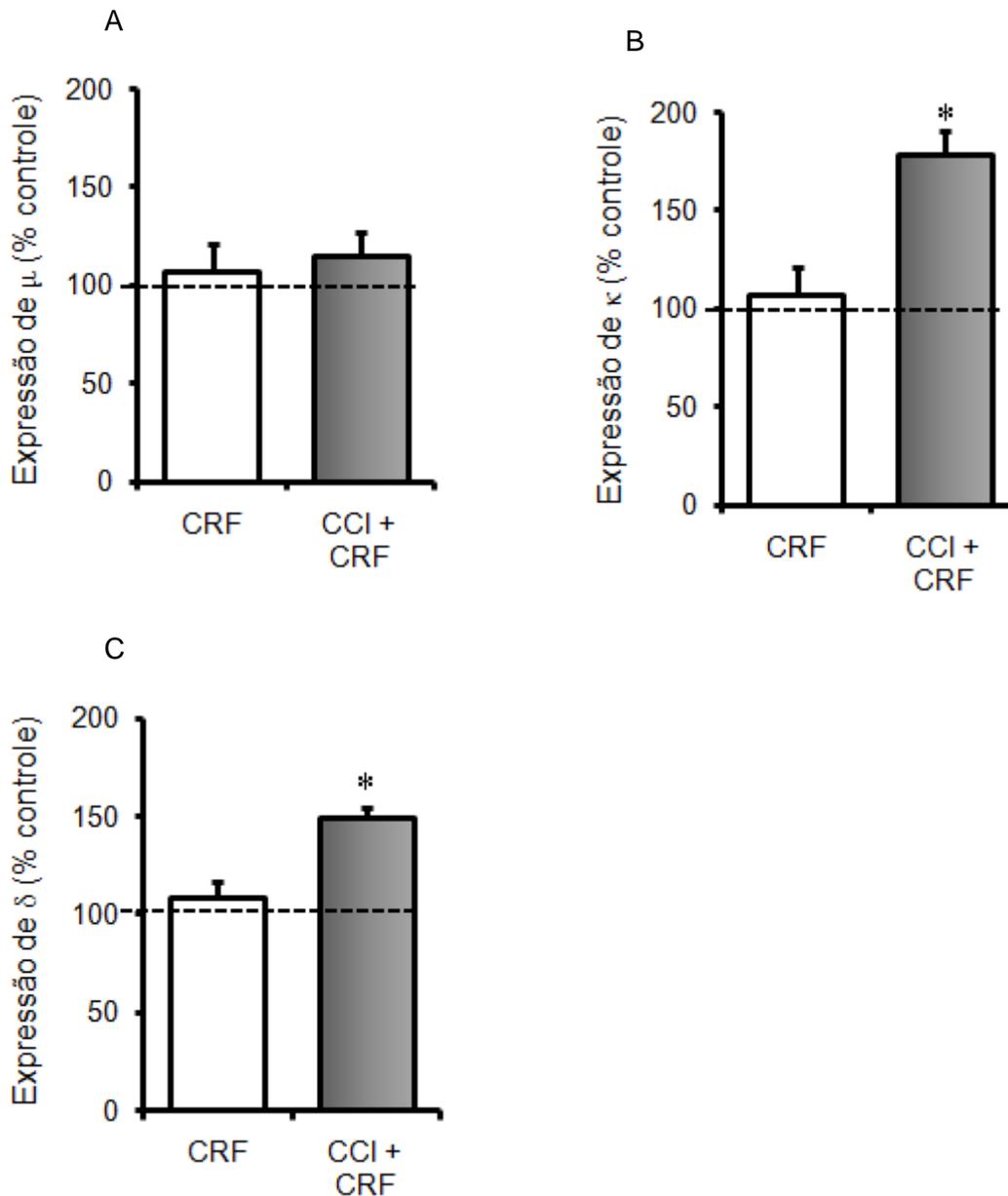


Figura 34- Efeito da administração intraplantar de Crotalina (CRF) (0.0006 μ g/pata) na ativação de receptores opióides do tipo μ (A), κ (B) e δ (C) no nervo da pata de ratos, na presença ou ausência da constrição crônica do nervo isquiático de ratos (CCI). A ativação dos receptores foi avaliada por ELISA, em cortes de tecido do nervo da pata, obtidos 1 hora após o tratamento com a crotalina. Nos ensaios de sensibilização, a CCI foi realizada 14 dias antes dos tratamentos com a crotalina. Foram utilizados anticorpos anti- receptor opióide que reconhecem apenas os receptores em sua forma ativa. Os valores estão apresentados como porcentagem em relação aos animais *naive* (linha tracejada). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em animais *naive*.

4.3 Ensaio *in vitro* utilizando cultura de células obtidas do gânglio da raiz dorsal (DRG) da medula espinha de ratos *naive*

Uma vez observado que a injúria periférica induzida pela PGE₂ em ratos, favorece a ativação de receptores opióides do tipo μ e κ por seus agonistas, investigamos se este eicosanóide seria capaz de induzir esta alteração por uma ação direta sobre a célula neuronal. Para tanto, a PGE₂ foi incubada com células do DRG obtidas de animais *naive*, e a ativação de receptores opióides, pelos agonistas e crotalina, foi avaliada utilizando os mesmos anticorpos descritos anteriormente. Adicionalmente, utilizando cultura de células do DRG, avaliamos algumas das possíveis vias de sinalização intracelular ativadas pela crotalina.

4.3.1 Efeito da prostaglandina E₂ (PGE₂) sobre a ativação de receptores opióides pelos seus agonistas

Inicialmente foi investigado se a PGE₂, quando incubada com as células do DRG em cultura, seria capaz de alterar a viabilidade destas células. A PGE₂, nas concentrações de 1, 10 e 100 μ M não alterou a viabilidade celular, avaliada pelo método de exclusão pelo azul de tripan (dados não mostrados). As concentrações de PGE₂ presentemente utilizadas, estão baseadas em dados de literatura mostrando que a PGE₂ acarreta alteração na expressão de receptores para taquicinas (SEGOND VON BANCHET et al., 2003).

A Figura 35 A mostra que a incubação das células do DRG com 1 μ M de DAMGO, agonista de receptor opióide μ , por 15 minutos, aumenta a quantidade de receptores μ em seu estado ativo (31 %), quando comparado aos valores obtidos em células incubadas apenas com o meio. Ainda, quando as células foram previamente incubadas com 1 μ M de PGE₂, por 15 minutos, a quantidade de receptores μ ativados aumentou em 78 %, na presença do agonista, quando comparado aos valores obtidos com as células não sensibilizadas. A concentração de agonista utilizada foi baseada em dados de literatura mostrando que esta concentração é eficaz em ativar receptores opióides μ em cultura de células neuronais (GUPTA et al., 2007).

A incubação dos DRGs com 1 μ M de U50,488, agonista de receptor opióide κ (Fig. 35 B) ou 1 μ M de DPDPE, agonista de receptor opióide δ (Fig. 35 C) promoveu aumento nos níveis de receptores κ (73%) e δ (178%) ativados, respectivamente, quando comparado com células incubadas apenas com o meio de cultura. A sensibilização prévia com PGE₂ aumentou a quantidade de receptores κ (154%), e diminuiu de 178% para 133 % os níveis de receptores δ ativados pelo respectivo agonista, quando comparado aos valores obtidos em células não sensibilizadas e tratadas com o agonista.

A incubação dos DRGs com 1 μ M de crotalina não interferiu com os níveis de receptores opióides do tipo κ ativados (Fig. 36). Contudo, na vigência de sensibilização por PGE₂, os níveis de receptores κ ativos aumentaram 58%, na presença de CRF, quando comparado aos valores obtidos em células controle incubadas apenas com o meio de cultura (Fig. 36).

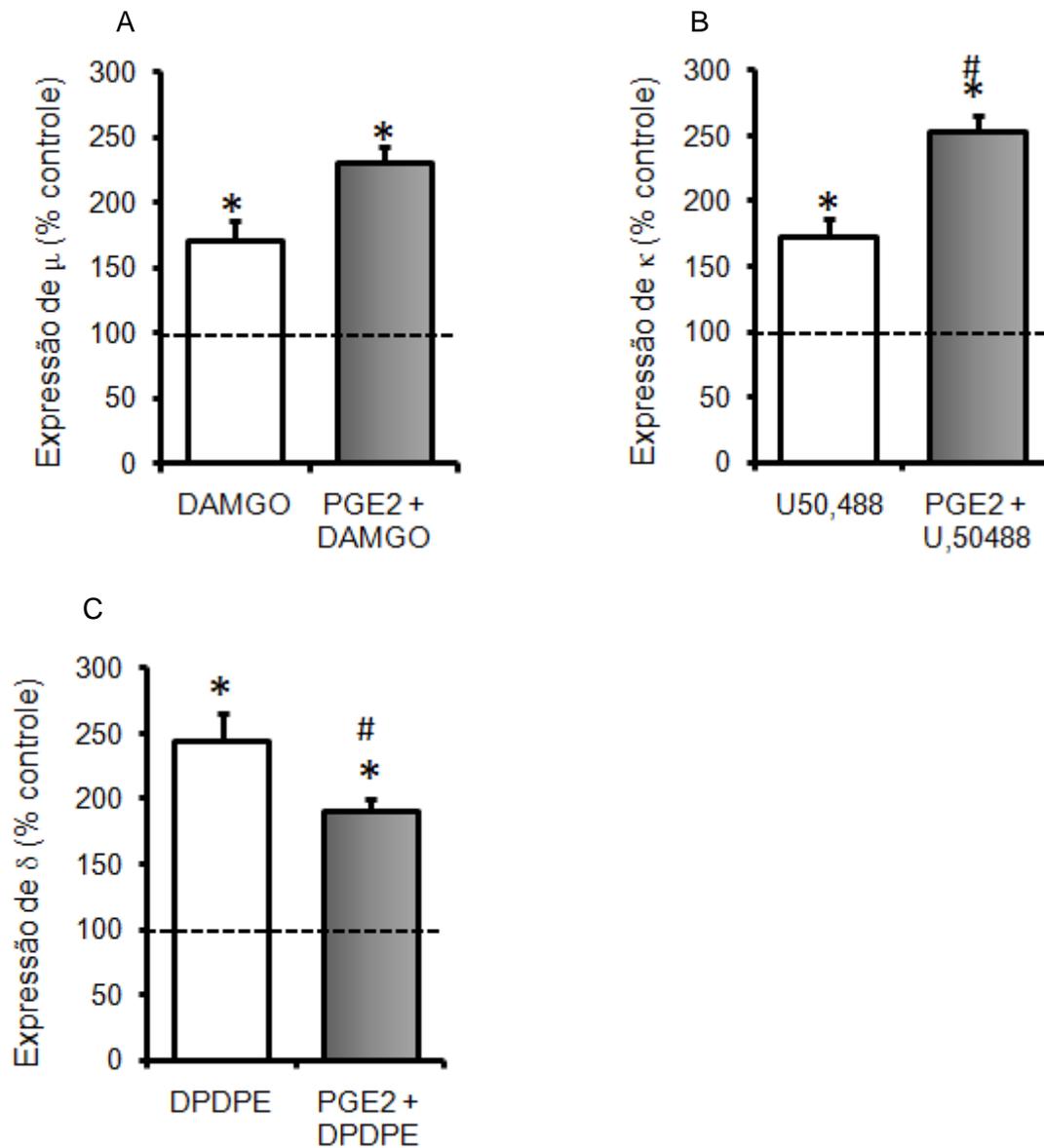


Figura 35- Efeito da prostaglandina E₂ sobre a ativação de receptores opióides pelo DAMGO (A), U 50,488 (B) e DPDPE (C). Células de DRG obtidas de ratos normais foram incubadas por 15 minutos, em atmosfera de 5% CO₂ (37°C) com PGE₂ ou veículo. Posteriormente, foram incubadas com o agonista (DAMGO, DPDPE ou U 50, 488), na concentração de 1 μ M, por 15 minutos. Para a detecção dos receptores opióides, foram utilizados anticorpos que reconhecem os receptores apenas em sua forma ativa (alteração conformacional). Os valores estão apresentados como porcentagem em relação às células não tratadas e incubadas com os mesmos anticorpos (linha tracejada). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos de células incubadas com veículo, # $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em células incubadas apenas com o agonista.

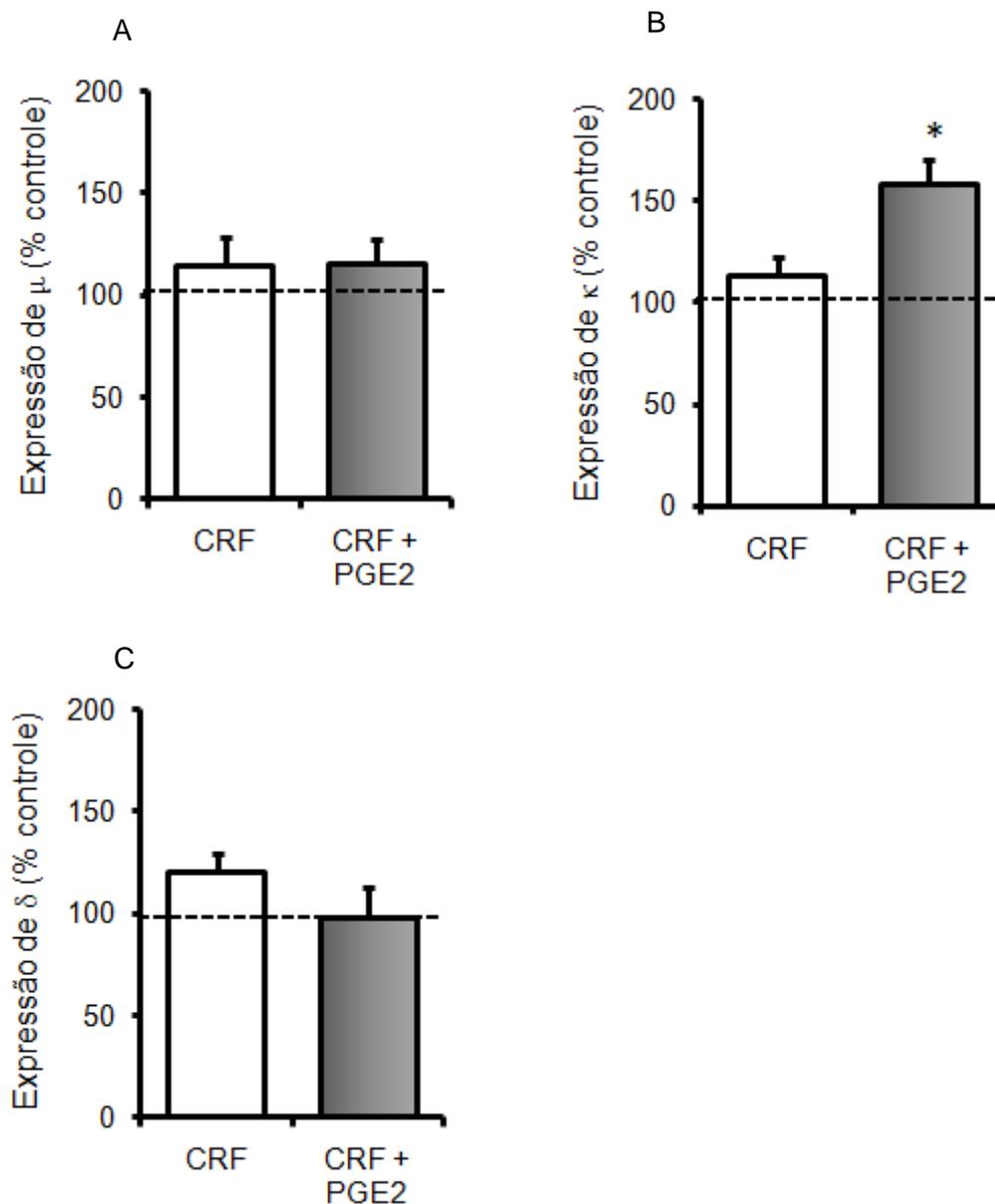


Figura 36- Efeito da prostaglandina E_2 sobre a ativação de receptores opióides do tipo μ (A) κ (B), δ (C) pela crotalina (CRF). Células de DRG obtidas de ratos *naive*, foram incubadas por 15 minutos em atmosfera de 5% CO_2 ($37^\circ C$), com PGE_2 ou veículo. Posteriormente, foram incubadas com crotalina ($1 \mu M$), por 15 minutos. Para a detecção dos receptores opióides foi utilizado anticorpos que reconhecem os receptores apenas em sua forma ativa (alteração conformacional). Os valores estão apresentados como porcentagem em relação às células não tratadas e incubadas com os mesmos anticorpos (linha tracejada). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos de células incubadas com veículo, # $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em células incubadas apenas com o agonista.

4.3.2 Efeito da crotalfina (A) e U 50,488 (B) sobre a concentração de GMP cíclico (GMPc) intracelular em cultura primária de células do DRG

Estudos prévios, realizados em nosso laboratório, demonstraram que o efeito antinociceptivo da crotalfina é mediado pela ativação da via L-arginina/óxido nítrico/GMPc/PKG e abertura de canais de K⁺ dependentes de ATP (GUTIERREZ et al., submetido). Ainda, outros grupos mostraram a importância desta via na antinocicepção periférica induzida por diferentes fármacos analgésicos (CUNHA et al., 2010; SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004). Assim, investigamos se a crotalfina é capaz de promover a produção de GMPc em células do DRG em cultura, na vigência ou ausência de sensibilização por PGE₂. Neste ensaio, foi utilizado como controle positivo, U 50,488, agonista de receptor opióide do tipo κ .

Os resultados apresentados na Figura 37 A mostram que a incubação de 1×10^6 células obtidas do DRG, com crotalfina (0,1; 1 ou 10 μ M), resultou no aumento das concentrações de GMPc (2,2; 2,45; 2,54 fmol/200 μ L, respectivamente), quantificados após lise celular, no tampão de lise. A pré-incubação destas células com PGE₂ promoveu aumento ainda mais significativo na liberação deste segundo mensageiro, pela crotalfina, nas concentrações de 1 (3,2 fmol/ 200 μ L) e 10 μ M (3,85 fmol/200 μ L), correspondente a um aumento de 31 e 55 %, respectivamente, quando comparado aos valores obtidos nas células incubadas apenas com crotalfina (Fig. 35A). O Nor-BNI, antagonista de receptor opióide do tipo κ , em concentrações equimolares à crotalfina (0,1; 1 ou 10 μ M), reverteu o efeito induzido pela crotalfina.

A incubação de com U 50,489 nas concentrações de 1 ou 10 μ M, mas não na concentração de 0,1 μ M, acarretou também aumento nas concentrações de GMPc (4,4 e 5,4 fmol/200 μ L, respectivamente). A pré-incubação destas células com PGE₂ promoveu aumento significativo na liberação deste mediador, nas três concentrações testadas 0,1, 1 e 10 μ M (3,04; 5,9 e 7,09 fmol/200 μ L - 68, 34 e 42 %, respectivamente), quando comparado aos valores obtidos nas células incubadas apenas com o agonista (Fig. 37 B). O Nor-BNI, antagonista de receptor opióide do tipo κ , em concentrações equimolares ao U 50,488, (0,1; 1 ou 10 μ M) reverteu o efeito induzido pelo agonista κ .

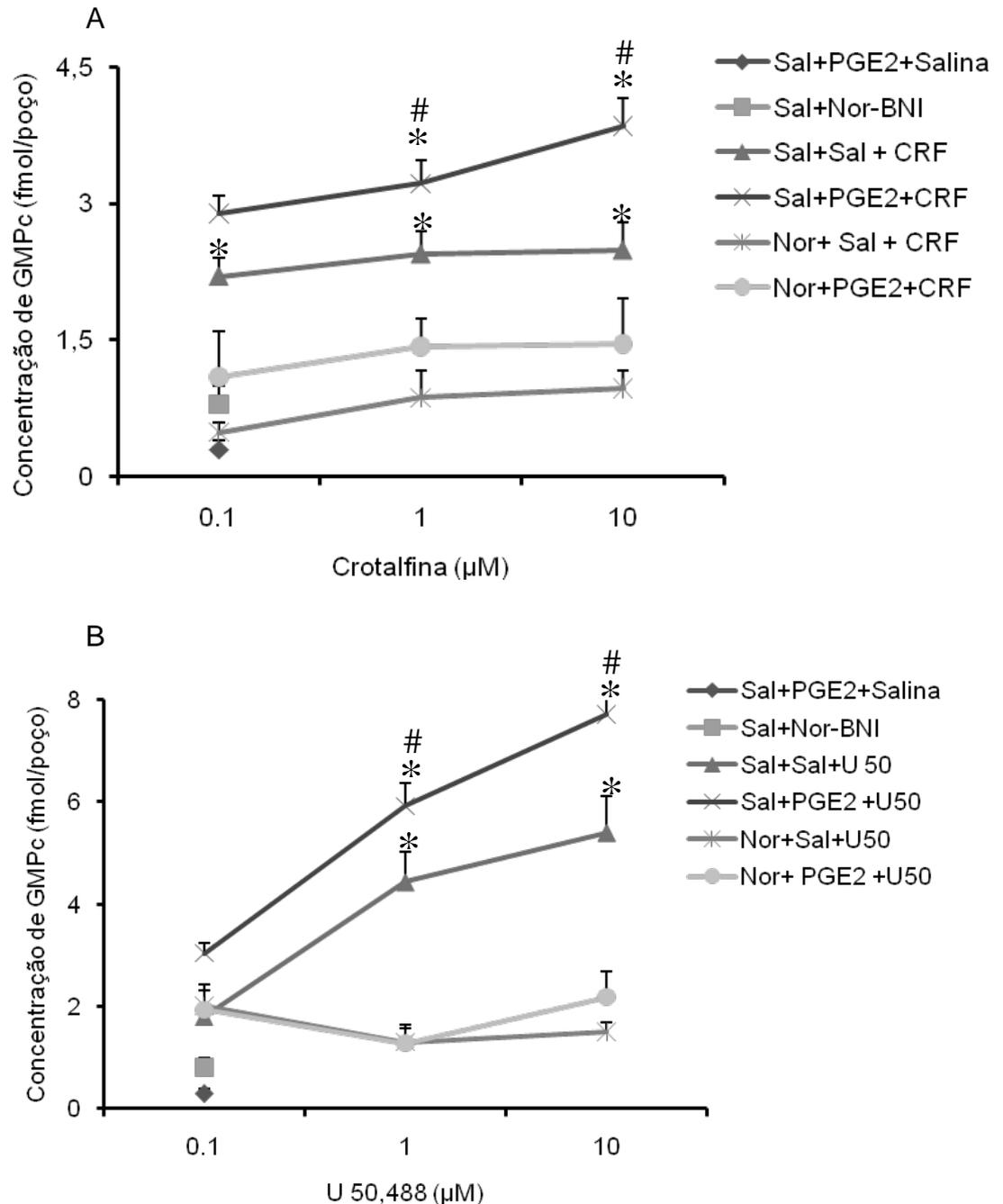


Figura 37- Efeito da crotalina (CRF) (A) e do U 50,488 (B) sobre a concentração de GMP cíclico intracelular em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG). Células de DRG obtidas de ratos normais foram incubadas por 15 minutos em atmosfera de 5% CO₂ (37°C) com salina ou prostaglandina E₂ (PGE₂). Posteriormente foram incubadas com crotalina (CRF) ou U 50,488 (0.1, 1 ou 10 μM). Para investigar o envolvimento de receptores κ, as células foram pré-incubadas por 30 minutos com Nor-BNI (em concentração equimolar à crotalina) ou agonista ou veículo (controle). O GMP cíclico intracelular foi dosado por meio de ensaio imunoenzimático. *p< 0,05 por comparação com grupo Sal+Sal+PGE, #p< 0,05 por comparação com o grupo Sal+Sal+CRF (A) ou Sal+Sal+U50 (B).

4.3.3 Efeito da crotalina sobre a ativação da Akt em células do gânglio da raiz dorsal (DRG), na vigência ou ausência de sensibilização por PGE₂

Baseado em dados de literatura mostrando que a ativação da serina/treonina quinase Akt é importante para o efeito antinociceptivo periférico de opióides como a morfina, DAMGO (agonista de receptores μ) e U 50, 488 (agonista de receptores κ) (CUNHA et al. 2010), investigamos se a crotalina é capaz de ativar esta via.

A incubação de células do DRG com PGE₂ (1 μ M), acarretou aumento na fosforilação da Akt (47%), quando comparado ao grupo controle (salina). A crotalina (1 μ M) não interferiu com a fosforilação da Akt, em comparação com células controles ou com células pré-incubadas com PGE₂ (Fig. 38 A).

O tratamento com o agonista de receptor opióide do tipo κ , U 50,488, na concentração de 1 μ M promoveu aumento na fosforilação da Akt (52%) quando comparados com o grupo controle (Fig. 38 B). A pré-incubação de células com PGE₂ acarretou aumento maior nos níveis de fosforilação (20%), em relação ao grupo tratado apenas com o agonista.

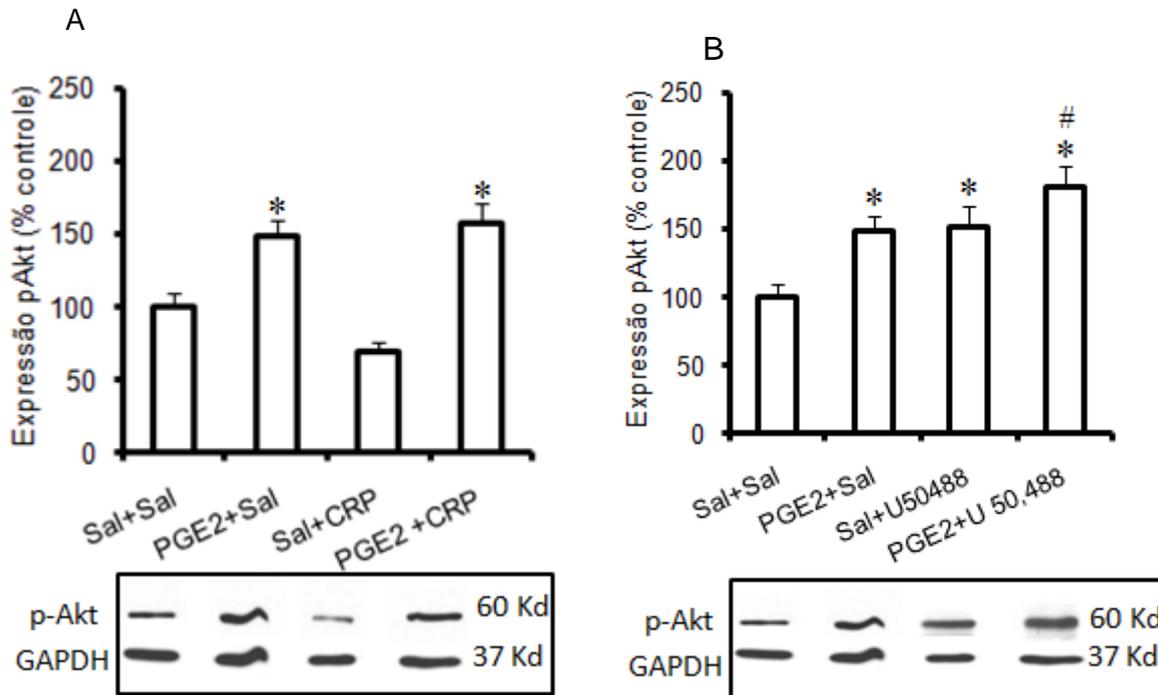


Figura 38 - Efeito da crotalina (A) e do U 50,488 (B) sobre a fosforilação da Akt em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG). Células de DRG obtidas de ratos normais foram incubadas por 15 minutos, em atmosfera de 5% CO₂ (37°C), com PGE₂ ou veículo. Posteriormente, as células foram incubadas com crotalina (CRF) (1 μM) ou U 50,488 (1 μM) por 15 minutos. A expressão da Akt foi avaliada por *western blotting*. Os resultados estão normalizados pela expressão de GAPDH e apresentados como porcentagem em relação as células tratadas apenas com salina (grupo controle, primeira barra). Foram realizados três experimentos independentes. *p < 0,05 por comparação com os valores obtidos de células do grupo Sal+Sal e #p < 0,05 por comparação com os valores obtidos de células do grupo Sal+U 50,488.

4.3.4 Efeito da crotalfina sobre a ativação da ERK1/2 e JNK em células do gânglio da raiz dorsal (DRG), na vigência ou ausência de sensibilização por PGE₂

Uma vez que os estudos utilizando o anticorpo conformação específica indicaram que a sensibilização prévia é importante para a ativação de receptores opióides do tipo κ pela crotalfina, investigamos se este tipo de sensibilização era capaz de interferir com a sinalização intracelular induzida pelo peptídeo. Para tanto, avaliamos a ativação de ERK1/2, pela crotalfina, uma vez que dados de literatura tem demonstrado que ocorre ativação desta via em células estimuladas agudamente com agonistas de receptores opióides do tipo μ e κ (BRUCHAS e CHAVKIN, 2010). Quando ativadas, estas MAPquinases tornam-se fosforiladas.

A incubação de células do DRG com PGE₂ (1 μ M) não acarretou alteração nos níveis de ERK 1/2 fosforilada, quando comparado aos valores do grupo controle (salina). Por outro lado, a incubação com CRF (1 μ M) promoveu aumento na fosforilação desta quinase (6 vezes), em relação ao grupo controle (Fig. 39). Ainda, a pré-incubação destas células com PGE₂ e posterior incubação com CRF, promoveu aumento ainda maior nos níveis de fosforilação da ERK1/2, quando comparado aos valores obtidos em células incubadas apenas com o CRF (1,5 vezes) (Fig. 40). A pré-incubação das células com Nor-BNI, antagonista de receptor opióide do tipo κ , bloqueou significativamente o aumento na fosforilação induzida pela crotalfina, tanto na presença quanto ausência de PGE₂ (Fig. 39).

O agonista de receptor opióide do tipo κ , U 50, 488 (1 μ M), utilizado como controle positivo, promoveu aumento fosforilação da ERK 1/2 (7 vezes), quando comparado ao grupo controle (Fig. 39). Quando as células foram pré-incubados com PGE₂, ocorreu fosforilação ainda maior da ERK1/2, quando comparado às células incubadas somente com o agonista (1,4 vezes) (Fig. 40).

Em relação à JNK, os resultados apresentados na Figura 41 mostram que a PGE₂, *per se*, não interferiu com a fosforilação desta quinase. Por outro lado, células incubadas com CRF apresentaram maior fosforilização desta quinase (9 vezes), quando comparado aos valores obtidos em células controle tratadas com salina. Novamente, a pré-incubação destas células com PGE₂ favoreceu a fosforilação desta quinase pela crotalfina, quando comparado aos valores obtidos em células

tratadas apenas com o CRF (1,5 vezes). O pré-tratamento com Nor-BNI, antagonista de receptor do receptor κ , não interferiu com a fosforilação da JNK induzida pela crotalfina. Contudo, o Nor-BNI, *per se*, induziu aumento na fosforilação da JNK (13 vezes) (Fig. 41). A incubação com U 50,888, tanto na ausência, quanto na presença de PGE₂, promoveu aumento na fosforilação desta quinase (2,5 e 3,5 vezes, respectivamente) (Fig. 42).

Uma vez que a crotalfina é capaz de ativar estas quinases e que este efeito é mediado por receptores opióides do tipo κ e potencializado pela PGE₂, investigamos o possível mecanismo envolvido na ativação destas quinases pelo peptídeo. Dados de literatura indicam que o efeito de agonista de receptor opióide κ sobre a sinalização de MAPKs, em astrócitos, é mediado pela PKC ζ (BELCHEVA et al., 2005).

Assim, investigamos presentemente se a PKC ζ é capaz de modular a ativação da ERK e JNK induzidas pela crotalfina. É importante ressaltar que os dados são ainda preliminares, uma vez que foi realizado apenas um experimento.

As células foram pré-incubadas com o peptídeo PKC ζ pseudosubstrato (peptídeo inibidor da PKC ζ). Este peptídeo é conjugado a uma sequência de aminoácidos chamada TAT, que direciona o peptídeo para dentro da célula.

Células controle, pré-incubadas apenas com a TAT e então, com salina ou PGE₂, seguida pela incubação com salina ou crotalfina, apresentaram padrão semelhante de fosforilação da ERK e JNK ao detectado nos experimentos descritos anteriormente (Figs. 43 e 44). O pré-tratamento com o peptídeo inibidor da PKC ζ inibiu o aumento da fosforilação da ERK1/2 induzida pela crotalfina, na ausência (55% de inibição), ou presença (100% de inibição) de PGE₂ (Fig. 43).

Em relação à JNK, a PKC ζ pseudosubstrato não interferiu com o aumento da fosforilação desta quinase induzida pela crotalfina. Interessantemente, quando as células foram pré-incubadas com PGE₂, este peptídeo foi capaz de bloquear o aumento da fosforilação desta quinase, induzida pela crotalfina (Fig. 44).

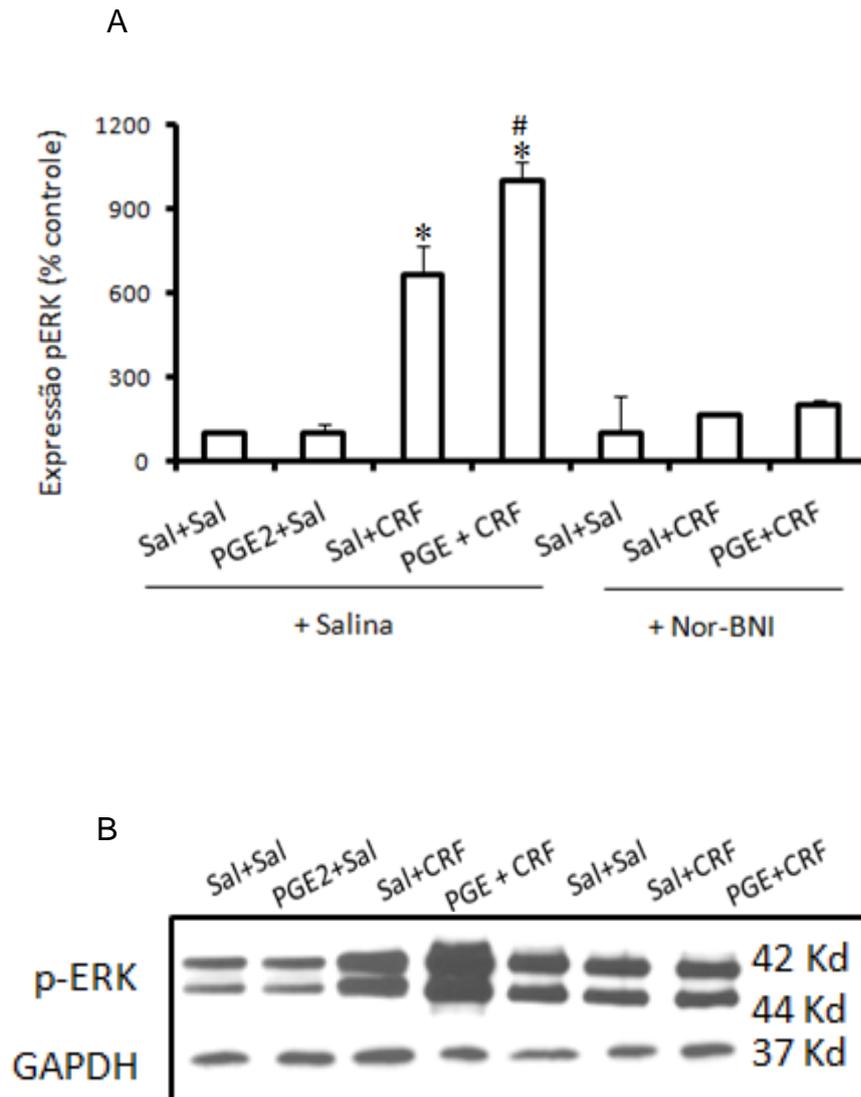


Figura 39 - Efeito da crotalina sobre a fosforilação da ERK1/2 em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG). Células de DRG obtidas de ratos normais, foram incubadas por 15 minutos, em atmosfera de 5% CO₂ (37°C), com PGE₂ ou veículo. Posteriormente foram incubadas com crotalina (CRF) (1 μM), por 15 minutos. Para investigar o envolvimento de receptores κ, as células foram pré-incubadas por 30 minutos, com Nor-BNI ou veículo (controle). (A) A expressão da ERK1/2 foi avaliada por *western blotting*. Os resultados estão normalizados pela expressão de GAPDH e apresentados como porcentagem em relação às células tratadas apenas com salina (grupo controle, primeira barra). (B) Imagem ilustrativa e representativa das bandas analisadas para a quantificação dos dados. Foram realizados três experimentos independentes. *p < 0,05 por comparação com os valores obtidos de células do grupo controle, #p < 0,05 por comparação com os valores obtidos de células do grupo CRF+Salina.

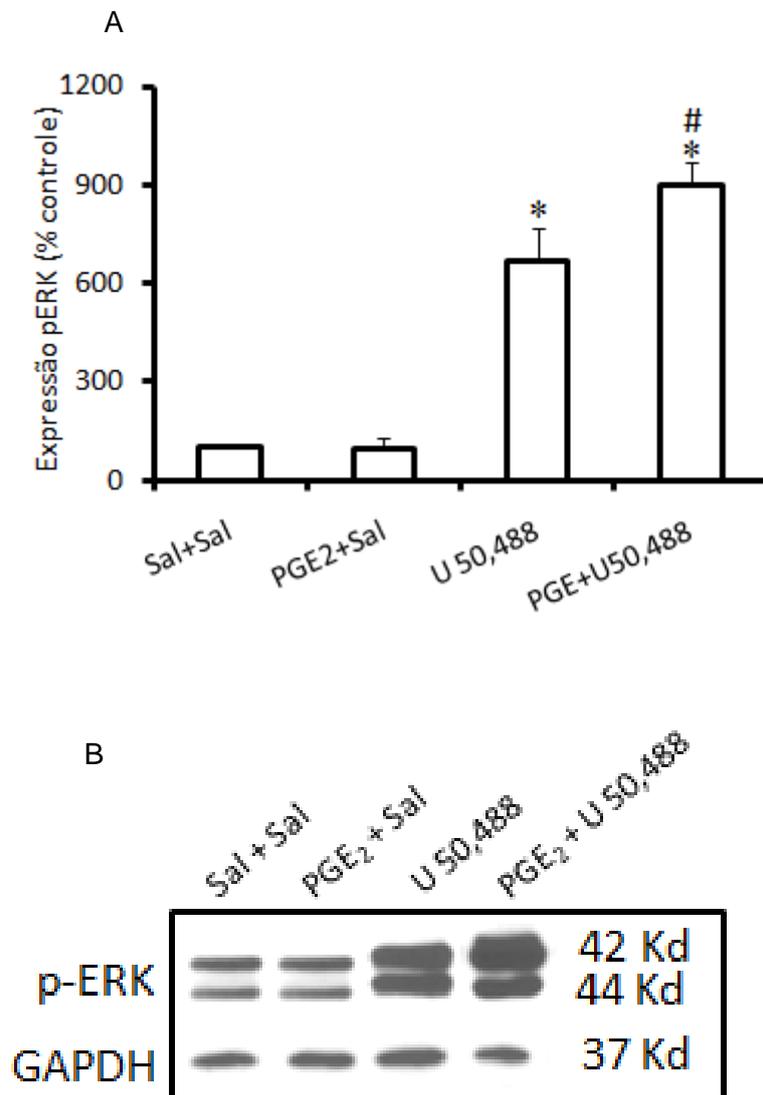


Figura 40 - Efeito do U 50,888 sobre a fosforilação da Erk1/2 em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG). Células de DRG obtidas de ratos normais, foram incubadas por 15 minutos, em atmosfera de 5% CO₂ (37°C), com PGE₂ ou veículo. Posteriormente foram incubadas com U 50,488 (1 μM), por 15 minutos. (A) A expressão da ERK1/2 foi avaliada por *western blotting*. Os resultados estão normalizados pela expressão de GAPDH e apresentados como porcentagem em relação às células tratadas apenas com salina (grupo controle, primeira barra). (B) Imagem ilustrativa e representativa das bandas analisadas para a quantificação dos dados. Foram realizados três experimentos independentes. * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos de células do grupo controle, # $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos de células do grupo U 50,488+Salina.

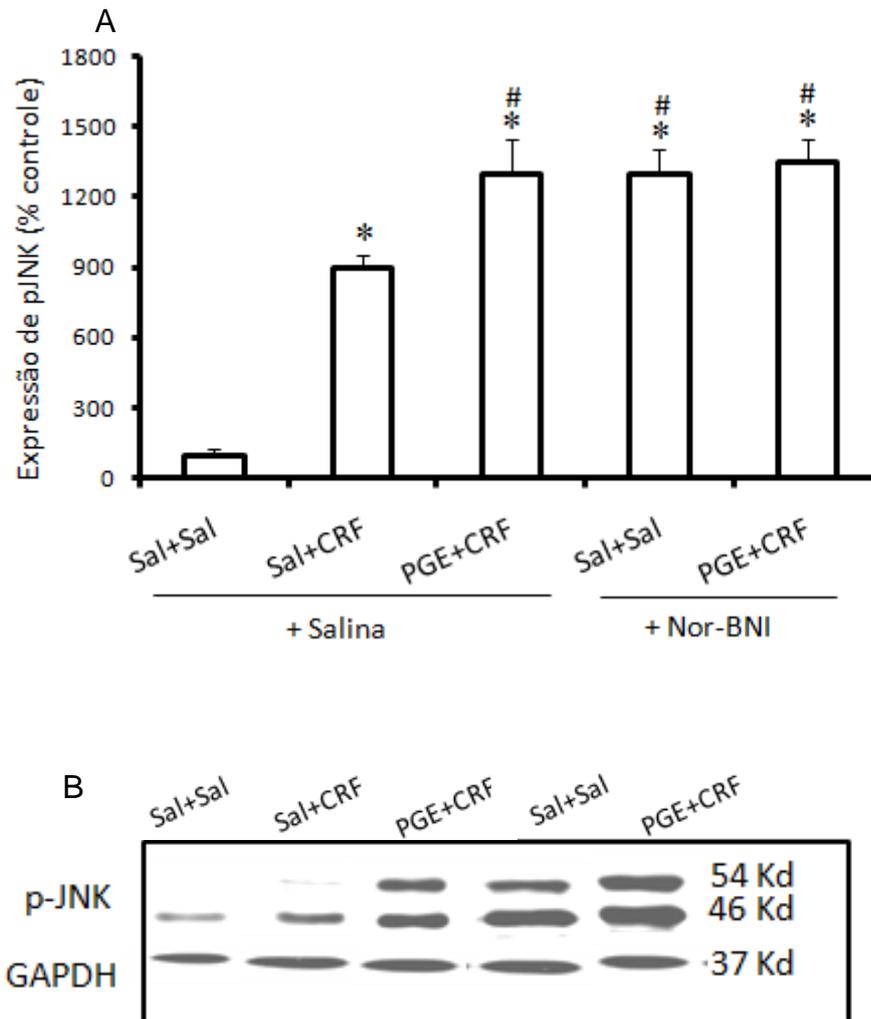


Figura 41 - Efeito da crociferina sobre a fosforilação da JNK1/2 em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG). Células de DRG obtidas de ratos normais, foram incubadas por 15 minutos, em atmosfera de 5% CO₂ (37°C), com PGE₂ ou veículo, ou 30 minutos com Nor-BNI. Posteriormente, as células foram incubadas com crociferina, (CRF) (1 μM), por 15 minutos. Para investigar o envolvimento de receptores κ, as células foram pré-incubadas 30 minutos com Nor-BNI ou veículo (controle). (A) A expressão da JNK foi avaliada por *western blotting*. Os resultados estão normalizados pela expressão de GAPDH e apresentados como porcentagem em relação as células tratadas apenas com salina (grupo controle, primeira barra). (B) Imagem ilustrativa e representativa das bandas analisadas para a quantificação dos dados. Foram realizados três experimentos independentes. *p < 0,05 por comparação com os valores obtidos de células do grupo controle, #p < 0,05 por comparação com os valores obtidos de células do grupo CRF+Salina.

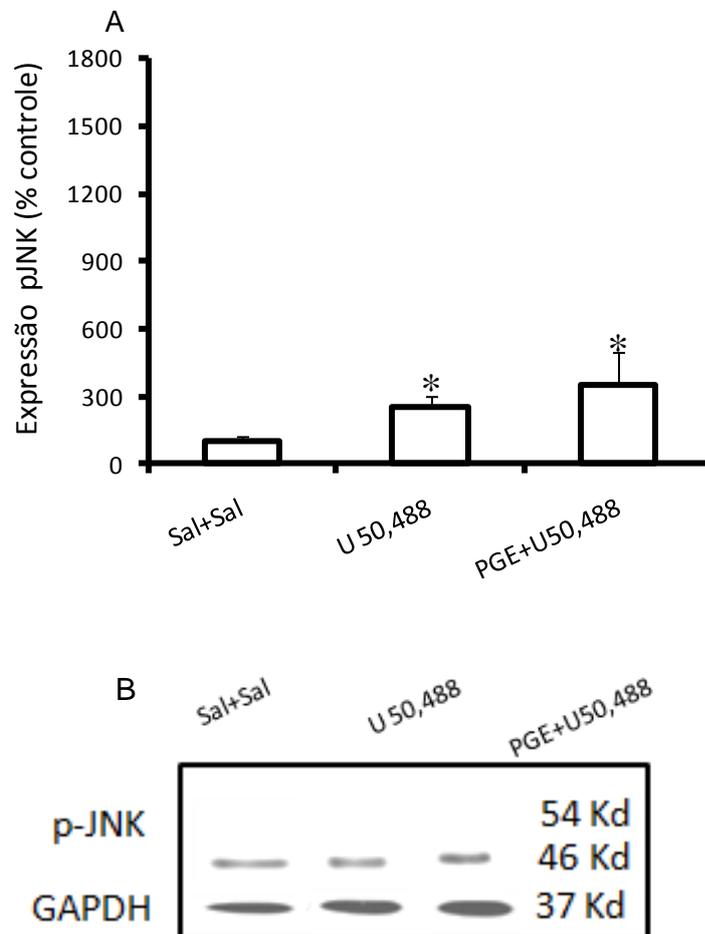


Figura 42 - Efeito do U 50,488 (B) sobre a fosforilação da JNK1/2 em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG). Células de DRG obtidas de ratos normais, foram incubadas por 15 minutos, em atmosfera de 5% CO₂ (37°C), com PGE₂. Posteriormente, as células foram incubadas com U 50,488 (1 μM), por 15 minutos. A expressão da JNK foi avaliada por *western blotting*. (A) Os resultados estão normalizados pela expressão de GAPDH e apresentados como porcentagem em relação as células tratadas apenas com salina (grupo controle, primeira barra). (B) Imagem ilustrativa e representativa das bandas analisadas para a quantificação dos dados. Foram realizados três experimentos independentes. * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos de células do grupo controle.

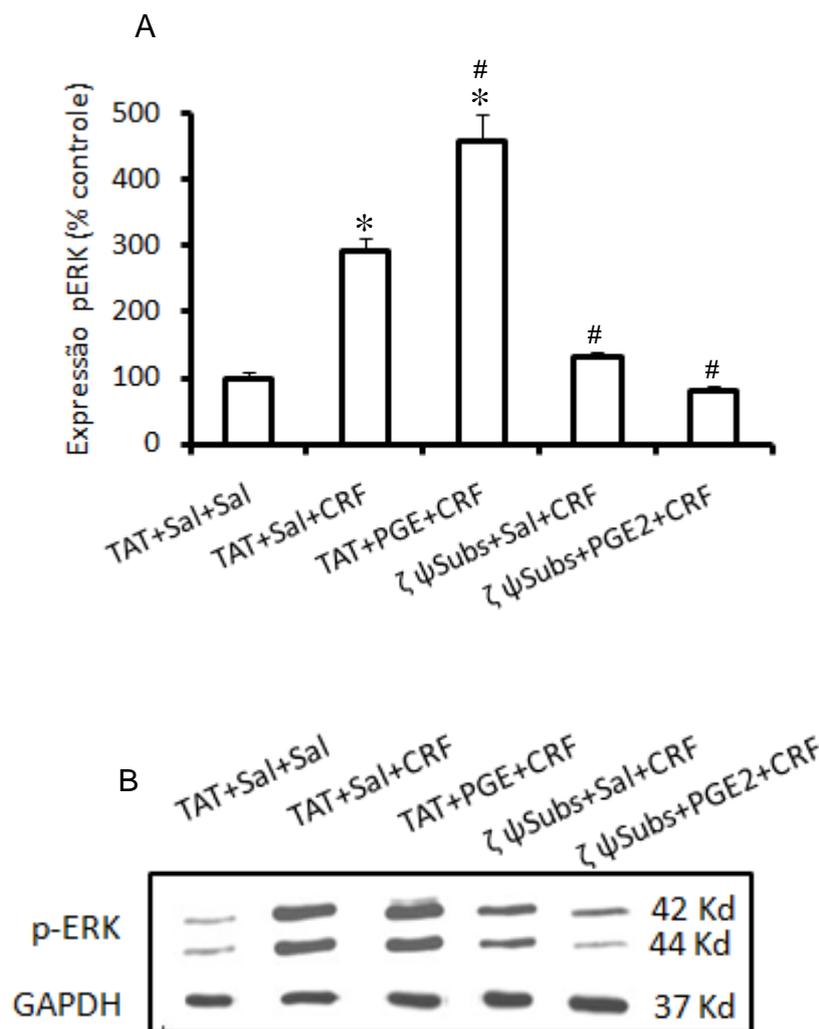


Figura 43 – Participação da PKC ζ no efeito da crotalina sobre a fosforilação da ERK1/2 em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG). Células de DRG obtidas de ratos normais, foram incubadas por 15 minutos, em atmosfera de 5% CO₂ (37°C), com TAT (controle) ou ζpseudosubstrato (ζψSubs) e, em seguida, por 15 minutos com PGE₂ ou veículo. Posteriormente, as células foram incubadas com crotalina (CRF) (1 μM) e TAT ou ζψSubs, por 15 minutos. (A) A expressão da pERK1/2 foi avaliada por *western blotting*. Os resultados estão normalizados pela expressão de GAPDH total e apresentados como porcentagem em relação às células tratadas apenas com salina (grupo controle, primeira barra). (B) Imagem ilustrativa e representativa das bandas analisadas para a quantificação dos dados. Foram realizados três experimentos independentes. *p < 0,05 por comparação com os valores obtidos de células do grupo controle, #p < 0,05 por comparação com os valores obtidos de células do grupo CRF+Salina.

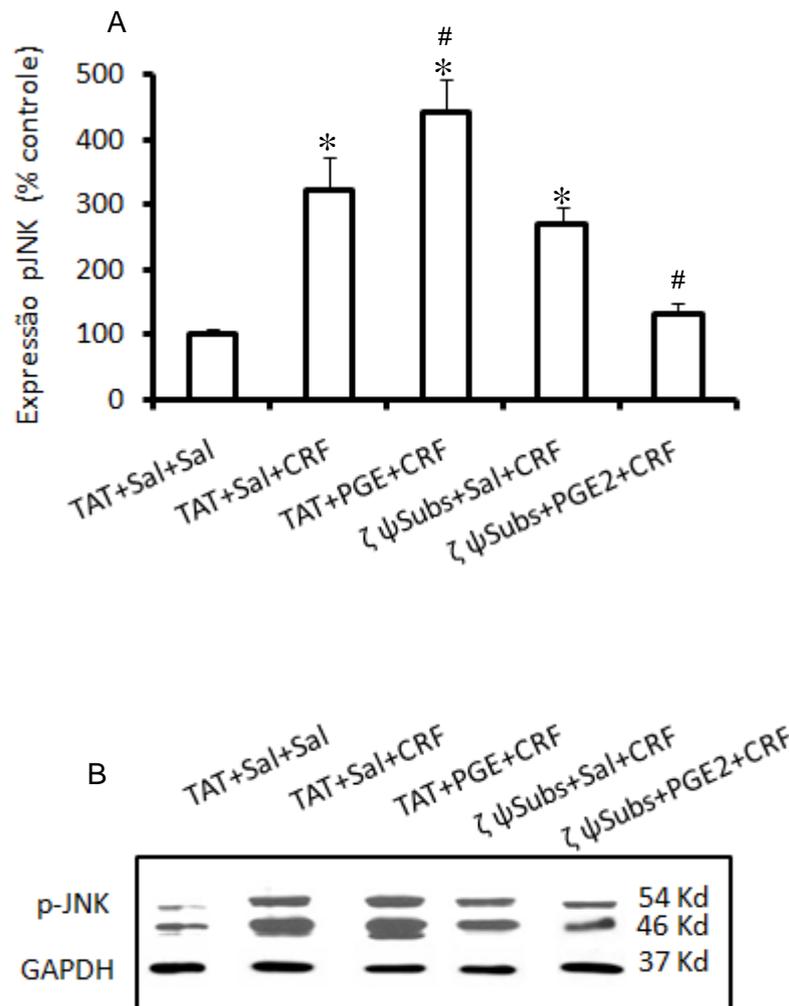


Figura 44 - Participação da PKC ζ no efeito da crotalina sobre a fosforilação da JNK1/2 em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG). Células de DRG obtidas de ratos normais, foram incubadas por 15 minutos, em atmosfera de 5% CO₂ (37°C), com TAT (controle) ou ζψseudosubstrato (ζψSubs) e, em seguida, por 15 minutos com PGE₂ ou veículo. Posteriormente, as células foram incubadas com crotalina (CRF) (1 μM) e TAT ou ζψSubs, por 15 minutos. A expressão de pJNK foi avaliada por *western blotting*. Os resultados estão normalizados pela expressão de GAPDH total e apresentados como porcentagem em relação às células tratadas apenas com salina (grupo controle, primeira barra). (B) Imagem ilustrativa e representativa das bandas analisadas para a quantificação dos dados. Foram realizados três experimentos independentes. *p < 0,05 por comparação com os valores obtidos de células do grupo controle, #p < 0,05 por comparação com os valores obtidos de células do grupo CRF+Salina.

4.3.5 Efeito da crotalina sobre o influxo de cálcio induzido pela capsaicina e prostaglandina E₂ (PGE₂)

Com o intuito de avaliar se, em nossas condições experimentais, a crotalina, assim como outros opióides, apresentam efeito inibitório sobre a concentração intracelular de íons envolvidos nos processos nociceptivos, no DRG, realizamos um ensaio inicial sobre a mobilização de cálcio intracelular, no DRG. Estes ensaios foram realizados em colaboração com o Departamento de Neurobiologia da Universidade de Stanford, EUA. A incubação de células do DRG com capsaicina (200 nM), promoveu aumento no influxo de cálcio nestas células (foram analisadas 25 células durante 200 segundos) (Fig. 45). O pré-tratamento com crotalina (1 µM), por 15 minutos, não interferiu com o aumento no influxo de cálcio induzido pela capsaicina. Ainda, a incubação destas células com PGE₂ (10 µM), promoveu aumento nos níveis de cálcio intracelular (Fig. 45C). Interessantemente, a pré-incubação com crotalina, nas células sensibilizadas por PGE₂, bloqueou este efeito (avaliado durante aproximadamente 600 segundos). Após este período, as mesmas células foram tratadas com capsaicina, sendo detectado aumento no influxo de cálcio nestas células. Esta resposta sugere que as células analisadas estavam responsivas a estímulos químicos. Cabe ressaltar que estes ensaios são preliminares, sendo necessários experimentos adicionais para ampliarmos o n experimental e aplicação do teste estatístico.

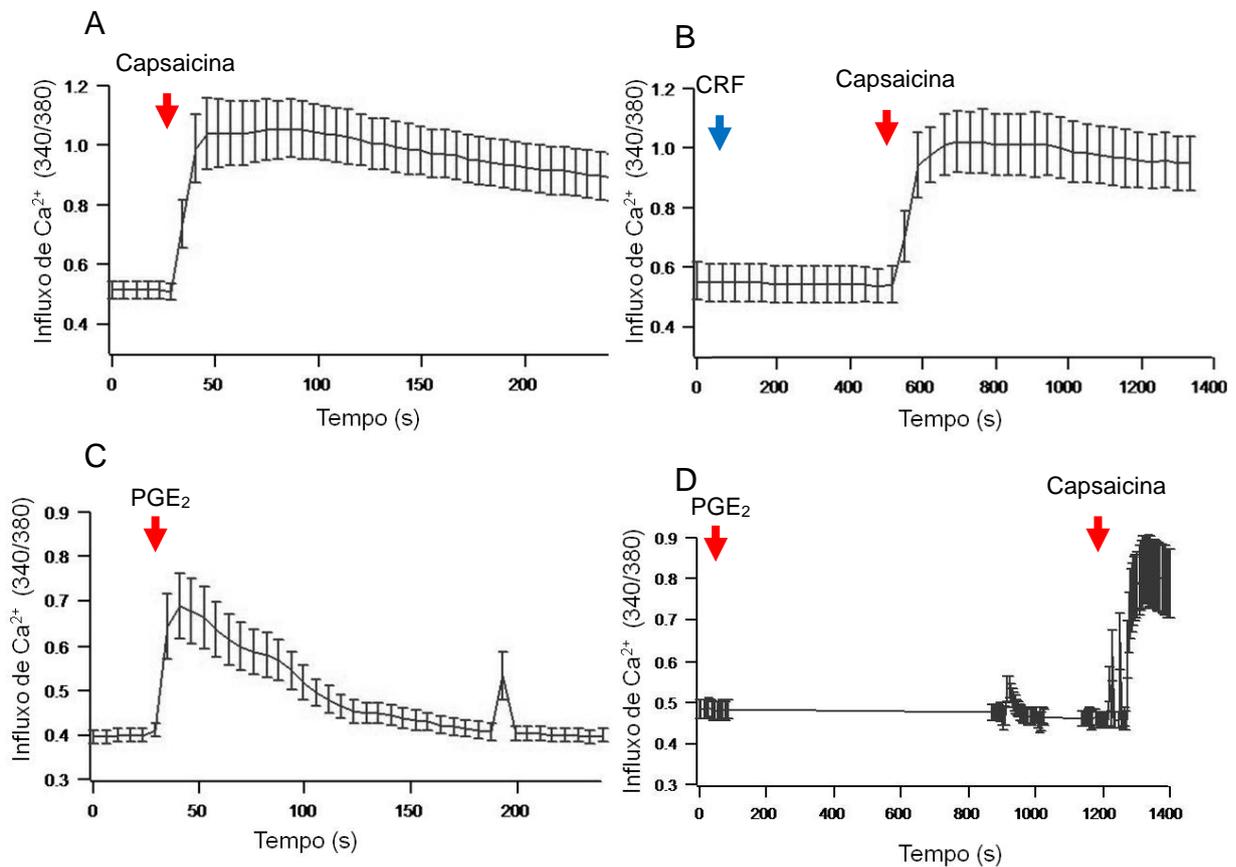


Figura 45 – Efeito da crotalina sobre a mobilização de cálcio induzida por capsaicina (A e B) e Prostaglandina E₂ (PGE₂) (C e D) em cultura primária de células do gânglio da raiz dorsal (DRG). Células de DRG obtidas de ratos *naive*, foram incubadas com capsaicina (200 nM) (A e B) ou PGE₂ (10 μM) (C e D). Para investigar o efeito da crotalina sobre estes estímulos, as células foram pré-incubadas com o peptídeo (1 μM) (B e D). O influxo de cálcio foi avaliado, em células individuais por microscopia de fluorescência, à excitação de 340 e 380 nm. Os dados estão expressos como a razão entre os valores obtidos na emissão de 340 e 380 nm. Foi realizada a análise de 25 células e um único experimento.

5 Discussão

Conforme mencionado na Introdução, dados de literatura têm indicado que fármacos com atividade opióide possuem eficácia analgésica aumentada na vigência de resposta inflamatória e/ou lesão tecidual (STEIN et al., 1989; TRUONG et al., 2003). Contudo, os mecanismos envolvidos neste aumento da eficácia analgésica não estão totalmente elucidados. Assim, o objetivo do presente projeto de pesquisa foi ampliar a caracterização dos mecanismos envolvidos neste efeito, avaliando as possíveis alterações na expressão e funcionalidade de receptores opióides periféricos, na ausência ou vigência de hipernocicepção induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂) ou de dor neuropática. Foi também investigada, nestas mesmas condições experimentais, as alterações na ativação dos receptores opióides pelos seus agonistas seletivos ou pela crotalina (CRF), um peptídeo analgésico obtido do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*.

Na primeira etapa deste estudo, o possível efeito antinociceptivo periférico (local) de agonistas específicos de receptores opióides do tipo μ , κ e δ , foi avaliado na ausência e na presença de hipernocicepção induzida por PGE₂. Para tanto, foi analisado o efeito destes agonistas em ratos submetidos ao teste de pressão de pata (RANDALL e SELITTO, 1957), injetados ou não, por via intraplantar, com PGE₂. O teste de pressão de pata utiliza como estímulo nociceptivo, um estímulo mecânico (força em gramas) e o limiar nociceptivo é caracterizado como a força (em gramas) necessária para a indução da retirada da pata. A hipernocicepção induzida pela PGE₂ é caracterizada pela sensibilização de fibras sensitivas aferentes primárias, diminuindo seu limiar de ativação (limiar nociceptivo) pelo estímulo mecânico (FERREIRA e NAKAMURA, 1979a; FERREIRA e LORENZETTI, 1981; DRAY, 1995; SOUTHALL e VASKO, 2001).

Os resultados obtidos indicam que o DAMGO, agonista de receptor μ opióide, o DPDPE, agonista de receptor δ opióide e o U 50,488, agonista de receptor κ opióide são capazes de alterar o limiar nociceptivo dos animais apenas quando administrados em ratos sensibilizados pela PGE₂. Esta sugestão está baseada nos resultados mostrando que, além de bloquear a hipernocicepção induzida por PGE₂, estes agonistas aumentam o limiar nociceptivo, em relação à medida basal, apenas em animais injetados com o eicosanóide, mas não em animais que não foram submetidos a nenhum tratamento. Cabe ressaltar que, nas doses aqui utilizadas, os agonistas, induziram apenas efeito local, uma vez que na pata contralateral à injeção

dos agonistas, tratada apenas com PGE₂, não foi observada alteração de hipernocicepção causada pelo eicosanóide. Estes dados estão de acordo com evidências clínicas e experimentais mostrando que fármacos opióides apresentam maior potência analgésica periférica na vigência de processos inflamatórios (STEIN et al., 1989), como por exemplo, na vigência de inflamação induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA) (MAEKAWA et al., 1996; MOUSA et al., 2002; CAHILL et al., 2003). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar este fenômeno, tais como alterações na expressão/exposição e/ou funcionalidade de receptores opióides (HASSAN et al., 1993; ANTONIJEVIC et al., 1995; ZOLLNER et al., 2003). Outros estudos mostram que, na presença de resposta inflamatória, ocorre aumento da reciclagem de receptores opióides (internalização e retorno à membrana), preservando a sinalização destes receptores e aumentando a eficácia da ação de analgésicos como, por exemplo, a morfina (ZOLLNER et al., 2008). Apesar destas evidências, estudos mostrando aumento da eficácia antinociceptiva de agonistas opióides em modelos nociceptivos agudos, como o da hipernocicepção induzida pela PGE₂ são escassos ou mesmo inexistentes. Assim, os dados ora apresentados indicam que a maior efetividade de agonistas opióides é também observada em processos agudos e sugerem que as possíveis alterações envolvidas no aumento da efetividade de fármacos opióides podem ocorrer rapidamente durante o desenvolvimento de um processo inflamatório ou lesão tecidual.

Nestes ensaios foi também confirmada a especificidade do receptor opióide envolvido no efeito antinociceptivo local de cada um dos agonistas utilizados. Para tanto, foram utilizados antagonistas seletivos de cada tipo de receptor opióide. Todos os antagonistas testados reverteram o efeito antinociceptivo de seu respectivo agonista, sugerindo que o efeito observado em nossos experimentos, foi decorrente da atuação específica do agonista no seu receptor.

Adicionalmente aos estudos utilizando drogas agonistas de receptores opióides, investigamos o efeito antinociceptivo local da crotalina (CRF), um peptídeo obtido a partir do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*. Dados anteriores mostraram que o CRF apresenta potente efeito antinociceptivo, quando administrado pela via oral, em modelos de hipernocicepção aguda e crônica, e que este efeito é mediado pela ativação de receptores opióides periféricos do tipo κ (hipernocicepção por PGE₂ ou carragenina) (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; PICOLO e CURY, 2004)

ou κ e δ (dor neuropática e dor de câncer) (BRIGATTE, 2005; GUTIERREZ, 2005). Diferentemente dos estudos realizados anteriormente, foi administrada por via intraplantar. Inicialmente, realizamos uma curva dose-resposta para a obtenção de uma dose de crotalfina que causasse antinocicepção apenas local. Para tanto, o CRF foi injetado em uma das patas posteriores e o agente hipernociceptivo (PGE_2) em ambas as patas. A dose de 0,0006 $\mu\text{g/pata}$ foi a menor dose testada capaz de acarretar efeito antinociceptivo apenas local. É importante salientar que as doses mais altas, além de reverter a hipernocicepção, promoveram aumento do limiar nociceptivo dos animais, quando comparado à medida inicial. Ainda, quando comparamos a resposta antinociceptiva de animais que receberam apenas CRF com animais que, além do CRF, foram sensibilizados com PGE_2 , observamos aumento da potência antinociceptiva deste peptídeo na vigência de hipernocicepção, da mesma forma que o observado para os agonistas seletivos de receptores opióides. Estes resultados sugerem, mais uma vez, que a injúria periférica pode contribuir para o aumento da resposta antinociceptiva periférica de substâncias capazes de ativar receptores opióides.

Escolhida a dose de CRF que causa apenas efeito local, realizamos uma curva tempo resposta para este efeito, uma vez que estudos anteriores mostraram que, para o CRF administrado por via oral, o efeito antinociceptivo é de longa duração (até cinco dias), no modelo de hipernocicepção acarretada pela PGE_2 (PEREIRA e CURY, em fase de elaboração; KONNO et al., 2008). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram estes dados e demonstram que a administração intraplantar de CRF produz efeito antinociceptivo, por um período de 120 horas (cinco dias) após uma única administração do peptídeo.

Ainda, baseado nos dados anteriores obtidos pelo nosso grupo, mostrando que o efeito antinociceptivo da crotalfina, administrada pela via oral, é mediado pela ativação de receptores opióides do tipo κ (modelos de dor aguda) ou κ e δ (modelos de dor crônica), investigamos se os mesmos mecanismos estariam envolvidos no efeito local deste peptídeo. Para tanto, inicialmente utilizamos um antagonista não seletivo de receptores opióides, a naloxona. Este antagonista, injetado pela via intraplantar, reverteu o efeito antinociceptivo do CRF. Esta reversão foi observada quando o antagonista foi administrado 165 min após o peptídeo, porém não foi mais detectada quando administrado 225 min após a crotalfina. Estes dados indicam que

o efeito antinociceptivo local do CRF é também mediado pela ativação de receptores opióides e corroboram os dados de Picoletto et al. (2002), em estudos com o veneno crotálico, mostrando que a naloxona é capaz de bloquear o efeito antinociceptivo do veneno, apenas quando administrada até a terceira hora após o tratamento com o veneno. Não temos até o presente momento dados que possam explicar a ausência da ação da naloxona quando administrada três horas após o CRF. Contudo, independentemente do mecanismo de ação da crotalina, é possível que o receptor opióide, uma vez ativado pelo peptídeo, tenha a sua conformação alterada e/ou acarrete uma resposta de sinalização intracelular, que não são revertidas pelo antagonista.

Uma vez detectada a participação de receptores opióides no efeito antinociceptivo local do CRF, caracterizamos quais seriam os tipos de receptores envolvidos neste efeito. Antagonistas seletivos para cada tipo de receptor opióide foram administrados aos animais, por via intraplantar, imediatamente antes da injeção de PGE₂ e do CRF. Os resultados obtidos indicam o envolvimento de receptores opióides do tipo κ no efeito antinociceptivo do peptídeo, uma vez que o Nor-BNI, mas não o CTOP ou o ICI 174, 864, bloqueou o efeito local do CRF no modelo de hipernocicepção induzida pela PGE₂. Estes resultados confirmam os dados obtidos por Konno et al. (2008), mostrando o envolvimento de receptores opióides do tipo κ no efeito antinociceptivo do CRF, administrado por via oral, nos modelos de hipernocicepção induzida por PGE₂ ou carragenina. Os experimentos foram repetidos injetando-se os antagonistas 165 min após a injeção de CRF e PGE₂. Os resultados mostraram que, nestas condições experimentais, os antagonistas do receptor opióide do tipo μ , δ e também κ não interferem com o efeito antinociceptivo do CRF. Estes dados confirmam que a reversão do efeito antinociceptivo da crotalina, pelo antagonista opióide, é dependente do tempo de tratamento. Os resultados obtidos com o Nor-BNI diferem dos resultados obtidos com a Naloxona, a qual foi efetiva em reverter o efeito do CRF quando administrada neste mesmo período (165 min). É importante ressaltar que o nor-BNI apresenta peso molecular maior e lipossolubilidade distinta da naloxona, o que pode interferir com o tempo necessário para a interação deste antagonista com o receptor opióide, quando comparado à naloxona.

Neste estudo foi também avaliado o efeito antinociceptivo local dos agonistas opióides e do CRF em modelo de dor neuropática.

A dor neuropática é usualmente decorrente da lesão de nervos periféricos, envolve sensibilização periférica e central e tem como características a presença de hipernocicepção, alodinia e dor espontânea (BENNETT e XIE, 1988; SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990). No nosso estudo, a dor neuropática foi induzida pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos, de acordo com o método descrito por Bennett e Xie (1988). É importante ressaltar que no modelo presentemente utilizado, não foi observado o fenômeno de autotomia, usualmente detectado em modelos de ligaduras firmes do nervo isquiático, em que há destruição de todas as fibras nociceptivas (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990). No modelo da CCI, ocorre apenas lesão parcial das fibras C (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990). No presente estudo, a ligadura do nervo isquiático acarretou diminuição do limiar nociceptivo, em relação à medida inicial, determinada no 14^o dia do período pós-operatório, caracterizando o fenômeno de hipernocicepção. Este procedimento provocou também diminuição na intensidade do estímulo tátil necessário para induzir a resposta de retirada da pata dos animais, quando comparado à medida inicial, caracterizando o fenômeno de alodinia. Experimentos realizados anteriormente em nosso laboratório, mostraram que neste período (14 dias) a CCI induz também o aparecimento de dor manifesta (GUTIERREZ et al., 2008).

Os agonistas dos receptores opióides μ , δ e κ , administrados por via intraplantar, nas mesmas doses testadas nos experimentos de hipernocicepção induzida pela PGE₂, reverteram parcialmente o efeito hipernociceptivo e a alodinia induzidos pela constrição crônica do nervo isquiático. A administração de doses três vezes maiores do agonista DAMGO (15 μ g/pata) e do DPDPE (60 μ g/pata), bloquearam a hipernocicepção e alodinia induzidos pela CCI, 1 e 3 horas após o tratamento. Por outro lado, a administração de doses mais altas de U 50,488 (30 μ g/pata), não reverteu os fenômenos nociceptivos induzidos pela CCI em nenhum dos períodos de observação. Nestes experimentos, detectamos visualmente, que o agonista acarretou edema na pata injetada, o que pode ter contribuído para a ausência de efeito antinociceptivo. Para avaliar se essas doses maiores dos agonistas induzem apenas efeito local, o efeito destes agonistas, nestas doses, foi testado no modelo da hipernocicepção acarretada pela PGE₂. Neste estudo, a

prostaglandina foi administrada em ambas as patas posteriores de animais *naive*. Os resultados confirmam que estes agonistas apresentam apenas efeito local, uma vez que o efeito antinociceptivo foi observado apenas na pata injetada como o agonista.

Estes resultados indicam que os agonistas de receptores μ e δ opióides, injetados localmente, podem apresentar efeito antinociceptivo, de maneira dose dependente, em modelo de dor neuropática. Cabe ressaltar que a literatura é escassa no que se refere a estudos sobre o efeito analgésico local de fármacos opióides, em modelos de dores crônicas. Obara et al. (2009) observaram que o DAMGO (4 - 9.5 nM) administrado pela via intraplantar, reverte a alodinia induzida pelo CCI em ratos, a partir de 5 minutos após sua injeção. Ainda, a loperamida, um agonista preferencial de receptores opióides μ , quando administrada sistemicamente, induz antinocicepção em modelo de hipernocicepção crônica induzida por constrição de nervos espinais. Este efeito é mediado pela ativação de receptores opióides periféricos do tipo μ . Catheline; Kayser; Guilbaud, (1996) mostram a importância receptores κ opióides periféricos na antinocicepção induzida pela morfina (1 mg/Kg, i.v.), em animais submetidos à CCI, uma vez a administração intraplantar de antagonistas destes receptores revertem a antinocicepção induzida pelo opióide. Recentemente, Obara et al. (2009), utilizando o modelo de constrição crônica do nervo isquiático de ratos, mostraram que dois agonistas de receptor κ (a dinorfina A e o ICI 199,441), apresentam potente efeito antinociceptivo quando injetados nas patas destes animais. Em relação aos agonistas de receptores δ , estudos avaliando sua ação local mostraram que a deltorfina II (50 μ g/pata), mas não o DPDPE (80 μ g/pata), ambos agonistas de receptores δ , é capaz de reverter a alodínia induzida pela constrição crônica do nervo isquiático de ratos (KABLI e CAHILL, 2007). Os autores sugerem que a diferença observada entre os dois agonistas pode ser decorrente da rápida degradação do DPDPE por encefalinases endógenas, enquanto que a deltorfina II parece ser mais resistente (ERSPAMER et al., 1989). Nossos resultados divergem dos de Klabi e Cahill (2007), uma vez que o DPDPE, apesar da ausência de efeito nos períodos iniciais, promove, três horas após sua administração, aumento do limiar nociceptivo e tátil nos animais submetidos à CCI. Por outro lado, nossos resultados corroboram os de Obara et al. (2009), os quais mostraram que dois agonistas do receptor delta (DSLET e SNC 80) são capazes de induzir efeito antinociceptivo local no modelo da CCI.

Posteriormente a avaliação do efeito dos agonistas opióides, investigamos o efeito local do CRF no modelo da CCI. Dados recentes obtidos pelo nosso grupo, mostraram que o CRF, administrado por via oral, inibe a dor neuropática induzida pela CCI em ratos (GUTIERREZ et al., 2008). Os resultados presentemente obtidos, mostram que o CRF é efetivo em inibir os fenômenos hipernociceptivos causados pela CCI, também quando administrado pela via intraplantar. Curiosamente, a mesma dose utilizada para reverter a hipernocicepção induzida pela PGE_2 , foi eficaz em induzir antinocicepção no modelo crônico. Adicionalmente, foi observado que o CRF, nesta dose, acarreta, nos animais falso operados, aumento do limiar nociceptivo quando comparado à medida basal. Cabe lembrar que: (a) animais falso operados não apresentaram o fenômeno de hipernocicepção e alodinia e (b) esta dose do CRF não promoveu alteração no limiar nociceptivo basal de animais normais (não submetidos à sensibilização, Fig. 8). Esses dados sugerem que, mesmo sem induzir injúria nervosa, o simples procedimento cirúrgico e a manipulação do nervo são capazes de potencializar o efeito antinociceptivo do CRF, indicando que, possivelmente, este processo já é suficiente para expor e/ou ativar os receptores opióides. Com o intuito de investigar esta hipótese, realizamos experimentos adicionais com outros animais falso-operados, submetidos apenas à incisão na pele e no músculo, sem a manipulação do nervo. Nestas condições experimentais, não foi detectado aumento do limiar nociceptivo dos animais, em relação à medida basal, para a dose de 0,0006 $\mu\text{g/pata}$ da crotalfina. Estes dados indicam que a manipulação do nervo é condição suficiente para favorecer alteração na expressão/atividade de receptores opióides e/ou o aumento na intensidade do efeito antinociceptivo da crotalfina.

Estudos farmacológicos anteriores demonstraram que o tipo de receptor opióide envolvido no efeito antinociceptivo do CRF, administrado pela via oral, depende do modelo utilizado para a indução de fenômenos nociceptivos (GUTIERREZ, 2005; KONNO et al., 2008). Assim, investigamos qual o tipo de receptor opióide estaria envolvido no efeito antinociceptivo local do CRF, no modelo da CCI. Nossos resultados indicam que, diferentemente do observado no modelo de hipernocicepção induzida por PGE_2 , o efeito da crotalfina no modelo da CCI, é mediado principalmente por receptores opióides periféricos do tipo δ e parcialmente, pelos receptores opióides do tipo κ . Como mencionado anteriormente, a literatura é

escassa no que se refere a estudos sobre o efeito antinociceptivo periférico de drogas opióides, na vigência de dor neuropática. Dados de literatura têm mostrado que na vigência de injúria periférica, incluindo a constrição crônica do nervo isquiático, pode ocorrer incremento do transporte axonal e da densidade de receptores opióides δ neste nervo e em células do gânglio da raiz dorsal (CAHILL et al., 2003; KABLI e CAHILL, 2007). É possível sugerir que o aumento da expressão de receptores δ opióides tenha contribuído para a observação de que estes receptores sejam os principais receptores envolvidos no efeito antinociceptivo do CRF neste modelo crônico de nocicepção.

Uma vez que o CRF induz potente efeito antinociceptivo mediado pela ativação de receptores κ e δ , neste modelo de dor neuropática, e de acordo com os resultados obtidos anteriormente, mostrando que os agonistas seletivos destes receptores (U 50,488, agonista de receptor κ , e DPDPE, agonista de receptor δ), reverteram parcialmente a hipernocicepção causada pela injúria nervosa, analisamos o efeito da administração conjunta (simultânea) destes agonistas sobre os fenômenos nociceptivos causados pela CCI. Os resultados mostraram que a administração conjunta dos agonistas κ e δ , nas concentrações previamente testadas, promoveu inibição mais intensa da hipernocicepção e alodinia, em comparação com o efeito observado para cada um dos agonistas administrados separadamente, indicando que a ativação simultânea destes dois tipos de receptores pode melhorar os sintomas característicos da dor neuropática.

Em conjunto, os resultados obtidos até o momento indicam que o efeito antinociceptivo local de agonistas opióides ou do CRF é potencializado na vigência de sensibilização periférica. Com o objetivo de avaliar os possíveis mecanismos envolvidos neste fenômeno, investigamos se o processo de sensibilização aguda ou crônica poderia acarretar alteração na expressão (gênica e protéica) e ativação de receptores opióides. Esses estudos foram realizados em tecido do DRG e do nervo da pata, obtidos de animais pré-tratados com PGE₂ (intraplantar) ou submetidos à lesão do nervo isquiático. Os estudos foram realizados nestes dois tecidos, uma vez que dados de literatura mostram que os receptores opióides do tipo μ , κ e δ são sintetizados no DRG (DADO et al., 1993; ARVIDSSON et al., 1995; JI et al., 1995; COGGESHALL et al., 1997) e podem ser transportados, pelo axônio, para o terminal central e periférico do neurônio aferente primário (HASSAN et al., 1993; MOUSA et

al., 2001). Foi observado ainda que estes receptores estão co-expressos com receptores para substância P, CGRP e/ou TRPV1 (MINAMI e SATOH, 1995; LI et al., 1998; WENK e HONDA, 1999; POONYACHOTI et al., 2002), corroborando a indicação de que os receptores opióides estão também localizados na porção periférica dos aferentes nociceptivos.

Nossos dados indicam que, tanto a sensibilização aguda quanto crônica, aumentam a expressão gênica e protéica para receptores opióides do tipo μ . Vários dados experimentais têm evidenciado que a administração intraplantar de agentes pró-nociceptivos, como o Adjuvante Completo de Freud (CFA) e carragenina, na pata ou músculo masseter de roedores, aumenta a expressão gênica e/ou protéica de receptores opióides μ no DRG ou no gânglio trigeminal, a partir de 1 hora após os tratamentos (HASSAN et al., 1993; PUEHLER et al., 2004). Estes dados, em conjunto com nossos resultados, indicam que a expressão de receptores opióides do tipo μ é aumentada na vigência de resposta inflamatória. Estes dados apontam para a importância destes receptores no controle endógeno da hipernocicepção.

De acordo ainda com os resultados obtidos neste estudo, foram também detectadas alterações na expressão dos receptores opióides do tipo μ , no DRG da região contralateral à CCI. Cabe ressaltar que, nos ensaios comportamentais *in vivo*, não foram detectados fenômenos hipernociceptivos na pata contralateral a CCI (dados não mostrados). Baseado nos dados evidenciando aumento na expressão dos receptores opióides do tipo μ , no DRG da região contralateral à CCI, e nos resultados mostrando que em patas de animais *naive*, os agonistas opióides não alteram o limiar nociceptivo basal dos animais, avaliamos, presentemente, o possível efeito do agonista do receptor opióide μ , administrado na pata contralateral àquela cujo nervo isquiático foi lesionado. A dose do agonista utilizada foi aquela que não interferiu com o limiar nociceptivo de animais *naive*. Interessantemente, os nossos resultados mostraram que o aumento na expressão deste receptor, no DRG contralateral, foi suficiente para favorecer, na pata correspondente, o aumento do limiar nociceptivo pelo agonista.

Os ensaios avaliando a expressão gênica e protéica para receptores opióides do tipo κ , mostraram que a sensibilização aguda por PGE₂ aumenta, enquanto que a sensibilização crônica (CCI) diminui, a expressão destes receptores. Estes dados indicam que, pelo menos para os receptores opióides do tipo κ , a expressão do

receptor é regulada diferentemente pelo tipo de inflamação/lesão tecidual. Ji e et al. (1995) observaram diminuição da expressão deste receptor no DRG de roedores submetidos à injeção intraplantar de carragenina. Cabe ressaltar que o estudo realizado por estes autores difere dos nossos, tanto pelo tipo do agente indutor de sensibilização, como no período de avaliação (1 e 3 dias após a carragenina) (Ji et al., 1995). É importante lembrar que o aumento da sensibilidade à dor causado pela carragenina envolve a liberação seqüencial de diversos mediadores nociceptivos (NAKAMURA e FERREIRA, 1987; CUNHA et al., 1991; CUNHA et al., 1992; FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993; CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999; CUNHA et al., 2005), enquanto a prostaglandina E₂, utilizada no nosso estudo, não induz resposta inflamatória, mas age sensibilizando diretamente o neurônio sensitivo primário, pela interação com receptores acoplados a segundos-mensageiros (FERREIRA, 1981; DRAY, 1995). Em relação à CCI, Obara e et al. (2009) observaram, de maneira semelhante aos nossos dados, diminuição na expressão gênica do receptor κ opióide no DRG de animais submetidos à constrição do nervo isquiático.

Em relação aos receptores δ , nossos resultados sugerem que os dois tipos de sensibilização, aguda e crônica, aumentam a expressão gênica destes receptores no DRG. Contudo, a expressão protéica deste receptor foi diferentemente modulada pela sensibilização aguda/ PGE₂ (diminuição da expressão protéica) ou crônica/CCI (aumento da expressão protéica). Não temos ainda dados que possam explicar a menor expressão deste receptor, na vigência de sensibilização por PGE₂. Contudo, este fenômeno pode ser consequência de alterações pós-transcricionais, como por exemplo, aumento da degradação desta proteína, ou ainda, em decorrência do período de avaliação da expressão protéica utilizada neste ensaio. Neste sentido, é possível que o aumento na expressão gênica destes receptores possa se refletir em aumento na expressão protéica em períodos mais tardios aos presentemente avaliados. Em relação ao modelo da CCI, os nossos resultados diferem daqueles obtidos por Obara et al. (2009), os quais observam diminuição da expressão gênica para receptores δ no DRG de animais submetidos à constrição crônica do nervo isquiático. Contudo, nossos dados estão de acordo com os obtidos por Cahill et al. (2007), mostrando aumento na expressão deste receptor no gânglio de animais submetidos a este modelo de sensibilização crônica. Cabe salientar que os

resultados de *immunoblotting* para este receptor são bastante controversos na literatura. Estudos mostram que o receptor δ , clonado, apresenta peso molecular de 65 Kd (KIEFFER et al., 1992), entretanto, na descrição do fabricante do anticorpo presentemente utilizado (Chemicon, EUA), o peso molecular do receptor é de 46 Kd e em condições redutoras, podem aparecer bandas de 37 e 75 Kd. Em nossos experimentos, visualizamos principalmente bandas de 37 e 65 Kd. Assim, baseados em nossas observações e em dados publicados por outros grupos, analisamos as bandas de 37 e 65 Kd (PERSSON et al., 2005; CAHILL et al., 2007). Não foi detectada alteração de expressão protéica da fração de 37 Kd e portanto, os dados ora apresentados se referem aos valores obtidos para a proteína de 65 Kd.

Como mencionado anteriormente, a crotalina apresenta efeito antinociceptivo periférico, mediado pela ativação de receptores opióides do tipo κ , no modelo da PGE_2 e do tipo κ e δ no modelo da CCI, indicando que este peptídeo é capaz de ativar, direta ou indiretamente, estes dois tipos de receptores opióides (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; PICOLO e CURY, 2004; BRIGATTE, 2005; GUTIERREZ, 2005). Em nossas condições experimentais, observamos incremento de receptores opióides do tipo κ , e diminuição de receptores do tipo δ , no modelo da PGE_2 e incremento nos níveis de receptores opióides δ , mas não κ no gânglio de animais submetidos à CCI. É importante lembrar que o agonista de receptor κ apresentou efeito antinociceptivo reduzido no modelo de hipernocicepção induzida pela CCI, porém efeito potente no modelo de hipernocicepção aguda acarretada pela PGE_2 . Assim, as alterações na disponibilidade destes receptores, nas diferentes condições experimentais, podem ter contribuído para as diferenças observadas na mediação dos efeitos da crotalina, nos dois modelos de hipernocicepção. Avaliamos ainda a expressão de receptores opióides em animais falso-operados. Vale lembrar que a manipulação do nervo foi condição suficiente para favorecer o aumento na intensidade do efeito antinociceptivo da crotalina. Contudo, não detectamos alteração na expressão de receptores opióides no DRG ou nervo da pata destes animais, que pudessem contribuir para o aumento do limiar nociceptivo destes animais. Entretanto, as possíveis alterações na ativação destes receptores, que pudessem contribuir para este fenômeno, não foram ainda avaliadas.

Baseado nos dados presentemente obtidos, mostrando que os receptores opióides podem ser diferentemente regulados, dependendo do estímulo aplicado

(agudo ou crônico) e do tipo de receptor avaliado, nosso próximo objetivo foi avaliar se estes estímulos, *per se*, seriam eficazes em ativar estes receptores. Dados de literatura obtidos em estudos de *binding*, utilizando células do DRG, mostraram que a inflamação induzida por CFA favorece a ligação do agonista ao receptor μ opióide e o acoplamento deste receptor à proteína G, com conseqüente ampliação da sinalização intracelular (ZOLLNER et al., 2003; SHAQURA et al., 2004). No presente estudo, a técnica escolhida para avaliação da ativação de receptores opióides (ELISA em tecidos), está baseada nos estudos realizados por Gupta e et al. (2007). Nestes estudos, foram desenvolvidos anticorpos capazes de reconhecer receptores opióides na sua forma ativada (conformação específica). Receptores acoplados à proteína G, como os receptores opióides, apresentam alterações conformacionais na porção N-terminal citoplasmática quando ativados por seu agonista (GUPTA et al., 2007).

Em nossos estudos, os anticorpos anti-receptor opióide foram incubados diretamente com o tecido do nervo da pata ou do DRG dos animais, ou então adicionados à cultura de células do DRG obtidos de animais *naive*. Além dos anticorpos que reconhecem apenas o receptor na sua forma ativada, utilizamos, nesses ensaios, como controle adicional, os mesmos anticorpos usados nos ensaios de *western blotting*, ou seja, anticorpos que reconhecem os receptores opióides independentemente de seu estado de ativação. Os resultados mostraram que, quando foram utilizados anticorpos que reconhecem os receptores independentemente de seu estado de ativação, ocorrem, da mesma forma que o observado nos ensaios de *western blotting*, alterações na expressão dos receptores opióides, que se traduziu em aumento ou diminuição, dependendo do estímulo e do receptor avaliado. Por outro lado, quando foram utilizados anticorpos que reconhecem apenas o receptor ativado, não foram detectadas diferenças significativas, em relação ao controle. Estes resultados indicam que a sensibilização por PGE₂ ou a constrição crônica do nervo, apesar de interferir com a expressão gênica e protéica dos receptores opióides, não foram capazes de induzir ativação destes receptores.

Em ensaio subsequente, foi avaliado se, na presença de sensibilização, os agonistas seletivos dos receptores opióides ou a crotalina seriam capazes de ativar mais os receptores, comparativamente à ativação na ausência de sensibilização.

Utilizando os anticorpos conformation específica, observamos que a ativação de receptores μ e κ , pelos seus agonistas seletivos, é maior na presença de sensibilização por PGE_2 . Diferentemente, a PGE_2 inibiu a ativação de receptores δ por seu agonista. Estes dados são interessantes e mostram que a PGE_2 é capaz de regular negativamente tanto a expressão quanto a ativação dos receptores opióides do tipo δ . Diversas evidências experimentais têm demonstrado que estes receptores não se encontram disponíveis na membrana celular, em condições basais. Para que os fármacos atuem nestes receptores é necessário que ocorra a exposição ou maior expressão destes receptores, a partir dos estoques intracelulares, como por exemplo, na vigência de inflamação crônica ou neuropatia (VANDERAH, 2010). Assim, é possível que, em nossas condições experimentais, a sensibilização induzida pela PGE_2 não tenha sido suficiente para promover a exposição/expressão destes receptores. Em relação aos dados de literatura, tem sido observado, em ensaios de *binding*, que, apesar da inflamação induzida por Adjuvante Completo de Freud (CFA) promover aumento do número de sítios de ligação do receptor opióide do tipo μ ao seu agonista, em células do DRG, não há aumento da afinidade pelo agonista (ZOLLNER et al., 2003). Cabe ressaltar que, diferentemente do CFA, a PGE_2 induz hipernocicepção aguda e, portanto, é um modelo que nos permite avaliar as alterações que ocorrem nos estágios iniciais do processo inflamatório, o que pode contribuir para a compreensão da maior efetividade de fármacos opióides também nestes períodos.

Além das alterações observadas para os agonistas seletivos de receptores opióides, foi também detectada alteração na ativação dos receptores opióides pela crotalina. Os nossos resultados mostraram que este peptídeo é capaz de ativar receptores opióides do tipo κ , mas não do tipo μ e δ . Contudo esta ativação foi observada somente na presença de sensibilização pela PGE_2 . Esses dados corroboram os resultados obtidos *in vivo*, nos ensaios comportamentais, mostrando que o efeito antinociceptivo da crotalina, na vigência de hipernocicepção induzida por PGE_2 , é mediada pela ativação de receptores opióides do tipo κ , mas não μ e δ .

É importante salientar que os estudos, descritos na literatura, sobre a ativação de receptores opióides, foram sempre realizados em modelo de inflamação crônica, envolvendo apenas os receptores opióides do tipo μ . O presente estudo foi o primeiro a investigar a ativação destes receptores nos estágios mais iniciais do

processo de sensibilização, bem como foi pioneiro em avaliar a ativação de receptores opióides do tipo κ e δ periféricos.

Diferentemente dos resultados observados nos estudos de sensibilização aguda, os dados obtidos no modelo de injúria crônica indicam que este tipo de sensibilização não é capaz de interferir com o efeito dos agonistas seletivos sobre a ativação de seus receptores. Interessantemente, esta injúria favoreceu a ativação de receptores opióides do tipo δ e κ , pela crotalfina, o que pode explicar a maior efetividade deste peptídeo, detectada nos estudos comportamentais. É importante ressaltar que o mecanismo de ação da crotalfina é ainda objeto de investigação, uma vez que estudos de *binding* indireto não detectaram ligação da crotalfina a receptores opióides

Uma vez demonstrado que a injúria induzida pela PGE_2 em ratos, é capaz de favorecer a ativação de receptores opióides por seu agonista, investigamos, em ensaios *in vitro*, se a PGE_2 acarretaria este efeito quando incubada com células obtidas do DRG de ratos *naive*. Os resultados obtidos confirmam os ensaios anteriores, de que a pré-sensibilização com PGE_2 favorece a ativação de receptores opióides pelo seu respectivo agonista e também pela crotalfina. Interessantemente, em relação aos receptores opióides do tipo δ , nossos resultados indicam que o agonista destes receptores é capaz de ativá-los, nas células não sensibilizadas pela prostaglandina. Contudo, esta ativação é diminuída quando as células são pré-incubadas com a PGE_2 . Em conjunto, estes dados sugerem que, a sensibilização aguda por PGE_2 é capaz de favorecer a ativação de receptores opióides μ e κ , porém, regula negativamente os receptores δ . Adicionalmente, nossos resultados demonstram, pela primeira vez, que a crotalfina é capaz de atuar diretamente em células do DRG, o que torna os estudos *in vitro* uma ferramenta importante para o entendimento dos mecanismos envolvidos na ação do peptídeo. Cabe ressaltar que os dados de literatura avaliando a ativação de receptores opióides, presentes em células nervosas em cultura, são ainda escassos. Estudos utilizando cultura de células do DRG de ratos envolvem, geralmente, receptores NK1, P2X3 (KAGE et al., 2002; SEGOND VON BANCHET et al., 2003), entre outros, sendo inexistentes os estudos relacionados a receptores opióides. Desta forma, a metodologia utilizada no presente estudo pode contribuir para a ampliação do conhecimento dos mecanismos envolvidos na ativação destes receptores.

Uma vez que os alvos moleculares de ação da crotalfina não estão caracterizados e baseados na observação de que este peptídeo é capaz de ativar, em células do DRG em cultura, os receptores opióides do tipo κ , na vigência de sensibilização por PGE_2 , investigamos, neste estudo, algumas das possíveis vias de sinalização intracelular ativadas por este peptídeo. Em alguns dos ensaios foi utilizado, como controle positivo, o agonista de receptores opióides do tipo κ , o U 50,488. Estes estudos foram realizados sob supervisão da Dra. Daria Mochly-Rosen, do Departamento de Química e Sistemas Biológicos na Universidade de Stanford, EUA.

Conforme mencionado na Introdução, os principais mecanismos de ação envolvidos nos efeito analgésico de fármacos opióides são a inibição do AMPc intracelular e de canais de Ca^{2+} , além do aumento dos níveis de GMPc e abertura de canais K_{ATP} .

Primeiramente avaliamos se a crotalfina seria capaz de interferir com a produção de GMPc intracelular. Ensaio comportamentais realizados anteriormente em nosso laboratório, utilizando abordagens farmacológicas, demonstraram que o efeito antinociceptivo periférico da crotalfina é mediado pela ativação da via L-arginina/NO/GMPc/PKG e abertura de canais de K^+ dependentes de ATP (GUTIERREZ, 2005). Corroborando estes dados, os resultados presentemente obtidos, nos ensaios *in vitro*, mostraram que a crotalfina aumenta os níveis deste segundo mensageiro, sendo este efeito potencializado pela PGE_2 . Estes resultados indicam, novamente, que a PGE_2 amplia a sinalização induzida pela crotalfina.

Conforme mencionado, o GMPc responsável pelo efeito antinociceptivo periférico dos opióides é originado a partir da NOS, uma vez que inibidores desta enzima e também da guanilato ciclase bloqueiam o efeito antinociceptivo periférico de fármacos como a morfina e também da crotalfina (GRANADOS-SOTO et al., 1995; SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004; GUTIERREZ et al., submetido). O incremento do GMPc, em neurônios nociceptivos, é atribuído à maior síntese de NO, proveniente da maior ativação da NOS neuronal, que pode ocorrer principalmente pela Ca^{2+} /calmodulina ou através fosforilação pela PI3K/AKT. Assim, investigamos se a crotalfina seria capaz de ativar a via da Akt em células do DRG em cultura. Nossos resultados mostraram que o agonista de receptor opióide do tipo κ , mas não a crotalfina, ativou a Akt em células do DRG, sugerindo que a crotalfina,

diferentemente da morfina ou do U 50,488, não ativa esta via de sinalização. Estes resultados confirmam dados recentes obtidos em nosso laboratório, em ensaios comportamentais *in vivo*, mostrando que o efeito antinociceptivo da crotalfina não é mediado pela ativação da via PI₃quinase/Akt (Britto e Cury, comunicação pessoal). Portanto, outro mecanismo deve estar envolvido no efeito da crotalfina sobre a NOS, como por exemplo, a ativação desta enzima por meio do cálcio intracelular. Vale ressaltar que o efeito da crotalfina sobre os níveis de GMPc é potencializado na vigência de sensibilização pela PGE₂, fenômeno em que se observa aumento nos níveis de Ca²⁺ intracelular. Experimentos adicionais serão necessários para o entendimento destes mecanismos.

Dados de literatura, obtidos em experimentos *in vitro* utilizando diferentes linhagens de células em cultura, mostram que a ativação de receptores opióides acarreta ativação da via das MAPKs (BELCHEVA et al., 1998; BOHN et al., 2000; BELCHEVA et al., 2005; BRUCHAS et al., 2006) e que a ativação diferencial das enzimas que compõem esta via, parece ser importante para os efeitos de alguns agonistas opióides. Komatsu et al. (2009) mostraram que a injeção intratecal de M3G, um metabólito da morfina, promove ativação da ERK por um mecanismo dependente da ativação da via NO/GMPc/PKG. Ainda, estudos realizados em neurônios hipocâmpais em cultura, mostram que doadores de NO promovem a abertura de canais K_{ATP} nestas células e este efeito é mediado pela ativação da via Ras/MAPK (LIN et al., 2004). Assim, avaliamos, em cultura de células do DRG, a possível ativação de MAPKs, pela crotalfina, na ausência ou presença de sensibilização por PGE₂. Nestes estudos, tanto a crotalfina quanto o agonista de receptores opióides do tipo κ, promoveram ativação de ERK1/2. Interessantemente, quando as células foram pré-sensibilizadas com PGE₂, esta ativação foi ainda maior e revertida pelo antagonista de receptor opióide do tipo κ. Estes dados mostrando que a ativação da ERK1/2 é dependente da ativação do receptor κ, sugerem uma via de sinalização intracelular decorrente da ativação destes receptores e suportam os resultados obtidos no ensaio de ELISA, mostrando que alterações conformacionais nos receptores opióides, podem ser indicativas da ativação destes receptores. Não foram presentemente realizados ensaios visando determinar as vias de sinalização subseqüentes à ativação da ERK1/2. Estudos demonstram que a ativação desta via leva à fosforilação do fator de transcrição CREB, o qual está envolvido na regulação

de diversos genes, incluindo a expressão de dinorfina (KREIBICH e BLENDY, 2004; CARLEZON JR.; DUMAN; NESTLER, 2005) e também de fatores pró-nociceptivos como substância P e CGRP (MA et al., 2001).

Dando continuidade a estes estudos, investigamos a ativação, pela crotalfina, de outra MAPK, a JNK. Esta via é normalmente relacionada ao estresse celular e sinais pró-inflamatórios, incluindo ativação de citocinas, além de nocicepção (MINDEN et al., 1994; ZHUANG et al., 2006). Dados de literatura tem mostrado que agonistas de receptores opióides do tipo μ e δ ativam a JNK em células de linhagens (SH-SY5Y e COS-7) transfectadas com estes receptores e que esta ativação é dependente da via PI_3 quinase/Akt. Em relação aos agonistas de receptor κ , a ativação desta via parece ser independente da ativação da PI_3 quinase (KAM et al., 2004b; BRUCHAS et al., 2007). Nossos estudos demonstram que a crotalfina e o U 50,488 são capazes de ativar a JNK e que esta ativação é maior na vigência de sensibilização por PGE_2 . Quando comparamos a ativação da JNK pelo agonista e a crotalfina, detectamos que a crotalfina ativa, aproximadamente, quatro vezes mais esta quinase.

Não temos ainda dados suficientes que possibilitem entender o papel desta via de sinalização, para o efeito antinociceptivo da crotalfina. Contudo é possível que a ativação desta via, pela crotalfina, bem como a maior ativação observada na presença de PGE_2 , favoreçam a ativação de fatores de transcrição que possam contribuir para a expressão de receptores/canais e/ou de outras vias de sinalização, envolvidos com a antinocicepção (SWEATT, 2004; THOMAS e HUGANIR, 2004; CARLEZON et al., 2005; BRUCHAS et al., 2008). Cabe ressaltar que estamos iniciando estudos, utilizando modelos comportamentais de avaliação de sensibilidade dolorosa e inibidores de MAPKs, para avaliar o envolvimento destas quinases no efeito antinociceptivo da crotalfina, in vivo. Ainda, é nosso objetivo investigar a possível ligação entre o aumento da liberação de GMPc e a ativação de MAPKs.

Interessantemente, os estudos utilizando Nor-BNI, antagonista de receptor κ , mostraram que este fármaco, *per se*, ativa esta via de sinalização. Nossos resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Bruchas e et al. (2007), utilizando linhagem de células HEK293 expressando κ -GFP, mostrando que o Nor-BNI atua como um antagonista do receptor opióide κ , possuindo eficácia “colateral”.

Estudos sugerem que alguns antagonistas de GPCRs são capazes de se ligar ao receptor e induz sinalização distinta da sinalização clássica do receptor pelo seu agonista (URBAN et al., 2007).

Sabe-se que o Nor-BNI apresenta efeito de longa duração tanto *in vivo*, quanto *in vitro*. Estes efeitos incluem antagonizar tanto o efeito antinociceptivo, quanto a sinalização intracelular induzida por ligantes de receptores opióides κ (MELIEF et al., ; BRUCHAS et al., 2007). Esta longa duração é dependente da ativação da JNK pelo antagonista, e independente da proteína G inibitória, uma vez a longa duração de ação deste antagonista é revertida pelo bloqueio desta quinase, mas não é modificada pela toxina pertussis (BRUCHAS et al., 2007). Ainda, estudos utilizando camundongos *knockout* para receptores opióides do tipo κ , confirmam que a ação do Nor-BNI é mediada pela ativação da JNK, uma vez que, nestes animais, não foi detectada fosforilação desta quinase no estriato e medula espinal destes animais, pelo Nor-BNI (BRUCHAS et al., 2007). Efeitos de longa duração são também observados para outros antagonistas de receptor opióide κ (NEGUS et al., 2002; CARROLL et al., 2004).

Interessados na compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação destas MAP quinases e levando em consideração que as proteína quinases C (PKCs) estão amplamente envolvidas em diversos tipos de sinalização, em vários tipos celulares, incluindo DRG (VELAZQUEZ et al., 2007), investigamos o envolvimento da PKC no efeito da crotalfina sobre a ativação da ERK1/2 e JNK. É importante mencionar que estudos realizados em células astrocíticas em cultura, mostram que a ativação de ERK1/2 por agonistas de receptores opióides do tipo μ , é dependente da ativação da PKC ϵ . Em relação ao receptor opióide κ , Belcheva e et al. (2005) demonstraram o envolvimento da PKC ζ na ativação das MAPKs por agonistas destes receptores em astrócitos. Estes autores mostraram que o agonista de receptor opióide κ é capaz de promover estimulação da atividade desta PKC e da ERK, por uma hora. Nossos resultados indicam que a PKC ζ está envolvida no efeito da crotalfina sobre a ativação da ERK1/2 e JNK, uma vez que a inibição desta PKC interferiu com a fosforilação destas quinases pela crotalfina. Em relação à JNK, é interessante notar que detectamos reversão apenas do aumento de sua fosforilação induzida pela PGE₂, sem interferir com o efeito da crotalfina *per se* sobre a fosforilação desta quinase. Estes dados sugerem que a PGE₂ pode favorecer a

ativação da PKC ζ , por um mecanismo ainda desconhecido, contribuindo para o aumento da ativação da JNK pela crotalfina. Assim, é possível que a ativação de receptores opióides κ pela crotalfina, favoreça a atividade da PKC ζ , a qual acarretaria a fosforilação de ERK1/2 e JNK.

Com o intuito de avaliar se, em nossas condições experimentais, a crotalfina apresenta efeito inibitório sobre a elevação de cálcio intracelular, realizamos um ensaio inicial sobre o efeito deste peptídeo sobre a mobilização de cálcio induzida por PGE₂. Dados experimentais demonstram que dentre outros mecanismos, a PGE₂ induz nocicepção pelo aumento das correntes de cálcio intracelular, favorecendo a liberação de neuropeptídeos (FERREIRA e NAKAMURA, 1979a; VASKO, 1995). Ainda, vários estudos tem mostrado que a ativação de receptores opióides inibe correntes de cálcio em neurônios do DRG e este efeito é considerado mecanismo primordial no efeito inibitório de opióides nestas células (STEIN; SCHAFER; MACHELCKA, 2003). Ainda, através da inibição da adenilato ciclase, os opióides suprimem correntes de cátions não seletivas induzidas pela PGE₂ (INGRAM e WILLIAMS, 1994). Os nossos estudos foram realizados em colaboração com o Departamento de Neurobiologia da Universidade de Stanford, EUA. Apesar de preliminares, os dados obtidos sugerem que a crotalfina, direta ou indiretamente, inibe as correntes de cálcio induzidas pela PGE₂, em cultura de células obtidas do DRG.

Baseado em dados mostrando que a morfina, e também ligantes seletivos de receptor opióides do tipo μ , inibem a atividade de receptores TRPV1 em modelo de inflamação induzida por CFA (ENDRES-BECKER et al., 2007), avaliamos o possível efeito da crotalfina sobre o influxo de cálcio induzido por capsaicina. Nas nossas condições experimentais, este peptídeo não foi capaz de interferir com a mobilização de cálcio acarretado por este agente. Cabe lembrar que o aumento do cálcio induzido pela capsaicina é decorrente de sua ligação aos receptores TRPV1, um receptor ionotrópico catiônico não-seletivo. Diferentemente, o aumento nas concentrações intracelulares de cálcio, pela PGE₂ é indireto, resultante da ativação de PKC e PKA (MORIYAMA et al., 2005).

6 Conclusão

Os dados apresentados indicam que:

- ✓ fármacos com atividade opióide apresentam maior eficácia local antinociceptiva na vigência de sensibilização aguda induzida pela PGE₂ ou de hipernocicepção crônica induzida pela CCI. Estas condições de sensibilização interferem com a expressão gênica e protéica de receptores opióides do tipo μ , κ e δ . Contudo, estes receptores são diferentemente regulados, dependendo do estímulo e do tecido avaliado, podendo ainda, apresentar maior ativação por seu agonista, nestas condições. Estes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias que resultem em melhor controle terapêutico dos diferentes tipos de dor.
- ✓ a crotalina apresenta maior eficácia antinociceptiva na vigência de sensibilização e este efeito parece ser decorrente da maior ativação de receptores κ (hipernocicepção induzida por PGE₂) ou κ e δ (hipernocicepção crônica induzida por lesão de nevo). Os resultados indicam ainda, que a crotalina ativa a via de sinalização das MAPKs, sendo que a sensibilização induzida pela PGE₂ amplia este efeito. A ativação das MAPKs por este peptídeo, é mediada pela ativação de PKC ζ em células do DRG. Estes resultados abrem novos caminhos para a investigação destas vias de sinalização no controle da hipernocicepção.

Referências

REFERÊNCIAS*

- AIMONE, L. D.; YAKSH, T. L. Opioid modulation of capsaicin-evoked release of substance P from rat spinal cord in vivo. **Peptides**, v. 10, n. 6, p. 1127-1131, 1989.
- AIRD, S. D. et al. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1040, n. 2, p. 217-224, 1990.
- AKOPIAN, A. N. et al. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. **Nat. Neurosci.**, v. 2, n. 6, p. 541-548, 1999.
- ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 6, p. 2181-2186, 1999.
- ALEY, K. O. et al. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. **J. Neurosci.**, v. 20, n. 12, p. 4680-4685, 2000.
- AMARANTE, L. H.; DUARTE, I. D. The kappa-opioid agonist (+/-)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 454, n. 1, p. 19-23, 2002.
- ANTONIJEVIC, I. et al. Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 1 p. 165-172, 1995.
- ARVIDSSON, U. et al. Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 5, p. 3328-3341, 1995.
- ATWEH, S. F.; KUHAR, M. J. Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. I. Spinal cord and lower medulla. **Brain. Res.**, v. 124, n. 1, p. 53-67, 1977.
- BARLOCCO, D. et al. The opioid-receptor-like 1 (ORL-1) as a potential target for new analgesics. **Eur J Med Chem**, v. 35, n. 3, p. 275-282, 2000.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.
- BASBAUM, A. I. et al. Opiate and stimulus-produced analgesia: functional anatomy of a medullospinal pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 73, n. 12, p. 4685-4688, 1976.
- BASBAUM, A. I. et al. The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. **Pain**, v. 47, n. 3, p. 359-367, 1991.
- BEGLEY, R. et al. Biodistribution of intracellularly acting peptides conjugated reversibly to Tat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 318, n. 4, p. 949-954, 2004.
- BELCHEVA, M. M. et al. Mu and kappa opioid receptors activate ERK/MAPK via different protein kinase C isoforms and secondary messengers in astrocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 30, p. 27662-27669, 2005.
- BELCHEVA, M. M. et al. Opioid modulation of extracellular signal-regulated protein kinase activity is ras-dependent and involves Gbetagamma subunits. **J. Neurochem.**, v. 70, n. 2, p. 635-645, 1998.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: Referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BELMONTE, C.; CERVERO, E. Neurobiology of receptors. In: BELMONTE, C.; CERVERO, E. (Ed.) **Oxford University Press**: Oxford, 1996. p. 34-39.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, 1988.

BERKLEY, K. J. Sex differences in pain. **Behav Brain Sci**, v. 20, n. 3, p. 371-380; discussion 435-513, 1997.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 1999.

BEVAN, S. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. In: WALL, P. D. e MELZACK, R. (Ed.). **Text Book of Pain**. Edinburgh: Churchill-Livingstone, p. 85-103. 1999.

BINDER, W. et al. Effect of gender on anti-inflammatory and analgesic actions of two kappa-opioids. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 292, n. 1, p. 303-309, 2000.

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

BOHN, L. M. et al. Mitogenic signaling via endogenous kappa-opioid receptors in C6 glioma cells: evidence for the involvement of protein kinase C and the mitogen-activated protein kinase signaling cascade. **J. Neurochem.**, v. 74, n. 2, p. 564-573, 2000.

BON, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta Physiol Pharmacol Latinoam**, v. 39, n. 4, p. 439-448, 1989.

BOWEN, C. A. et al. Effects of mixed-action kappa/mu opioids on cocaine self-administration and cocaine discrimination by rhesus monkeys. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 6, p. 1125-1139, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAZIL, V. **Do emprêgo da peçonha em terapêutica**. p. 7-21, 1934.

BRAZIL, V. **Do emprego da peçonha em terapêutica**. v. 60, p. 398-408, 1950.

BRIGATTE, P. **Efeito antinociceptivo do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a dor de câncer em ratos. Inibição do crescimento tumoral pela crotoxina**. 2005. 152 f. Tese (Doutorado em Patologia) - Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BRIGATTE, P. et al. Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediated by pharmacodynamic mechanisms. **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1399-1410, 2001.

BROMM, B.; TREEDE, R. D. Pain related cerebral potentials: late and ultralate components. **Int. J. Neurosci.**, v. 33, n. 1-2, p. 15-23, 1987.

BROWNSTEIN, M. J. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 90, n. 12, p. 5391-5393, 1993.

BRUCHAS, M. R.; CHAVKIN, C. Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 210, n. 2, p. 137-147, 2010.

BRUCHAS, M. R. et al. Kappa opioid receptor activation of p38 MAPK is GRK3- and arrestin-dependent in neurons and astrocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 26, p. 18081-18089, 2006.

BRUCHAS, M. R. et al. Repeated swim stress induces kappa opioid-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. **Neuroreport**, v. 19, n. 14, p. 1417-1422, 2008.

BRUCHAS, M. R. et al. Long-acting kappa opioid antagonists disrupt receptor signaling and produce noncompetitive effects by activating c-Jun N-terminal kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 41, p. 29803-29811, 2007.

CAHILL, C. M.; HOLDRID et al. Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. **Trends Pharmacol Sci**, v. 28, n. 1, p. 23-31, 2007.

CAHILL, C. M. et al. Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. **Pain**, v. 101, n. 1-2, p. 199-208, 2003.

CAO, Y. Q. Voltage-gated calcium channels and pain. **Pain**, v. 126, n. 1-3, p. 5-9, 2006.

CARLEZON JR., W. A.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. The many faces of CREB. **Trends Neurosci.**, v. 28, n. 8, p. 436-445, 2005.

CARLTON, S. M. et al. Neuroma formation and numbers of axons in a rat model of experimental peripheral neuropathy. **Neurosci. Lett.**, v. 131, n. 1, p. 88-92, 1991.

CARROLL, I. et al. Pharmacological properties of JD1c: a novel kappa-opioid receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 501, n. 1-3, p. 111-119, 2004.

CATHELINE, G.; KAYSER, V. GUILBAUD, G. Further evidence for a peripheral component in the enhanced antinociceptive effect of systemic morphine in mononeuropathic rats: involvement of kappa-, but not delta-opioid receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 315, n. 2, p. 135-143, 1996.

CAVIEDES, B. E.; HERRANZ, J. L. [Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain]. **Rev Neurol**, v. 35, n. 11, p. 1037-1048, 2002.

CELERIER, E. et al. Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine. **Anesthesiology**, v. 92, n. 2, p. 465-472, 2000.

CESARE, P. et al. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron**, v. 23, n. 3, p. 617-624, 1999.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, p. 55-63, 1994.

CHATURVEDI, K. et al. Structure and regulation of opioid receptors. **Biopolymers**, v. 55, n. 4, p. 334-346, 2000.

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

COLEMAN, R. A. et al. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol. Rev.**, v. 46, n. 2, p. 205-229, 1994.

COLLINS, S. et al. NMDA receptor antagonists for the treatment of neuropathic pain. **Pain Med.**, v. 11, n. 11, p. 1726-1742,

COMPTON, P. et al. Withdrawal hyperalgesia after acute opioid physical dependence in nonaddicted humans: a preliminary study. **J. Pain.**, v. 4, n. 9, p. 511-519, 2003.

COUSINS, M. J.; COHEN, M. L. Physiology and Psychology of Acute Pain. In: COUSINS, M. J. e COHEN, M. L. (Ed.). **Acute Pain Management: Scientific Evidence**. Melbourn, Australia: Australian and New Zealand College of Anaesthetists, 2005. p. 1-19.

COX, J. J. et al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 894-898, 2006.

CUNHA, F. Q. et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br J Pharmacol.**, v. 104, n. 3, p. 765-767, 1991.

CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 660-664, 1992.

CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M.M; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127, n. 3, p. 671-678, 1999.

CUNHA, T. M. et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 107, n. 9, p. 4442-4447, 2010.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

DADO, R. J. et al. Immunofluorescent identification of a delta (delta)-opioid receptor on primary afferent nerve terminals. **Neuroreport**, v. 5, n. 3, p. 341-344, 1993.

DAI, Y. et al. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 17, p. 7737-7745, 2002.

DAVIDSON, J. et al. Pethidine-augmented white cell scintigraphy in inflammatory bowel disease. **Eur J Nucl Med**, v. 27, n. 6, p. 656-659, 2000.

DEVOR, M. The pathophysiology of damaged peripheral nerves. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (Ed.). **Text Book of Pain**. Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1994. p. 79-100.

DHAWAN, B. N. et al. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 48, n. 4, p. 567-592, 1996.

DIB-HAJJ, S. D.; YANG, Y.; WAXMAN S.G Genetics and molecular pathophysiology of Na(v)1.7-related pain syndromes. **Adv. Genet.**, v. 63, p. 85-110, 2008.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN, A. F. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 8, p. 1235-1238, 1987.

DINA, O. A. et al. Role of the sensory neuron cytoskeleton in second messenger signaling for inflammatory pain. **Neuron**, v. 39, n. 4, p. 613-624, 2003.

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

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

ELIAV, E. et al. The kappa opioid agonist GR89,696 blocks hyperalgesia and allodynia in rat models of peripheral neuritis and neuropathy. **Pain**, v. 79, n. 2-3, p. 255-264, 1999.

ENDRES-BECKER, J. et al. Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. **Mol. Pharmacol.**, v. 71, n. 1, p. 12-18, 2007.

ENGLAND, S.; BEVAN, S.; DOCHERTY, R.J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. **J. Physiol.**, v. 495, pt. 2, p. 429-440, 1996.

ERSPAMER, V. et al. Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for delta opioid binding sites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 86, n. 13, p. 5188-5192, 1989.

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

FAURE, G. et al. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A2 neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. **Biochemistry**, v. 30, n. 32, p. 8074-8083, 1991.

FERGUSON, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, n. 1, p. 1-24, 2001.

FERGUSON, S. S. et al. Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. **Science**, v. 271, n. 5247, p. 363-366, 1996.

FERREIRA, S. H. Local control of inflammatory pain. **Agents Actions**, v. 11, n. 6-7, p. 636-638, 1981.

FERREIRA, S. H. **A classification of peripheral analgesics based upon their mode of action.** Oxford: Oxford University Press, 1990.

FERREIRA, S. H. **Óxido Nítrico Endógeno y Farmacos Nitrovasodilatadores.** Cantabria: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cantabria, 1994.

FERREIRA, S. H. et al. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 201, n. 1, p. 121-122, 1991.

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

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

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B.B.; CORRÊA, F.M.A. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 53, p. 39, 1978.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 1227-1231, 1993.

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

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

FERREIRA, S. H.; ROMITELLI, M.; DE NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 13, p. S220-222, 1989. Suppl. 5.

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

FOLEY, K. M.; INTURRISI, C. E. Analgesic drug therapy in cancer pain: principles and practice. **Med. Clin. North. Am.**, v. 71, n. 2, p. 207-232, 1987.

FUJINO, H. et al. Prostaglandin E₂ induced functional expression of early growth response factor-1 by EP₄, but not EP₂, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 14, p. 12151-12156, 2003.

GENDRON, L. et al. Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. **Neuroscience**, v. 150, n. 4, p. 807-817, 2007.

GIORGI, R. et al. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicol.**, v. 31, n. 10, p. 1257-1265, 1993.

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

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

GOUARDERES, C.; CROS, J.; QUIRION, R. Autoradiographic localization of mu, delta and kappa opioid receptor binding sites in rat and guinea pig spinal cord. **Neuropeptides**, v. 6, n. 4, p. 331-342, 1985.

GRACEY, R. H.; LYNCH S.A.; BENNETT, G.J. Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. **Pain**, v. 51, n. 2, p. 175-194, 1992.

GRANADOS-SOTO, V. et al. Evidence for the involvement of nitric oxide in the antinociceptive effect of ketorolac. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 277, n. 2-3, p. 281-284, 1995.

GRANADOS-SOTO, V. et al. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 340, n. 2-3, p. 177-180, 1997.

GUIGNARD, B. et al. Acute opioid tolerance: intraoperative remifentanil increases postoperative pain and morphine requirement. **Anesthesiology**, v. 93, n. 2, p. 409-417, 2000.

GUPTA, A. et al. Conformation state-sensitive antibodies to G-protein-coupled receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 8, p. 5116-5124, 2007.

GUTIERREZ, V. P. **Efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a dor neuropática e a resposta imune**. 2005. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GUTIERREZ, V. P. et al. Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 594, n. 1-3, p. 84-92, 2008.

GUTIERREZ, V. P. et al. Peripheral -arginine-nitric oxide-cGMP pathway and ATP-sensitive K⁺ channels are involved in the antinociceptive effect of crotalphine on neuropathic pain in rats. **Behavioural Pharmacology**. Submitted.

HAN, J. et al. ATP-sensitive K(+) channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 283, n. 4, p. H1545-1554, 2002.

HAN, J. et al. Modulation of ATP-sensitive potassium channels by cGMP-dependent protein kinase in rabbit ventricular myocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 25, p. 22140-22147, 2001.

HARRISON, L. M. et al. Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates. **Peptides**, v. 19, n. 9, p. 1603-1630, 1998.

HASSAN, A. H. et al. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. **Neuroscience**, v. 55, n. 1, p. 185-195, 1993.

HINGTGEN, C. M. et al. Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 7 Pt 2, p. 5411-5419, 1995.

INGRAM, S. L.; WILLIAMS, J. T. Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase. **Neuron**, v. 13, n. 1, p. 179-186, 1994.

ITO, N. OBATA, H.; SAITO, S. Spinal microglial expression and mechanical hypersensitivity in a postoperative pain model: comparison with a neuropathic pain model. **Anesthesiology**, v. 111, n. 3, p. 640-648, 2009.

JENSEN, T. S. Opioids in the brain: supraspinal mechanisms in pain control. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 41, n. 1, pt. 2, p. 123-132, 1997.

JI, R. R.; WOOLF, C. J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol. Dis.**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2001.

JI, R. R. et al. Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 12, p. 8156-8166, 1995.

JOHNSON, E. E. et al. The role of opioid receptor phosphorylation and trafficking in adaptations to persistent opioid treatment. **Neurosignals**, v. 14, n. 6, p. 290-302, 2005.

JONGKAMONWIWAT, N. et al. The presence of opioid receptors in rat inner ear. **Hear Res.**, v. 181, n. 1-2, p. 85-93, 2003.

JOSHI, S. K. et al. Involvement of the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. **Pain**, v. 123, n. 1-2, p. 75-82, 2006.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

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

KABLI, N.; CAHILL, C. M. Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain. **Pain**, v. 127, n. 1-2, p. 84-93, 2007.

KAGE, K. et al. Alteration of dorsal root ganglion P2X3 receptor expression and function following spinal nerve ligation in the rat. **Exp. Brain Res.**, v. 147, n. 4, p. 511-519, 2002.

KAM, A. Y. et al. Kappa-opioid receptor signals through Src and focal adhesion kinase to stimulate c-Jun N-terminal kinases in transfected COS-7 cells and human monocytic THP-1 cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 310, n. 1, p. 301-310, 2004a.

KAM, A. Y. et al. Phosphatidylinositol-3 kinase is distinctively required for mu-, but not kappa-opioid receptor-induced activation of c-Jun N-terminal kinase. **J. Neurochem.**, v. 89, n. 2, p. 391-402, 2004b.

KARANDIKAR, M.; COBB, M. H. Scaffolding and protein interactions in MAP kinase modules. **Cell Calcium**, v. 26, n. 5, p. 219-226, 1999.

KASSUYA, C. A. et al. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **Br. J. Pharmacol.**, v. 150, n. 6, p. 727-737, 2007.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 87, n. 1, p. 3-11, 2001.

KIEFFER, B. L. et al. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 89, n. 24, p. 12048-12052, 1992.

KIEFFER, B. L.; EVANS, C. J. Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo. **Neuropharmacology**, v. 56 Suppl 1, p. 205-212, 2009.

KIM, S. H.; CHUNG, J. M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, n. 3, p. 355-363, 1992.

KOHNO, T. et al. Three-dimensional structure in solution of the calcium channel blocker omega-conotoxin MVIIA. **Biochemistry**, v. 34, n. 32, p. 10256-10265, 1995.

KOMATSU, T. et al. Spinal ERK activation via NO-cGMP pathway contributes to nociceptive behavior induced by morphine-3-glucuronide. **Biochem. Pharmacol.**, v. 78, n. 8, p. 1026-1034, 2009.

KONNO, K. et al. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, v. 29, n. 8, p. 1293-1304, 2008.

KREIBICH, A. S.; BLENDY, J. A. cAMP response element-binding protein is required for stress but not cocaine-induced reinstatement. **J. Neurosci.**, v. 24, n. 30, p. 6686-6692, 2004.

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

KURASHI, Y. et al. Suppression by gabapentin of pain-related mechano-responses in mice given orthotopic tumor inoculation. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, n. 4, p. 550-552, 2003.

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

LAW, P. Y. et al. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 40, p. 389-430, 2000.

LEE, B. H. et al. Behavioral characteristics of a mouse model of cancer pain. **Yonsei. Med. J.**, v. 46, n. 2, p. 252-259, 2005.

LEWIS, J. et al. Opioids and pain regulation. **Pain Headache**, v. 9, p. 129-159, 1987.

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

LIGHT, A. R.; WILLCOCKSON, H. H. Spinal laminae I-II neurons in rat recorded in vivo in whole cell, tight seal configuration: properties and opioid responses. **J. Neurophysiol.**, v. 82, n. 6, p. 3316-3326, 1999.

LIN, Y. F. et al. NO stimulation of ATP-sensitive potassium channels: Involvement of Ras/mitogen-activated protein kinase pathway and contribution to neuroprotection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, n. 20, p. 7799-7804, 2004.

LOESER, J. D. Perspectives on pain. In: WORLD CONGRESS ON CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 1., 1980, London. **Proceedings...** London: [s.n.], 1980. p. 316-326.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-477, 2008.

LOHSE, M. J. et al. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. **Science**, v. 248, n. 4962, p. 1547-1550, 1990.

LOMAS, L. M. et al. Sex differences in the potency of kappa opioids and mixed-action opioids administered systemically and at the site of inflammation against capsaicin-induced hyperalgesia in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 191, n. 2, p. 273-285, 2007.

LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrrone-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflamm Res**, v. 45, n. 6, p. 308-311, 1996.

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

LUGER, N. M. et al. Efficacy of systemic morphine suggests a fundamental difference in the mechanisms that generate bone cancer vs inflammatory pain. **Pain**, v. 99, n. 3, p. 397-406, 2002.

MA, W. et al. Chronic morphine exposure increases the phosphorylation of MAP kinases and the transcription factor CREB in dorsal root ganglion neurons: an in vitro and in vivo study. **Eur. J. Neurosci.**, v. 14, n. 7, p. 1091-1104, 2001.

MAEKAWA, K. et al. Expression of mu- and kappa-, but not delta-, opioid receptor mRNAs is enhanced in the spinal dorsal horn of the arthritic rats. **Pain**, v. 64, n. 2, p. 365-371, 1996.

MALMBERG, A. B. et al. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma. **Science**, v. 278, n. 5336, p. 279-283, 1997.

MANSOUR, A. et al. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. **J. Comp. Neurol.**, v. 350, n. 3, p. 412-438, 1994.

MAO, J.; GOLD, M.S.; BACKONJA, M.M. Combination drug therapy for chronic pain: a call for more clinical studies. **J. Pain.**, v. 12, n. 2, p. 157-166, 2010.

MAO, J. et al. Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord of rats associated with tolerance to the analgesic effects of morphine. **Brain. Res.**, v. 677, n. 2, p. 257-267, 1995.

MCLACHLAN, E. M. et al. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. **Nature**, v. 363, n. 6429, p. 543-546, 1993.

MELCHIORRI, P. et al. Long-term sensitization to the activation of cerebral delta-opioid receptors by the deltorphin Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂ in rats exposed to morphine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 89, n. 9, p. 3696-3700, 1992.

MELIEF, E. J. et al. Ligand-directed c-Jun N-terminal kinase activation disrupts opioid receptor signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 107, n. 25, p. 11608-11613, 2010.

MERSKEY, H. Logic, truth and language in concepts of pain. **Qual. Life. Res.**, v. 3, p. S69-76, 1994.

MESSINGER, R. B. et al. In vivo silencing of the Ca(V)_{3.2} T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy. **Pain**, v. 145, n. 1-2, p. 184-195, 2009.

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

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

MILLIGAN, E. D. et al. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. **Brain. Res.**, v. 861, n. 1, p. 105-116, 2000.

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

MINDEN, A. et al. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. **Mol. Cell Biol.**, v. 14, n. 10, p. 6683-6688, 1994.

MOCHLY-ROSEN, D.; KAUVAR, L. M. Modulating protein kinase C signal transduction. **Adv. Pharmacol.**, v. 44, p. 91-145, 1998.

MORIYAMA, T. et al. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. **Mol. Pain**, v. 1, p. 3, 2005.

MOUSA, S. A. et al. Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. **J. Neuroimmunol.**, v. 126, n. 1-2, p. 5-15, 2002.

MOUSA, S. A. et al. beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. **J. Neuroimmunol.**, v. 115, n. 1-2, p. 71-78, 2001.

NAGAKURA, Y. et al. Determination of current threshold for paw withdrawal with sine-wave electrical stimulation in rats: effect of drugs and alteration in acute inflammation. **Pain**, v. 134, n. 3, p. 293-301, 2008.

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

NARITA, M. et al. Lack of the involvement of mu1-opioid receptor subtype on motivational effects induced by the endogenous mu-opioid receptor ligands endomorphin-1 and -2 in the mouse. **Neurosci. Lett.**, v. 308, n. 1, p. 17-20, 2001.

NASSAR, M. A. et al. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, n. 34, p. 12706-12711, 2004.

NEGRI, M. et al. Plasma opioid levels during extracorporeal gallstone lithotripsy. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 88, n. 7, p. 1093-1096, 1993.

NEGUS, S. S. et al. Kappa opioid antagonist effects of the novel kappa antagonist 5'-guanidinonaltrindole (GNTI) in an assay of schedule-controlled behavior in rhesus monkeys. **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 163, n. 3-4, p. 412-419, 2002.

NORTH, R. A. Twelfth Gaddum memorial lecture. Drug receptors and the inhibition of nerve cells. **Br. J. Pharmacol.**, v. 98, n. 1, p. 13-28, 1989.

NORTH, R. A.; EGAN, T. M. Actions and distributions of opioid peptides in peripheral tissues. **Br. Med. Bull.**, v. 39, n. 1, p. 71-75, 1983.

OBARA, I. et al. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. **Pain**, v. 141, n. 3, p. 283-291, 2009.

OCANA, M. et al. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 500, n. 1-3, p. 203-219, 2004.

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

PARADA, C. A. et al. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to Nav1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 100, n. 5, p. 2923-2928, 2003.

PERSSON, A. I. et al. Comparison of immunoblotted delta opioid receptor proteins expressed in the adult rat brain and their regulation by growth hormone. **Neurosci. Res.**, v. 52, n. 1, p. 1-9, 2005.

PICOLO, G. **Participação de receptores opióides, óxido nítrico e de canais para potássio no efeito antinociceptivo induzido pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus***. 2002. 100 f. Tese (Departamento de Farmacologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

PICOLO, G. et al. Activation of peripheral ATP-sensitive K⁺ channels mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 469, n. 1-3, p. 57-64, 2003.

PICOLO, G.; CURY, Y. Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, a delta- and kappa-opioid receptor agonist. **Life Sci.**, v. 75, n. 5, p. 559-573, 2004.

PICOLO, G. et al. The antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom is mainly due to a supraspinally integrated response. **Toxicon**, v. 36, n. 1, p. 223-227, 1998.

PICOLO, G.; GIORGI, R.; CURY, Y. Delta-Opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 391, p. 55-62, 2000b.

PIERCE, K. L. et al. Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 25, p. 23155-23160, 2001.

PIOVEZAN, A. P. et al. Endothelins potentiate formalin-induced nociception and paw edema in mice. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 75, n. 6, p. 596-600, 1997.

PIROS, E. T. et al. Functional analysis of cloned opioid receptors in transfected cell lines. **Neurochem. Res.**, v. 21, n. 11, p. 1277-1285, 1996.

POLAKIEWICZ, R. D. et al. A mitogen-activated protein kinase pathway is required for mu-opioid receptor desensitization. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 20, p. 12402-12406, 1998.

POLAKIEWICZ, R. D. et al. mu-Opioid receptor activates signaling pathways implicated in cell survival and translational control. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 36, p. 23534-23541, 1998.

POLGAR, E. et al. The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. **Brain. Res.**, v. 833, n. 1, p. 71-80, 1999.

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

PORRECA, F. et al. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 96, n. 14, p. 7640-7644, 1999.

PORRECA, F. et al. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci.**, v. 25, n. 6, p. 319-325, 2002.

PRZEWLOCKA, B. et al. Differential effects of opioid receptor agonists on nociception and cAMP level in the spinal cord of monoarthritic rats. **Life Sci.**, v. 50, n. 1, p. 45-54, 1992.

PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in chronic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 429, n. 1-3, p. 79-91, 2001.

PUEHLER, W. et al. Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction. **Neuroscience**, v. 129, n. 2, p. 473-479, 2004.

QUIRION, R. Pain, nociception and spinal opioid receptors. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 8, n. 4-6, p. 571-579, 1984.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesia activity on inflamed tissue. **Arch. Inst. Pharmacodyn.**, v. 111, p. 209-219, 1957.

RECHTHAND, E.; RAPOPORT, S. I. Regulation of the microenvironment of peripheral nerve: role of the blood-nerve barrier. **Prog. Neurobiol.**, v. 28, n. 4, p. 303-343, 1987.

REGAN, J. W. et al. Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. **Mol. Pharmacol.**, v. 46, n. 2, p. 213-220, 1994.

REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. The primary afferent nociceptor as pattern generator. **Pain**, v. 6, p. S103-109, 1999.

REISINE, T. et al. Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G proteins and effector systems. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 780, p. 168-175, 1996.

REXED, B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. **J. Comp. Neurol.**, v. 100, n. 2, p. 297-379, 1954.

SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, n. 10, p. 3680-3685, 2004.

SAEGUSA, H.; MATSUDA, Y.; TANABE, T. Effects of ablation of N- and R-type Ca(2⁺) channels on pain transmission. **Neurosci. Res.**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2002.

SASAMURA, T. et al. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 441, n. 3, p. 185-191, 2002.

SCHAEFFER JR, R. C. et al. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) of size-selected crotalid venom antigens by Wyeth's polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 26, n. 1, p. 67-76, 1988.

SCHAFER, M. et al. Inflammation enhances peripheral mu-opioid receptor-mediated analgesia, but not mu-opioid receptor transcription in dorsal root ganglia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 279, n. 2-3, p. 165-169, 1995.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch. Surg.**, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SCHEMELZ, M. et al. Sensitization of intensive branches of C nociceptors in human skin. **J. Physiology**, v. 480, p. 389-394, 1994.

SCHMIDT, R. et al. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 1 Pt 1, p. 333-341, 1995.

SCHNITZLER, A.; PLONER, M. Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. **J. Clin. Neurophysiol.**, v. 17, n. 6, p. 592-603, 2000.

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

SCHWEI, M. J. et al. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 24, p. 10886-10897, 1999.

SEGAWA, K. et al. Inhibitory effects of nicorandil on rat mesangial cell proliferation via the protein kinase G pathway. **Nephron**, v. 87, n. 3, p. 263-268, 2001.

SEGOND VON BANCHET, G. et al. Prostaglandin E2 increases the expression of the neurokinin1 receptor in adult sensory neurones in culture: a novel role of prostaglandins. **Br. J. Pharmacol.**, v. 139, n. 3, p. 672-680, 2003.

SELLEY, D. E. et al. Modification of G protein-coupled functions by low-pH pretreatment of membranes from NG108-15 cells: increase in opioid agonist efficacy by decreased inactivation of G proteins. **Mol. Pharmacol.**, v. 44, n. 4, p. 731-741, 1993.

SELTZER, Z. et al. Modulation of neuropathic pain behavior in rats by spinal disinhibition and NMDA receptor blockade of injury discharge. **Pain**, v. 45, n. 1, p. 69-75, 1991.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205-218, 1990.

SHAHABI, N. A. et al. delta opioid receptors stimulate Akt-dependent phosphorylation of c-jun in T cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, n. 2, p. 933-939, 2006.

SHAQURA, M. A. et al. Characterization of mu opioid receptor binding and G protein coupling in rat hypothalamus, spinal cord, and primary afferent neurons during inflammatory pain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 308, n. 2, p. 712-718, 2004.

SHIMOYAMA, M. et al. A mouse model of neuropathic cancer pain. **Pain**, v. 99, n. 1-2, p. 167-174, 2002.

SHIMOYAMA, M. et al. Change of dorsal horn neurochemistry in a mouse model of neuropathic cancer pain. **Pain**, v. 114, n. 1-2, p. 221-230, 2005.

SMITH, J. A. et al. Characterization of prostanoid receptor-evoked responses in rat sensory neurones. **Br. J. Pharmacol.**, v. 124, n. 3, p. 513-523, 1998.

SNEDECOR, G. W. et al. **Statistical methods Biometry**. New York: Owa State University Press.p.859, 1946.

SOARES, A. C.; DUARTE, I. D. Dibutyl-*cyclic* GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K(+) channels in the rat PGE₂-induced hyperalgesic paw. **Br. J. Pharmacol.**, v. 134, n. 1, p. 127-131, 2001.

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

SOUTHALL, M. D.; VASKO, M. R. Prostaglandin receptor subtypes, EP₃C and EP₄, mediate the prostaglandin E₂-induced cAMP production and sensitization of sensory neurons. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 19, p. 16083-16091, 2001.

STEIN, C. et al. Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, n. 16, p. 1123-1126, 1991.

STEIN, C. et al. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin. **J. Neurosci.**, v. 10, n. 4, p. 1292-1298, 1990.

STEIN, C.; GRAMSCH, C.; HERZ, A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 87, n. 15, p. 5935-5939, 1990.

STEIN, C. et al. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 248, n. 3, p. 1269-1275, 1989.

STEIN, C.; SCHAFER M.; MACHELCKA, K. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nat. Med.**, v. 9, n. 8, p. 1003-1008, 2003.

SUGIMOTO, Y. et al. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP₃ subtype. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 10, p. 6463-6466, 1992.

SWAYNE, L. A.; BOURINET, E. Voltage-gated calcium channels in chronic pain: emerging role of alternative splicing. **Pflugers Arch.**, v. 456, n. 3, p. 459-466, 2008.

SWEATT, J. D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 14, n. 3, p. 311-317, 2004.

TAIWO, Y. O. et al. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience**, v. 32, n. 3, p. 577-580, 1989.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Kappa- and delta-opioids block sympathetically dependent hyperalgesia. **J. Neurosci.**, v. 11, n. 4, p. 928-932, 1991.

TEGEDER, I. et al. Peripheral opioid analgesia in experimental human pain models. **Brain**, v. 126, n. Pt 5, p. 1092-1102, 2003.

TEIXEIRA, M. J. **Dor: Conceitos Gerais.** São Paulo: Limay.72, 1994.

THOMAS, G. M.; HUGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 5, n. 3, p. 173-183, 2004.

TODD, A. J.; KOERBER, H. R. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: MCMAHON, S. B. e KOLTZENBURG, M. (Ed.). **Textbook of Pain.** Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, p. 2006.

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

TZELLOS, T. G. et al. Efficacy of pregabalin and gabapentin for neuropathic pain in spinal-cord injury: an evidence-based evaluation of the literature. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 64, n. 9, p. 851-858, 2008.

URBAN, J. D. et al. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 320, n. 1, p. 1-13, 2007.

VAN DER VRIES, E. et al. Evaluation of a rapid molecular algorithm for detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus and screening for a key oseltamivir resistance (H275Y) substitution in neuraminidase. **J. Clin. Virol.**, v. 47, n. 1, p. 34-37, 2010.

VANDERAH, T. W. Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain. **Clin. J. Pain**, v. 26 p. S10-15, 2010.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. **Pain**, v. 85, n. 1-2, p. 9-18, 2000.

VASKO, M. R. Prostaglandin-induced neuropeptide release from spinal cord
In: NYBERG, F.;SHARMA, H. S. e WIESENFELD-HALLIM, A. (Ed.). **Progress in Brain Research**, v.104, p. 1995.

VELAZQUEZ, K. T. et al. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. **Pharmacol. Res.**, v. 55, n. 6, p. 578-589, 2007.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic? **Br. J. Anaesth.**, v. 105 Suppl 1, p. i69-85,

WATABE, A. et al. Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 27, p. 20175-20178, 1993.

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

WHITE, R. E. Cyclic GMP and ion channel regulation. **Adv. Second Messenger Phosphoprotein. Res.**, v. 33, p. 251-277, 1999.

WIESELER-FRANK, J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Glial activation and pathological pain. **Neurochem. Int.**, v. 45, n. 2-3, p. 389-395, 2004.

WIESENFELD-HALLIN, Z. Sex differences in pain perception. **Gend. Med.**, v. 2, n. 3, p. 137-145, 2005.

WILLIS, A. L.; CORNELSEN, M. Repeated injection of prostaglandin E2 in rat paws induces chronic swelling and a marked decrease in pain threshold. **Prostaglandins**, v. 3, n. 3, p. 353-357, 1973.

WITTERT, G. et al. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 218, n. 3, p. 877-881, 1996.

WOOD, P. L. The significance of multiple CNS opioid receptor types: a review of critical considerations relating to technical details and anatomy in the study of central opioid actions. **Peptides**, v. 9 Suppl 1, p. 49-55, 1988.

WOOLF, C. J. Pain. **Neurobiol. Dis.**, v. 7, n. 5, p. 504-510, 2000.

WOOLF, C. J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Ann. Intern. Med.**, v. 140, n. 6, p. 441-451, 2004.

YAKSH, T. L. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. **Trends Pharmacol Sci**, v. 20, n. 8, p. 329-337, 1999.

YAKSH, T. L.; RUDY, T. A. Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. **Pain**, v. 4, n. 4, p. 299-359, 1978.

YAMDEU, R. S. et al. p38 Mitogen-activated protein kinase activation by nerve growth factor in primary sensory neurons upregulates mu-opioid receptors to enhance opioid responsiveness toward better pain control. **Anesthesiology**, v. 114, n. 1, p. 150-161, 2010.

YOSHIMURA, M.; NORTH, R. A. Substantia gelatinosa neurones hyperpolarized in vitro by enkephalin. **Nature**, v. 305, n. 5934, p. 529-530, 1983.

ZAMPONI, G. W. et al. Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. **Brain. Res. Rev.**, v. 60, n. 1, p. 84-89, 2009.

ZHANG, H. W. et al. Mechanical hypersensitivity and alterations in cutaneous nerve fibers in a mouse model of skin cancer pain. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 91, n. 2, p. 167-170, 2003.

ZHANG, X. et al. Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. **Neuroscience**, v. 82, n. 1, p. 223-240, 1998.

ZHANG, Y. et al. Intrathecal morphine reduces allodynia after peripheral nerve injury in rats via activation of a spinal A1 adenosine receptor. **Anesthesiology**, v. 102, n. 2, p. 416-420, 2005.

ZHENG, H. et al. Agonist-selective signaling of G protein-coupled receptor: mechanisms and implications. **IUBMB Life**, v. 62, n. 2, p. 112-119,

ZHUANG, Z. Y. et al. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 13, p. 3551-3560, 2006.

ZIMMERMANN, K. et al. Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. **Nature**, v. 447, n. 7146, p. 855-858, 2007.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

ZOLLNER, C. et al. Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain. **J. Clin. Invest.**, 2008.

ZOLLNER, C. et al. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. **Mol. Pharmacol.**, v. 64, n. 2, p. 202-210, 2003.