



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ENVOLVIMENTO DA VIA L-ARGININA/ NO/ GMP_c MEDULAR NO
EFEITO ANTI-EDEMATOGÊNICO DA MORFINA ADMINISTRADA
POR VIA INTRATECAL

SARA COMELLI BROCK

FLORIANÓPOLIS – SC

2006

SARA COMELLI BROCK

**ENVOLVIMENTO DA VIA L-ARGININA/ NO/ GMP_c MEDULAR NO
EFEITO ANTI-EDEMATOGÊNICO DA MORFINA ADMINISTRADA POR
VIA INTRATECAL**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-
graduação em Neurociências, Centro de
Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Neurociências.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi

FLORIANÓPOLIS – SC

2006

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.”*

Mensagem/ Mar Português

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi, pelo incentivo, confiança e sobretudo pela paciência com que nos ajuda sempre;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pelos ensinamentos;

Ao professor Jamil Assreuy, pela atenção e disponibilização de seu laboratório sempre que necessário, e aos seus orientandos, em especial ao Daniel e Geisson, pela paciência e dedicação;

Aos funcionários da Neurociências, em especial ao secretário Nivaldo, e aos funcionários da Farmacologia;

Às meninas do laboratório, Elis, Lúcia e Maria, que tornaram possível meu aprendizado dentro do laboratório, sendo grandes professoras e sobretudo grandes amigas;

Aos colegas de laboratório, Daniel, Eduardo, Taty e Raquel pelo incentivo e companheirismo;

À minha família, pela confiança dedicada;

Ao Juliano, em especial, por estar comigo cada dia desta caminhada, demonstrando seu amor com muito apoio, compreensão e paciência;

A todos os amigos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

Sobretudo à DEUS, por ter me iluminado durante este caminho.

RESUMO

A atividade antidrômica nas fibras aferentes primárias causada por reflexos da raiz dorsal (RRDs) pode interferir na inflamação periférica. Tendo em vista este aspecto, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da morfina e da via L-arginina/ Óxido Nítrico (NO)/ GMPc, intratecal no edema e migração de neutrófilos induzidos por carragenina. Para indução do edema inflamatório, ratos Wistar machos (250 - 350 g) receberam carragenina subcutânea (150 µg/ 50 µl) na pata posterior esquerda. Avaliou-se o edema de pata pelo aumento de volume (ml) e a migração de neutrófilos pela dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). As drogas em estudo foram administradas por via intratecal, num volume máximo de 20 µl, 30 minutos antes da aplicação de carragenina. Morfina (37 nmol) inibiu o edema de pata, sendo que o inibidor de corticosteróide Aminoglutetimida (50 mg/kg, v.o., 90 minutos antes do tratamento intratecal) não modificou este efeito. Morfina não causou alteração na atividade da enzima MPO. O inibidor da síntese de NO, N^G-nitro-L-arginina (L-NNA), em doses menores (0,01 e 0,03 nmol) potencializou o edema de pata e em doses maiores (3 e 30 nmol) o inibiu. O precursor da síntese de NO, L-arginina (0,015 nmol) preveniu o efeito da dose menor de L-NNA (0,01 nmol), no entanto, L-arginina (4,5 nmol) não preveniu o efeito da dose maior de L-NNA (3 nmol). A co-administração de L-NNA (3 pmol) ou do inibidor da guanilato ciclase, 1H-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona (ODQ, 10 nmol), com a morfina (37 nmol) preveniu o efeito anti-edematogênico da morfina. ODQ também preveniu o efeito anti-edematogênico do doador de NO, S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP, 3 nmol). O tratamento intratecal não alterou o edema induzido por carragenina na pata anterior, sugerindo que a manipulação intratecal com estas drogas não apresentou efeito sistêmico. Estes resultados sugerem a participação da via L-arginina/ NO/ GMPc medular no efeito anti-edematogênico da morfina administrada por via intratecal. A manipulação medular com estes agentes pode modular a deflagração de RRDs nos aferentes primários e, conseqüentemente, influenciar o componente neurogênico da inflamação.

Palavras-chave: Edema inflamatório. Reflexo da raiz dorsal. Morfina. Óxido nítrico.

ABSTRACT

The antidromic activity observed in the primary afferent fibers as a consequence of dorsal root reflexes (DRRs) can modulate the peripheral inflammation. The aim of this work was to investigate the effect the intrathecal administration of morphine and the spinal L-arginine/ Nitric oxide (NO)/ cGMP pathway in carrageenan-induced edema and neutrophil migration. Male Wistar rats (250-350 g) received carrageenan (150 µg/ 50 µl, subcutaneous) in the left hindpaw. Edema was measured as paw volume increased (ml), and neutrophil migration by the dosage of myeloperoxidase (MPO) activity. The rats received intrathecal injections of drugs (20 µl) 30 minutes before carragenan treatment. Morphine (37 nmol) inhibited of the inflammatory paw edema, but had no effect on neutrophil migration. The corticosteroid inhibitor, Aminoglutethimide (50 mg/kg, v.o.), administered 90 min before morphine injection, did not modify the morphine effect. The nitric oxide sintase inhibitor, L-NNA (0.01 e 0.03 nmol) promoted increase of the paw edema. However, at higher doses this drug (3 and 30 nmol) inhibited the paw edema. The NO precursor, L-arginine (0,015 nmol) prevented the L-NNA effect in dose of 0.01 nmol, but L-arginine (4,5 nmol) did not prevent the L-NNA effect in dose of 3 nmol. The co-administration of L-NNA (3 pmol) or ODQ (a guanylate cyclase inhibitor, 10 nmol) with morphine (37 nmol) prevented the anti-edematogenic effect of morphine. ODQ also prevented the anti-edematogenic effect of SNAP (a NO donors, 3 nmol). The intrathecal treatment did not modify the edema induced by carrageenan given in the forepaw suggesting that intratecal manipulation with these drugs had no systemic effect. These results suggest that there is participation of spinal cord L-arginine/ NO/ cGMP pathway in the anti-edematogenic effect of morphine via modulation of dorsal root reflex and neurogenic inflammation.

Key words: Inflammatory edema. Dorsal root reflexe. Morphine. Nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração do Reflexo Axonal e do Reflexo da Raiz Dorsal.....	09
Figura 2 – Esquema da reação catalisada por NOS e seus co-fatores.....	12
Figura 3 – Efeito da morfina no aumento de volume de pata.....	29
Figura 4 – Efeito da morfina no aumento de volume de pata.....	30
Figura 5 – Efeito da aminoglutetimida sobre a inibição do aumento de volume de pata produzido pela morfina.....	32
Figura 6 – Efeito da administração de morfina na atividade da enzima Mieloperoxidase.....	33
Figura 7 – Efeito do L-NNA no aumento de volume de pata.....	35
Figura 8 – Efeito do NPLA no aumento de volume de pata.....	37
Figura 9 – Efeito do L-NNA na inibição do aumento de volume de pata produzido pela morfina.....	40
Figura 10 – Efeito da L-arginina e da co-administração de L-arginina + L-NNA no aumento de volume de pata.....	41
Figura 11 – Efeito do SNAP no aumento de volume de pata.....	43
Figura 12 – Efeito do ODQ no aumento de volume de pata.....	46
Figura 13 – Efeito do ODQ co-administrado com morfina ou SNAP no aumento de volume de pata.....	47
Figura 14 – Efeito das drogas na Pata Anterior.....	48
Figura 15 – Efeito do SNAP na pressão arterial.....	49
Figura 16 – Modelo esquemático da ação da morfina intratecal sobre a Inflamação periférica.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da administração de outras doses de L-NNA no aumento de volume de pata.....	36
Tabela 2 – Efeito da administração de outras doses de NPLA no aumento de volume de pata.....	38
Tabela 3 – Efeito da administração de outras doses de SNAP no aumento de volume de pata.....	44

LISTA DE ABREVIÇÕES

AG - aminoglutetimida
AMPc - monofosfato cíclico de adenosina
BH₄ - tetrahidrobiopterina
Ca²⁺/CAM - complexo cálcio-calmodulina
CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CHA - ciclohexiladenosina
E.P.M. - erro padrão da média
FAD - dinucleotídeo de flavina
fMLP - peptídeo N-formil
FMN - mononucleotídeo de flavina
GABA - ácido gama aminobutírico
GCs - guanilato ciclase solúvel
GMPc - guanosina 3P, 5P-monofosfato cíclico
GTP - guanosina 5P-trifosfato
HTAB - hexadeciltrimetilamônio
IL-8 - interleucina - 8
i.t. - intratecal
L-NNA - N^G-nitro-L-arginina
L-ARG - L-arginina
L-NAME - N^G-nitro-L-arginina metil éster
L-NMMA - N^G-monometil-L-arginina
LTB₄ - leucotrieno B₄
MOR - morfina
MPO - mieloperoxidase
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NKA - neurocinina A
NKB - neurocinina B
NKK - neurocinina K
NMDA - N-metil-D-aspartato
NO - óxido nítrico
NOHarginina - N^W-hidroxi-L-arginina

NOS - óxido nítrico sintase

NO_2^- - íon nitrito

NO_3^- - íon nitrato

NPLA - N^ω-propil-L-arginina

ODQ - 1H-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona

PAD - despolarização do aferente primário

p/v - peso por volume

RRD - reflexo da raiz dorsal

r.p.m. - rotações por minuto

s.c. - subcutâneo

SF - solução fisiológica

SNAP - S-nitroso-N-acetilpenicilamina

SP - substância P

TMB - tetrametilbenzidina

VIP - peptídeo vasoativo intestinal

v.o. - via oral

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIÇÕES	x
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 EDEMA INFLAMATÓRIO.....	02
1.1.1 Componente Neurogênico da Inflamação.....	05
1.2 REFLEXO DA RAIZ DORSAL.....	06
1.3 ÓXIDO NÍTRICO.....	11
1.4 OPIÓIDES NA INFLAMAÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 JUSTIFICATIVA.....	18
2.2 OBJETIVO GERAL.....	19
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 ANIMAIS.....	21
3.2 INJEÇÃO INTRATECAL.....	21
3.3 MODELO EXPERIMENTAL:	
EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	22
3.4 MENSURAÇÃO DO EDEMA DE PATA.....	22
3.5 DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE.....	23
3.6 DROGAS UTILIZADAS.....	24

3.7 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL.....	25
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
4 RESULTADOS.....	27
4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	28
4.2 EFEITO DA AMINOGLUTETIMIDA SOBRE A INIBIÇÃO DO AUMENTO DE VOLUME DE PATA PRODUZIDO PELA MORFINA.....	31
4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA NA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE.....	31
4.4 EFEITO DO INIBIDOR DAS ENZIMAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES (L-NNA) NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA.....	34
4.5 EFEITO DO INIBIDOR DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL (NPLA) NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA.....	34
4.6 EFEITO DO L-NNA CO-ADMINISTRADO COM MORFINA NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA	39
4.7 EFEITO DA L-ARGININA NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA.....	39
4.8 EFEITO DO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO (SNAP) NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA.....	42
4.9 EFEITO DO INIBIDOR DA ENZIMA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (ODQ) NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA.....	42
4.10 EFEITO DO ODQ CO-ADMINISTRADO COM MORFINA OU SNAP NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA	45
4.11 EFEITO SISTÊMICO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL.....	45

5 DISCUSSÃO.....	54
6 CONCLUSÃO.....	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 EDEMA INFLAMATÓRIO

O edema constitui um dos sintomas de grande relevância em um processo inflamatório tecidual e é consequência de uma série de alterações no tecido vascular. Estímulos que produzem trauma tecidual, por exemplo, são capazes de desencadear eventos vasculares associados ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória que tem como resultado, entre outros, o desenvolvimento de edema inflamatório (Rang *et al.*, 2003).

Os eventos vasculares ocorrem imediatamente após um estímulo inflamatório e compreendem alterações do fluxo e do calibre dos vasos sanguíneos. Inicialmente ocorre vasoconstrição transitória das arteríolas que é seguida por vasodilatação promovendo assim o aumento do fluxo sanguíneo no foco inflamatório (hiperemia) o que, por sua vez, causa ruborização (eritema). A estase do sangue no foco inflamatório associada ao aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilares tem como consequência a exsudação de líquido plasmático do sangue para os tecidos. Este extravasamento de líquido, rico em proteínas plasmáticas, reduz a pressão osmótica intravascular e aumenta a pressão osmótica do líquido intersticial. Este fenômeno, associado ao aumento da pressão hidrostática secundária a vasodilatação, contribui para a saída de líquido do sangue para o meio intersticial formando o edema inflamatório (Cotran *et al.*, 1999). O líquido extravasado contém uma variedade de mediadores inflamatórios que podem influenciar a atividade das células adjacentes e os próprios vasos sanguíneos. Dentre eles encontram-se os componentes de quatro cascatas enzimáticas: o sistema complemento, o sistema de

coagulação, o sistema fibrinolítico e o sistema das cininas. Os componentes destes sistemas interagem entre si de forma complexa, modulando, amplificando e otimizando a resposta inflamatória (Rang *et al.*, 2003).

Os eventos celulares referem-se à participação de células no processo inflamatório. Dentre as células envolvidas na inflamação, algumas (células endoteliais, mastócitos e macrófagos teciduais) estão normalmente presentes nos tecidos, enquanto outras (plaquetas e demais leucócitos) têm acesso à área de inflamação a partir do sangue. Uma vez estimuladas ou lesadas, as células inflamatórias sintetizam e liberam mediadores (por exemplo, histamina e citocinas) que, juntamente com os mediadores plasmáticos (por exemplo, bradicinina) irão modificar e regular os elementos vasculares e celulares. Estas células também geram metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas) e têm capacidade de fagocitar.

Quando há dano tecidual ou se ocorrer processo infeccioso, a resposta celular aguda pode ocorrer dentro de poucas horas. A característica desta fase é o aparecimento de células polimorfonucleares ou granulócitos, principalmente neutrófilos, nos tecidos. Estas células, que se encontram no sangue, deverão passar através do vaso sangüíneo para o tecido, atraídas por fatores quimiotáticos (promovem a quimiotaxia/migração de células) num fenômeno denominado migração celular. Alguns fatores quimiotáticos incluem a interleucina - 8 (IL-8), o peptídeo formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP, um produto bacteriano), o fator do complemento C5a e o leucotrieno B₄ (LTB₄). A migração celular é um evento constituído de alguns passos: (1) Marginação: as células migram para as proximidades da parede vascular; (2) Rolamento: as células entram em contato com a parede vascular através de moléculas de adesão (selectinas) que promovem uma

ligação fraca entre as células e o endotélio; (3) Adesão: as células inflamatórias se aderem mais fortemente à parede do endotélio vascular através de moléculas de adesão, principalmente ICAMs (presentes na parede vascular) e integrinas (presente nas células) e (4) Diapedese: passagem dessas células para o meio intersticial. Uma das primeiras células a migrarem para o foco inflamatório são os neutrófilos. Uma vez no tecido estas células além de fagocitarem o corpo estranho também liberam substâncias altamente destrutivas ao microorganismo. Outra célula importante é o monócito/ macrófago, também com grande capacidade fagocítica e que participa da inflamação um pouco mais tardiamente contribuindo para a resolução do processo. Esta célula é chamada de monócito quando está no sangue circulante porém, após migrar para o tecido, passa a se chamar macrófago (Walzog e Gaehtgens, 2000; Rang *et al.*, 2003).

Há ainda a participação ativa das células neuronais no processo inflamatório. Sabe-se que os neurônios sensoriais não só conduzem os estímulos dos tecidos lesados para o sistema nervoso central, sendo sua clássica função aferente, mas também que funcionam como 'eferentes neurosecretores', ou seja, são capazes de sintetizar e secretar substâncias denominadas neuropeptídeos através de suas terminações periféricas, estas substâncias por sua vez, são consideradas como os mediadores do componente neurogênico da inflamação nos tecidos periféricos (Maggi e Melli, 1988; Fantini *et al.*, 1995).

1.1.1 Componente Neurogênico da Inflamação

O componente neurogênico da inflamação corresponde à participação dos neurônios sensoriais como secretores de substâncias que podem interferir no processo inflamatório periférico. As principais funções deste componente incluem a vasodilatação arteriolar e o extravasamento plasmático (Szolcsányi, 1988), juntos estes fatores contribuem para a formação do edema inflamatório.

A função efetora dos terminais aferentes primários é iniciada pela liberação de peptídeos vasoativos, tais como substância P (SP), neurocinina A, B e K (NKA, NKB e NKK), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) (Holzer, 1988; Maggi, 1995; Meyer *et al.*, 2006).

A SP e bem como outras taquicininas, tais como, NKA e NKB, causam extravasamento plasmático (Lembeck e Holzer, 1979; Ferrell e Russell, 1986; Jacques *et al.*, 1989) e seus efeitos são mediados via receptores NK1, NK2 e NK3, respectivamente (Iwamoto e Nadel, 1989). O extravasamento plasmático resultante da estimulação sensorial é prevenido por antagonistas de taquicininas, especialmente antagonistas de receptor NK1 (Lembeck *et al.*, 1992). A SP também causa vasodilatação (Lembeck e Holzer, 1979), indiretamente por liberar histamina dos mastócitos, ou agindo diretamente na vasculatura (Meyer *et al.*, 2006). Estas ações da SP contribuem para a formação do edema inflamatório (Escott e Brain, 1993). Outras ações da SP liberada periféricamente incluem o aumento da proliferação e da função das células T (Payan *et al.*, 1983); ativação da produção de citocinas pelos monócitos (Jeurissem *et al.*, 1994); aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (Nakagawa *et al.*, 1993).

O CGRP é um potente indutor de vasodilatação (Brain e Willians, 1985). Esta vasodilatação não depende da liberação de mediadores inflamatórios como a

histamina ou as prostaglandinas, mas parece ser devida a dilatação das arteríolas (Brain *et al.*, 1985). O antagonista de CGRP (CGRP₈₋₃₇) inibe parcialmente a formação de edema produzido por estimulação de um nervo cutâneo, sugerindo que a vasodilatação resultante da liberação de CGRP das terminações sensoriais periféricas contribuem para a formação do edema (Escott e Brain, 1993).

Embora a ação efetora dos neurônios sensoriais seja atribuída, em parte, a um reflexo axonal local estimulado pela lesão, esta também é decorrente da estimulação destes mesmos neurônios no corno dorsal da medula espinhal (Rees *et al.*, 1994; Sluka *et al.*, 1995b). As fibras sensoriais que podem contribuir para o desenvolvimento da inflamação neurogênica, são as fibras C e A δ , consideradas fibras nociceptivas (Willis, 1999; Lin *et al.*, 2000). Lin *et al.* (1999), demonstraram que parte da vasodilatação e do edema após uma injeção intradérmica de capsaicina ocorre por uma atividade antidrômica mediada pela medula espinhal, decorrente de um reflexo que pode ser registrado na raiz dorsal.

1.2 REFLEXO DA RAIZ DORSAL

A entrada da informação sensorial no sistema nervoso central é realizada através do corno dorsal da medula espinhal, pelas raízes dorsais, sendo que a atividade motora emerge a partir do corno ventral. Todavia, Gotch e Horsley (1891) detectaram que sob algumas circunstâncias uma atividade pode ser detectada emergindo da medula espinhal através das raízes dorsais, ou seja, “percorrendo” de forma antidrômica as fibras sensoriais primárias. Esta “descarga direta para trás” de Gotch e Horsley tem sido objeto de investigações e é relatada como Reflexo da Raiz Dorsal (RRD) (Willis, 1999).

O mecanismo envolvido da deflagração do RRD envolve um processo de despolarização das fibras aferentes nociceptivas na medula espinhal, denominada *PAD* (*primary afferent depolarization*). Esta despolarização é parcialmente responsável por um tipo de inibição conhecida como inibição pré-sináptica, por causar uma inativação de canais de sódio e de cálcio, e um aumento na condutância de íons cloreto (Cl^-) e íons potássio (K^+), estas ações resultam na redução da amplitude dos potenciais de ação que invadem os terminais pré-sinápticos. A redução do tamanho do potencial de ação pré-sináptico pode resultar em um menor influxo de íons Ca^{2+} para dentro do terminal pré-sináptico e, assim, diminuir a quantidade de neurotransmissor a ser liberada (Willis, 2006).

A inibição pré-sináptica e a PAD podem ser bloqueadas por antagonistas de receptores GABA_A , implicando a participação de interneurônios que liberam o ácido gama aminobutírico (GABA) nestes processos. A razão pelas quais os terminais aferentes são despolarizados explica-se pela alta concentração de íons Cl^- nos neurônios aferentes primários. Sendo que a ativação de receptores GABA_A , abre os canais de cloreto, ocorre um efluxo destes íons, resultando em despolarização. A alta concentração de íons Cl^- no interior destas células é mantida por um co-transportador de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$, que carrega dois íons Cl^- , um Na^+ e um K^+ através da membrana celular para dentro do citoplasma (Willis, 1999; Willis, 2006).

Embora a PAD seja normalmente um evento inibitório, pode ser convertido em um mecanismo excitatório se o RRD for deflagrado. Por exemplo, durante um processo inflamatório periférico, o processo de PAD é intensificado o suficiente para evocar um potencial de ação que pode ser conduzido centrifugamente e liberar neuropeptídeos no tecido periférico, assim como liberar neurotransmissores no corno dorsal por uma ação centrípeta (Willis, 1999).

A manipulação espinal de alguns neurotransmissores pode modular a despolarização das fibras aferentes e conseqüentemente modificar um evento inflamatório periférico (Rees *et al.*, 1994). O bloqueio espinal de receptores GABA_A (Sluka *et al.*, 1993) e não-NMDA (N-metil-D-aspartato) (Sluka *et al.*, 1994) reduziram o edema em articulação inflamada com carragenina. O bloqueio de receptores não-NMDA também aboliu quase completamente os reflexos da raiz dorsal e preveniu o *flare* (região avermelhada ao redor do sítio de lesão) e o edema causados por injeção intradérmica de capsaicina (Lin *et al.*, 1999). Uma possível explicação para este fato é que os terminais centrais dos aferentes primários liberam aminoácidos excitatórios, como o glutamato, o qual ativa receptores não-NMDA nos interneurônios GABAérgicos, causando, então, liberação de GABA que irá agir em receptores localizados nos terminais centrais dos aferentes primários (Figura 1) (Sluka *et al.*, 1995b; Willis, 1999). Os receptores NMDA também estão presentes nestes terminais aferentes, mas são considerados auto-receptores, por responderem mais à liberação de glutamato dos próprios aferentes do que ao glutamato liberado de interneurônios (Willis, 1999).

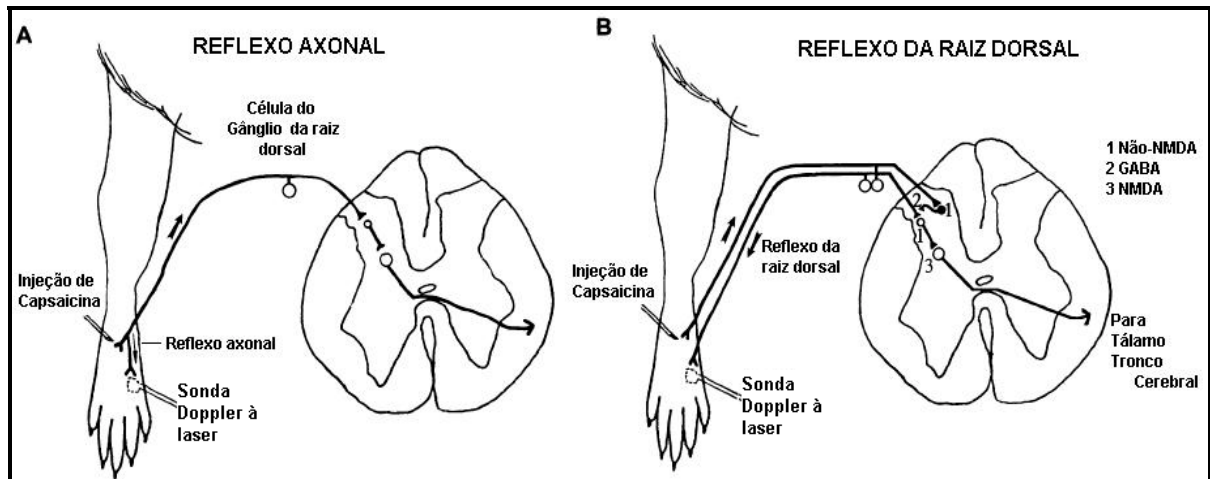


Figura 1 – Ilustração do Reflexo Axonal e do Reflexo da Raiz Dorsal. Em **A**, a injeção intradérmica de capsaicina causa vasodilatação local por um mecanismo denominado reflexo axonal, bem como ativação da via nociceptiva na medula. Em **B**, a injeção de capsaicina ativa circuitos medulares que resultam no reflexo da raiz dorsal, o qual produz vasodilatação na região adjacente à lesão. O circuito do corno dorsal envolve receptores de glutamato não-NMDA e receptores GABA_A, e a informação nociceptiva é transmitida para neurônios de projeção via ativação de receptores NMDA (Modificado de Willis, 1999).

Estudos imunohistoquímicos mostram que os terminais centrais dos neurônios aferentes primários no corno dorsal da medula espinhal são imunopositivos para o glutamato, mas não para o GABA (De Biasi e Rustioni, 1990; Phend *et al.*, 1992). Estes dados estão de acordo com a explicação de que os terminais aferentes liberam glutamato no corno dorsal da medula espinhal, que irá agir nos interneurônios. Por outro lado, a maioria dos interneurônios são imunopositivos para GABA (Todd e McKenzie, 1989). Morfologicamente, a interação dos interneurônios GABAérgicos com os terminais aferentes ocorre via sinapses axoaxônicas ou dendroaxônicas, sendo estes interneurônios pré-sinápticos, ou seja, seu conteúdo é liberado e age nas fibras dos terminais aferentes, considerados neste caso como pós-sinápticos (Barber *et al.*, 1978; Bernardi *et al.*, 1995).

Valtschanoff *et al.* (1992) e, mais tarde, Bernardi *et al.*, (1995) mostraram uma co-localização no corno dorsal da enzima óxido nítrico sintase com cerca de um terço dos interneurônios positivos para GABA, porém estas células não se apresentaram como pré-sinápticas aos aferentes nociceptivos, ou seja, os mediadores, como GABA e o óxido nítrico liberados destes interneurônios não estariam agindo nas terminações dos aferentes primários. Porém, mesmo não estando presente na maioria dos interneurônios (os dois terços restantes), o óxido nítrico por ser um gás altamente difusível, pode agir em vários circuitos do corno dorsal (Bredt e Snyder, 1992), sugerindo um possível papel modulatório deste mediador sobre os impulsos recebidos da periferia bem como na atividade GABAérgica envolvida na deflagração dos reflexos da raiz dorsal.

Os neurônios aferentes primários, incluindo os nociceptores, contém uma variedade de receptores em toda sua extensão. O papel destes receptores na despolarização dos aferentes primários ou na inibição pré-sináptica é ainda incerto. Porém, alguns destes receptores estão envolvidos na inibição pré-sináptica sem deflagrar despolarização, como é o caso dos receptores GABA_B e dos receptores opióides. GABA agindo em receptores GABA_B causa inibição pré-sináptica por bloqueio dos canais de Ca²⁺-voltagem-dependentes ou aumento da condutância a íons K⁺, todavia, os aferentes primários não são despolarizados. Os opióides, ao agirem em seus receptores localizados nos terminais aferentes, ao mesmo tempo que hiperpolarizam estes neurônios também os tornam mais suscetíveis à inibição pré-sináptica (Willis, 1999).

1.3 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula importante na sinalização intracelular e intercelular. Está envolvido na regulação de diversos mecanismos fisiológicos e patológicos de vários sistemas, incluindo o sistema nervoso, cardiovascular e imunológico. O NO pode agir como mediador biológico similar a um neurotransmissor no sistema nervoso, podendo regular o tônus dos vasos sangüíneos no sistema vascular bem como atuando como um importante efetor de defesa no sistema imune (Aktan, 2004).

O NO é um gás radical livre, de baixo peso molecular e que por sua polaridade se difunde rapidamente do seu sítio de formação para seu sítio de ação. A biossíntese do óxido nítrico no organismo é realizada a partir da L-arginina e do oxigênio molecular. Esta reação requer co-fatores como o NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo), o FMN (flavina mononucleotídeo), o FAD (flavina adenina nucleotídeo), o BH₄ (tetrahydrobiopterina) e um grupo ferro-heme. Em geral, a reação consiste na conversão do aminoácido L-arginina em NO e citrulina via N^w-hidroxi-L-arginina (NOHarginina) como um intermediário (Figura 2) (Stuehr *et al.*, 1991; Moncada e Higgs, 1993; Mayer e Hemmens, 1997; Alderton *et al.*, 2001).

A produção de óxido nítrico é catalisada por uma família de enzimas denominada óxido nítrico sintase (NOS – *nitric oxide synthase*) (130-160 kDa). Foram identificadas três isoformas, as quais são produtos de genes diferentes, têm localização, regulação e propriedades catalíticas distintas. As isoformas são referidas pelas seguintes nomenclaturas: nNOS (*nitric oxide synthase neuronal*, também conhecida como Tipo I, NOS-I e NOS-1), encontrada predominantemente

em tecidos neuronais; iNOS (*nitric oxide synthase inducible*, também conhecida como Tipo II, NOS-II e NOS-2), isoforma induzível em muitas células e tecidos; e a eNOS (*nitric oxide synthase endothelial*, também conhecida como Tipo III, NOS-III e NOS-3), presente nas células endoteliais. No passado, as isoformas eram diferenciadas por sua expressão constitutiva (eNOS e nNOS) ou induzida (iNOS) e por serem cálcio-calmodulina (Ca^{2+} /CaM)-dependentes (eNOS e nNOS) ou não (iNOS) (Alderton *et al.*, 2001). Embora a nomenclatura dada às isoformas destas enzimas tenha sido baseada no tecido onde elas foram originalmente purificadas, existem evidências de que elas podem estar presentes em outros tecidos (Moncada *et al.*, 1997; Michel e Feron, 1997).

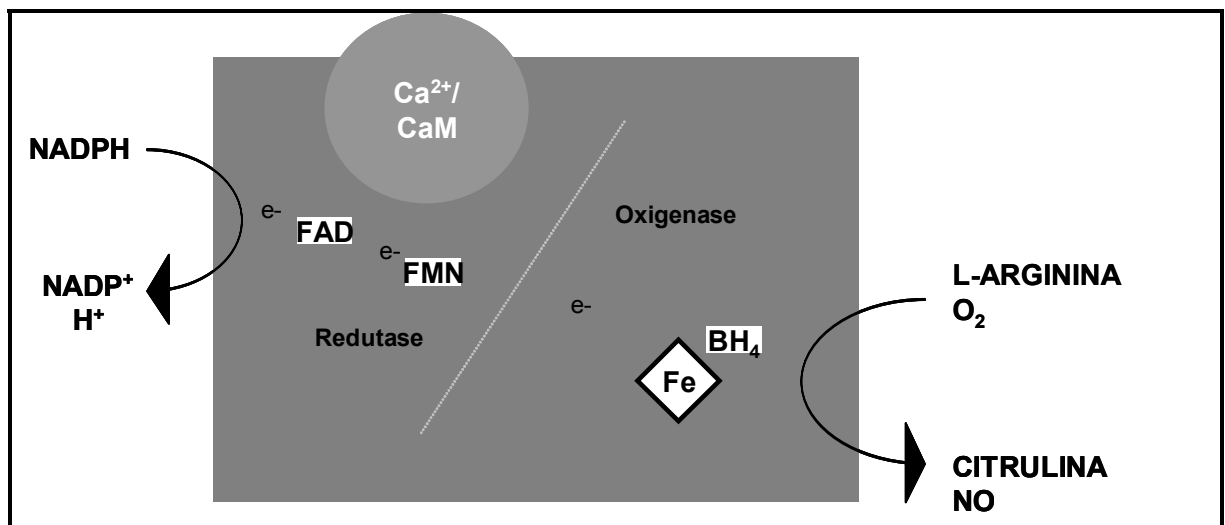


Figura 2 – Esquema da reação catalisada por NOS e seus co-fatores. NADPH doa elétrons (e^-) para o domínio redutase da enzima e continua via carregadores redox FAD e FMN para o domínio oxigenase. Então, interagem com um grupamento ferro-heme e BH_4 no sítio ativo para catalisar a reação de oxigênio com L-arginina, gerando citrulina e NO como produtos. O fluxo de elétrons através do domínio redutase requer a presença de cálcio-calmodulina (Ca^{2+} /CaM) (Modificado de Alderton *et al.*, 2001).

Sob condições fisiológicas, o NO é oxidado a Nitrito (NO_2^-) e Nitrato (NO_3^-). Em baixas concentrações e na ausência de proteínas e metais os quais contribuem pra sua destruição, a decomposição de óxido nítrico pode ser lenta (Denninger e Marletta, 1999). A estrutura eletrônica faz da molécula de NO um excelente ligante de grupamentos heme, presente em enzimas como a guanilato ciclase (ativada até mesmo em concentrações baixas de óxido nítrico), e a própria enzima óxido nítrico sintase (Assreuy *et al.*, 1993; De Alba *et al.*, 1999).

A enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) é o principal alvo para as ações do NO. Esta enzima catalisa a conversão de guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico (GMPc) (Denninger e Marletta, 1999). O GMPc é um segundo mensageiro que pode agir através de proteínas quinases, fosfodiesterases ou diretamente em canais iônicos, promovendo diversos efeitos conforme o tipo de célula e tecido (Ignarro *et al.*, 1992; Moncada e Higgs, 1991).

Existem evidências consideráveis quanto à importância do NO na transmissão nervosa, podendo agir como um neurotransmissor ou neuromodulador tanto no sistema nervoso central (Garthwaite, 1991; Meller e Gebhart, 1993) quanto no sistema nervoso periférico (Ferreira *et al.*, 1991; Duarte *et al.*, 1992). Além disso, estudos imunohistoquímicos revelam que a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), está localizada constitutivamente nos neurônios e em algumas fibras do corno dorsal superficial (substância gelatinosa) da medula espinhal (Dun *et al.*, 1992; Valtschanoff *et al.*, 1992), uma área vital para a integração dos impulsos nociceptivos periféricos (Kumazawa e Perl, 1978). Embora a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) não seja normalmente expressa no cérebro e na medula, quando estimulada adequadamente, por exemplo, por citocinas, é capaz de sintetizar óxido nítrico em concentrações nanomolares, ou seja, 100-1000 vezes

maiores que a produção por nNOS (Kuo e Abe, 1995).

Na medula espinhal, o óxido nítrico atua como um modulador da atividade neuronal. Sua ação nos mecanismos de processamento nociceptivo do corno dorsal ainda é incerta. Sabe-se que, sob condições patológicas de dor, como por exemplo durante uma inflamação periférica, a intensidade de estímulos dolorosos que chega ao corno dorsal causa aumento do influxo de Ca^{2+} via ativação de receptores NMDA, bem como ativa a enzima óxido nítrico sintase, aumentando assim, a produção de óxido nítrico (Woolf e Salter, 2000). Por este motivo, muitos trabalhos apontam o NO como um mediador pró-nociceptivo (Meller *et al.*, 1992; Malmberg e Yaksh, 1993; Sakurada *et al.*, 1996; Machelska *et al.*, 1999), enquanto outros apontam como anti-nociceptivo, como Hoheisel *et al.* (2000) que mostraram que o NO tem efeito depressor tônico da atividade basal dos nociceptores no corno dorsal da medula, atividade que é responsável pela parestesia e dor espontânea em pacientes com neuropatia. Outro estudo mostra que o NO inibe a neurotransmissão excitatória mediada por correntes induzidas por NMDA na substância gelatinosa (Nicholson *et al.*, 2004), e ainda, parece estar envolvido na mediação da resposta antinociceptiva da norepinefrina no corno dorsal (Chiari *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000).

Além das evidências do efeito anti-nociceptivo do NO medular, outros trabalhos também demonstraram que o efeito de algumas substâncias analgésicas periféricas não-opioides, como o mirceno e a dipirona (Duarte *et al.*, 1992), o diclofenaco (Tonussi e Ferreira, 1994), bem como o efeito da acetilcolina (Duarte *et al.*, 1990), ocorrem por ativação da via NO-GMPc. A ação anti-nociceptiva periférica mediada por opioides também parece ser devida à ativação da via NO-GMPc (Ferreira *et al.*, 1991; Granados-Soto *et al.*, 1997; Sachs *et al.*, 2004).

1.4 OPIÓIDES NA INFLAMAÇÃO

Os receptores opióides estão amplamente expressos no sistema nervoso central e sua ativação resulta em potente analgesia via inibição da transmissão nociceptiva ascendente excitatória e ativação de sistemas de inibição descendente, sendo o corno dorsal da medula espinhal um importante sítio para as ações dos opióides (Fields e Basbaum, 1999; Yaksh, 1999). Na região medular os receptores estão localizados nos corpos celulares do gânglio da raiz dorsal e nos terminais das fibras aferentes primárias. Também há receptores opióides nos terminais periféricos dos neurônios aferentes primários (Stein, 1995).

Os três membros da família de receptores opióides são o Mu (MOR), o delta (DOR) e o kappa (KOR). Estes receptores possuem sete domínios transmembrana, são acoplados a proteína G e compartilham de homologia na sua estrutura. As endorfinas são os ligantes endógenos do receptor do tipo Um, ao qual a morfina se liga com grande afinidade. As encefalinas ligam-se aos receptores delta com grande afinidade. As dinorfinas ligam-se aos receptores kappa-opióides. Os peptídeos opióides não se ligam exclusivamente a um tipo de receptor, mas apresentam afinidade maior ou menor por um determinado tipo (Przewlocki e Przewlocka, 2001).

Além da potente capacidade de promover analgesia, os opióides também podem reduzir a inflamação neurogênica por diminuir a liberação de SP dos terminais aferentes primários (Yaksh, 1988; Joris *et al.*, 1990). Além disso, os receptores opióides localizados nas células imunes podem mediar a supressão da função dos linfócitos bem como inibir a síntese e liberação de citocinas (Stein *et al.*, 2001). Planas *et al.* (1995) e Sacerdote *et al.* (1996) também observaram efeitos próinflamatórios de antagonistas opióides, como naloxona e naltrexona,

respectivamente.

Embora o efeito antiinflamatório periférico dos agonistas opióides esteja bem documentado, existem poucas evidências da capacidade da morfina em modificar a inflamação neurogênica via modulação da resposta antidrômica (reflexo da raiz dorsal) e, se tal efeito, poderia ser mediado por NO.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista muitos dos aspectos que estão envolvidos em um processo inflamatório periférico e como os terminais das fibras aferentes primárias interferem diretamente neste processo torna-se fundamental a compreensão dos eventos que ocorrem na periferia mediante manipulação farmacológica na região medular.

Estudos demonstram que o óxido nítrico e o GMPc possuem papel importante na transmissão sináptica da medula espinhal (Meller e Gebhart, 1993). O envolvimento do óxido nítrico em vários mecanismos no corno dorsal da medula espinhal sugere uma possível participação deste mediador na formação dos reflexos da raiz dorsal e, conseqüentemente, na modulação da liberação de substâncias pelo terminal periférico dos nociceptores. Além disso, a administração intratecal de opióides para o controle da dor em procedimentos cirúrgicos pode apresentar, além do efeito analgésico, um efeito antiinflamatório adicional, o qual pode ser modulado pelo óxido nítrico.

Assim, uma melhor compreensão da função do óxido nítrico medular sobre a inflamação periférica, bem como sua influência na mediação do efeito opióide, pode contribuir para o aperfeiçoamento dos procedimentos analgésicos e antiinflamatórios.

2.2 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da via L-arginina/ NO/ GMPc medular na modulação da inflamação periférica, bem como, seu envolvimento com o efeito da morfina administrada por via intratecal.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o efeito da injeção intratecal de morfina sobre o edema e a infiltração de neutrófilos induzidos por carragenina na pata de ratos;

Verificar o efeito da injeção intratecal de um inibidor da enzima óxido nítrico sintase não seletivo, o L-NNA (N^G-Nitro-L-Arginina) e um seletivo para a enzima óxido nítrico sintase neuronal, o NPLA (N⁰-Propil-L-Arginina) sobre o edema induzido por carragenina na pata de ratos;

Verificar o efeito da injeção intratecal do precursor da síntese de óxido nítrico (L-Arginina) e do doador de óxido nítrico (SNAP, S-nitroso-N-acetilpenicilamina) sobre o edema induzido por carragenina na pata de ratos;

Verificar o efeito da injeção intratecal do inibidor da enzima guanilato ciclase (ODQ, 1H-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona) sobre o edema induzido por carragenina na pata de ratos;

Verificar o efeito da injeção intratecal do inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NNA e/ou NPLA) e do inibidor da enzima guanilato ciclase (ODQ) co-administrados por via intratecal com morfina sobre o edema.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Wistar* machos (250 - 350 g) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de 21 ± 2 °C, ciclo claro e escuro de 12 em 12 horas controlado automaticamente, com água e alimento livres. No dia do experimento os animais foram acomodados na sala de teste para ambientação pelo menos 1 hora antes do início do experimento.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (260/CEUA e 23080.032820/2003-74/UFSC) e estão de acordo com o Guia de Cuidados com Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (NIH, USA).

3.2 INJEÇÃO INTRATECAL

As drogas foram injetadas no espaço subaracnóide em nível lombar (cisterna lombar), utilizando-se o método previamente descrito por Mestre e colaboradores (1994). Neste procedimento, os animais foram previamente anestesiados com halotano (2% em oxigênio) e, em seguida, uma agulha 29 gauge, 12,7 mm de comprimento (Seringa BD Ultra Fine[®] 30 unidades) foi introduzida perpendicularmente entre as vértebras L5 e L6. Um leve bater de cauda (*flick*) foi observado indicando que o canal vertebral foi atingido pela agulha e imediatamente após, a injeção era concluída. O procedimento de injeção intratecal era experimentado apenas uma vez. Caso não se observasse “*flick*” na primeira tentativa

de injeção, o animal era excluído do experimento. O volume máximo injetado no espaço intratecal foi de 20 μ l.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL: EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.

Utilizou-se o modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos, proposto por Winter e colaboradores (1962). A carragenina (tipo múltiplo kappa/lambda; BDH, UK) foi diluída em solução fisiológica 0,9 % a uma concentração de 3 mg/ ml. Os animais receberam 50 μ l (150 μ g) de carragenina subcutânea (s.c.) na região plantar da pata posterior direita 30 minutos após terem recebido a injeção intratecal.

Para verificar um possível efeito sistêmico decorrente da injeção intratecal das drogas utilizadas neste estudo, avaliou-se também o edema da pata anterior direita, induzido por 50 μ l (150 μ g) de carragenina, em alguns grupos experimentais distintos daqueles que receberam carragenina na pata posterior.

3.4 MENSURAÇÃO DO EDEMA DE PATA

Para avaliar o edema de pata utilizou-se uma cubeta (10 ml) com solução de sulfato de lauril em água (2,5 %) colocada sobre uma balança eletrônica de precisão. Para tal medida, a pata do animal foi submergida dentro da cubeta até a altura da articulação tíbio-társica e a variação de volume da pata foi calculada pelo aumento do peso da coluna líquida, considerando-se que 1 ml de água corresponde a 1 g (densidade da solução da cubeta). A primeira medida do edema (medida basal) foi

realizada sempre antes da injeção intratecal de drogas e, as demais medidas em tempos subseqüentes (1, 2, 3 e 4 horas após a administração de carragenina na pata).

3.5 DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE

O recrutamento de neutrófilos foi quantificado indiretamente através da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase. Após cada experimento de mensuração de edema de pata, realizou-se a eutanásia dos animais, sendo o tecido subcutâneo da pata removido, agrupado, triturado e homogenizado com auxílio de um homogenizador do tipo Ultra-Turrax, em solução tampão de fosfato de sódio (50 mM; pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; 0,5% p/v) por 10 segundos. A solubilização final foi feita usando-se um sonicador (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer, IL, EUA) por 10 segundos a 4 °C. O homogenato resultante foi então centrifugado (15 min, 10.000 r.p.m., 4 °C) e uma alíquota (25 µL) do sobrenadante foi utilizada para o ensaio da mieloperoxidase, dispondo cada amostra em triplicata. A reação enzimática desenvolveu-se em incubadora a 37 °C por 5 minutos, na presença de tetrametilbenzidina (TMB; 1,6 mM), peróxido de hidrogênio (H₂O₂; 0,5 mM) e solução tampão fosfato de sódio (80 mM; pH 5,4). A seguir, a reação foi interrompida pela adição de 100 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄; 1 M) e efetuou-se a leitura da absorbância da solução final (450 nm) com auxílio de um aparelho leitor de placa (Ultra microplate reader EL 808, Biot-Tek Instruments, INC., EUA). O valor médio obtido de cada amostra foi dividido pela quantidade de proteína de sua amostra respectiva.

Para estimar a quantidade de proteína total presente nas amostras de tecido,

uma alíquota (200 μ l) da solução final anterior foi retirada e diluída em solução tampão de fosfato de sódio (800 μ l; 50 mM; pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; 0,5% p/v). Após procedeu-se a leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro a 280 nm (Hitachi, Modelo 2001, Japan). A estimativa da quantidade de proteína total foi realizada assumindo que 1 mg de proteína equivale a 1 unidade de absorbância. A atividade da mieloperoxidase foi expressa como densidade óptica média \pm erro padrão da média por mg de proteína.

3.6 DROGAS UTILIZADAS

As seguintes drogas foram utilizadas neste estudo: Sulfato de Morfina (Dimorf[®]; Cristália, BRA), agonista opióide; Aminoglutetimida (Orimeten[®]; Novartis, BRA), inibidor da síntese de corticosteróide; N^G-Nitro-L-Arginina (L-NNA; Sigma, EUA), inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase; N^ω-Propil-L-Arginina (NPLA, Tocris, EUA), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal; L-Arginina (Tocris, EUA), substrato para a enzima óxido nítrico sintase; S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP; Sigma, EUA), doador de óxido nítrico; 1H-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona (ODQ; Tocris, EUA), inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel. Todas as drogas foram diluídas em solução fisiológica 0,9%. Com exceção da Aminoglutetimida que foi administrada por via oral (v.o.), todas as demais drogas foram administradas por via intratecal (i.t.).

3.7 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

Para mensuração da pressão arterial, um grupo de animais (n=3) foi anestesiado com quetamina e xilazina (90 e 15 mg/kg, respectivamente), administrada por via intramuscular e suplementada a intervalos de 45 a 60 minutos. Para prevenir coágulos, administrou-se heparina intraperitoneal diluída em solução fisiológica 0,9% estéril tamponada com fosfato de acordo com a formulação de Dulbecco. Posicionou-se o animal em decúbito dorsal na mesa cirúrgica e realizou-se a traqueostomia (com inserção de cânula) sendo mantida a respiração espontânea. A artéria carótida direita foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com o auxílio de uma linha de sutura, o fluxo sanguíneo foi interrompido na altura da extremidade distal, enquanto o fluxo em sua extremidade proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Utilizando-se uma tesoura oftálmica, um pequeno corte foi feito na região medial da porção da artéria carótida clampeada, servindo como via para a inserção de um cateter de polietileno, que foi conectado à artéria e destinou-se à mensuração contínua da pressão arterial. Após a manipulação cirúrgica e um período de estabilização de 30 minutos, posicionou-se cuidadosamente os animais em decúbito ventral e, após 5 minutos de estabilização, aplicou-se a injeção intratecal de S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP; 3 nmol) e avaliou-se a pressão arterial média durante 40 minutos.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M) do número de animais (n) apresentado conforme cada resultado. A diferença entre o valor da mensuração do edema realizado antes e depois da injeção de carragenina corresponde ao aumento de volume representado no eixo y dos gráficos. Alguns resultados são expressos como a diferença percentual de volume de pata em relação ao controle, considerado 100%. A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do programa “Graph Pad Prism 3.0[®]”. Utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey, quando mais de dois grupos foram avaliados, ou teste *t* de Student’s, quando apenas dois grupos foram comparados.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

Morfina (18 ou 37 nmol; 20 μ l) ou solução fisiológica 0,9 % estéril (controle; 20 μ l) foram administradas por via intratecal trinta minutos antes da aplicação subcutânea de carragenina na pata posterior esquerda (150 μ g; 50 μ l). A maior dose de morfina (37 nmol) promoveu inibição significativa do aumento de volume de pata quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 3). Observou-se um efeito máximo na primeira hora de registro que perdurou durante todo o período de avaliação (4 horas). Doses maiores de morfina (75 e 150 nmol) também promoveram inibição significativa do aumento de volume de pata (Figura 4). Porém, após a administração destas doses observaram-se alterações comportamentais nos animais, como por exemplo, agitação e agressividade. Desta forma, determinou-se que a dose de 37 nmol seria a utilizada para os demais experimentos, uma vez que produziu inibição significativa do aumento de volume de pata sem causar alterações comportamentais visíveis nos animais.

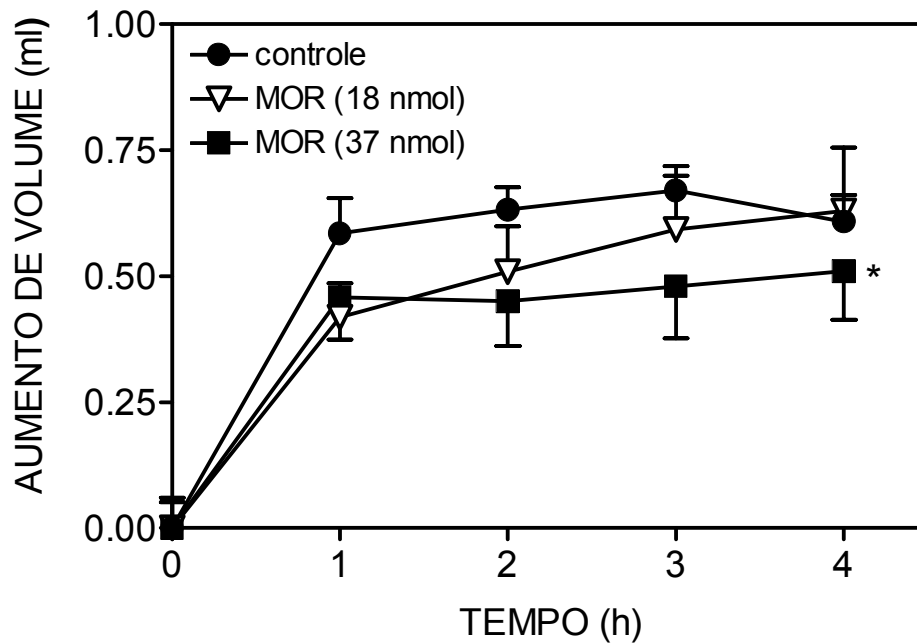


Figura 3 – Efeito da morfina no aumento de volume de pata. Morfina (18 ou 37 nmol; 20 μ l, i.t.) ou solução fisiológica 0,9 % (controle; 20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina (tempo 0 h). O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 h, sendo o primeiro registro realizado 1 h após a aplicação de carragenina. Os pontos representam a média \pm E.P.M. de 6 animais. * indica a diferença estatística das curvas em relação ao grupo controle com $p < 0,05$ (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Tukey).

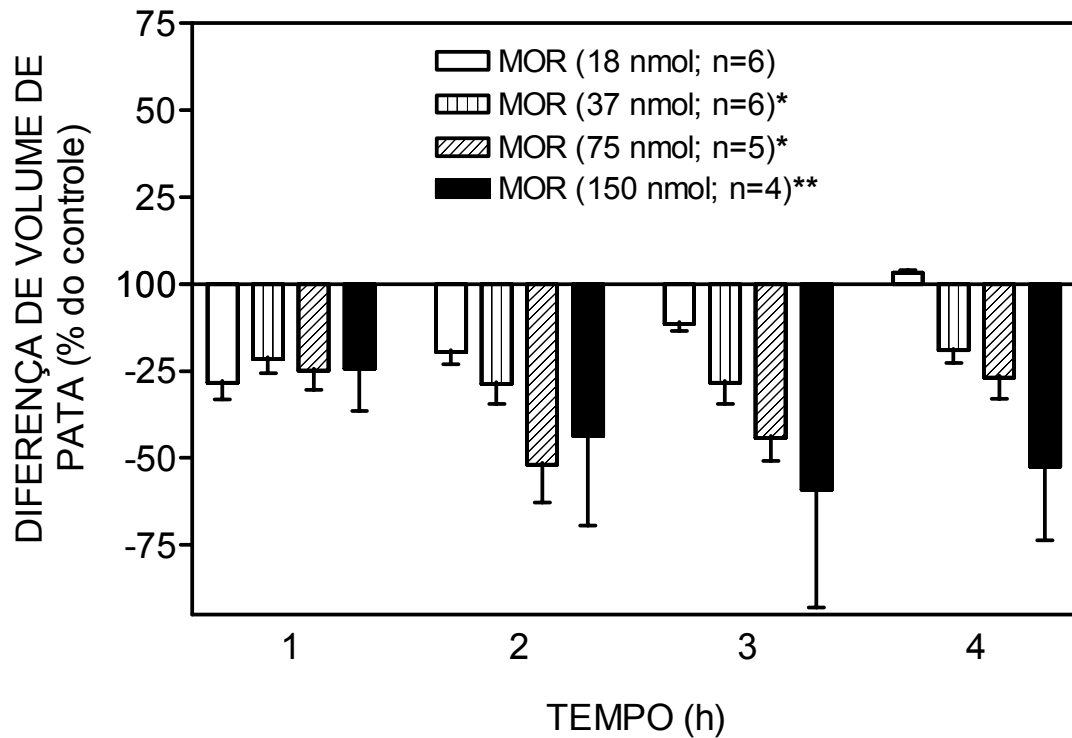


Figura 4 – Efeito da morfina no aumento de volume de pata. Morfina (18; 37; 75 ou 150 nmol; 20 μ l, i.t.) ou solução fisiológica 0,9 % (controle; 20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina. O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 h, sendo o primeiro registro realizado 1 h após a aplicação de carragenina. As barras representam a diferença percentual média \pm EPM entre os grupos tratados e o controle (considerado 100%). * e ** indicam a diferença estatística das quatro horas em relação ao grupo controle com $p < 0,05$ (Teste t de Student's pareado) e $p < 0,01$ (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Tukey) respectivamente.

4.2 EFEITO DA AMINOGLUTETIMIDA SOBRE A INIBIÇÃO DO AUMENTO DE VOLUME DE PATA PRODUZIDO PELA MORFINA

Aminoglutetimida (50 mg/kg) ou solução fisiológica 0,9 % estéril (SF; 0.1 ml/100 g) foram administradas por via oral 2 horas antes da aplicação subcutânea de carragenina na pata posterior esquerda (150 µg; 50 µl). Morfina (MOR; 37 nmol; 20 µl) ou solução fisiológica 0,9 % estéril (SF; 20 µl) foram administradas por via intratecal 30 minutos antes da carragenina. Nesta situação, o efeito da morfina na inibição do aumento de volume de pata não foi alterado pelo pré-tratamento com aminoglutetimida (Figura 5).

4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA NA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE

A determinação da atividade da enzima mieloperoxidase foi utilizada como medida indireta para avaliar a migração de neutrófilos para a região da pata inflamada. A administração intratecal de morfina nas doses de 18, 37 e 150 nmol não foi capaz de alterar a atividade da enzima mieloperoxidase após as 4 horas da aplicação de carragenina como observado na Figura 6, assim como a dose de 37 nmol também não alterou a atividade desta enzima, após duas horas da aplicação de carragenina (DO/mg proteína = $1,17 \pm 0,1$; MOR; $1,19 \pm 0,06$, controle).

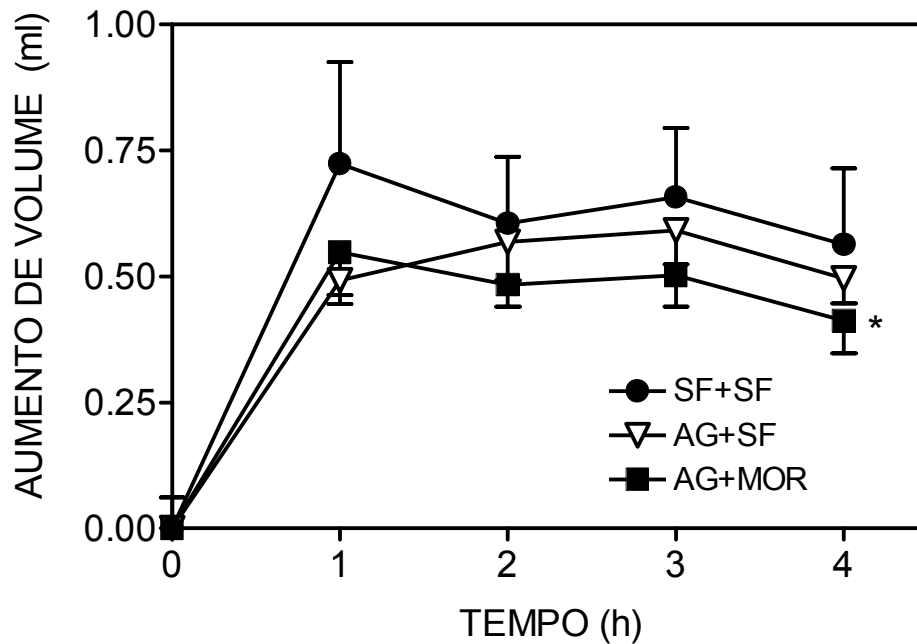


Figura 5 – Efeito da aminoglutetimida sobre a inibição do aumento de volume de pata produzido pela morfina. Aminoglutetimida (AG; 50 mg/kg; v.o.) foi administrada 90 min antes da injeção i.t. de morfina (MOR; 37 nmol; 20 μ l). O grupo SF+SF recebeu solução fisiológica 0,9 % v.o. (0.1 ml/ 100g) e i.t. (20 μ l). O grupo AG+SF recebeu aminoglutetimida v.o. (50 mg/kg) e solução fisiológica i.t. (20 μ l). O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 h, sendo o primeiro registro realizado 1 h após a aplicação de carragenina. Os pontos representam a média \pm E.P.M. de 6 animais.* indica a diferença estatística das curvas entre o grupo SF+SF e AG+MOR com $p < 0,05$ (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Tukey).

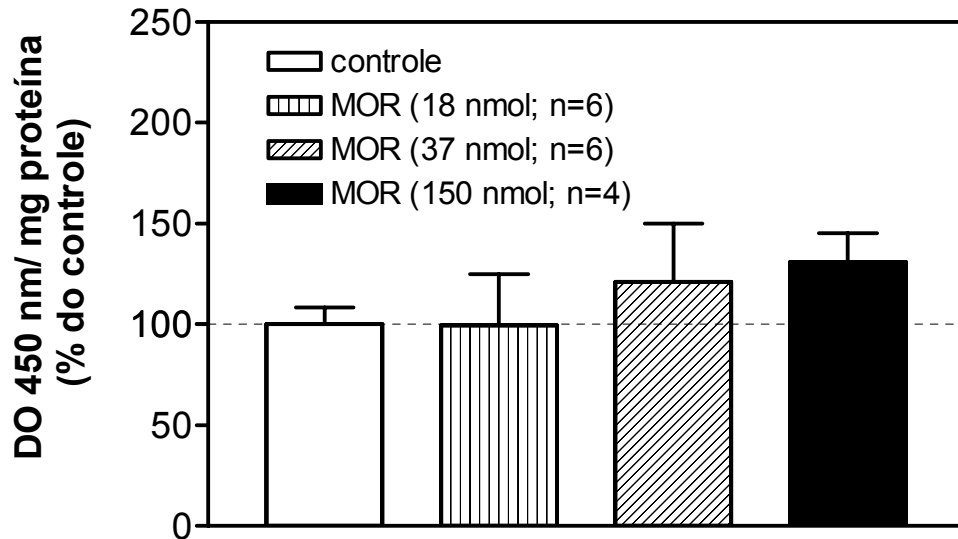


Figura 6 – Efeito da administração de morfina na atividade da enzima mieloperoxidase. A atividade da enzima foi expressa como Densidade Óptica (DO) a 450 nm por mg de proteína. Morfina (18 ou 37 nmol; 20 µl; i.t.) ou solução fisiológica 0,9 % (controle; 20 µl; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina. O tecido da pata foi coletado imediatamente após a realização da última medida do aumento de volume de pata (4ª hora). Cada barra representa a média ± E.P.M. em relação ao controle 100%. Não houve diferença estatística significativa (ANOVA de uma via seguida de teste Tukey).

4.4 EFEITO DO INIBIDOR DAS ENZIMAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES (L-NNA) NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA

L-NNA (N^G -Nitro-L-Arginina; 0,01, 0,03, 3 ou 30 nmol; 20 μ l) ou solução fisiológica 0,9 % (controle; 20 μ l) foram administrados por via intratecal 30 minutos antes da aplicação subcutânea de carragenina na pata posterior esquerda (150 μ g; 50 μ l). As menores doses de L-NNA (0,01 e 0,03 nmol) promoveram elevação significativa e dose-dependente do aumento de volume de pata ($p < 0,05$ e 0,001, respectivamente) (Figura 7 Painel A). Por outro lado, as doses maiores (3 e 30 nmol) promoveram efeito contrário, ou seja, inibição significativa e dose-independente do aumento de volume de pata ($p < 0,001$) (Figura 7 Painel B). Os resultados de outras doses de L-NNA (3 pmol; 0,3; 0,1 e 10 nmol) estão expostos na Tabela 1. Apenas a dose de 10 nmol demonstrou efeito inibitório sobre o aumento de volume como as doses maiores da Figura 7 Painel B. Assim, verificou-se que doses menores de L-NNA potencializaram e doses maiores inibiram o aumento de volume de pata.

4.5 EFEITO DO INIBIDOR DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL (NPLA) NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA

NPLA (N^O -Propil-L-Arginina) ou solução fisiológica 0,9 % estéril (controle; 20 μ l) foram administrados por via intratecal 30 minutos antes da aplicação subcutânea de carragenina na pata posterior esquerda (150 μ g; 50 μ l). NPLA não promoveu alteração significativa no aumento de volume de pata em todas as doses testadas (Figura 8 e Tabela 2).

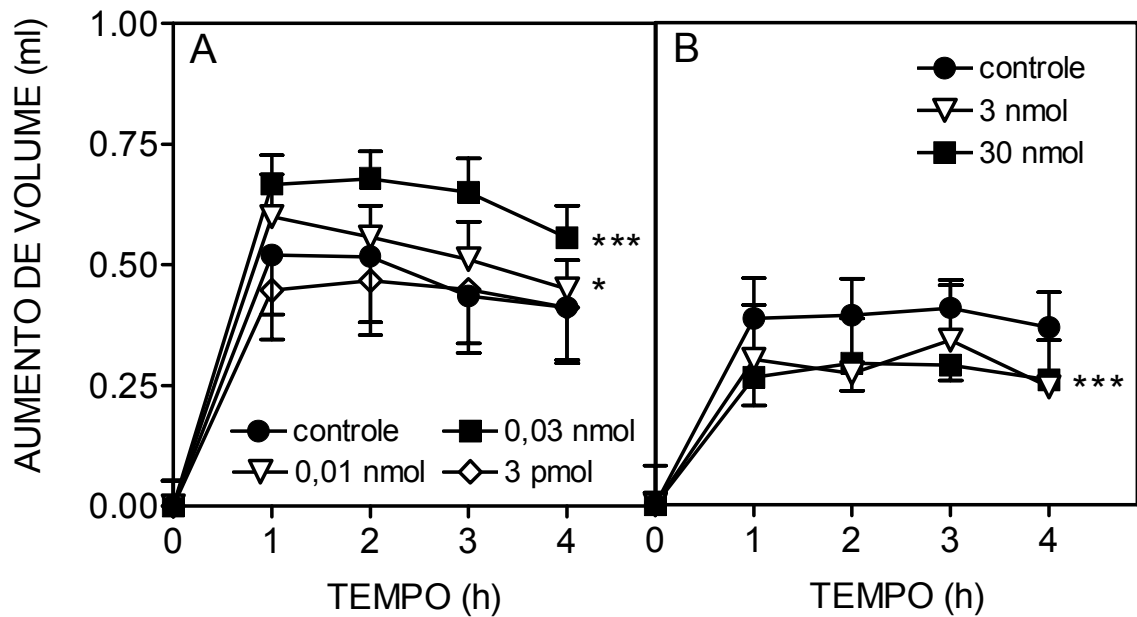


Figura 7 – Efeito do L-NNA no aumento de volume de pata. L-NNA (Painel A - 3 pmol, 0,01 ou 0,03 nmol; Painel B - 3 ou 30 nmol; 20 μ l; i.t.) ou solução fisiológica 0,9 % (controle; 20 μ l; i.t.) administrados 30 min antes da aplicação de carragenina. O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 h e o primeiro registro foi realizado 1 h após a aplicação de carragenina. Os pontos representam a média \pm E.P.M. de 6 animais. * e *** indicam a diferença estatística com $p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Tukey).

Tabela 1 – Efeito da administração de outras doses de L-NNA no aumento de volume de pata.

GRUPOS	AUMENTO DE VOLUME (% do controle)			
	1h	2h	3h	4h
0.3 nmol <i>n</i> = 6	101,7 ± 12,8	102,4 ± 9,0	88 ± 9,6	100 ± 9,0
0.1 nmol <i>n</i> = 6	103,7 ± 23,7	91,4 ± 18,6	91,6 ± 16,3	100,8 ± 26,3
10 nmol <i>n</i> = 6	74,7 ± 7,4	72,4 ± 8,4	71,1 ± 8,3	81,9 ± 11,5 **

Os dados são expressos como média ± E.P.M da diferença percentual dos grupos tratados com seus respectivos controles, sendo este considerado 100%. ** indica a diferença estatística significativa com $p < 0,01$ (Teste *t* de Student's pareado).

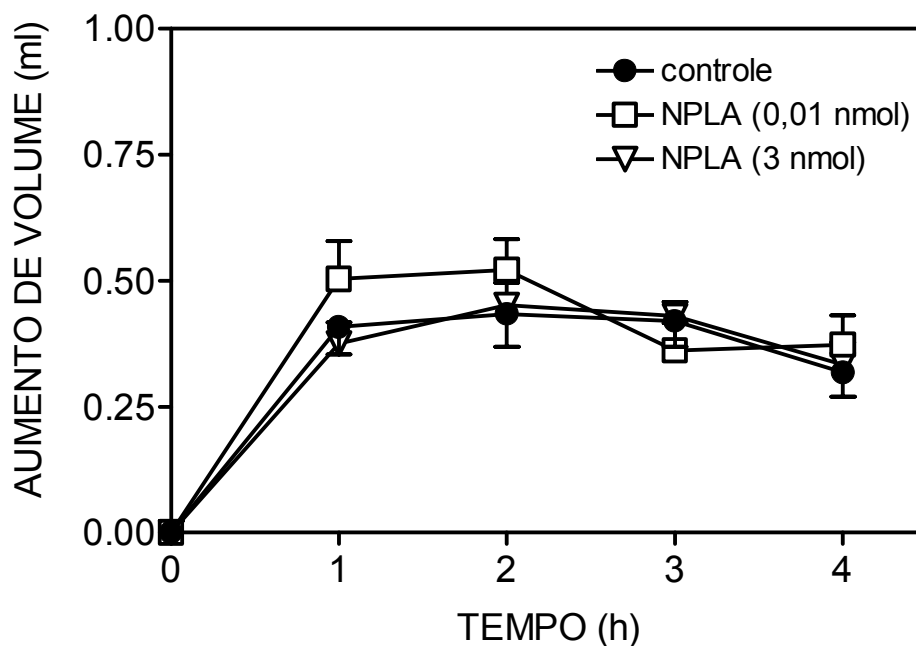


Figura 8 – Efeito do NPLA no aumento de volume de pata. NPLA (0,01 ou 3 nmol; 20 μ l; i.t.) ou solução fisiológica 0,9 % (controle; 20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina. O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 h, sendo o primeiro registro realizado 1 h após a aplicação de carragenina. Os pontos representam a média \pm E.P.M. de 5 animais no grupo controle e 6 nos demais. Não houve diferença estatística significativa (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Tukey).

Tabela 2 – Efeito da administração de outras doses de NPLA no aumento de volume de pata.

GRUPOS	AUMENTO DE VOLUME (% do controle)			
	1h	2h	3h	4h
0.1 pmol <i>n= 6</i>	107,3 ± 22	90,7 ± 16,6	96,6 ± 13	95 ± 16
0.5 pmol <i>n= 6</i>	119,7 ± 21,6	98,5 ± 22,1	101,9 ± 20	96 ± 24
1 pmol <i>n= 6</i>	96,4 ± 11,4	93 ± 7,7	89 ± 13,9	84,7 ± 15,2
5 pmol <i>n= 6</i>	88,2 ± 11,2	94,4 ± 14,5	97 ± 15,8	93 ± 14,6

Os dados são expressos como média ± E.P.M da diferença percentual dos grupos tratados com seus respectivos controles, sendo este considerado 100%. Análise estatística: ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Tukey.

4.6 EFEITO DO L-NNA CO-ADMINISTRADO COM MORFINA NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA

Neste experimento foi utilizada a dose subefetiva de L-NNA que não promoveu efeito potenciador do aumento de volume, anterior àquela efetiva de 0.01 nmol, ou seja, utilizou-se 3 pmol de L-NNA. L-NNA (3 pmol; 10 µl) foi co-administrada com morfina (37 nmol; 10 µl) por via intratecal 30 minutos antes da injeção subcutânea de carragenina na pata (150 µg; 50 µl). L-NNA preveniu o efeito inibitório da morfina sobre o aumento de volume de pata (Figura 9).

4.7 EFEITO DA L-ARGININA NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA

L-arginina (L-ARG; 0,015 nmol; 20 µl), ou solução fisiológica 0,9 % estéril (controle; 20 µl) foram administradas por via intratecal 30 minutos antes da aplicação subcutânea de carragenina na pata posterior esquerda (150 µg; 50 µl). No mesmo experimento, combinou-se L-NNA (0,01 nmol; 10 µl) com L-arginina (L-ARG; 0,015 nmol; 10 µl), para verificar se o substrato da enzima poderia prevenir o efeito potenciador do aumento de volume de pata visto no experimento anterior (Figura 7 Painel A). Como mostra a Figura 10, L-arginina inibiu significativamente o aumento de volume de pata ($p < 0,01$). A administração concomitante de L-arginina com L-NNA não modificou o aumento de volume de pata em relação ao controle.

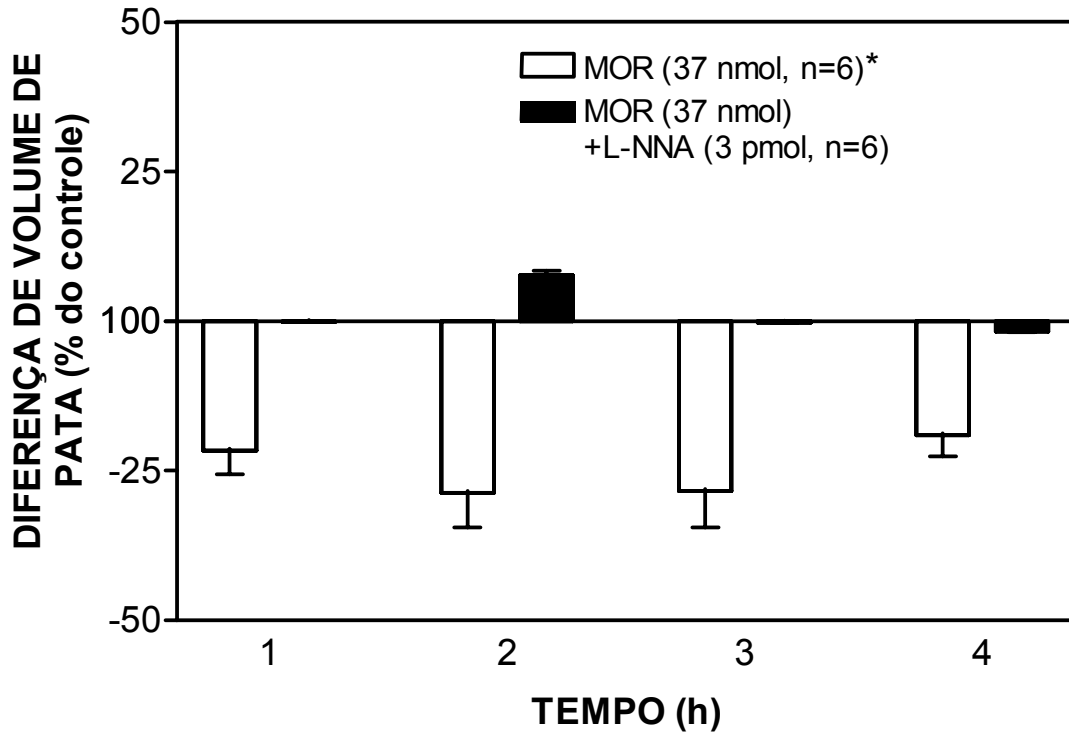


Figura 9 – Efeito do L-NNA na inibição do aumento de volume de pata produzido pela morfina. L-NNA (3 pmol; 10 μ l; i.t.) e morfina (37 nmol; 10 μ l; i.t.) foram co-administrados 30 min antes da injeção de carragenina. O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 h, sendo o primeiro registro realizado 1 h após a aplicação de carragenina. As barras representam a diferença percentual da média \pm EPM entre os grupos tratados e o controle (considerado 100%). * indica a diferença estatística das quatro horas em relação ao grupo controle com $p < 0,05$ (Teste t de Student's pareado).

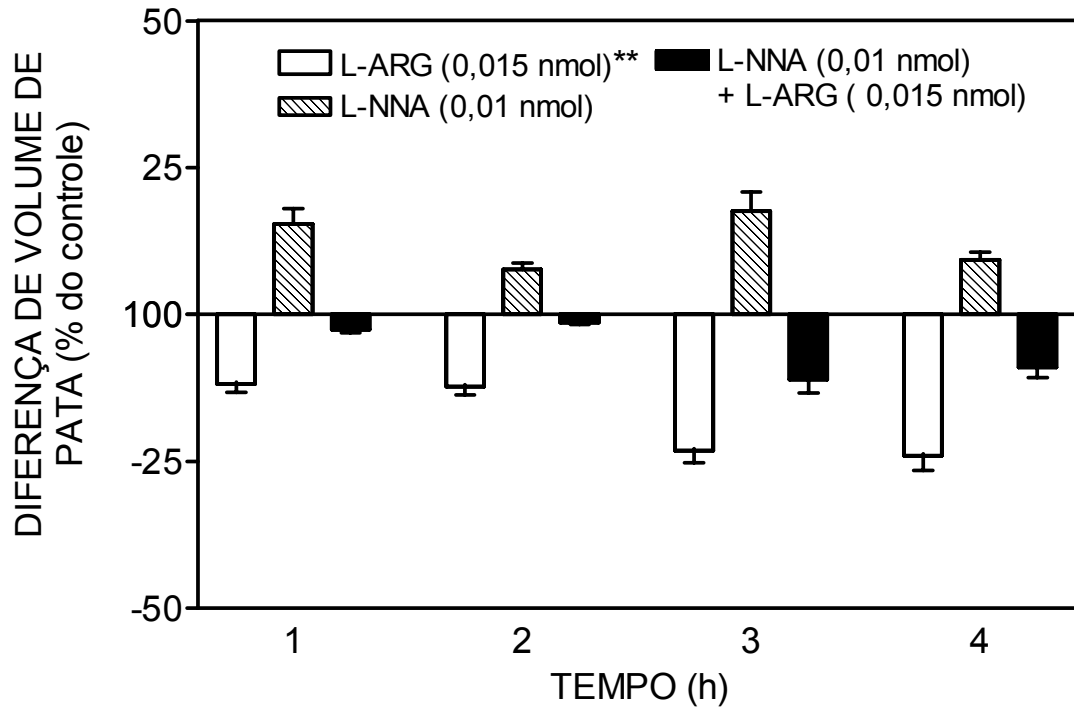


Figura 10 – Efeito da L-arginina e da co-administração de L-arginina + L-NNA no aumento de volume de pata. L-arginina (L-ARG; 0,015 nmol; 20 μ l; i.t.) ou solução fisiológica 0,9 % (controle; 20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina, assim como a combinação L-arginina (L-ARG; 0,015 nmol; 10 μ l; i.t.) + L-NNA (0,01 nmol; 10 μ l; i.t.). O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 h, sendo o primeiro registro realizado 1 h após a aplicação de carragenina. As barras representam a diferença percentual da média \pm EPM (n=6) entre os grupos tratados e o controle (considerado 100%). ** indica a diferença estatística das quatro horas em relação ao grupo controle com $p < 0,01$ (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Tukey).

4.8 EFEITO DO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO (SNAP) NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA

SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina; 3 ou 5 nmol; 20 μ l) ou solução fisiológica 0,9 % estéril (controle; 20 μ l) foram administrados por via intratecal 30 minutos antes da aplicação subcutânea de carragenina na pata posterior esquerda (150 μ g; 50 μ l). A menor dose de SNAP (3 nmol) foi capaz de inibir o aumento de volume de pata de forma significativa ($p < 0,05$) (Figura 11). O efeito de outras doses de SNAP (1, 10, 25 e 50 nmol e 1 μ mol) foi avaliado e os resultados estão expostos na Tabela 3. Nenhuma destas doses de SNAP foi capaz de alterar o aumento de volume de pata.

4.9 EFEITO DO INIBIDOR DA ENZIMA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (ODQ) NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA

ODQ (1H-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona; 10, 21 ou 42 nmol; 20 μ l) ou solução fisiológica 0,9 % estéril (controle; 20 μ l) foram administrados por via intratecal 30 minutos antes da aplicação subcutânea de carragenina na pata posterior esquerda (150 μ g; 50 μ l). As duas maiores doses (20 e 40 nmol) promoveram diminuição significativa do aumento de volume de forma dose-independente ($p < 0,001$) (Figura 12).

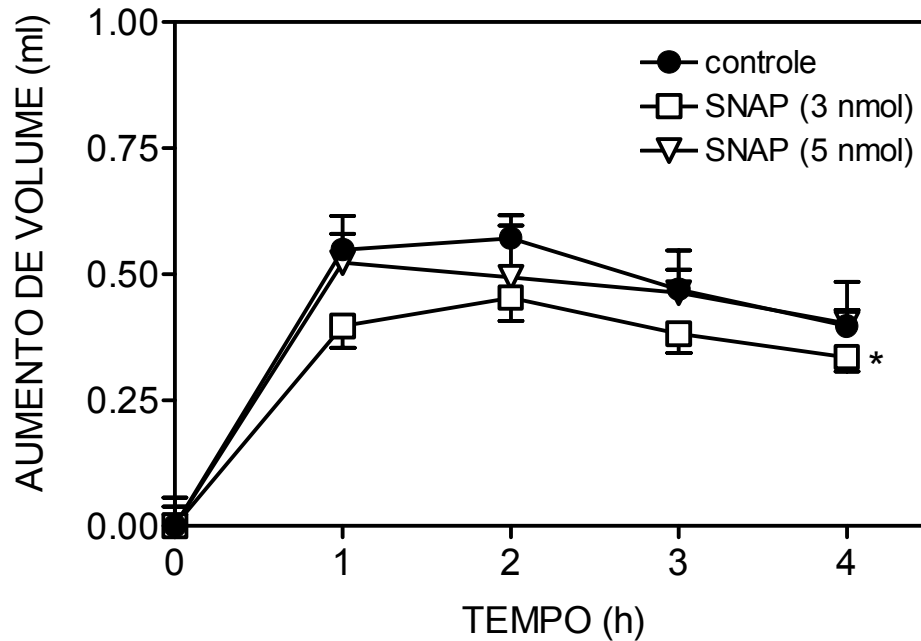


Figura 11 – Efeito do SNAP no aumento de volume de pata. SNAP (3 ou 5 nmol; 20 μ l; i.t.) ou solução fisiológica 0,9 % (controle; 20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina. O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 h, sendo o primeiro registro realizado 1 h após a aplicação de carragenina. Os pontos representam a média \pm E.P.M. de 6 animais. * indica a diferença estatisticamente significativa com $p < 0,05$ (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Tukey).

Tabela 3 – Efeito da administração de outras doses de SNAP no aumento de volume de pata.

GRUPOS	AUMENTO DE VOLUME (% do controle)			
	1h	2h	3h	4h
1 nmol <i>n= 6</i>	126,9 ± 13,1	111,7 ± 11,1	106,8 ± 0,07	106,4 ± 10
10 nmol <i>n=6</i>	111 ± 18,2	96,3 ± 10,6	86,6 ± 10,7	83,3 ± 10,2
25 nmol <i>n= 6</i>	95,5 ± 5,3	92,7 ± 9,5	91,2 ± 9	96,3 ± 8,7
50 nmol <i>n= 6</i>	97,1 ± 16	101,4 ± 13,7	95 ± 12,4	103 ± 8,8
1 μmol <i>n= 6</i>	102,9 ± 20	102 ± 13	101,5 ± 14,2	98,3 ± 9,3

Os dados são expressos como média ± E.P.M da diferença percentual dos grupos tratados com seus respectivos controles, sendo este considerado 100%. Análise estatística: ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Tukey.

4.10 EFEITO DO ODQ CO-ADMINISTRADO COM MORFINA OU SNAP NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA

ODQ (10 nmol; 10 μ l) foi administrada em combinação com a morfina (37 nmol; 10 μ l) ou com SNAP (3 nmol; 10 μ l) por via intratecal 30 min antes da aplicação subcutânea de carragenina na pata (150 μ g; 50 μ l). ODQ preveniu o efeito inibitório tanto da morfina quanto do SNAP sobre o aumento de volume de pata (Figura 13).

4.11 EFEITO SISTÊMICO DA ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL

Para verificar um possível efeito sistêmico das drogas administradas por via intratecal, um grupo de animais para cada droga estudada recebeu carragenina (150 μ g; 50 μ l) na pata anterior esquerda 30 minutos após a injeção intratecal de determinada droga. Verificou-se o aumento do volume desta pata anterior exatamente como procedido na pata posterior. Morfina (37 nmol), L-NNA (0,01 e 3 nmol), L-arginina (3 nmol) e ODQ (21 nmol) não promoveram alteração do volume de pata de forma significativa, enquanto o SNAP (3nmol) promoveu uma redução do volume de pata quando comparado com seu controle ($p < 0,001$) (Figura 14). Para distinguir se este efeito do SNAP ocorreu por alteração da pressão arterial, um grupo de animais foram submetidos à mensuração da pressão arterial basal, e logo após receberam a injeção intratecal de SNAP, permanecendo a mensuração por até 40 minutos após a injeção. Como mostra a Figura 15, não houve alteração da pressão arterial média após a aplicação de SNAP intratecal em relação ao estado basal dos animais.

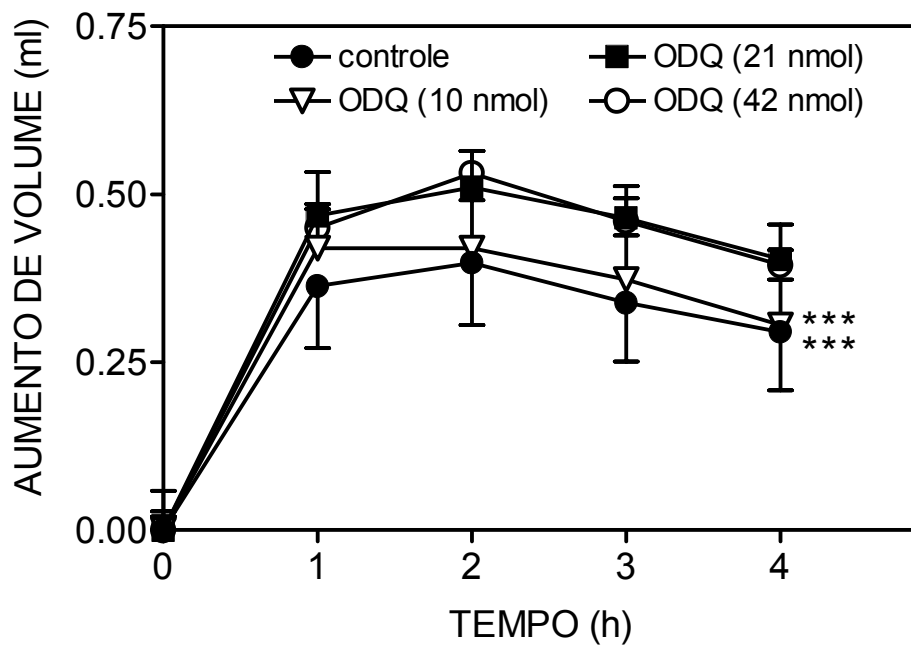


Figura 12 – Efeito do ODQ no aumento de volume de pata. ODQ (10, 21 ou 42 nmol; 20 μ l; i.t.) ou solução fisiológica 0,9 % (controle; 20 μ l; i.t.) foram administrados 30 trinta minutos antes da aplicação de carragenina na pata posterior esquerda (150 μ g; 50 μ l; s.c.). O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 h e o primeiro registro foi realizado 1 h após a aplicação de carragenina. Os pontos representam a média \pm E.P.M. de 6 animais. *** indica a diferença estatística significativa com $p < 0,001$ (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Tukey).

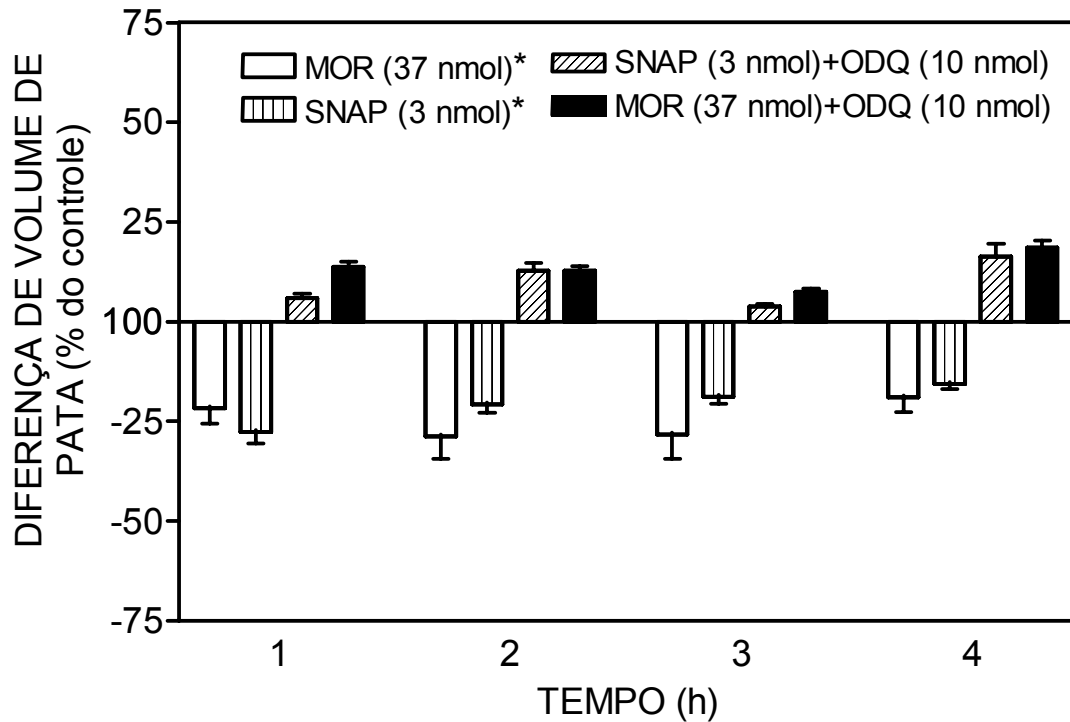


Figura 13 – Efeito do ODQ co-administrado com morfina ou SNAP no aumento de volume de pata. ODQ (10 nmol; 10 μ l) + Morfina (MOR; 37 nmol; 10 μ l; i.t.) ou + SNAP (3 nmol; 10 μ l; i.t.) ou solução fisiológica 0,9 % (controle; 20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina. O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 h, sendo o primeiro registro realizado 1 h após a aplicação de carragenina. As barras representam a diferença percentual média \pm EPM (n=6) entre os grupos tratados e o controle (considerado 100%). * indica a diferença estatística das quatro horas em relação ao grupo controle. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados e o controle (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Tukey).

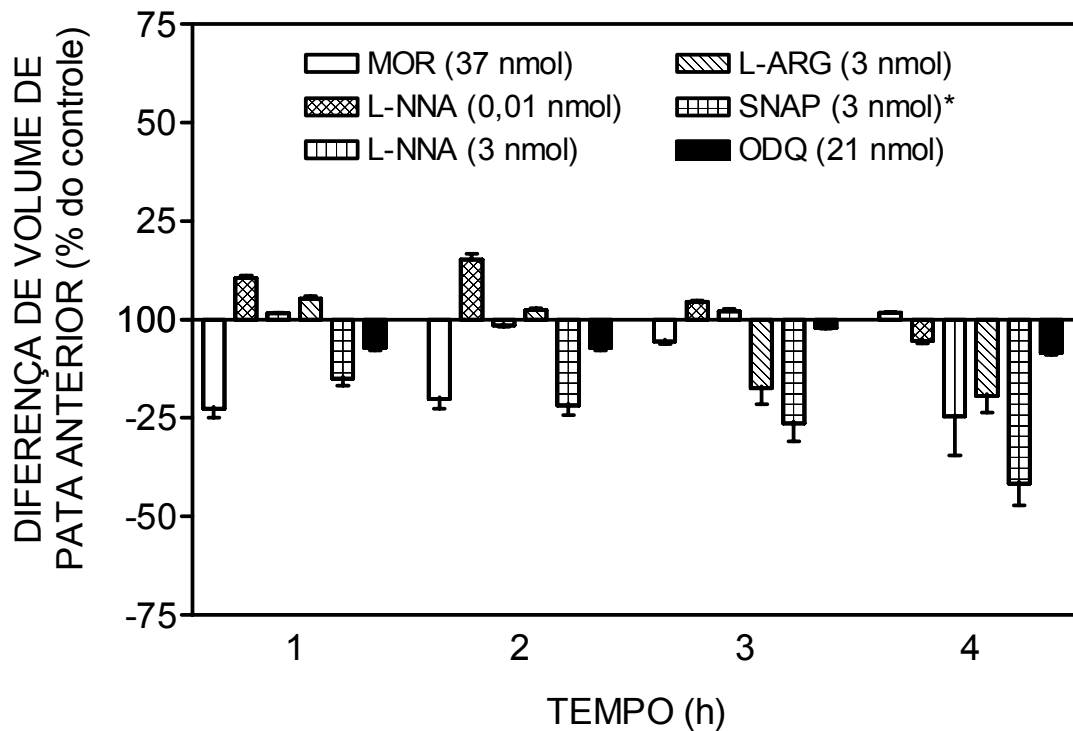


Figura 14 – Efeito das drogas na Pata Anterior. Morfina (MOR; 37 nmol; 20 μ l), L-NNA (0,01 e 3 nmol), L-arginina (L-ARG; 3 nmol), SNAP (3 nmol; 20 μ l), ODQ (21 nmol; 20 μ l) ou solução fisiológica 0,9 % (controle; 20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina na pata anterior. O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 h, sendo o primeiro registro realizado 1 h após a aplicação de carragenina. As barras representam a diferença percentual média \pm EPM (n=6) entre os grupos tratados e o controle (considerado 100%). * indica a diferença estatística das quatro horas em relação ao seu respectivo grupo controle (Teste *t* de Student's pareado).

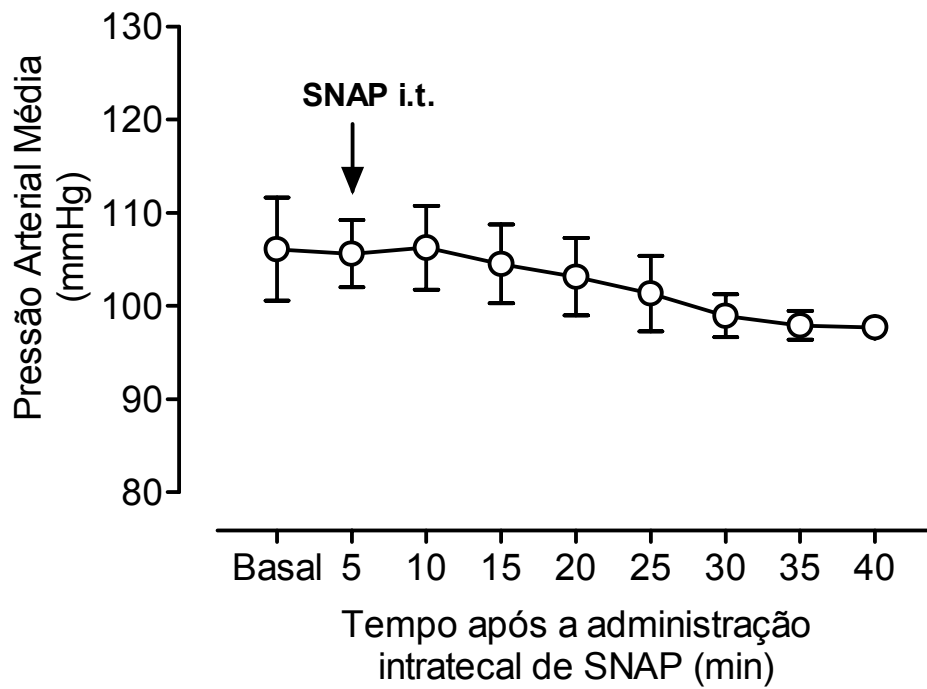


Figura 15 – Efeito do SNAP na pressão arterial. SNAP (3 nmol; 20 μ l) foi administrado por via intratecal 5 min após a mensuração basal da pressão arterial média. A mensuração permaneceu até 40 minutos após a injeção de SNAP. Os pontos representam a média \pm E.P.M. de 3 animais. Não houve variação estatística significativa do valor da pressão arterial média basal em relação aos valores nos tempos subsequentes a injeção intratecal (ANOVA seguida de teste Tukey).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Desde sua introdução, em 1962, por Winter e colaboradores, o edema de pata de rato induzido por carragenina é um dos modelos mais utilizados para o estudo da inflamação aguda, sendo a formação de edema uma das características mais avaliadas. Basicamente o pico de edema se desenvolve dentro de 3 a 4 horas, tornando-se necessário a avaliação por pelo menos 4 horas após a aplicação de carragenina. A formação de edema se dá na fase inicial (até 2 horas) e é caracterizada pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina, a seguir o edema passa a estar relacionado com a elevação da produção de prostaglandinas (Di Rosa *et al.*, 1971). A migração e ativação de neutrófilos no local da inflamação também contribuem para o desenvolvimento do processo e conseqüente formação de edema (Di Rosa e Sorrentino, 1968).

Os neurônios sensoriais também são ativados durante a inflamação periférica, conduzindo os estímulos dos tecidos para o sistema nervoso central e funcionando como 'eferentes neurosecretores' (Maggi e Melli, 1988). Este componente neurogênico da inflamação pode ser responsável por parte da vasodilatação e do extravasamento plasmático que ocorrem após a aplicação de carragenina na pata de ratos. A atividade antidrômica em fibras aferentes primárias é um importante mecanismo pela qual a inflamação neurogênica é induzida. Eventos periféricos incluem a liberação de substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP), de terminais dos aferentes primários (Willis, 1999).

Existem muitos mecanismos pelo qual a inflamação pode aumentar a probabilidade de deflagração de reflexos da raiz dorsal (Willis, 1999). Sluka e colaboradores (1995b), sugeriram que a inflamação pode causar uma estimulação

de mecanismos GABAérgicos no corno dorsal da medula espinhal, bem como demonstrado após aplicação de carragenina na pata de ratos, com aumento de células GABA-imunoreativas (Castro-Lopes, 1994). Um aumento da liberação de GABA de interneurônios pode resultar em mais despolarização dos eferentes primários (PAD) e conseqüentemente maior deflagração de reflexos da raiz dorsal (Willis, 1999; Cervero e Laird, 2003). Outro mecanismo envolvido seria um aumento na atividade do co-transportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$. Este co-transportador é responsável pela manutenção da concentração de íons cloreto no interior da célula aferente primária, assim, quando o GABA ativa seu receptor ionotrópico GABA_A , os canais de Cl^- se abrem, e estes íons saem da célula, despolarizando-a. Proteínas quinases dependentes de nucleotídeos cíclicos, como o AMPc e o GMPc, são exemplos de sinais de transdução que podem regular a atividade deste transportador (Willis, 1999). Uma interferência farmacológica na medula espinhal que possa agir nesses mecanismos de deflagração dos reflexos da raiz dorsal pode ser uma ferramenta importante no controle da inflamação periférica.

Este estudo mostrou primeiramente que a morfina e algumas substâncias que fazem parte da via L-arginina/ NO/ GMPc, quando injetadas por via intratecal em nível lombar de ratos, podem modificar o edema inflamatório induzido por carragenina aplicada na pata posterior.

Morfina produziu um significativo efeito anti-edematogênico, porém, menos intenso que os efeitos observados com indometacina (Daher e Tonussi, 2003) e serotonina (Daher *et al.*, 2005) sob essas mesmas condições. A evidência de que agonistas de receptores opióides podem estimular a função do eixo hipotálamo-pituitária-adrenocortical em ratos (Gonzalvez *et al.*, 1991; Pechnick, 1993), sugeriu que fosse investigado o envolvimento de corticosteróides neste efeito induzido pela

morfina. O efeito anti-edematogênico não foi revertido por pré-tratamento com aminoglutetimida, o qual sugere que um aumento nos níveis de esteróides endógenos, devido à estimulação espinhal ou outras condições inesperadas de estresse, parece não ser responsável pelo efeito da morfina. Uma possível explicação é que a geração de reflexos da raiz dorsal (Rees *et al.*, 1994) pode ser modulada pela morfina na medula, podendo então diminuir a inflamação periférica. Todos os três tipos de receptores opióides estão expressos nas terminações centrais de neurônios aferentes primários (Stein *et al.*, 2001) e podem mediar a hiperpolarização causada pela morfina, impedindo assim a geração de reflexo da raiz dorsal, deflagrado por uma despolarização destes mesmos terminais (Willis, 1999). Estes receptores estão associados à inibição da enzima adenilato ciclase, aumento da condutância do íon potássio e a uma inibição da condutância do íon cálcio. Todos estes efeitos resultam na diminuição da excitabilidade dos neurônios (Law *et al.*, 2000). Mais especificamente, já se tem demonstrado que o efeito anti-nociceptivo periférico (Rodrigues e Duarte, 2000), e central (Ocaña *et al.*, 1990; Roane e Boyd, 1993) da morfina resultam da ativação de canais de K⁺ sensíveis à ATP. Porém, quanto ao efeito inibitório dos opióides na liberação de neuropeptídeos, como a SP (Yaksh *et al.*, 1980; Yaksh, 1988), o mecanismo envolvido é ainda incerto.

Outra consideração a ser feita é que a morfina também pode agir em receptores localizados em interneurônios no corno dorsal (Chen *et al.*, 2005), pois os reflexos da raiz dorsal são produzidos não apenas como uma função da excitabilidade do nociceptor por si mesmo, mas também como uma função da excitabilidade dos interneurônios (Cervero e Laird 1996, Lin *et al.*, 1999). Conseqüentemente, os receptores opióides no corno dorsal podem também ter um

papel na inibição destes interneurônios, e conseqüentemente nos reflexos da raiz dorsal, e edema. Lembrando que existem receptores opióides também em células gliais (Watkins *et al.*, 2005) que de alguma forma podem estar contribuindo para o efeito visto com a morfina.

Muitos estudos têm demonstrado que a morfina administrada sistemicamente produz redução do extravasamento plasmático (Bartho e Szolcsányi, 1981; Hargreaves *et al.*, 1988; Joris *et al.*, 1990; Barber, 1993) e do edema (Hargreaves *et al.*, 1988; Joris *et al.*, 1990; Sacerdote *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 1996) induzidos por inflamação. Se estes efeitos ocorrem via ativação de receptores periféricos ou centrais é ainda incerto. Para Whiteside *et al.*, 2005 o efeito anti-edematogênico da morfina ocorre através de uma ação nos receptores localizados centralmente, pois utilizando um agonista específico de receptor opióide periférico não houve alteração no edema inflamatório. Porém, estes autores concordam que uma ativação periférica de receptores opióides pode afetar alguns componentes do processo inflamatório, tais como extravasamento plasmático dado por ativação antidrômica dos nociceptores, sem necessariamente afetar o edema resultante.

Sendo assim, a administração intratecal de morfina pode estar modulando a inflamação periférica através de uma somação de efeitos, como a inibição na excitabilidade dos aferentes primários via ativação de receptores localizados nos terminais centrais destas fibras; inibição da liberação de SP dos terminais periféricos dos aferentes primários; e uma interferência sobre os interneurônios que estão envolvidos na deflagração dos reflexos da raiz dorsal.

Alguns mecanismos pelo qual a conectividade sensorial modula a inflamação têm sido alvo de estudo em outros modelos. Os reflexos da raiz dorsal transmitidos retrogradamente ao longo das fibras sensoriais contribuem para o edema no joelho

seguido da indução de artrite experimental em várias espécies (Rees *et al.*, 1995; Sluka *et al.*, 1995a). A administração espinal de antagonistas de receptores não-NMDA, mas não NMDA bloqueiam este edema (Sluka *et al.*, 1994). O aumento de edema na pele, seguido de injeção intradermal de capsaicina, parece ser modulado diferentemente do joelho. Na pele, o edema é bloqueado por ambos os antagonistas de receptores NMDA e não-NMDA (Lin *et al.*, 1999) e parece ser mediado por reflexos da raiz dorsal exclusivamente em fibras sensoriais A δ e C (Lin *et al.*, 2000). Antagonista de receptores GABA_A, como a bicuculina, reduz o edema de joelho e interfere com o aumento de temperatura e hiperalgesia (Sluka *et al.*, 1993). Assim, parece que o edema pode ser controlado diferentemente na articulação e na pele e a manipulação espinal de alguns neurotransmissores pode modificar o processo inflamatório periférico.

Sabe-se que carragenina aplicada na pata é capaz de estimular a migração de neutrófilos (Fernandes *et al.*, 2002; Chou, 2003; Chou *et al.*, 2003). No presente estudo testou-se a atividade da enzima mieloperoxidase como medida indireta para analisar a migração de neutrófilos para a região da pata inflamada. Como resultado, observou-se que a morfina intratecal não foi capaz de alterar esta migração. Ao contrário da administração intratecal de ciclohexiladenosina (CHA), um agonista de receptor A1 de adenosina (Bong *et al.*, 1996; Sorkin *et al.*, 2003) e de um antagonista de receptor NMDA (Bong *et al.*, 1996), os quais reduziram a acumulação de neutrófilos em resposta à injeção intradérmica de carragenina. Fecho e colaboradores (2006) analisaram o efeito da morfina administrada sistemicamente na atividade da mieloperoxidase de ratos Fischer e Lewis (linhagem que demonstram diferentes respostas inflamatórias e imunológicas) e obtiveram em ambos, uma diminuição na migração de neutrófilos na pata que recebeu

carragenina. A explicação para este efeito da morfina sistêmica é incerto, mas provavelmente possa ser decorrente de uma ação periférica, já que a aplicação intratecal não promoveu nenhuma alteração.

Para saber se o efeito anti-edematogênico da morfina não poderia ser devido a alteração sistêmica promovida pela injeção intratecal, um grupo de animais com carragenina na pata anterior, recebeu morfina intratecal no mesmo nível lombar do experimento com carragenina na pata posterior. Neste caso, se alguma alteração sistêmica fosse promovida, certamente o edema da pata anterior sofreria alguma alteração. Mas, neste experimento, não ocorreu alteração do edema de forma significativa, demonstrando assim, um efeito segmentar da aplicação intratecal de morfina em nível lombar.

Muitos trabalhos sobre o efeito analgésico periférico dos opióides sugerem que estes são mediados pela ativação da enzima guanilato ciclase via ativação do sistema L-arginina/ NO (Ferreira *et al.*, 1991; Granados-Soto *et al.*, 1997; Maegawa e Tonussi, 2003; Sachs *et al.*, 2004). Para verificar se esta mesma via está mediando o efeito anti-edematogênico da morfina administrada via intratecal, utilizou-se uma série de agentes que interferem nesta via.

Como resultado geral deste trabalho tem-se que o efeito anti-edematogênico da morfina pode ser prevenido por um inibidor não-seletivo da síntese de óxido nítrico (NO), e também pelo inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), sugerindo um possível envolvimento tanto do NO quanto do GMPc no efeito da morfina.

Primeiramente observou-se o efeito do inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N^G-nitro-L-arginina (L-NNA), administrado intratecalmente, onde este mostrou um efeito pró-edematogênico em suas menores doses, e em

doses maiores apresentou um efeito contrário, ou seja, anti-edematogênico. Existe a possibilidade de alguns inibidores de NO, como o N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) agirem como substratos para a síntese de NO (Archer e Hampl, 1992). De fato, células endoteliais em cultura são capazes de metabolizar L-NMMA a citrulina e subsequentemente a L-arginina, um precursor da síntese de NO (Hecker *et al.*, 1990). Também, um dos inibidores mais utilizados nos estudos farmacológicos com NO é o N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), e sua capacidade como inibidor da síntese de NO parece limitada, visto que L-arginina e um inibidor da fosfodiesterase de GMPc podem acentuar o efeito anti-nociceptivo promovido por L-NAME, mostrando que seu efeito pode ser pela estimulação da via L-arginina/ NO/ GMPc e não por uma inibição (Duarte e Ferreira, 2000). Há, portanto, a possibilidade de que em altas doses o L-NNA utilizado possa estar agindo como substrato da síntese de NO, facilitando ou ativando a via L-arginina/ NO/ GMPc, ao invés de propriamente estar inibindo. Em combinação com a morfina, o L-NNA em sua menor dose foi capaz de prevenir o efeito inibitório da morfina sobre o edema, sugerindo, assim, a possível participação do NO neste efeito.

As controvérsias na literatura sobre o papel do NO, aparecem principalmente nos estudos de nocicepção, onde efeitos pró e anti-nociceptivos são amplamente discutidos. Possíveis explicações para estas aparentes discrepâncias são que (1) NO e GMPc tem diferentes ações na atividade basal e na excitabilidade dos neurônios, (2) diferentes ações em nível medular e supra-medular, e (3) apresentam efeito anti ou pró-nociceptivo dependendo de suas concentrações (Sousa e Prado, 2001; Tegeder *et al.*, 2002).

Muitos estudos implicam a via NO-GMPc mais na hiperalgesia que na anti-nocicepção especialmente sob condições patológicas (Meller *et al.*, 1992; Haley *et*

al., 1992; Malmberg e Yaksh, 1993; Sakurada *et al.*, 1996; Machelska *et al.*, 1999; Osborne e Coderre, 1999). Todavia, outros estudos apontam para uma ação antinociceptiva (Duarte *et al.*, 1990; Ferreira *et al.*, 1991; Granados-Soto *et al.*, 1997; Budzinsk *et al.*, 2000; Jain *et al.*, 2001; Sachs *et al.*, 2004).

Se os mesmos mecanismos podem estar envolvidos com a transmissão nociceptiva e com a deflagração de reflexos da raiz dorsal e conseqüente inflamação neurogênica, os demais resultados deste trabalho levam à sugestão de que a via L-arginina/ NO/ GMPc além de mediar o efeito analgésico da morfina periférica (Ferreira *et al.*, 1991), pode também fazer parte do mecanismo anti-edematogênico da morfina medular. Como visto em nossos resultados, ODQ, um inibidor da guanilato ciclase solúvel, sozinho, foi capaz de aumentar o edema significativamente e em combinação com a morfina preveniu a ação desta, assim como também preveniu o efeito anti-edematogênico do doador de NO (SNAP). Os resultados com SNAP e ODQ mostram as similaridades do mecanismo anti-edematogênico da morfina intratecal com o efeito analgésico da morfina periférica.

O precursor de NO, L-arginina, quando administrado sozinho também reduziu o edema, provavelmente por fornecer substrato para a formação de NO, dando início a via subseqüente a ser ativada. Porém, administração concomitante de L-NNA e L-arginina, não causou alteração no edema. Como a ação da maioria dos inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS), L-NNA ocupa o sítio ligação da L-arginina (Alderton, 2001), competindo com esta e impedindo assim a formação de NO.

Entre as três isoformas de NOS, a NOS neuronal é a mais abundante no sistema nervoso central e está localizada principalmente em neurônios (Dawson e Snyder, 1994). Tem-se reportado que a nNOS medular exerce uma função crítica no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia inflamatória (Handy e Moore 1998);

Osborne e Coderre, 1999). Sendo assim, após os resultados obtidos com um inibidor não-seletivo de NOS, L-NNA, utilizou-se um inibidor seletivo para NOS neuronal, N^ω-propil-L-arginina (NPLA). Surpreendentemente, a administração intratecal deste inibidor não promoveu nenhuma alteração no edema de pata. Desde que a deflagração de reflexos da raiz dorsal é dependente da liberação de GABA de interneurônios para os aferentes primários, e que há uma co-localização da enzima NOS neuronal com terminais GABAérgicos (Valtschanoff *et al.*, 1992), seria possível uma modulação do NO nesta deflagração, porém, todos os terminais GABAérgicos que se mostraram pré-sinápticos aos aferentes primários não apresentam positividade para nNOS (Bernardi *et al.*, 1995). Este fato pode explicar porque a inibição específica da nNOS como realizado neste estudo não desencadeou nenhuma alteração no edema.

Embora, as demais isoformas eNOS e iNOS não estejam presentes nos neurônios, são expressas principalmente nas células gliais (Saha e Pahan, 2006; Tao *et al.*, 2004). As células da glia, astrócitos e microglias, expressam a iNOS somente após um evento isquêmico, traumático, neurotóxico ou inflamatório (Saha e Pahan, 2006). Enquanto a eNOS além de estar constitutivamente presente nas células endoteliais (Alderton *et al.*, 2001), aparece também nos astrócitos (Tao *et al.*, 2004). Sabe-se que a glia modula dinamicamente a função dos neurônios sob condições tanto fisiológicas quanto patológicas (Watkins e Maier, 2003). Neste caso, uma condição inflamatória periférica, como dado pela carragenina na pata, pode promover a ativação destas células e conseqüente participação na liberação de mediadores no corno dorsal (Watkins e Maier, 2003), os quais podem também influenciar a deflagração dos reflexos da raiz dorsal. Tanto eNOS quanto a iNOS presentes nestas células podem ter sido afetadas pelo inibidor não-seletivo de NOS,

promovendo os efeitos observados.

Há também controvérsias na literatura quanto aos efeitos das enzimas eNOS e iNOS sobre a nocicepção. A inibição medular de eNOS seletivamente não afetou a hiperalgesia térmica depois da injeção de carragenina na pata, porém, em camundongos *Knockout* para nNOS, a inibição de eNOS foi anti-hiperalgésica (Tao *et al.*, 2004). Osborne e Coderre (1999) sugeriram que a iNOS medular tem um papel no desenvolvimento da hiperalgesia térmica associada com inflamação por carragenina na pata. Enquanto que Budzinski e colaboradores (2000) verificaram a acentuação da hiperalgesia com a administração de inibidor de iNOS intratecal e intraplantar em modelo de carragenina na pata. Embora a iNOS não seja normalmente expressa nos tecidos, quando estimulada adequadamente, como por citocinas, sintetiza óxido nítrico em concentrações nanomolares, ou seja, 100-1000 vezes maiores que a produção por nNOS (Kuo e Abe, 1995). Entretanto, independente de qual NOS ou ambas possam ter sido ativadas neste presente trabalho, o fato é que o NO formado e sua via nestas circunstâncias parece inibir a propagação de reflexos da raiz dorsal e conseqüentemente, o edema.

Como a iNOS provavelmente opera extraneuronalmente o NO liberado por estas enzimas pode difundir-se para os nociceptores (ou aferentes primários na medula) através da membrana neuronal (Budzinski *et al.*, 2000). Além disso, o NO liberado pela eNOS do endotélio microvascular do nervo óptico atinge os axônios e desempenha um papel tônico e fásico na sinalização do sistema nervoso (Garthwaite *et al.*, 2006). O NO tem a capacidade de modificar a estrutura lipídica da membrana plasmática (Kanner *et al.*, 1992). Não pode ser excluído que esta modificação da membrana neuronal tanto na periferia como nos terminais medulares dos neurônios nociceptivos pode resultar na diminuição da liberação de

neurotransmissores, por um mecanismo de dessensibilização dos nociceptores descrito por Duarte *et al.*, 1992. Um exemplo deste mecanismo pode estar no trabalho de Kamisaki e colaboradores (1995) que indicaram o NO como um agente responsável direto pela redução da liberação de SP de sinaptossomas da medula espinhal, sendo que este efeito pode ser mediado por ativação da guanilato ciclase e conseqüente aumento nos níveis de GMPc.

Como a inibição da síntese de GMPc preveniu o efeito anti-edematogênico da morfina intratecal, este segundo mensageiro pode participar da modulação dos reflexos da raiz dorsal via ativação de proteína quinase dependente de GMPc que, conseqüente atua em canais de K^+ específicos ou ainda podem regular a atividade do co-transportador $Na^+-K^+-Cl^-$.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados suportam o envolvimento da via L-arginina/ NO/ GMPc no efeito anti-edematogênico da morfina intratecal, desde que este efeito foi prevenido por um inibidor da síntese de NO (L-NNA) e por um inibidor da síntese de GMPc (ODQ), além do doador de NO (SNAP) e o seu precursor L-arginina terem promovido também diminuição do edema de pata induzido por carragenina.

A migração de neutrófilos parece não ser afetada pela interferência da morfina no edema.

Todas as drogas, exceto SNAP, não promoveram alteração no edema da pata anterior, que foi um meio utilizado como controle de um possível efeito sistêmico sobre a pressão arterial, por exemplo. Mesmo o SNAP que se apresentou como anti-edematogênico também na pata anterior, não promoveu alteração na pressão arterial. Provavelmente este efeito possa ser devido a uma difusão anterógrada da droga no espaço subaracnóide da região medular.

Como sugestão do mecanismo envolvido com o efeito anti-edematogênico da morfina e da via NO/ GMPc, temos na Figura 16 um modelo esquemático mostrando uma possível explicação para os resultados obtidos com este trabalho. Tendo assim, como continuidade desta pesquisa, a necessidade de investigar as vias que podem estar sendo ativadas como consequência do aumento de GMPc, como a proteína quinase G (PKG) e canais de K^+ . E ainda, se o efeito GABAérgico na deflagração de reflexos da raiz dorsal pode ser alterado por NO.

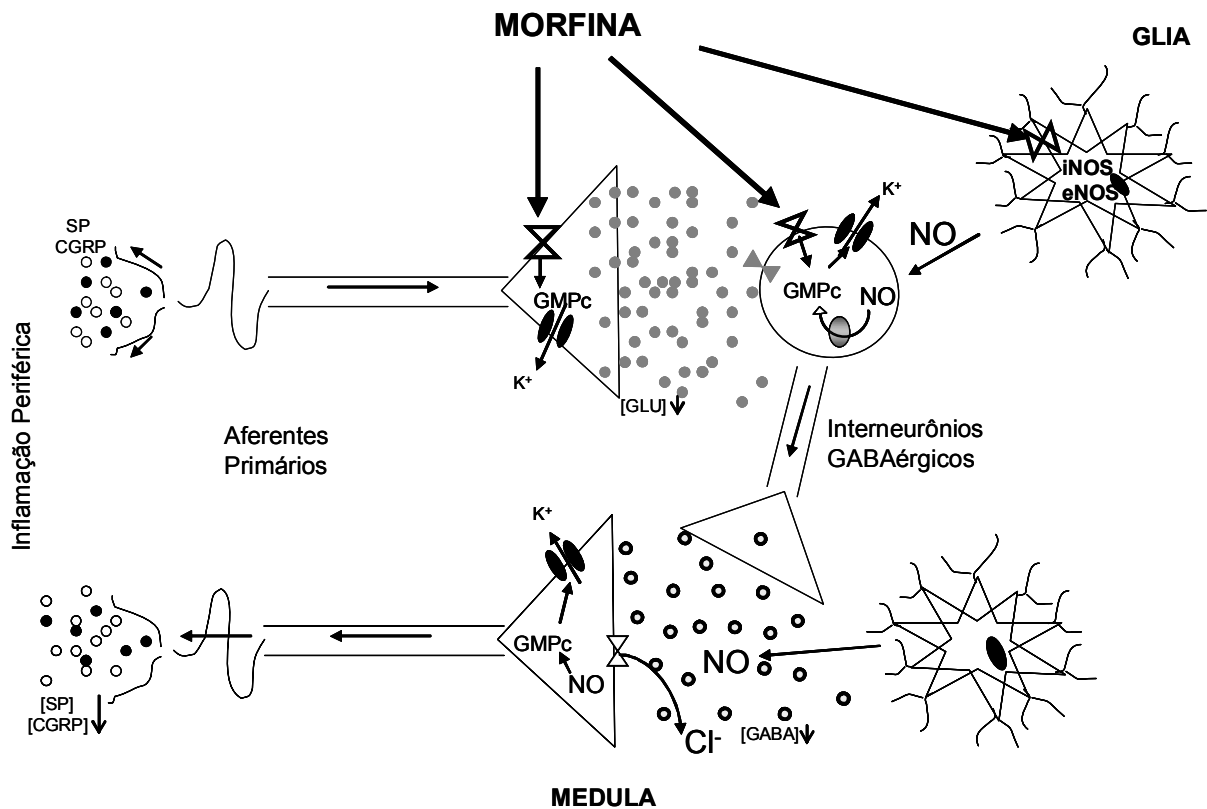


Figura 16 - Modelo esquemático da ação da morfina intratecal sobre a inflamação periférica. Quando um evento inflamatório ocorre na periferia, são liberados neuropeptídeos vasodilatadores (SP e CGRP) no local, assim como glutamato (GLU) na medula, por causa da ativação direta dos neurônios aferentes primários. GLU ativa interneurônios GABAérgicos medulares promovendo a liberação de GABA que despolariza os aferentes primários por promover a saída de íons Cl⁻, que acentua a liberação de neuropeptídeos na periferia. A morfina, administrada por via intratecal, pode se ligar a receptores localizados nos aferentes primários e/ou nos interneurônios GABAérgicos, hiperpolarizando estas células e diminuindo a liberação de neurotransmissores neste circuito. O mecanismo de ação da morfina parece envolver a ativação de NO e GMPc, porém a fonte de NO neste circuito deve provir de uma fonte extraneuronal, como as células glias.

___7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences**, 75:639–653, 2004.
- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, 357:593–615, 2001.
- ASSREUY, J.; CUNHA, F.Q.; LIEW, F.Y.; MONCADA, S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, 108:833–837, 1993.
- ARCHER, S.L.; HAMPL, V. N^G-monomethyl-L-arginine causes nitric oxide synthesis in isolated arterial rings: trouble in paradise. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 188:590–596, 1992.
- BARBER, A. μ - and μ -opioid receptor agonists produce peripheral inhibition of neurogenic plasma extravasation in rat skin. **Eur. J. Pharmacol.**, 236:113–120, 1993.
- BARBER, R.P.; VAUGHN, J.E.; SAITO, K.; MCLAUGHLIN, B.J.; ROBERTS, E. GABAergic terminals are presynaptic to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. **Brain Res.**, 141:35–55, 1978.
- BARTHO, L.; SZOLCSANYI, J. Opiate agonists inhibit neurogenic plasma extravasation in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 73:101–104, 1981.
- BERNARDI, P.S.; VALTSCHANOFF, J.G.; WEINBERG, R.J.; SCHMIDT, H.H.H.W.; RUSTIONI, A. Synaptic interactions between primary afferent terminals and GABA and nitric oxide-synthesizing neurons in superficial laminae of the rat spinal cord. **J. Neuroscience**, 15:1363–1371, 1995.
- BONG, G.W.; ROSENGREN, S.; FIRESTEIN, G.S. Spinal cord adenosine receptor stimulation in rats inhibits peripheral neutrophil accumulation: the role of N-methyl-D-aspartate receptors. **J. Clin. Invest.**, 98:2779–2785, 1996.
- BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. **Br. J. Pharmacol.**, 86:855–860, 1985.
- BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J.; TIPPINS, J.R.; MORRIS, H.R.; MACINTYRE, I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. **Nature**, 313:54–56, 1985.

- BREDDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, 8:3-11, 1992.
- BUDZINSKI, M.; MISTEREK, K.; GUMULKA, W.; DOROCIĄK, A. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in persistent pain. **Life Sciences**, 66:301-305, 2000.
- CASTRO-LOPES, J.M.; TAVARES, I.; TÖLLE, T.R.; COIMBRA, A. Carrageenan-induced inflammation of the hind foot provokes a rise of GABA-immunoreactive cells in the rat spinal cord that is prevented by peripheral neurectomy or neonatal capsaicin treatment. **Pain**, 56:193–201, 1994.
- CERVERO, F., LAIRD, J.M. Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. **Pain**, 68:13–23, 1996.
- CERVERO, F.; LAIRD, J.M. From acute to chronic pain. In: BOUNTRA, C.; MUNGLANI, R.; SCHMIDT, W. **Pain**. Marcel Dekker: New York, 2003.
- CHEN, S.R.; EISENACH, J.C.; PAN, H.L. Intrathecal S-nitroso-N-acetylpenicillamine and L-cysteine attenuate nerve injury-induced allodynia through noradrenergic activation in rats. **Neuroscience**, 101:759-765, 2000.
- CHEN, Y.P.; CHEN, S.R.; PAN, H.L. Effect of morphine on deep dorsal horn projection neurons depends on spinal gabaergic and glycinergic tone: implications for reduced opioid effect in neuropathic pain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 315:696-703, 2005.
- CHIARI, A.; LI, X.H.; XU, Z.; PAN, H.L.; EISENACH, J.C. Formation of 6-nitro norepinephrine from nitric oxide and norepinephrine in the spinal cord and its role in spinal analgesia. **Neuroscience**, 101:189–196, 2000.
- CHOU, T.C. Anti-inflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 139:1146-1152, 2003.
- CHOU, T.C.; CHANG, L.P.; LI, C.Y.; WONG, C.S.; YANG, S.P. The antiinflammatory and analgesic effects of baicalin in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. **Anesth. Analg.**, 97:1724-1729, 2003.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Pathologic Basis of Disease**. 6 ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1999.
- DAHER, J.B.; DE MELO, M.D.; TONUSSI, C.R. Evidence for a spinal serotonergic control of the peripheral inflammation in the rat. **Life Sciences**, 76:2349–2359, 2005.

- DAHER, J.B.; TONUSSI, C.R. A spinal mechanism for the peripheral anti-inflammatory action of indomethacin. **Brain Res.**, 962:207–212, 2003.
- DAWSON, T.M.; SNYDER, S.H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci.**, 14:5147-5159, 1994.
- DE ALBA, J.; CARDENAS, A.; MORO, M.A.; LEZA, J.C.; LORENZO, P.; BOSCA, L.; LIZASOAIN, I. Down-regulation of neuronal nitric oxide synthase by nitric oxide after oxygen-glucose deprivation in rat forebrain slices. **Journal of Neurochemistry**, 72: 248–254, 1999.
- DE BIASI, S.; RUSTIONI, A. Ultrastructural immunocytochemical localization of excitatory amino acids in the somatosensory system. **J. Histochem. Cytochem.**, 38:1745–1754, 1990.
- DENNINGER, J.W.; MARLETTA, M.A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1411:334–350, 1999.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, 104:15–29, 1971.
- DI ROSA, M., SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. **Eur. J. Pharmacol.**, 4:340–342, 1968.
- DUARTE, I.D.G.; DOS SANTOS, I.R.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, 217:225-7, 1992.
- DUARTE, I.D.G.; FERREIRA, S.H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine–nitric oxide–cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, 221:171–174, 1992.
- DUARTE, I.D.G.; FERREIRA, S.H. L-NAME causes antinociception by stimulation of the arginine-NO-cGMP pathway. **Mediators Inflamm.**, 9:25-30, 2000.
- DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, 186:289–293, 1990.
- DUN, N.J.; DUN, S.L.; FORSTERMANN, U.; TSENG, L.F. Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. **Neuroscience Letters**, 147:217-220, 1992.

- ESCOTT, K.J.; BRAIN, S.D. Effect of a calcitonin gene-related peptide antagonist (CGRP₈₋₃₇) on skin vasodilatation and oedema induced by stimulation of the rat saphenous nerve. **Br. J. Pharmacol.**, 110:772–776, 1993.
- FANTINI, F.; MAGNONI, C.; PINCELLI, C.; GIANNETTI, A. Neurogenic inflammation and the skin: neural modulation of cutaneous inflammatory reactions. **Eur. J. Dermatol.**, 5:349-357, 1995.
- FECHO, K.; MANNING, E.L.; MAIXNER, W.; SCHMITT, C.P. Effects of carrageenan and morphine on acute inflammation and pain in Lewis and Fischer rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, *article in press*, 2006.
- FERNANDES, D.; DA SILVA-SANTOS, J.E.; ASSREUY, J. Nitric oxide-induced inhibition of mouse paw edema: involvement of soluble guanylate cyclase and potassium channels. **Inflamm. Res.**, 51:377–384, 2002.
- FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur. J. Pharmacol.**, 201:121–122, 1991.
- FERRELL, W.R.; RUSSELL, N.J. Extravasation in the knee induced by antidromic stimulation of articular C fibre afferents of the anaesthetized cat. **J. Physiol.**, 379:407–416, 1986.
- FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Melzak and Wall: **Text Book of Pain**. 4 ed. Churchill Livingstone, Edinburg: 309–343, 1999.
- GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell–cell signaling in the nervous system, **Trends Neurosci.**, 14:60–67, 1991.
- GARTHWAITE, G.; BARTUS, K.; MALCOLM, D.; GOODWIN, D.; KOLLB-SIELECKA, M.; DOOLDENIYA, C.; GARTHWAITE, J. Signaling from blood vessels to CNS axons through nitric oxide. **J. Neurosci.**, 26:7730-7740, 2006.
- GONZALVEZ, M.L.; MILANES, M.V.; VARGAS, M.L. Effects of acute and chronic administration of mu- and delta-opioid agonists on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 200:155–158, 1991.
- GRANADOS-SOTO, V.; RUFINO, M.O.; GOMES LOPES, L.D.; FERREIRA, S.H. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. **Eur. J. Pharmacol.**, 340:177–180, 1997.

- HALEY, J.E.; DICKENSON, A.H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. **Neuropharmacology**, 31:251–258, 1992.
- HANDY, R.L.C.; MOORE, P.K. Effects of selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia. **Neuropharmacology**, 37:37–43, 1998.
- HARGREAVES, K.M.; DUBNER, R.; JORIS, J. Peripheral actions of opiates in the blockade of carrageenan-induced inflammation. In: DUBNER, R.; GEBHART, G.F.; BOND, M.R. **Proceeding of the Vth World Congress on Pain**. Elsevier, New York: 55–60, 1988.
- HECKER, M.; MITCHELL, J.A.; HARRIS, H.J.; KATSURA, M.; THIEMERMANN, C.; VANE J.R. Endothelial cells metabolize N^G -monomethyl-L-arginine to L-citrulline and subsequently to L-arginine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 167:1037–1043, 1990.
- HOHEISEL, U.; UNGER, T.; MENSE, S. A block of spinal nitric oxide synthesis leads to increased background activity predominantly in nociceptive dorsal horn neurones in the rat. **Pain**, 88:249-257, 2000.
- HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, 24:739–768, 1988.
- IGNARRO, L.J. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. **Biochemical Society Transactions**, 20:465–469, 1992.
- IWAMOTO, I.; NADEL, J.A. Tachykinin receptor subtype that mediates the increase in vascular permeability in guinea pig skin. **Life Sci.**, 44:1089–1095, 1989.
- JACQUES, L.; COUTURE, R.; DRAPEAU, G.; REGOLI, D. Capillary permeability induced by intravenous neurokinins. **Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 340:170–179, 1989.
- JAIN, N.K.; PATIL, C.S.; SINGH, A.; KULKARNI, S.K. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Brain Res.**, 909:170–178, 2001.
- JEURISSEN, F.; KAVELAARS, A.; KORSTJENS, M.; BROEKE, D.; FRANKLIN, R.A.; GELFAND, E.W.; HEIJNEN, C.J. Monocytes express a non-neurokin substance P receptor that is functionally coupled to MAP Kinase. **Journal of Immunology**, 152:2987–2994, 1994.

- JORIS, J; COSTELLO, A; DUBNER, R.; HARGREAVES, K.M. Opiates suppress carrageenan-induced edema and hyperthermia at doses that inhibit hyperalgesia. **Pain**, 43:95–103, 1990.
- KAMISAKI, Y.; NAKAMOTO, K.; WADA, K.; ITOH, T. Nitric oxide regulates substance P release from rat spinal cord synaptosomes. **J. Neurochem.**, 65:2050-206, 1995.
- KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. **Lipids**, 27:46-49, 1992.
- KUMAZAWA. T.; PERL, E.R. Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: indications of their place in dorsal horn functional organization. **J. Comp. Neurol.**, 177:417–434, 1978.
- KUO, P.C.; ABE, K.Y. Cytokine-mediated production of nitric oxide in isolated rat hepatocytes is dependent on cytochrome P-450III activity. **FEBS Lett.**, 360:10-14, 1995.
- LAW, P.; WONG, Y.H.; LOH, H.H. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 40:389–430, 2000.
- LEMBECK, F.; DONNERER. J.; TSUCHIYA, M.; NAGAHISA, A. The nonpeptide tachykinin antagonist CP-96,345 is a potent inhibitor of neurogenic inflammation. **Br J Pharmacol.**, 105:527–530, 1992.
- LEMBECK, F.; HOLZER, P. SP as a neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, 310:175–183, 1979.
- LIN, Q.; WU, J.; WILLIS, W.D. Dorsal root reflexes and cutaneous neurogenic inflammation following intradermal injection of capsaicin in rats. **J Neurophysiol.**, 82:2602–2611, 1999.
- LIN, Q.; ZOU, X.; WILLIS, W.D. A δ and C primary afferents convey dorsal root reflexes after intradermal injection of capsaicin in rats. **J. Neurophysiol.**, 84:2695–2698, 2000.
- MACHELSKA, H.; PAVONE, F.; CAPONE, F.; PRZEWLOCKA, B. Antinociception after both peripheral and intrathecal injection of oxotremorine is modulated by spinal nitric oxide. **European Neuropsychopharmacology**, 9:213–217, 1999.
- MAEGAWA FA, TONUSSI CR. The L-arginine/nitric oxide/cyclic-GMP pathway apparently mediates the peripheral antihyperalgesic action of fentanyl in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 36:1701-1707, 2003.

- MAGGI, C.A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Progress in Neurobiology**, 45:1–98, 1995.
- MAGGI, C.A.; MELLI, A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. **Gen. Pharmacol.**, 19:1–43, 1988.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. **Pain**, 54:291–300, 1993.
- MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends in Biochemical Sciences**, 22:477–481, 1997.
- MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, 52:127–136, 1993.
- MELLER, S.T.; PECHMAN, P.S.; GEBHART, G.F.; MAVES, T.J. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. **Neuroscience**, 50:7–10, 1992.
- MESTRE, C.; PELESSIER, T.; FIALIP, J.; WILCOX, G.; ESCHALIER, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, 32:197–200, 1994.
- MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: Melzak and Wall: **Text Book of Pain**. 5 ed. Elsevier: London, 2006.
- MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: why, where, how and why? **J. Clin. Invest.**, 100:2146–2152, 1997.
- MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **European Journal of Clinical Investigation**, 21:361–374, 1991.
- MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, 329:2002–2012, 1993.
- MONCADA, S.; HIGGS, E.A.; FURCHGOTT, R. XIV International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. **Pharmacol. Rev.**, 49:137–142, 1997.

- NAKAGAWA. N.; IWAMOTO. I.; YOSHIDA. S. Effect of substance P on the expression of an adhesion molecule ICAM-1 in human vascular endothelial cells. **Regulatory Peptides**, 46:223–224, 1993.
- NICHOLSON, R.; SPANSWICK, D.; LEE, K. Nitric oxide inhibits NMDA currents in a subpopulation of substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. **Neuroscience Letters**, 359:180–184: 2004.
- OCANÄ, A.M.; DEL POZO, E.; BARRIOS, M.; ROBLES, L.I.; BAEYENS, J.M. An ATP-dependent potassium channel blocker antagonises morphine analgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, 186:377–378, 1990.
- OSBORNE, M.G.; CODERRE, T.J. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hiperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, 126:1840-1846, 1999.
- PAYAN, D.G.; BREWSTER, D.R.; GOETZL, E.J. Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. **J. Immunol.**, 131:1613–1615, 1983.
- PECHNICK, R.N. Effects of opioids on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 33:353–382. 1993.
- PHEND, K.D.; WEINBERG, R.J.; RUSLIONI, A. Techniques to optimize postembedding single and double staining for amino acid neurotransmitters. **J. Histochem. Cytochem.**, 40:1011–1020, 1992.
- PLANAS, M.E.; RODRIGUEZ, L.; SANCHEZ, S.; POL, O.; PUIG, M.M. Pharmacological evidence for the involvement of the endogenous opioid system in the response to local inflammation in the rat paw. **Pain**, 60:67–71, 1995.
- PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, 429:79–91, 2001.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5 ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2003.
- REES, H.; SLUKA, K.A.; WESTLUND, K.N.; WILLIS, W.D. Do dorsal root reflexes augment peripheral infammation? **NeuroReport.**, 5:821–824, 1994.
- REES, H.; SLUKA, K.A.; WESTLUND, N.; WILLIS, W.D. The role of glutamate and GABA receptors in the generation of dorsal root reflexes by acute arthritis in the anesthetized cat. **J. Physiol.**, 484:437–445, 1995.

- ROANE, D.S.; BOYD, N.E. Reduction of food intake and morphine analgesia by central glibenclamide. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 46:205–207, 1993.
- RODRIGUES, A.R.; DUARTE, I.D. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. **Br. J. Pharmacol.**, 129:110–114, 2000.
- SACERDOTE, P.; BIANCHI, M.; PANERAI, A.E. Involvement of β -endorphin in the modulation of paw inflammatory edema in the rat. **Regul. Pept.**, 63:79–83, 1996.
- 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. **PNAS**, 101:3680–3685, 2004.
- SAHA, R.N.; PAHAN, K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. **Antioxidants & redox signaling**, 8:929-948, 2006.
- SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TAN-NO, K.; YONEZAWA, A.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; HARA, A.; ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem. Int.**, 29:271–278, 1996.
- SLUKA, K.A.; JORDAN, H.H.; WESTLUND, K.N. Reduction in joint swelling and hyperalgesia following post-treatment with a non-NMDA glutamate receptor antagonist. **Pain**, 59:95–100, 1994.
- SLUKA, K.A.; REES, H.; WESTLUND, N.; WILLIS, W.D. Fiber types contribute to dorsal root reflex induced by joint inflammation in cats and monkeys. **J. Neurophysiol.**, 74:981–989, 1995a.
- SLUKA, K.A.; WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Joint inflammation and hyperalgesia are reduced by spinal bicuculline. **Neuroreport**, 5:109–112, 1993.
- SLUKA, K.A.; WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. The role of dorsal root reflexes in neurogenic inflammation. **Pain Forum**, 4:141–149, 1995b.
- SOUSA, A.M.; PRADO, W.A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Res.**, 897:9–19, 2001.
- SORKIN, L.S.; MOORE, J.; BOYLE, D.L.; YANG, L.; FIRESTEIN, G.S. Regulation of peripheral inflammation by spinal adenosine: role of somatic afferent fibers. **Experimental Neurology**, 184:162–168, 2003.

- STEIN, C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. **N. Engl. J. Med.**, 332:1685–1690, 1995.
- STEIN, C. MACHELSKA, H.; BINDER, W.; SCHÄFER, M. Peripheral opioid analgesia. **Curr. Opin. Pharmacol.**, 1:62–65, 2001.
- STUEHR, D.J.; KWON, N.S.; NATHAN, C.F.; GRIFFITH, O.W.; FELDMAN, P.L.; WISEMAN, J. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. **Journal of Biological Chemistry**, 26:6259–6263, 1991.
- SZOLCSÁNYI, J. Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. **Agents Actions**, 23:4–11, 1988.
- TAO, F.; TAO, Y.-X.; ZHAO, C.; DORÉ, S.; LIAW, W.-J.; RAJA, S.N.; JOHNS, R.A. Differential roles of neuronal and endothelial nitric oxide synthases during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia. **Neuroscience**, 128:421–430, 2004.
- TEGEDER, I.; SCHMIDTKO, A.; NIEDERBERGER, E.; RUTH, P.; GEISSLINGER, G. Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats. **Neurosci. Lett.**, 332:146–150, 2002.
- TODD, A.J.; MCKENZIE, J. GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. **Neuroscience**, 31:799–806, 1989.
- TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **Eur. J. Pharmacol.**, 251:173–179, 1994.
- VALTSCHANOFF, J.G.; WEINBERG, R.J.; RUSTIONI, A.; SCHMIDT, H.H.H.W. Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. **Neuroscience Letters**, 148:6–10, 1992.
- WALKER, J.S.; CHANDLER, A.K.; WILSON, J.L.; BINDER, W.; DAY, R.O. Effect of μ -opioids morphine and buprenorphine on the development of adjuvant arthritis in rats. **Inflamm Res.**, 45:299–302, 1996.
- WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: The path to a new understanding of acute inflammation. **News Physiol.**, 15:107–113, 2000.
- WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nat Rev Drug Discov.**, 12:973–985, 2003.

- WATKINS, L.R.; HUTCHINSON, M.R.; JOHNSTON, I.N.; MAIER, S.F. Glia: novel counter-regulators of opioid analgesia. **Trends Neurosci.**,12:661-669, 2005.
- WHITESIDE, G.T.; BOULET, J.M.; WALKER, K. The role of central and peripheral μ opioid receptors in inflammatory pain and edema: a study using morphine and DIPOA ([8-(3,3-diphenyl-propyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]dec-3-yl]-acetic acid). **J Pharmacol Exp Ther.**, 314:1234–1240, 2005.
- WILLIS, W.D. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double edged sword, **Exp. Brain Res.**, 124:395–421, 1999.
- WILLIS, W.D. John Eccles' studies of spinal cord presynaptic inhibition. **Progress in Neurobiology**, 78:189–214, 2006.
- WINTER, C.A.; RISLEY, E.D.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 111:544–547, 1962.
- WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, 288:1765–1768, 2000.
- YAKSH, T.L. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. **Brain research**, 458:319–324, 1988.
- YAKSH T.L. Central pharmacology of nociceptive transmission. In: Melzak and Wall: **Text Book of Pain**. 4 ed. Churchill Livingstone, Edinburg: 253–308, 1999.
- YAKSH, T.L.; JESSELL, T.M.; GAMSE, R.; MUDGE, A.W.; LEEMAN, S.E. Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo. **Nature**, 286:155–156, 1980.