

LÚCIA DE CASTRO BASTOS

**INDUÇÃO DE HIPERPATIA POR INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE PGE₂.
ESTUDO FARMACOLÓGICO DE UM NOVO PARÂMETRO DA
HIPERALGESIA TÉRMICA.**

**Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia,
Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor
em Farmacologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos
Rogério Tonussi.**

**FLORIANÓPOLIS – SC
2009**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

B327i Bastos, Lúcia de Castro
Indução de hiperpatia por injeção intraplantar de
PGE2. estudo farmacológico de um novo parâmetro da
hiperalgesia térmica [tese] / Lúcia de Castro Bastos
; orientador, Carlos Rogério Tonussi. - Florianópolis,
SC, 2009.
80 f.: tabs., grafs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui bibliografia

1. Farmacologia. 2. Prostaglandinas. 3. Nocicepção.
4. Capsaicina. 5. Serotonina. 6. Histamina. 7. Opioides.
I. Tonussi, Carlos Rogerio. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia. III. Título.

CDU 615

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi, por me abrir as portas de seu laboratório e proporcionar tantos ensinamentos, pela confiança e grande amizade,

Aos professores Aleksander, Guilherme, Giles, Pádua e Rui, por terem aceitado o convite de integrar a banca examinadora desta tese e pelos preciosos argumentos que auxiliaram no enriquecimento deste trabalho,

Aos professores do Departamento de Farmacologia, que contribuíram de maneira importante para minha formação,

Aos colegas de laboratório, Eduardo, Daniel, Tatiany, Elisângela, Sara, e em especial Maria, pela amizade, carinho e companheirismo,

Aos colegas e amigos do Departamento, pela amizade e colaboração,

Aos funcionários do Departamento, em especial a Rita, Diana e Pedro, pelo seu empenho e dedicação,

Ao Rodrigo, meu grande companheiro e maior incentivador, por seu amor, carinho, dedicação e amizade,

À Luísa e Ivan por iluminarem minha vida,

A minha cunhada e amiga Érika, que sempre está por perto nos maus e principalmente, bons momentos,

Aos meus pais, Marcílio e Sílvia, e irmãos Nídia, Mário e Marcelo, que apesar da distância geográfica, estão sempre disponíveis quando preciso,

A Latina-Tec - São Carlos,

Ao Cnpq, CAPES, FAPESC e Pronex pelo auxílio financeiro.

SENTIMOS A DOR MAS NÃO A SUA AUSÊNCIA.

ARTHUR SCHOPENHAUER

RESUMO

Modelos animais de nocicepção avaliam principalmente medidas de limiar de resposta a estímulos mecânicos ou térmicos. Entretanto, a característica hiperalgésica de nocicepção tardia após o término do estímulo normalmente é negligenciada por modelos animais. Em humanos esta característica recebe a denominação de hiperpatia. Neste trabalho a nocicepção tardia, que se correlaciona com a hiperpatia humana foi pesquisada em ratos. Foram realizados tratamentos que classicamente promovem sensibilização nociceptiva, seguidos por exposições a estímulos térmicos quentes. Foi aplicado em ratos Wistar machos injeção intraplantar (i.pl.) de 50 µl de PGE₂ 350 ng/pata, ou serotonina (0,3 nmol/pata), ou histamina (2, 20, 200 nmol/pata), ou aplicação tópica (a.t.) de dimetilsulfoxido (DMSO) 100% ou capsaicina 10 mM. Uma hora após o tratamento plantar foi iniciada a avaliação da hiperpatia pela contagem do número de lambidas e sacudidas de pata (NLSP) que ocorreram durante 5 minutos, a cada hora durante um período total de 6 horas. Cada avaliação de NLSP foi realizada imediatamente após a imersão da pata em água quente (50 °C) por 7 s. PGE₂, serotonina, histamina, DMSO e capsaicina promoveram aumento do NLSP após estímulo térmico supra-limiar. O tratamento sistêmico prévio com indometacina só não reduziu o NLSP no grupo que recebeu histamina. A hiperpatia induzida por PGE₂ foi reduzida pelo tratamento local com indometacina. O tratamento sistêmico com antagonista de receptores H1 loratadina não reduziu o NLSP promovido por PGE₂. Verificou-se que tanto o tratamento sistêmico, quanto o tratamento local com opióides reduziu o NLSP, e esse efeito foi revertido por antagonistas opióides. Também foi verificado que alguns receptores serotoninérgicos periféricos participam da modulação da hiperpatia. Também foi realizado teste de retirada da pata a estímulo térmico, com equipamento regulado para curva de aquecimento lento, ou seja, ativação preferencial de fibras C. Neste teste, não ocorreu diminuição de limiar nos animais que receberam PGE₂ ou DMSO, mas sim nos grupos que receberam capsaicina e carragenina. O tratamento neonatal com capsaicina reduziu a sensibilização induzida por DMSO e capsaicina, mas não por PGE₂. Os resultados obtidos sugerem que a hiperpatia pode ser mediada principalmente por fibras Aδ, e ainda, PGE₂ parece ser mais seletiva para induzir hiperpatia do que diminuição de limiar a estímulo térmico. Sugere-se também que a hiperpatia induzida por DMSO e capsaicina pode ser indiretamente mediada por PGE₂ e fibras C.

Palavras chave: hiperpatia, prostaglandina E₂, nocicepção, capsaicina, DMSO, serotonina, histamina, opióides

ABSTRACT

Animal models for mechanical or heat nociception usually only measure the threshold response latency. In this study, the effect of typical sensitising treatments on the lasting nocifensive behaviour elicited after a supra-threshold heating stimulus - the hyperpathic component of hypernociception - was assessed. Male Wistar rats received either intra-plantar (i.pl.) injection of 350 ng PGE₂ (50 µl), or serotonin (0,3 nmol/paw), or histamine (2, 20, 200 nmol/paw), or topical application (t.a.) of 100% dimethylsulfoxide (DMSO), and 10 mM capsaicin. One hour after the treatments the number of nocifensive events (NNE) was scored hourly (6 h), for 5 min immediately after a hind paw immersion in hot water (50 °C/7s). All treatments increased the NNE induced by the supra-threshold stimuli. Indomethacin given 30 min before paw treatments, inhibited NNE in all groups, but histamine group. The indomethacin local treatment reduced the PGE₂ hyperpathia. The H1 receptor antagonist loratadine did not reduce the NNE promoted by PGE₂. Opioid treatments (systemic and local) also reduced the NNE, and the opioid antagonist blocked this effect. The local treatment with 5-HT1, 5-HT2, and 5-HT3 receptor antagonists showed a peripheral serotonergic modulation of hyperpathia. PGE₂ and DMSO did not lower the heat threshold in the paw withdrawal test, although carrageenan and capsaicin were effective. Capsaicin neonatal treatment (CNT) reduced the sensitisation induced by DMSO and capsaicin, but not that induced by PGE₂. These data suggest that hyperpathia is probably conveyed by Aδ nociceptors, and PGE₂ seems to be more selective to induce this phenomenon than lowering the thermal threshold. In addition, this hyperpathic effect induced by DMSO and capsaicin seems to be indirectly mediated by PGE₂ and C-fibres.

Key words: Hyperpathia, prostaglandin E₂, nociception, capsaicin, DMSO, serotonin, histamine, opioids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Equipamento para estímulo térmico por imersão	17
Figura 2 – Pesquisa para padronização dos parâmetros para os testes de hiperpatia	25
Figura 3 – Efeito da indometacina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE ₂ , DMSO e capsaicina	28
Figura 4 – Efeito da aplicação periférica de indometacina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE ₂	29
Figura 5 – Efeito do tratamento tardio com indometacina sobre a hiperpatia ..	30
Figura 6 – Efeito de PGE ₂ , DMSO e capsaicina no teste de hipernocicepção térmica	32
Figura 7 – Influência do tratamento neonatal com capsaicina sobre a hiperpatia	34
Figura 8 – Influência do tratamento neonatal com capsaicina sobre a nocicepção induzida por capsaicina	35
Figura 9 – Efeito da loratadina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE ₂	37
Figura 10 – Efeito da indometacina sobre a hiperpatia após sensibilização por histamina	39
Figura 11 – Efeito hiponociceptivo periférico de antagonistas de receptores de serotonina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE ₂	41
Figura 12 – Efeito do tratamento tardio periférico com antagonistas de receptores para serotonina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE ₂	42

Figura 13 – Efeito da indometacina sobre a nocicepção e a hiperpatia promovidas por serotonina	44
Figura 14 – Efeito do tratamento tardio periférico com antagonistas de receptores para serotonina sobre a hiperpatia após sensibilização por serotonina	45
Figura 15 – Efeito da morfina e naloxona sobre a hiperpatia após injeção i.pl. de PGE ₂	47
Figura 16 – Efeito da co-administração de morfina e PGE ₂ sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE ₂	48
Figura 17 – Efeito do tratamento tardio com morfina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE ₂	50
Figura 18 – Efeito do tratamento tardio com loperamida e naloxonazina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE ₂	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sintomas e sinais sensoriais associados com a dor..... 04

LISTA DE ABREVIATURAS

a.t. – aplicação tópica

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

Cipro – ciproheptadina

EP – receptor de prostaglandina

epm – erro padrão da média

i.p. – intraperitoneal

i.pl. – intraplantar

IASP - International Association for the Study of Pain

Indo – indometacina

K_i – constante de inibição

Lope – loperamida

Met – metisergida

MOR – receptores μ -opióides

Morf - morfina

n – número de animais da amostra

Naloz – naloxonazina

NLSP – número de lambidas e sacudidas da pata

Onda – ondansetrona

s.c. – subcutânea

Sol – solução

TNC – tratamento neonatal com capsaicina

v.o. – via oral

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 DOR E NOCICEPÇÃO	01
1.1.1 Sintomas e sinais sensoriais relacionados com a dor	02
1.1.2 Hiperpatia	04
1.1.3 Fibras sensoriais	05
1.1.4 Mediadores periféricos relacionados à nocicepção	07
1.1.5 Relação de modelos animais com a clínica	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 ANIMAIS	16
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	16
3.2.1 Avaliação nociceptiva imediata	16
3.2.2 Avaliação da hiperpatia ao calor	17
3.2.3 Avaliação da hipernocicepção térmica	18
3.2.4 Degeneração de fibras nociceptivas tipo C	19
3.2.5 Protocolos experimentais	19

3.3 DROGAS, REAGENTES E COMPOSTOS	21
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
4 RESULTADOS	23
4.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA NOCIFENSIVA TARDIA INDUZIDA POR PGE ₂ COM SENSIBILIZAÇÃO EM ÁGUA QUENTE	23
4.2 INDUÇÃO DE HIPERPATIA TÉRMICA APÓS DIFERENTES ESTÍMULOS QUÍMICOS E EFEITO DA INDOMETACINA SOBRE ESTA RESPOSTA ...	26
4.3 EFEITO DE PGE ₂ , DMSO E CAPSAICINA NO TESTE DE HIPERNOCICEPÇÃO TÉRMICA	31
4.4 EFEITO DA DEGENERAÇÃO DE FIBRAS NOCICEPTIVAS TIPO C SOBRE A HIPERPATIA	33
4.5 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA HISTAMINÉRGICO NO MODELO DE HIPERPATIA TÉRMICA.....	36
4.5.1 Efeito da loratadina sobre a hiperpatia após injeção intraplantar de PGE₂	36
4.5.2 Hiperpatia após injeção intraplantar de histamina. Efeito da indometacina sobre essa resposta	38
4.6 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NO MODELO DE HIPERPATIA TÉRMICA	40
4.6.1 Efeito dos antagonistas de receptores 5HT sobre a hiperpatia após injeção intraplantar de PGE₂	40
4.6.2 Efeito de indometacina e antagonistas de receptores 5HT sobre a hiperpatia após injeção intraplantar serotonina	43
4.7 MODULAÇÃO DA HIPERPATIA TÉRMICA, POR RECEPTORES OPIÓIDES, APÓS INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE PGE ₂	46

4.7.1 Efeito da administração sistêmica de opióides sobre a hiperpatia após injeção intraplantar de PGE₂	46
4.7.2 Papel dos receptores opióides periféricos sobre a hiperpatia após injeção intraplantar de PGE₂	46
4.7.3 Efeito do tratamento tardio com opióides sobre a hiperpatia após injeção intraplantar de PGE₂	49
5 DISCUSSÃO	52
5.1 EVIDÊNCIAS DO PAPEL SELETIVO DE FIBRAS A δ NO MODELO DE HIPERPATIA TÉRMICA	52
5.2 PESQUISA DE MEDIADORES FARMACOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA HIPERPATIA TÉRMICA	55
5.2.1 Sistema histaminérgico	55
5.2.2 Sistema serotoninérgico	56
5.2.3 Sistema opióide	60
6 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A dor constitui um importante sistema de alarme do organismo. Ela tem a função primária de sinalizar a ocorrência de danos teciduais, sendo inclusive um dos cinco sinais característicos da resposta inflamatória (dor, calor, tumor, rubor e perda da função). A dor é uma experiência altamente complexa e subjetiva, pois além de fornecer informações sensoriais como localização, intensidade e tipo de estímulo aplicado, também se caracteriza por componentes afetivos e cognitivos. As bases anatômicas, neurais e emocionais que se relacionam com a dor tem sido alvo de estudos por séculos, e ainda são motivo de discussões acaloradas (Craig, 2003; Perl, 2007). Até o momento, a definição mais aceita para dor é a utilizada pela International Association for the Study of Pain (IASP), que define a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou provável, ou descrita nesses termos” (Merskey e Bogduk, 1994).

Na derme, epiderme, articulações, músculos e vísceras, encontram-se terminações nervosas livres de fibras aferentes primárias que respondem a estímulos químicos, mecânicos ou térmicos (Giordano, 2005). Quando estimulados, esses neurônios especializados despolarizam e desencadeiam potenciais de ação que se propagam ao longo de toda fibra o que resulta na liberação de neurotransmissores em sinapses no corno dorsal da medula espinhal. Através da interação sináptica entre interneurônios e neurônios de projeção, a informação vai alcançar o sistema tálamo-cortical, onde será processada e interpretada.

Há mais de um século Sherrington apresentou o termo nocicepção (do latim *nocere* que significa dano, lesão) para designar um fenômeno sensorial fisiológico (Sherrington, 1906). Recentemente foi apresentada uma proposta para definir nocicepção como sendo o processo neural de codificação e processamento do estímulo nocivo (Loeser e Treede, 2008). Os estímulos

nociceptivos são estímulos de alta intensidade, ou seja, que lesionam ou potencialmente podem lesionar o tecido e ativam terminações de fibras aferentes primárias específicas, os **nociceptores** (Coutaux et al., 2005; Loeser e Treede, 2008).

1.1.1 Sintomas e Sinais Sensoriais relacionados com a Dor

Existem várias situações em que a dor deixa de ser um sinal de perigo para o organismo e passa a ser um problema real. Isto ocorre principalmente em lesões do sistema nervoso, ou estados inflamatórios crônicos, onde a dor não mais oferece benefícios ao paciente (Costigan e Woolf, 2000). A dor inflamatória pode resultar de uma lesão tecidual (incisão ou queimadura), contato com agentes químicos (picadas de insetos), ou processos auto-imunes (artrite). Independentemente do tipo de estímulo, ocorrerá recrutamento e acúmulo de células inflamatórias no sítio da lesão, degranulação de mastócitos, liberação de mediadores inflamatórios como: bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, serotonina, histamina, substância P, tromboxanas, óxido nítrico (NO), fator de ativação plaquetária (PAF), fator de necrose tumoral (TNF α), fator de crescimento do nervo (NGF), adenosina, ATP, interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6, neurotrofinas, prótons, radicais livres, entre outros. Esses mediadores irão ativar nociceptores, direta ou indiretamente, através da liberação de outros mediadores, principalmente prostanóides (Marchand et al., 2005). Os mediadores inflamatórios produzem vários efeitos, entre eles, ativação sustentada e sensibilização de fibras sensoriais aferentes e, conseqüentemente, sensibilização da medula espinhal. A dor inflamatória pode durar horas, dias, meses ou anos. De maneira geral as dores inflamatórias são responsivas a anti-inflamatórios esteroidais, não esteroidais (AINES) e opióides (Negus et al., 2006).

A dor crônica ocorre pelas mesmas vias de sinalização que a dor aguda, mas causando sensações exacerbadas. A dor aguda leva a uma reação de proteção do indivíduo, a dor neuropática representa uma resposta tardia e contínua a uma lesão que não é aguda. Segundo a IASP, dor neuropática é a dor iniciada ou causada por lesão primária, disfunção, ou perturbação transitória no sistema nervoso (Merskey e Bogduk, 1994). Entretanto, como

esta definição é muito abrangente, recentemente colocou-se em discussão uma nova definição para dor neuropática, que seria: “dor que ocorre em consequência de lesão ou doença que afete o sistema somato-sensorial” (Loeser e Treede, 2008). Dores neuropáticas podem ser causadas por compressão, transecção, infiltração, isquemia ou dano metabólico em neurônios, principalmente nos corpos celulares, ou uma combinação desses fatores. Alguns exemplos de patologias neuropáticas de origem periférica seriam: neuropatia diabética periférica, neuralgia pós-herpética, terapia anti-neoplásica, dor do membro fantasma e neuralgia do trigêmeo. Síndromes centrais que resultam em dor neuropática incluem esclerose múltipla, lesão medular, doença de Parkinson e derrame cerebral (Dworkin, 2002). Se o diagnóstico de dor neuropática já é difícil em humanos, podemos imaginar que em animais esse diagnóstico é bem mais complexo. Entretanto, existem relatos de diagnóstico de dores neuropáticas em animais (Newton et al., 2000; O'Hagan, 2006; Rusbridge e Jeffery, 2008; Cashmore et al., 2009).

Apesar da existência de uma lista proposta pela IASP, com a terminologia para termos relacionados à dor (Merskey e Bogduk, 1994), o debate entre clínicos e pesquisadores para se melhorar essas definições é constante (Loeser e Treede, 2008; Devor, 2008; Merskey, 2008). Na tabela 1 listamos alguns sintomas e sinais sensoriais associados com a dor que são de relevância para este trabalho.

Tabela 1: Sintomas e Sinais Sensoriais Associados com a Dor

Alodinia*	Dor em resposta a estímulo não nociceptivo antes da lesão. (Este termo deveria ser usado somente quando se tem certeza de que o estímulo aplicado não é capaz de ativar nociceptores.)
Anestesia	Perda da sensação normal na região afetada.
Disestesia	Sensações anormais desagradáveis espontâneas ou evocadas.
Hiperalgisia*	Sensibilidade à dor aumentada a um estímulo previamente doloroso. (Inclui tanto diminuição de limiar, como aumento da resposta a estímulos supralimiais)
Hiperpatia	Resposta nociceptiva intensa e prolongada após um estímulo doloroso aplicado na região afetada.
Hipoestesia	Redução da sensação normal na região afetada.
Parestesia	Sensações espontâneas anormais não dolorosas.
Hipernocicepção	Sensibilidade aumentada para estímulos não nociceptivos e nociceptivos. (Termo mais apropriado quando se trata de resultados obtidos a partir da avaliação da nocicepção em modelos animais) **

Adaptado de Galluzzi 2007

* Definições propostas no encontro de Kyoto (Loeser e Treede, 2008)

** (Parada et al., 2003; Villarreal et al., 2009)

1.1.2 Hiperpatia

Existe uma característica importante na condição hiperalgésica que normalmente é negligenciada por modelos animais, e esta característica é a nocicepção tardia após o término do estímulo. Em condições neuropáticas esse fenômeno pode ser exacerbado, e então é chamado de hiperpatia (Merskey e Bogduk, 1994; Galluzzi, 2007). Em condições inflamatórias crônicas, a hiperpatia também pode ocorrer na forma de uma grande sensibilidade dolorosa ou “*tenderness*” (Rigby e Wood, 1990; Chenitz, 1992; Scott e Houssien, 1996; Brosseau et al., 2003).

A hiperpatia representa uma forma de manifestação de dor bastante frequente em humanos que sofrem de diferentes patologias inflamatórias ou neuropáticas e também em animais (Mathews, 2008). A hiperpatia é definida como “síndrome dolorosa caracterizada por reação dolorosa anormal a um estímulo, principalmente a estímulos repetitivos, e também por diminuição no

limiar” (Merskey e Bogduk 1994). Pode ocorrer juntamente com alodinia, hiperestesia, hiperalgesia ou disestesia. Normalmente é uma dor de característica explosiva, onde a identificação e localização do estímulo ocorrem de maneira errônea, e ainda, pode ocorrer sensação de radiação e retardo da sensação (after-sensation) (Merskey e Bogduk 1994). Alguns exemplos de patologias em que os indivíduos apresentem hiperpatia são: causalgia do tipo II, dor de origem central e neuralgia pós-herpética (Merskey e Bogduk 1994).

A percepção de sensação desagradável que ocorre tardiamente tem sido pesquisada através de técnicas experimentais de eletrofisiologia. Nestes experimentos são obtidas estimativas da atividade neural após a cessação do estímulo (mecânico, térmico, químico ou elétrico). Essa atividade neural é denominada de “pós-descarga”. Geralmente ocorre um padrão de resposta contínua e de duração extremamente curta, que persiste por entre poucos segundos, até no máximo 4 minutos após o término do estímulo (Pitcher e Henry, 1999, 2000, 2001, 2004).

O sintoma de hiperpatia pode estar expressando um padrão alterado dos potenciais de ação das fibras sensoriais periféricas, onde pode ocorrer aumento na frequência de disparos, de maneira contínua e prolongada, ou ainda, uma fibra pode estar sendo ativada pelos potenciais de ação de uma fibra vizinha, situação conhecida como transmissão efáptica (Kamermans e Fahrenfort, 2004; Meyer et al., 2006). Provavelmente, este tipo de padrão alterado não é detectado por testes de hipernocicepção e alodinia, pois estes avaliam variação de limiar de resposta a estímulos nociceptivos, e não possibilitam a avaliação de reações decorrentes de disparos contínuos de neurônios. Deste modo, o componente hiperalgésico que representa a hiperpatia humana, não tem sido pesquisado de maneira adequada, devido à carência de um modelo experimental confiável que avalie este fenômeno.

1.1.3 Fibras Sensoriais

Através da ativação das fibras sensoriais periféricas somos capazes de perceber e distinguir os mais variados tipos e intensidades de estímulos químicos, mecânicos ou térmicos. Isso é possível porque as fibras sensoriais possuem estrutura e características próprias e são ativadas por estímulos

diferentes. As fibras sensoriais podem ser classificadas tendo como base sua estrutura, espessura e velocidade de condução. Fibras A α e A β são as mais calibrosas (6 a 22 μ m) e são envolvidas por uma camada espessa de mielina, possuem velocidade de condução alta (70 a 120 m/s) e geralmente são unimodais. As fibras A δ possuem uma fina camada de mielina, diâmetro entre 1 e 5 μ m e velocidade de condução intermediária (4 a 30 m/s). As fibras A δ podem ser chamadas de nociceptores termomecânicos, pois respondem a estímulos nociceptivos térmicos e mecânicos. E por último as fibras C, não possuem mielina, sendo bastante delgadas (0,3 a 1,5 μ m) e tem velocidade de condução baixa (0,4 a 2 m/s). A maioria das fibras C representa neurônios nociceptivos polimodais, ou seja, respondem a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos de alta intensidade (Coutaux et al., 2005; Meyer et al., 2006). Estímulos não nociceptivos, como por exemplo o toque, ativam as fibras A α e A β , entretanto, já foi observada a ativação de fibras A β por estímulos nociceptivos (Djoughri e Lawson, 2004).

Quando estímulos térmicos de alta intensidade são aplicados sobre a pele, imediatamente ocorre a sensação de dor cortante ou ferroadada, e em seguida ocorre sensação de dor difusa ou em queimação. A dor inicial ocorre pela ativação de fibras A δ , que possuem alta velocidade de condução, e a dor mais tardia ocorre pela ativação de fibras C que conduzem a informação mais lentamente (Campbell e LaMotte, 1983). O bloqueio de fibras A por pressão ou isquemia, evita somente a “primeira dor” (Price et al. 1977), demonstrando que a nocicepção ao calor é mediada por ativação de fibras C e A δ .

As fibras A δ foram classificadas em tipo I e tipo II por apresentarem respostas diferentes a estímulos térmicos quentes (Treede et al. 1995, 1998). As Fibras A δ tipo I podem ser ativadas por estímulos mecânicos intensos e por temperaturas acima de 52 °C. Essas fibras apresenta m limiar de disparo alto, latência de resposta longa e picos de descarga tardios e duradouros (Meyer et al., 2006). As Fibras A δ tipo II também são sensíveis a estímulos mecânicos, mas são ativadas por temperaturas mais baixas (43 °C), e apresentam características semelhantes às fibras C. Essas fibras possuem limiar de disparo mais baixo, e respondem imediatamente e de maneira vigorosa. Além disso, o

tempo de resposta é curto, e logo ocorre adaptação ao estímulo nessas fibras (Meyer et al., 2006).

Os protocolos animais usualmente utilizados para estudo de dor avaliam basicamente dois tipos de resposta, a hipernocicepção e a alodinia. Para isso são utilizados testes de variação de limiar de resposta. Normalmente, nos protocolos de avaliação de hipernocicepção térmica ocorre ativação predominantemente de fibras C, que se caracterizam por apresentar baixo limiar de disparo e tempo de resposta curto (Meyer e Campbell, 1981). As fibras A δ demoram cerca de 1 segundo para atingir o limiar de disparo, e continuam disparando por um período longo (Meyer e Campbell, 1981). Portanto, quando essas fibras começam a ser ativadas, o experimentador não tem mais ferramentas para avaliar essa resposta. Deste modo, conforme a rampa de aquecimento utilizada nos testes de limiar, muitas vezes as fibras A δ nem chegam a ser ativadas, e se o são, não há meios do experimentador avaliar a duração e a intensidade do comportamento evocado. Acreditamos que devido à suas características de disparos prolongados, as fibras A δ sejam as grandes responsáveis pela manifestação hiperalgésica de hiperpatia. Existe uma grande dificuldade técnica de realizar experimentos animais onde se verifique de maneira confiável o papel nociceptivo das fibras A δ . Por esta razão, ocorre uma busca constante por ferramentas farmacológicas que ativem fibras sensoriais específicas. O dimetilsulfóxido (DMSO) pode ser uma dessas ferramentas farmacológicas específicas, pois foi verificado que ele sensibiliza seletivamente fibras A δ (Tzabazis et al., 2005). Deste modo, o desenvolvimento de técnicas experimentais que possibilitem a avaliação comportamental evocada por fibras A δ é de grande relevância para o aprimoramento das pesquisas relacionadas à dor.

1.1.4 Mediadores Periféricos Relacionados À Nocicepção

Qualquer tipo de lesão resulta na liberação local de várias substâncias pró-inflamatórias e/ou pró-nociceptivas. Alguns mediadores podem ativar os nociceptores diretamente, enquanto outros possuem ação indireta, através da interação com células inflamatórias, que irão liberar agentes algogênicos. Além disso, esses mediadores podem sensibilizar os nociceptores, promovendo

hiperalgesia primária ou ainda podem agir sinergicamente, potencializando a resposta nociceptiva (Meyer et al, 2006).

Entre as substâncias de maior importância nos processos inflamatórios e na modulação da dor, estão os metabólitos do ácido araquidônico, também conhecidos como eicosanóides. Entre esses metabólitos estão incluídos as prostaglandinas (PGs), tromboxana A₂ e leucotrienos. As prostaglandinas e a tromboxana A₂ são sintetizadas a partir do metabolismo do ácido araquidônico por uma das isoformas da enzima cicloxigenase (COX). Geralmente, a isoforma COX-1 é constitutiva, enquanto a COX-2 é induzida em resposta à diversos estímulos, inclusive inflamatórios (para revisão ver Smith, 2006). De maneira geral os eicosanóides não ativam nociceptores diretamente, mas sensibilizam nociceptores para ativação por outros estímulos e agentes (para revisão ver Schaible et al., 2002; Cunha e Ferreira, 2003). Entretanto, também foi verificado efeito excitatório direto de prostaciclina I₁ e PGE₂ em fibras aferentes de articulações (Meyer et al, 2006). Outras prostaglandinas parecem ter maior importância na dor inflamatória e na hiperalgesia. Aos leucotrienos sugeriu-se atuação na hiperalgesia mecânica e térmica pela sensibilização de fibras C (Bisgaard e Kristensen, 1985; Martin et al., 1988).

A **PGE₂** apresenta importante contribuição para inflamação e nocicepção, sendo extremamente potente na interação com as células e tecidos (possui ação em escala nanomolar a micromolar) (Samuelsson et al., 1987). As prostaglandinas sensibilizam nociceptores para estímulos físicos e também para outras substâncias. Alguns agentes pró-inflamatórios como citocinas, endotoxinas e mitógenos, induzem a COX a sintetizar prostaglandinas (Coutaux et al., 2005). A PGE₂ atua em receptores específicos, os receptores EP1, EP2, EP3 e EP4, induzindo respostas celulares variadas (Narumiya e Fitzgerald, 2001). Os receptores de prostaglandinas são receptores acoplados a proteínas G com sete domínios trans-membrana (Vanegas e Schaible, 2001). O efeito das prostaglandinas sobre a nocicepção está relacionado com a ativação das vias adenil ciclase / AMPc / proteína quinase A (PKA), que ocorrem pelo acoplamento de PGE₂ a receptores EP2. A ativação dessas vias provoca fosforilação dos canais de sódio, inibição das correntes de potássio dependentes de voltagem e influxo de cálcio em fibras aferentes nociceptivas

(Vanegas e Schaible, 2001). A alteração de influxo de íons causa redução do limiar, aumento na excitabilidade, liberação aumentada de transmissores (aminoácidos excitatórios, substância P, CGRP e NO) e redução na inibição mediada por glicina no corno dorsal da medula espinhal (Ahmadi et al., 2002).

A PGE₂ é muito utilizada como ferramenta farmacológica em experimentos comportamentais de nocicepção, principalmente como agente sensibilizante na indução de hiperalgesia (Ferreira et al., 1978a, 1978b; Smith et al., 2006; Derow et al., 2007). Entretanto, existem relatos de que a PGE₂ cause resposta nociceptiva imediata após injeção intraplantar em ratos (Hong e Abbott, 1994; Bastos et al., 2004). É possível que alguns metabólitos de PGE₂ possam excitar neurônios nociceptivos diretamente, através da ativação do receptor de potencial transitório A1 (TRPA1) (Taylor-Clark et al., 2008).

A **histamina**, quando liberada por mastócitos após lesão tecidual pode levar a vários efeitos, incluindo vasodilatação, edema, e principalmente prurido. A ação pruritogênica é mediada pela ação da histamina em receptores H1 (Schmelz e Handwerker, 2006). A histamina, quando acoplada a seus receptores, induz a fosforilação de proteínas quinases, o que causa aumento da eficiência dos canais de sódio tetrodotoxina resistentes (TTXr) e causa diminuição de limiar de outros receptores (Coutaux et al., 2005). O seu papel em relação à nocicepção não é muito claro, uma vez que a aplicação exógena de histamina na pele causa coceira e não dor (Simone et al., 1991). Além disso, a histamina excita nociceptores polimodais viscerais e potencializa a resposta de nociceptores ao calor (Mizumura et al., 1994; Koda et al., 1996). Os nociceptores cutâneos mecanossensíveis de ratos e humanos respondem fracamente à histamina (Koppert et al., 1993), entretanto, uma sub-população de Fibras C mecano-insensíveis é vigorosamente excitada por histamina (Schmelz et al., 1997). A histamina também participa da hiperalgesia secundária através da inflamação neurogênica. Na inflamação neurogênica ocorre ativação antidrômica de nociceptores pelo reflexo axônico, resultando na liberação de CGRP e substância P pelas terminações periféricas de nociceptores. A substância P se acopla a receptores específicos (NK1), causando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático e degranulação de mastócitos. Os mastócitos liberam histamina,

que amplia o processo vascular e sensibiliza os nociceptores. Este mecanismo ocorre no local da lesão, mas também atinge regiões íntegras do tecido, causando hiperalgesia secundária (Coutaux et al., 2005).

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT) possui um papel complexo na modulação e processamento da dor. Dependendo da natureza do estímulo nociceptivo aplicado, ela pode tanto inibir como facilitar a transmissão nociceptiva (Millan, 2002). Existe uma grande variedade de receptores serotoninérgicos que podem ser expressos tanto no sistema nervoso central, como no sistema nervoso periférico, e que estão envolvidos na mediação nociceptiva (Millan, 2002; Nicholson et al., 2003; Sommer, 2004). Além de amplamente distribuídos pelo organismo, esses receptores podem apresentar características farmacológicas e de transdução muito variadas, o que pode resultar em efeitos algícos ou analgésicos, dependendo do sub-tipo e localização do receptor ativado (Sommer, 2004). A co-administração de serotonina com outros agentes, como bradicinina, noradrenalina e substância P causa potencialização do comportamento nociceptivo (Hong e Abbott, 1994). Os receptores 5HT1A (Taiwo e Levine, 1992), 5HT2A (Rueff e Dray, 1992; Tokunaga et al., 1998; Okamoto et al., 2006), 5HT3 (Giordano e Schultea, 2004) e 5HT4 (Doak e Sawynok, 1997) estão envolvidos na sensibilização de fibras aferentes primárias periféricas. Entre esses, os receptores 5HT2A periféricos possuem importância na dor inflamatória (Okamoto et al., 2006; Sasaki et al., 2006). Apesar de existir três sub-tipos de receptores 5HT2 (5HT2A, 5HT2B, e 5HT2C), os sub-tipos 5HT2A e 5HT2C possuem características farmacológicas e de transdução bastante semelhantes (Hoyer et al. 2002).

Recentemente, através de técnicas de biologia molecular, pesquisadores puderam identificar, clonar e pesquisar receptores encontrados na membrana de fibras aferentes primárias. Entre esses receptores, alguns são transdutores, isto é, são estruturas capazes de transformar estímulos físicos em correntes despolarizantes que percorrem ao longo de toda membrana celular. A plasticidade que caracteriza os nociceptores polimodais pode ser atribuída a esses receptores especializados presentes na membrana dos nociceptores. Dentre esses receptores podemos citar a superfamília dos canais iônicos

ácido-sensíveis (ASIC) (Reeh e Kress, 2001; Waldmann, 2001), os receptores glutamatérgicos AMPA/kainato e NMDA (Carlton, 2001; Ruscheweyh e Sandkühler, 2002; Neugebauer, 2002), os adrenoceptores (Khasar et al., 1999), e os receptores vanilóides (Kress e Zeilhofer, 1999).

Os **vanilóides** são substâncias irritantes responsáveis pela sensação pungente promovida pelas pimentas. Entre eles podemos citar a capsaicina, piperina e zingerona que são encontradas em pimenta vermelha, pimenta do reino e gengibre (Sternier e Szallasi, 1999). A capsaicina é um composto que inicialmente promove excitação neuronal seguida de estado refratário prolongado, onde os neurônios que inicialmente se apresentavam ativos se tornam não responsivos a vários estímulos (Szallasi e Blumberg, 1999). A capsaicina ativa receptores específicos, os receptores vanilóides de potencial transitório tipo 1 (TRPV1) (Caterina et al., 1997), promovendo ativação de fibras C (Holzer, 1988), e algumas fibras A δ (Lawson e Nickels, 1980; Nagy et al., 1983). O receptor TRPV1 é um canal de cátion não seletivo, que pertence à superfamília de canais iônicos térmicos de potencial transitório (termo TRP), que são canais sensíveis à temperatura. Além de serem ativados por temperaturas acima de 43 °C, os receptores TRPV1 são ativados por prótons, alguns endocanabinóides, produtos da lipoxigenase, e capsaicina (Szallasi et al., 2007). Este receptor pode sofrer sensibilização por mediadores liberados durante a resposta inflamatória, que ativam a via de sinalização da fosfolipase C, como a bradicinina e o fator de crescimento do nervo (NGF) (Chuang et al., 2001). Agonistas dos receptores TRPV1, como capsaicina e resiniferatoxina, têm sido utilizados como ferramentas farmacológicas para o estudo da contribuição das vias sensíveis à capsaicina para o desenvolvimento de respostas nociceptivas. A administração de altas doses destes agonistas, em animais neonatos ou adultos, leva à destruição dos neurônios que expressam receptores TRPV1, através do influxo maciço de íons cálcio para o interior destas células (Lawson, 1987; Holzer, 1991; Hiura, 2000; Roh et al., 2008).

1.1.5 Relação De Modelos Animais Com A Clínica

Atualmente, a dor é um grande problema de saúde pública mundial. Segundo estimativas da American Pain Foundation, entre as patologias crônicas que atingem americanos, a dor tem prevalência maior do que doenças cardíacas e câncer, juntos (www.painfoundation.org). Os custos anuais com dores crônicas estão estimados em 100 bilhões de dólares (National Institutes of Health, 1998) e estima-se 50 milhões de faltas ao trabalho por ano (American Pain Society, 2000). Em relação aos animais domésticos, não existem muitos estudos epidemiológicos sobre dor. Apesar das dores agudas e inflamatórias serem as mais frequentemente identificadas em cães e gatos, ocorre incidência de 12 a 18% de hiperalgesia secundária, o que sugere a ocorrência de plasticidade central e dor sustentada (Muir et al., 2004; Wiese et al., 2005).

Para o tratamento e alívio da dor inflamatória, tradicionalmente os analgésicos mais utilizados são os anti-inflamatórios esteroidais, os não esteroidais e os opióides que de maneira geral são muito efetivos. Entretanto, sob algumas condições esses fármacos não produzem o efeito desejado, ou promovem efeitos colaterais insustentáveis, o que resulta na busca de novos analgésicos que sejam mais eficazes e que causem menos efeitos colaterais indesejáveis. Para o desenvolvimento de medicamentos eficientes e adequados, e sua posterior utilização na clínica é necessário o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da dor. A observação clínica e os modelos animais são fundamentais no aprendizado e entendimento dos mecanismos responsáveis pela manutenção dos diferentes tipos de dores. É importante ressaltar que estudos de dor realizados em modelos animais envolvem rigorosas questões éticas, morais, técnicas e filosóficas.

A aplicação de estímulo térmico, mecânico ou químico em pessoas com dor inflamatória ou dor crônica causa uma combinação de sintomas, geralmente descritos como hiperalgesia ou alodinia. Em humanos, esses sintomas podem ser distinguidos através da descrição verbal, e podem ser documentados e quantificados através do preenchimento de questionários específicos e escalas visuais análogas, (Galer e Jensen, 1997; Krause e Backonja, 2003). Em animais, geralmente são avaliados os comportamentos,

principalmente aqueles relacionados com o movimento de membros, como lambidas e sacudidas de pata, proteção e retirada da pata do solo. Após lesão em modelos nociceptivos, esses comportamentos são observados de maneira estereotipada, não sendo observados em animais saudáveis. Deste modo, são atribuídos a uma atividade neuronal que em humanos provocaria dor (Hogan, 2002). Os testes realizados com animais são baseados em dois tipos de dor, a dor espontânea e a dor evocada por um estímulo (Bennett, 1994).

A dor espontânea é comumente relatada por pessoas que sofrem de dores crônicas, sendo que este tipo de dor pode ser contínua, ou em episódios, e também pode variar na qualidade, ou seja, pode ser em queimação, latejante, cortante ou tipo choque, entre outras (Blackburn-Munro, 2004). É muito frequente a ocorrência de dor evocada após estímulo em pacientes que sofrem de dor crônica, principalmente hiperalgesia e/ou alodinia após aplicação de estímulo térmico (quente ou frio) ou mecânico. Perante estímulos nociceptivos os animais apresentam os mesmos reflexos de retirada do membro que os humanos. Sendo assim, a grande maioria dos modelos animais de dor evocada após estímulo usa testes de hipernocicepção térmica, hipernocicepção mecânica, alodinia mecânica (Zimmermann, 2001). Nos modelos animais, a intensidade do estímulo nociceptivo está diretamente relacionada com o limiar de resposta que causa o comportamento de defesa após estímulo mecânico (filamentos de von Frey, teste de pressão na pata) ou térmico (testes quentes ou frios) (Le Bars et al., 2001).

Podemos considerar que a sensação de dor persistente é mais séria que a diminuição de limiar. O movimento de retirada do membro previne a sensação desagradável na hiperalgesia, entretanto a sensação de hiperpatia não pode ser prevenida, mesmo com a interrupção do estímulo desencadeante. Em humanos, existem vários protocolos experimentais de estudos de dor neuropática que avaliam a hiperpatia (Defrin et al., 2001; Mitchell e Fallon, 2002; Ofek e Defrin, 2007). Porém, a grande maioria dos estudos sobre dores neuropáticas e inflamatórias avaliam basicamente a diminuição de limiar nociceptivo, para estímulos mecânicos e térmicos, relegando a hiperpatia a um segundo plano. Este fato se torna ainda mais relevante em modelos animais, devido à dificuldade de caracterizar uma

relação confiável entre estímulo aplicado e resposta comportamental observada. Algumas vezes até são realizadas tentativas de estudar a hiperpatia, mas de maneira incorreta. Como, quando é utilizada como sinônimo de nocicepção contínua promovida por agente químico (Wallace et al., 2002), ou ainda, como produto secundário de um modelo designado para avaliar respostas de alterações de limiar (Seltzer e Shir, 1988; Shir e Seltzer, 1990; Seltzer et al., 1990). No primeiro caso é difícil determinar quando a estimulação nociceptiva direta termina e a resposta tardia começa (o que é crítico para a definição de hiperpatia). No segundo caso, a duração do estímulo não é constante, pois varia conforme o tempo de resposta de retirada do membro. Assim, o desenvolvimento de um método confiável para se estudar o fenômeno de hiperpatia é de extrema importância para o aprimoramento do entendimento das vias e mecanismos envolvidos na fisiopatologia deste componente da dor, e conseqüente avanço no desenvolvimento de fármacos analgésicos efetivos, e sem efeitos colaterais indesejados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Apresentar um modelo experimental com roedores que permita a observação da duração da resposta nocifensiva após o término do estímulo. Assim, oferecer uma ferramenta que possibilite estudar um fenômeno que pode estar criticamente envolvido com a hiperpatia humana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Verificar se PGE₂, DMSO e capsaicina promovem resposta nocifensiva tardia no modelo de hiperpatia.

2 - Pesquisar se PGE₂, DMSO e capsaicina promovem hipernocicepção térmica no teste de retirada da pata.

3 - Pesquisar a importância das fibras C e A δ na manifestação da resposta nocifensiva tardia.

4 - Pesquisar a importância dos prostanóides na resposta nocifensiva tardia através do pré-tratamento, co-administração ou pós-tratamento com indometacina.

5 - Pesquisar através do uso de anti-histamínicos se a resposta nocifensiva tardia pode ser uma reação de prurido.

6 - Pesquisar se a resposta nocifensiva tardia é sensível ao tratamento opióide sistêmico e/ou periférico.

7 - Pesquisar o papel de receptores serotoninérgicos periféricos na manifestação da resposta nocifensiva tardia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 200 e 250 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de 22 ± 2 °C, ciclo claro/escuro de 12/12 h controlado automaticamente, e água e ração fornecidos *ad libitum* até o momento do experimento.

No dia anterior ao experimento os animais eram colocados na sala de experimento para ambientação. Após uma hora, eram colocados individualmente na caixa de observação por um período de 20 minutos. Os experimentos foram realizados a uma temperatura ambiente de 21 ± 2 °C. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC.

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Avaliação Nociceptiva Imediata

Para avaliação nociceptiva, os animais receberam injeção subcutânea (50 µl) na região plantar da pata posterior direita, ou aplicação tópica (a.t.) na pata, da substância a ser avaliada. A a.t. foi realizada com um cotonete encharcado pelo agente indutor, e este cotonete foi passado por toda a pata (porção dorsal e plantar). Imediatamente após aplicação do estímulo primário, os animais foram colocados individualmente, em caixa acrílica de observação (29 X 29 X 29 cm) para avaliação da resposta nocifensiva. O comportamento nocifensivo foi avaliado pela contagem do número de eventos nocifensivos, ou seja, número de lambidas e sacudidas de pata durante 5 minutos.

3.2.2 Avaliação da Hiperpatia ao Calor



Figura 1 - Equipamento para estímulo térmico por imersão

Para realização desse protocolo, foi desenvolvido em nosso laboratório um equipamento para auxiliar na execução dos experimentos. Este equipamento possui um sistema de circulação de água entre dois compartimentos. O compartimento interno é destinado ao armazenamento e aquecimento ou resfriamento da água, e outro compartimento, que se localiza na porção externa do equipamento, é o local onde se mergulha a pata do rato. A circulação da água é obtida através de uma bomba de água, e um termostato eletrônico mantém a água na temperatura desejada, quente ou fria, com variação de $\pm 0,1$ °C (Figura 1).

Para realizar a avaliação da resposta nocifensiva tardia ao calor, uma hora após injeção intraplantar (i.pl.) ou aplicação tópica de agente indutor primário, os animais eram contidos de forma que a pata posterior direita (ipsilateral) ficasse livre para ser submersa no compartimento externo do equipamento. A temperatura da água utilizada foi de 50 °C e o tempo de imersão da pata de 7 s. Imediatamente após o estímulo térmico, os animais eram colocados em caixa acrílica de observação (29 X 29 X 29 cm), onde o comportamento nocifensivo foi avaliado através da contagem do número de lambidas e sacudidas de pata (NLSP), contabilizados durante 5 minutos. Esse

procedimento foi iniciado uma hora após a injeção intraplantar ou administração tópica de agente indutor primário, e foi repetido a cada hora durante 6 horas. A sensibilização em água a 50 °C durante 7 s foi escolhida porque, nestas condições, os animais tratados com PGE₂ apresentaram resposta nocifensiva consistente, e os animais que receberam veículo não. A Figura 2 mostra experimentos pilotos para obtenção deste protocolo (Bastos, 2003).

3.2.3 Avaliação da Hipernocicepção Térmica

Para avaliação da hipernocicepção térmica foi utilizado o teste plantar (Ugo Basile, Modelo 7370, Milão, Itália) baseado no modelo desenvolvido por Hargreaves (Hargreaves et al., 1988). Neste modelo, os ratos foram colocados em compartimentos acrílicos de 28 x 40 x 35 cm sobre um piso transparente. Um feixe de luz radiante de 55 W era direcionado ao centro da superfície plantar da pata posterior direita através do piso. O equipamento foi regulado com rampa de aquecimento lento. Neste equipamento, o intervalo de tempo entre o início do estímulo e o movimento de retirada da pata é mensurado automaticamente, e é interpretado como latência a estímulo nociceptivo térmico. Diminuições significativas na latência de retirada da pata foram tomados como indicativo de hipernocicepção térmica. Cada ponto de resposta nocifensiva foi obtido pela média de três medidas consecutivas, com intervalos de 2 minutos entre medidas. Para evitar lesões teciduais, foi utilizado um tempo de corte de 20 s. Antes do início do experimento, foi obtida medida basal. Uma hora após a injeção intraplantar ou aplicação tópica de agente indutor primário, foi realizada a primeira medida. Subsequentemente foram feitas medidas com intervalos de uma hora durante um período total de 6 horas.

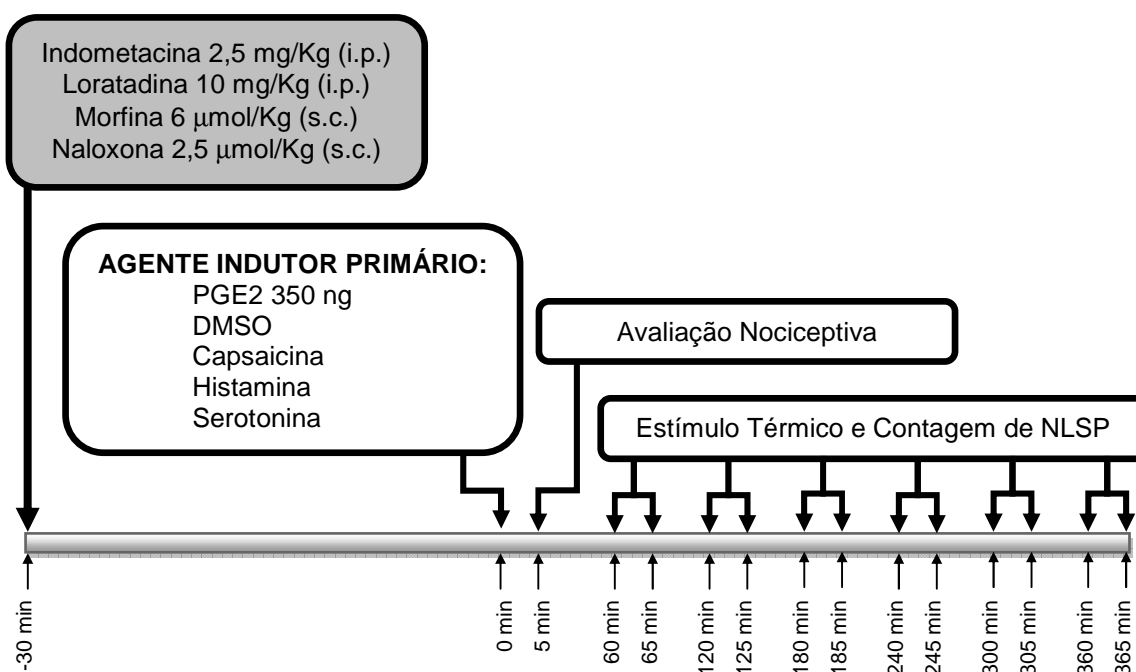
3.2.4 Degeneração de Fibras Nociceptivas Tipo C

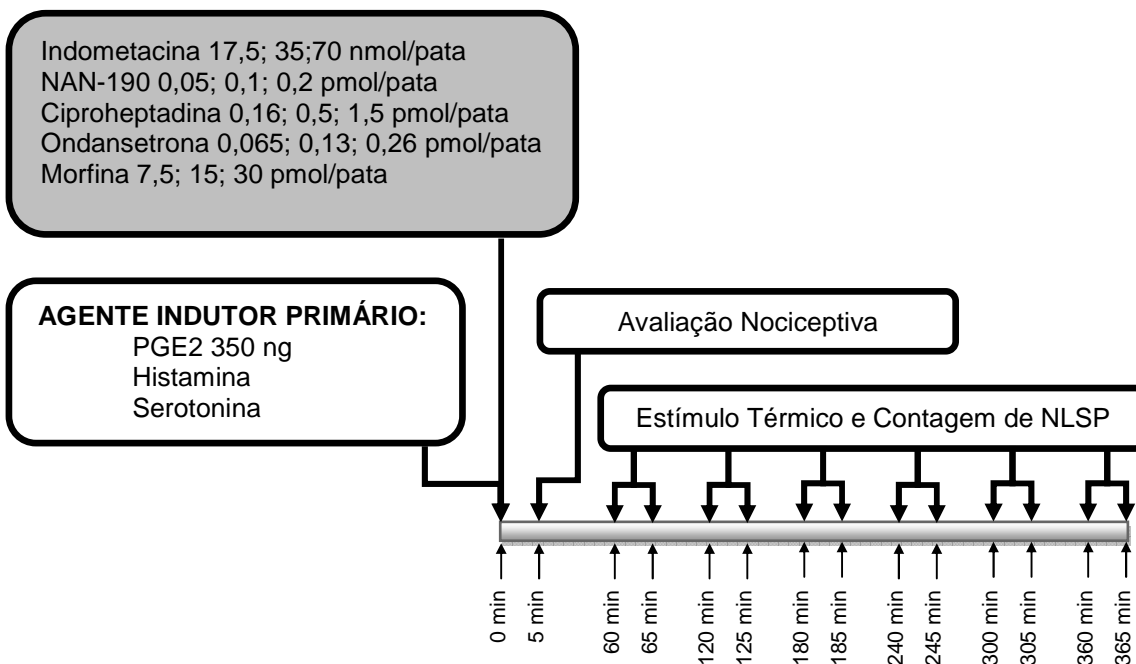
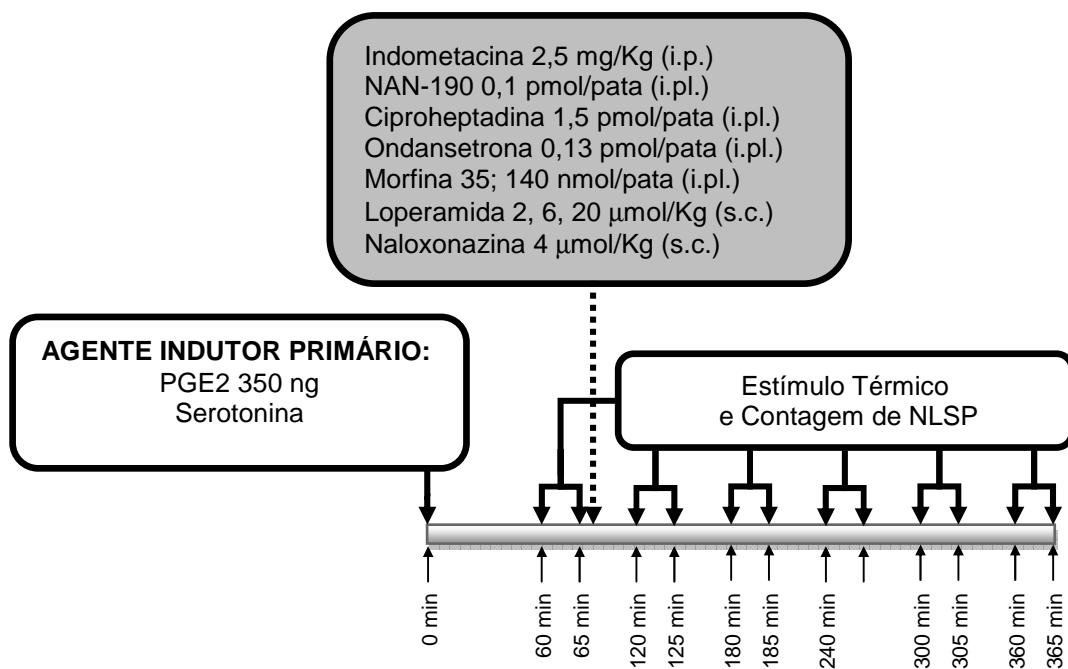
A degeneração de neurônios sensoriais não mielinizados foi realizada através do tratamento neonatal com capsaicina descrito por Jancsó (Jancsó et al., 1977). Neste procedimento, ratos com dois dias de vida recebem injeção subcutânea de solução de capsaicina (50 mg/Kg) na porção dorsal do pescoço, no volume de 10 μ l/g (peso do animal). A capsaicina é diluída em solução de 10% de etanol, 10% de Tween 80 e 80% de solução fisiológica para se obter a dose de 5 mg/ml. A eficácia do tratamento neonatal em destruir fibras tipo C é verificada antes da realização dos experimentos, quando os animais atingem 2 meses. Para isto é realizado o teste oftálmico descrito por Hammond e Ruda (Hammond e Ruda, 1991). Neste teste, 20 μ l de capsaicina 0,01% são instilados em um olho do animal, e em seguida os movimentos de esfregar o olho são contabilizados durante 1 minuto. Os animais que friccionam o olho no máximo 5 vezes durante esse período são considerados como dessensibilizados.

3.2.5 Protocolos Experimentais

Neste trabalho foram realizados três tipos de tratamentos:

Tratamento Prévio:



Co-administração:**Tratamento tardio:**

3.3 DROGAS, REAGENTES E COMPOSTOS

Os compostos utilizados neste trabalho foram:

- Capsaicina (Tocris - EUA);
- Carragenina multi-tipo κ/λ (BDH Chemicals - Reino Unido);
- Cloridrato de ciproheptadina (Tocris - EUA);
- Dimetilsulfóxido (DMSO, Merck - Alemanha);
- Histamina (Sigma-Aldrich, EUA);
- Indometacina (Prodome Química e Farmacêutica - Brasil);
- Cloridrato de loperamida (Tocris - EUA);
- Loratadina (Aventis Pharma - Brasil);
- Sulfato de morfina (Laboratórios Cristália - Brasil);
- Cloridrato de naloxona (Sigma - Aldrich, EUA);
- Dicloridrato de naloxonazina (Tocris - EUA);
- NAN-190 hidrobrometo (Tocris - EUA);
- Cloridrato de ondansetrona (Laboratórios Cristália - Brasil);
- PGE₂ (Sigma - Aldrich, EUA);
- Salina tamponada com fosfato em tabletes (*phosphate-buffered saline* – PBS, Sigma - Aldrich, EUA);
- Sulfato de serotonina (Sigma - Aldrich, EUA).

A PGE₂ foi estocada em solução mãe de 500 µg/ml em etanol absoluto e foi diluída em PBS imediatamente antes do uso. Para trabalhar com PGE₂, foram utilizadas ponteiros e tubos de micro-centrífuga (eppendorf) siliconizados. A concentração de PGE₂ utilizada foi 350 ng/pata que equivale a 1 nmol/pata. O grupo controle recebeu apenas veículo, ou seja, solução PBS com etanol 1,4%.

A indometacina foi diluída em solução de bicarbonato de sódio 1,3% e pH = 8. A loratadina foi diluída em PBS contendo 1% de polisorbato 80 (Tween 80). A loperamida foi diluída em PBS contendo 10% de DMSO e 10% de Tween 80.

A capsaicina 10 mM foi diluída em etanol absoluto e no momento do experimento foi acrescentado 50% de água.

Utilizamos a constante de inibição (K_i), como parâmetro para escolha das doses inicialmente utilizadas, de alguns fármacos administrados pela via intraplantar. Para este fim, utilizamos o site <http://pdsp.med.unc.edu/pdsp.php>. O K_i da morfina é 145 nM (Codd et al., 1995), que equivale a 7,25 pmol/50 μ l. O K_i da ciproheptadina é 10 nM (Young et al., 2005), que equivale a 0,5 pmol/50 μ l. O K_i de NAN-190 é 0,7 nM (Millan et al., 1994) que equivale aproximadamente a 0,05 pmol/50 μ l. O K_i da ondansetrona é 1,3 nM (Katayama et al., 1997), que equivale a 0,065 pmol/50 μ l.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (epm) de 6 animais. Para comparação entre as curvas foram utilizados o teste t de Student para amostras pareadas, ou análise de variância (ANOVA) de uma via, ou para medidas repetidas. Quando detectado nível de significância mínimo de $P < 0,05$ a ANOVA foi seguida de teste de Dunnet ou teste de Newman-Keuls. Para realização das análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA NOCIFENSIVA TARDIA INDUZIDA POR PGE₂ COM SENSIBILIZAÇÃO EM ÁGUA QUENTE

Para definir a melhor relação entre temperatura da água e tempo de imersão da pata que cause resposta nocifensiva tardia apenas nos animais sensibilizados por PGE₂, e não nos animais que recebem veículo, realizamos alguns experimentos. Neste protocolo experimental os animais receberam injeção intraplantar de 50 µl de PGE₂, ou veículo, para avaliação da resposta nocifensiva tardia. Duas horas após a injeção intraplantar, foi feita a primeira exposição à água quente, e a partir de então, de uma em uma hora, até 6 horas. Após a exposição à água quente, a resposta nocifensiva foi avaliada pelo número de lambidas e sacudidas da pata, totalizados durante 10 minutos. A dose de PGE₂ utilizada foi 250 ng/50µl, e como veículo, uma solução de etanol a 1 % que foi a mesma concentração de etanol na solução aplicada de PGE₂.

As temperaturas utilizadas foram de 45° C, 47° C e 50° C e com os tempos de exposição de 10 segundos, 7 segundos e 5 segundos (Figura 2). Nas temperaturas de 45° e 47° C/10s, mesmo os grupos tratados com PGE₂ não apresentaram resposta nocifensiva tardia. Já os grupos estimulados com 50° C/10s, tanto o grupo tratado com PGE₂ como o grupo controle, apresentaram resposta nocifensiva tardia, embora o grupo estimulado com PGE₂ tenha apresentado resposta estatisticamente significante maior ($t_{(0,05, 5)} = 2,76$). Os grupos estimulados com água a 50° C/5s não apresentaram resposta nocifensiva tardia, porém com a estimulação a 50° C/7s, apenas o grupo injetado com PGE₂ apresentou resposta nocifensiva tardia ($t_{(0,05, 5)} = 5,76$). Assim, escolhemos a temperatura de 50° C com 7 segundos de exposição, pois com estes padrões foi obtida uma resposta nocifensiva tardia uniforme e

que se repetia de maneira consistente, sem que houvesse sensibilização do grupo controle (Figura 2E).

Esses resultados fazem parte do trabalho de dissertação (Bastos, 2003). No desenvolvimento deste trabalho, foram necessárias algumas modificações na dose de PGE₂, para conseguirmos resultados semelhantes aos obtidos anteriormente.

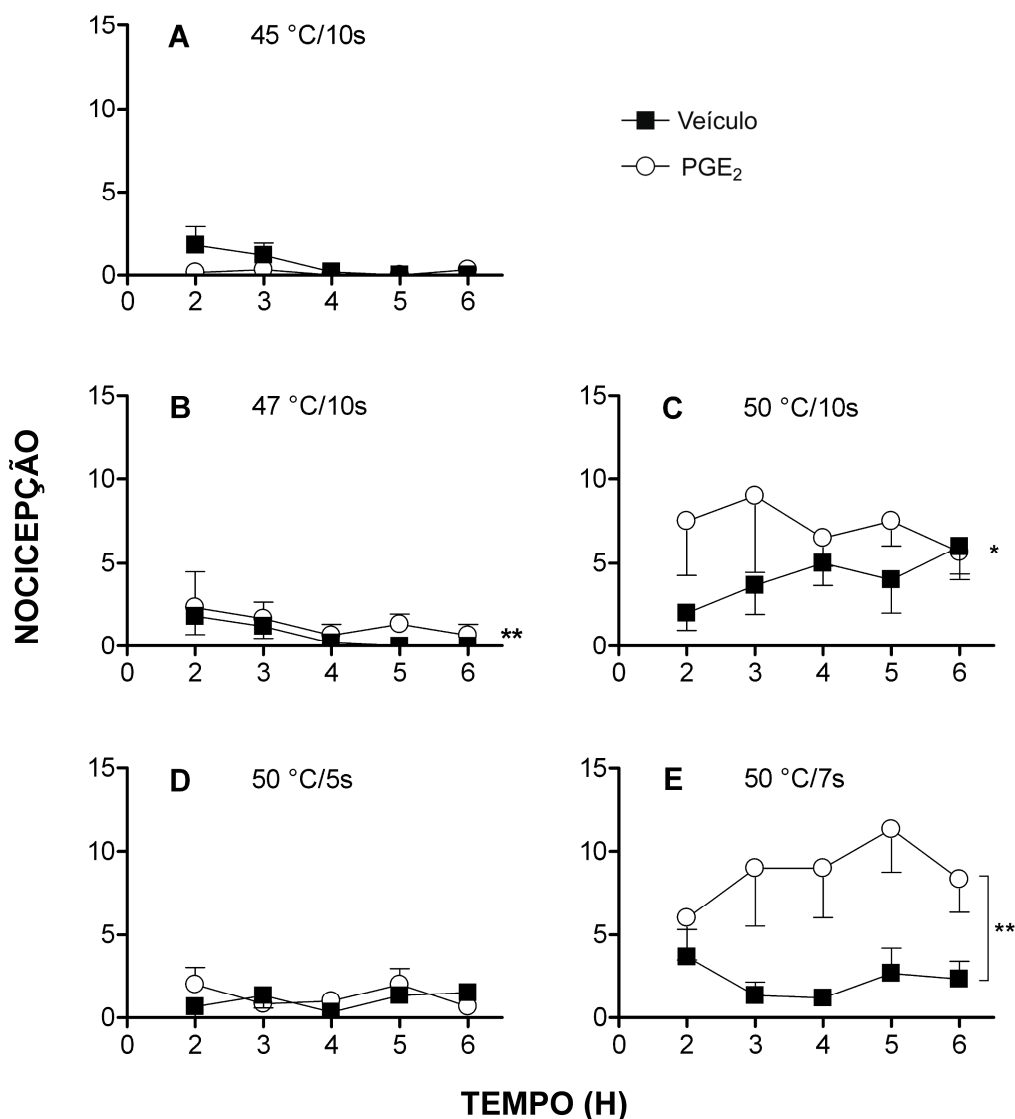


Figura 2 – Pesquisa para padronização dos parâmetros para os testes de hiperpatia. Todos os animais receberam injeção intraplantar de 250 ng/pata de PGE₂ ou solução controle (etanol 1 %). Após 2 horas foi iniciada a avaliação da resposta nocifensiva tardia à exposição de água quente, que foi verificada pelo NLSP durante 10 minutos. Os tempos e temperaturas de exposição foram: 10 segundos a 45° C (Painel A); 10 segundos a 47° C (Painel B); 10 segundos a 50° C (Painel C); 05 segundos a 50° C (Painel D); e 7 segundos a 50° C (Painel E). Os pontos indicam a média de 6 animais \pm epm. * e ** indicam respectivamente diferença estatística significativa, ao nível de $P < 0,05$ e $P < 0,01$ no teste *t* de Student para amostras pareadas.

4.2 INDUÇÃO DE HIPERPATIA TÉRMICA APÓS DIFERENTES ESTÍMULOS QUÍMICOS E EFEITO DA INDOMETACINA SOBRE ESTA RESPOSTA

A partir de dados que sugerem que DMSO possui ação seletiva sobre fibras A δ e capsaicina possui ação seletiva sobre fibras C, utilizamos estes dois fármacos, além da PGE₂, para pesquisar o envolvimento de fibras nociceptivas específicas no modelo de hiperpatia térmica. Neste experimento pesquisamos a hiperpatia térmica após injeção i.pl. de 50 μ l de PGE₂ 350 ng/pata, ou aplicação tópica de DMSO (100%) ou solução de capsaicina 10 mM. Os veículos foram, respectivamente, etanol 1,4% (i.pl.), água (a.t.) e etanol 50% (a.t.). A injeção i.pl. de PGE₂ causou aumento estatístico significativo do NLSP durante as 6 h de observação ($P < 0,001$) (Figura 3A). O tratamento tópico com DMSO ou capsaicina também induziu aumento do NLSP após estímulos térmicos sucessivos (50 $^{\circ}$ C / 7s), quando comparado com os animais tratados com veículo ($P < 0,001$) (Figura 3B, C). Essa resposta foi de magnitude semelhante à promovida pela injeção i.pl. de PGE₂.

O envolvimento de produtos da cicloxigenase no mecanismo de sensibilização promovido neste modelo experimental foi verificado pela influência do tratamento prévio com o inibidor de COX, indometacina. Como resultado, observamos que indometacina 2,5 mg/kg i.p. 30 minutos antes da aplicação de PGE₂, DMSO ou capsaicina nas patas, promoveu redução do NLSP durante as 6 h de observação (ANOVA; $F_{(2,12)} = 35,40$, $F_{(2,15)} = 25,86$ e $F_{(2,15)} = 54,49$ respectivamente) (Figura 3 A, B, C). O grupo controle recebeu solução de bicarbonato 1,3% (i.p.) ao invés de indometacina.

Esses resultados sugerem que a produção endógena de prostanóides ocorreu após utilização de qualquer um dos três fármacos sensibilizantes. Com o objetivo de verificar se o efeito hiponociceptivo da indometacina no modelo de hiperpatia seria decorrência de ação entral ou periférica, realizamos a co-administração de PGE₂ 350 ng e indometacina nas doses de 17,5 nmol, 35 nmol ou 70 nmol. Os fármacos foram administrados na mesma seringa, de maneira que o volume final injetado foi 50 μ l/pata. Neste experimento, todas as doses de indometacina resultaram em redução estatística significativa do NLSP durante as 6 horas de observação (ANOVA; $F_{(4,25)} = 12,90$) (Figura 4).

Também pesquisamos o efeito da indometacina quando administrada após o processo de hiperpatia já ter iniciado. A indometacina (2,5 mg/Kg i.p.) foi administrada 30 ou 60 min após a injeção i.pl. de PGE₂ (350 ng/pata). Verificamos que a indometacina administrada 30 min após PGE₂ i.pl. reduziu o NLSP (ANOVA; $F_{(2,15)} = 112,9$) (Figura 5A), mas indometacina 60 min após injeção i.pl. não alterou a resposta (Figura 5B).

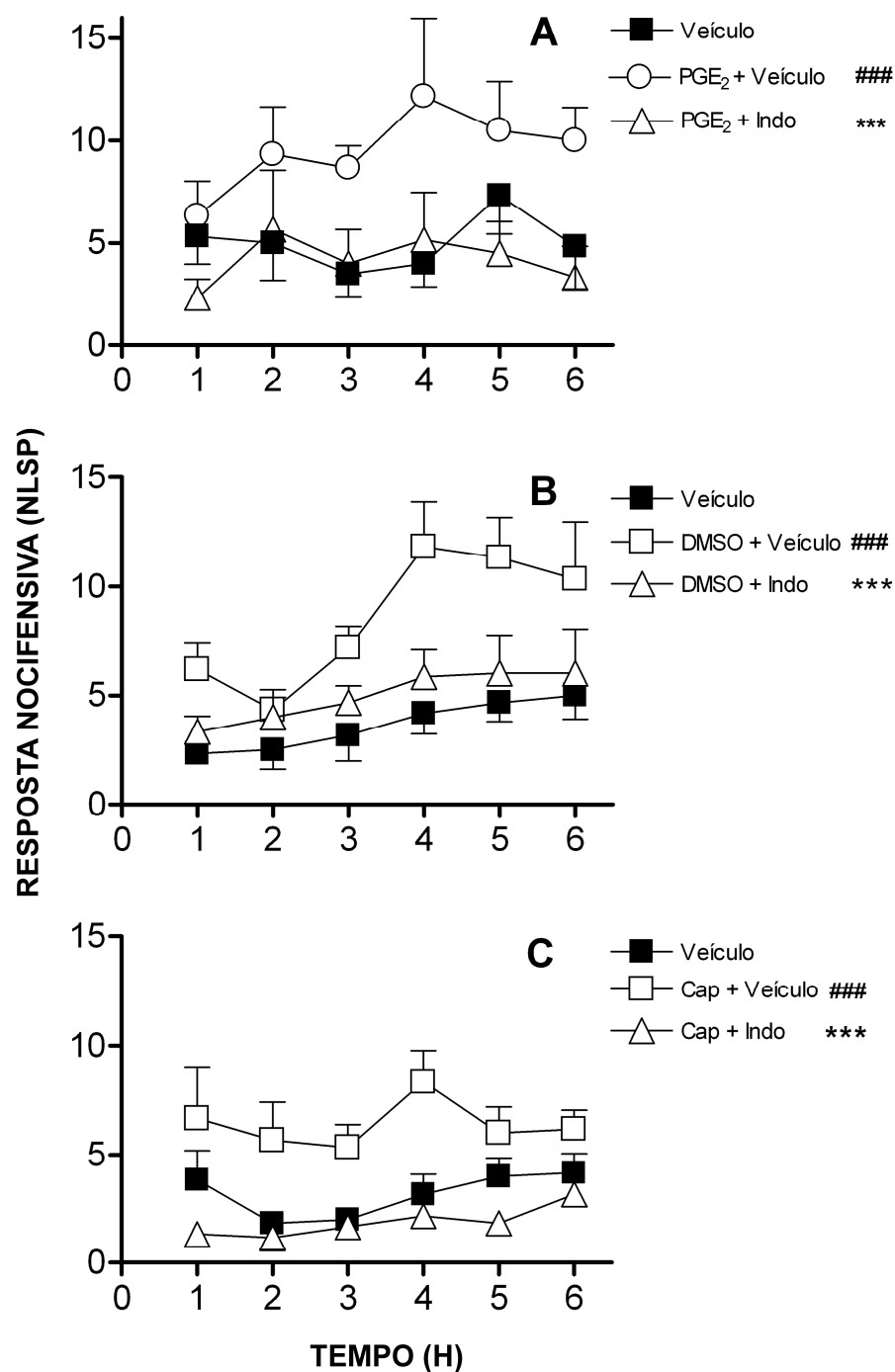


Figura 3 - Efeito da indometacina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE₂, DMSO e capsaicina. Uma hora após aplicação de PGE₂, DMSO ou capsaicina na pata dos ratos, a hiperpatia foi avaliada pela contagem de lambidas e sacudidas da pata (NLSP) em períodos de 5 min, a cada hora, imediatamente após imersão da pata em água a 50 °C / 7s, durante 6 h. Indometacina (2.5 mg/Kg, i.p.) foi administrada 30 min antes do estímulo químico. **A)** PGE₂ 350 ng/pata (i.pl.) **B)** DMSO 100% (a.t.) **C)** Capsaicina 10 mM (a.t.). Os pontos representam média ± epm de NLSP de 6 animais. *** representa P < 0,001 entre estímulo químico e indometacina e ### representa P < 0,001 entre estímulo químico e veículo (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls).

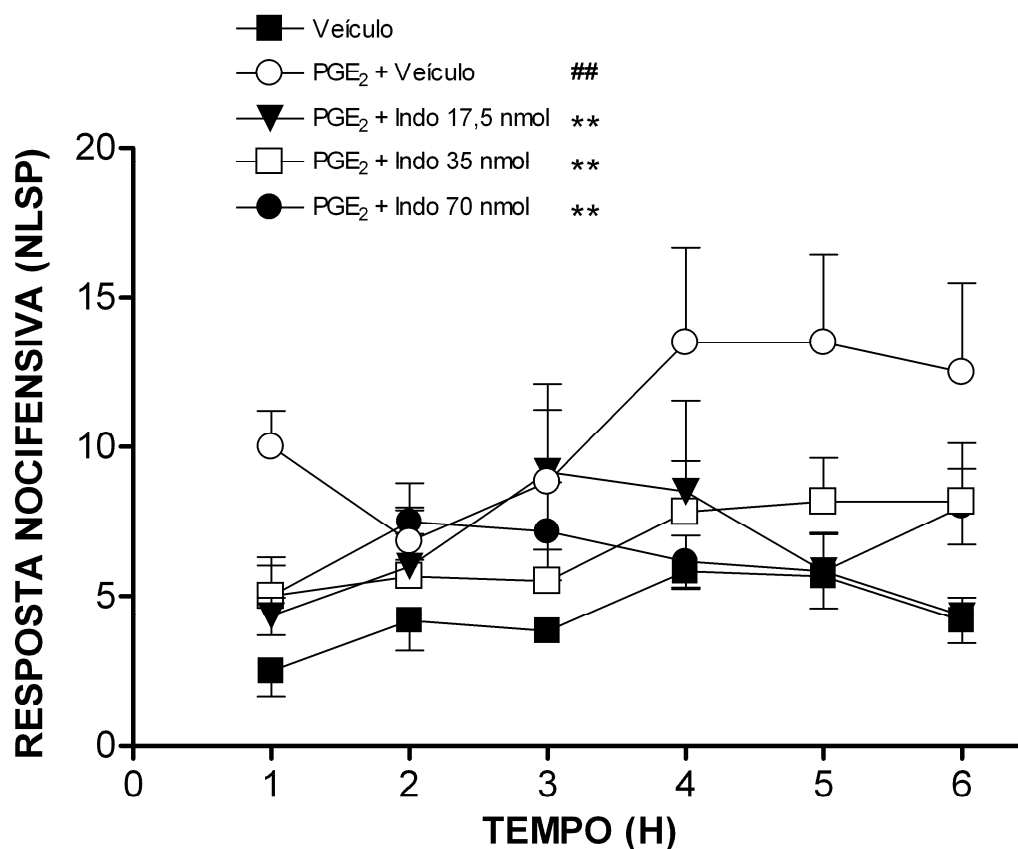


Figura 4 - Efeito da aplicação periférica de indometacina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE₂. PGE₂ (350 ng/pata) e indometacina (17,5; 35; 70 nmol/pata) foram associadas na mesma seringa e aplicadas por via i.pl. no volume de 50 µl. A hiperpatia foi avaliada durante 6 horas pela contagem de lambidas e sacudidas da pata (NLSP) a cada hora durante 5 minutos, imediatamente após imersão da pata em água a 50 °C / 7s. Os pontos representam média ± epm de NLSP de 6 animais. ** representa P < 0,01 entre PGE₂ e indometacina e ## representa P < 0,01 entre PGE₂ e veículo (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Dunnet).

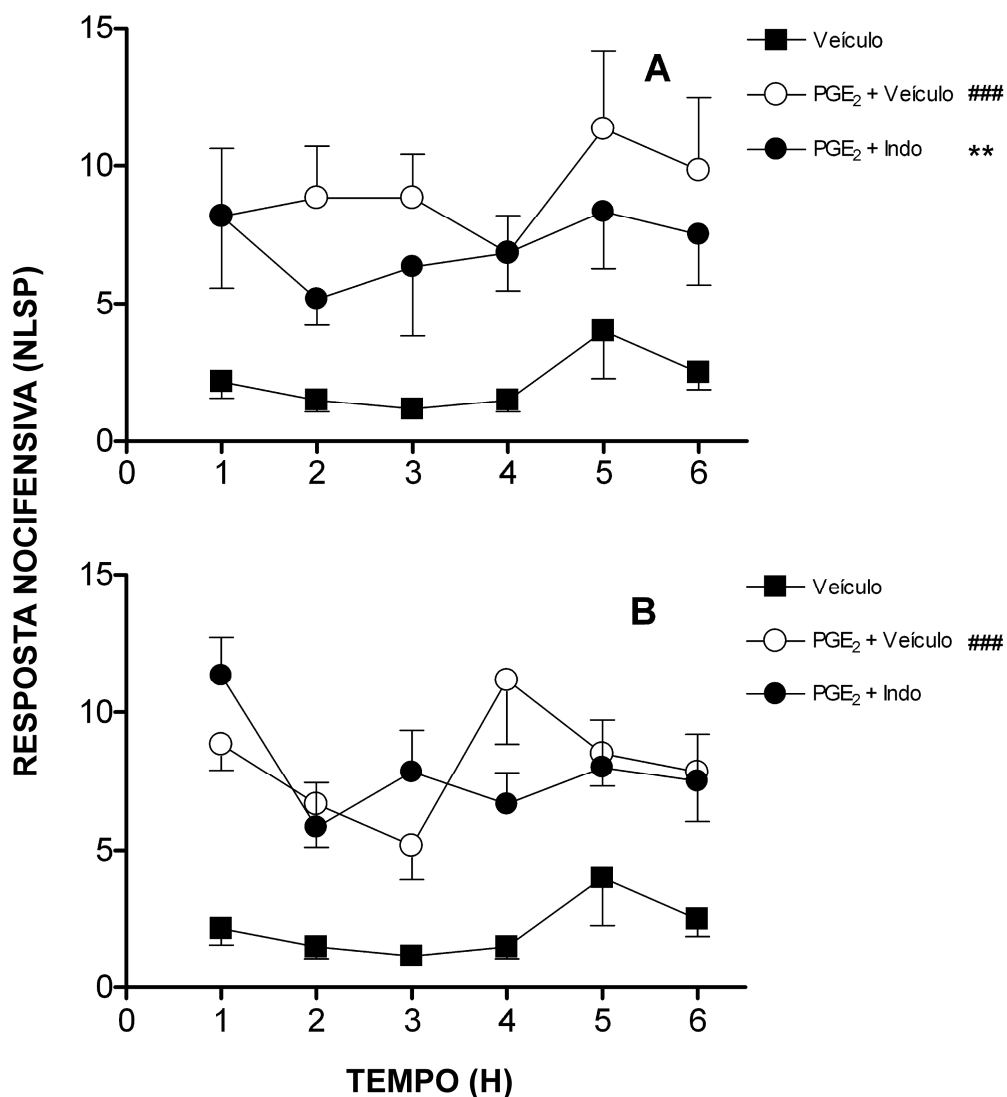


Figura 5 – Efeito do tratamento tardio com indometacina sobre a hiperpatia. Os animais foram tratados com indometacina 2,5 mg/Kg i.p. depois da injeção i.pl. de PGE₂ (350 ng/pata). A hiperpatia foi avaliada pela contagem de lambidas e sacudidas da pata (NLSP) em períodos de 5 min, a cada hora, imediatamente após imersão da pata em água a 50 °C / 7s, durante 6 horas. Essas medidas foram iniciadas uma hora após a injeção i.pl. de PGE₂. **A)** Indometacina 30 min após PGE₂. **B)** Indometacina 60 min após PGE₂. Os pontos representam média ± epm de NLSP de 6 animais. ** representa P < 0,01 entre PGE₂ e pós-tratamento com indometacina, e ### representa P < 0,001 entre PGE₂ e veículo (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls).

4.3 EFEITO DE PGE₂, DMSO E CAPSAICINA NO TESTE DE HIPERNOCICEPÇÃO TÉRMICA

A idéia de que a manifestação de hiperpatia em nosso modelo, possa ocorrer por mecanismos diferentes daqueles observados em modelos de diminuição de limiar, nos fez realizar este experimento. Nós avaliamos se a injeção i.pl. de PGE₂ ou a aplicação tópica de DMSO ou de capsaicina poderiam causar alteração no limiar de resposta no modelo de hipernocicepção térmica (teste de Hargreaves). Neste experimento utilizamos tempos entre estímulos, semelhantes ao protocolo de hiperpatia térmica, ou seja, uma medida a cada hora durante 6 horas. A carragenina (500 µg/pata) foi utilizada como controle positivo, e causou redução estatística significativa quando comparada com os animais que receberam veículo ($P < 0,05$) (Figura 6). A aplicação tópica de capsaicina 10 mM também resultou em diminuição de limiar quando comparada com o grupo que recebeu veículo (ANOVA; $F_{(2,16)} = 7,90$) (Figura 6B). Entretanto, PGE₂ 350 ng/pata (Figura 6A), e DMSO 100% (Figura 6B) não promoveram alteração no limiar ao calor.

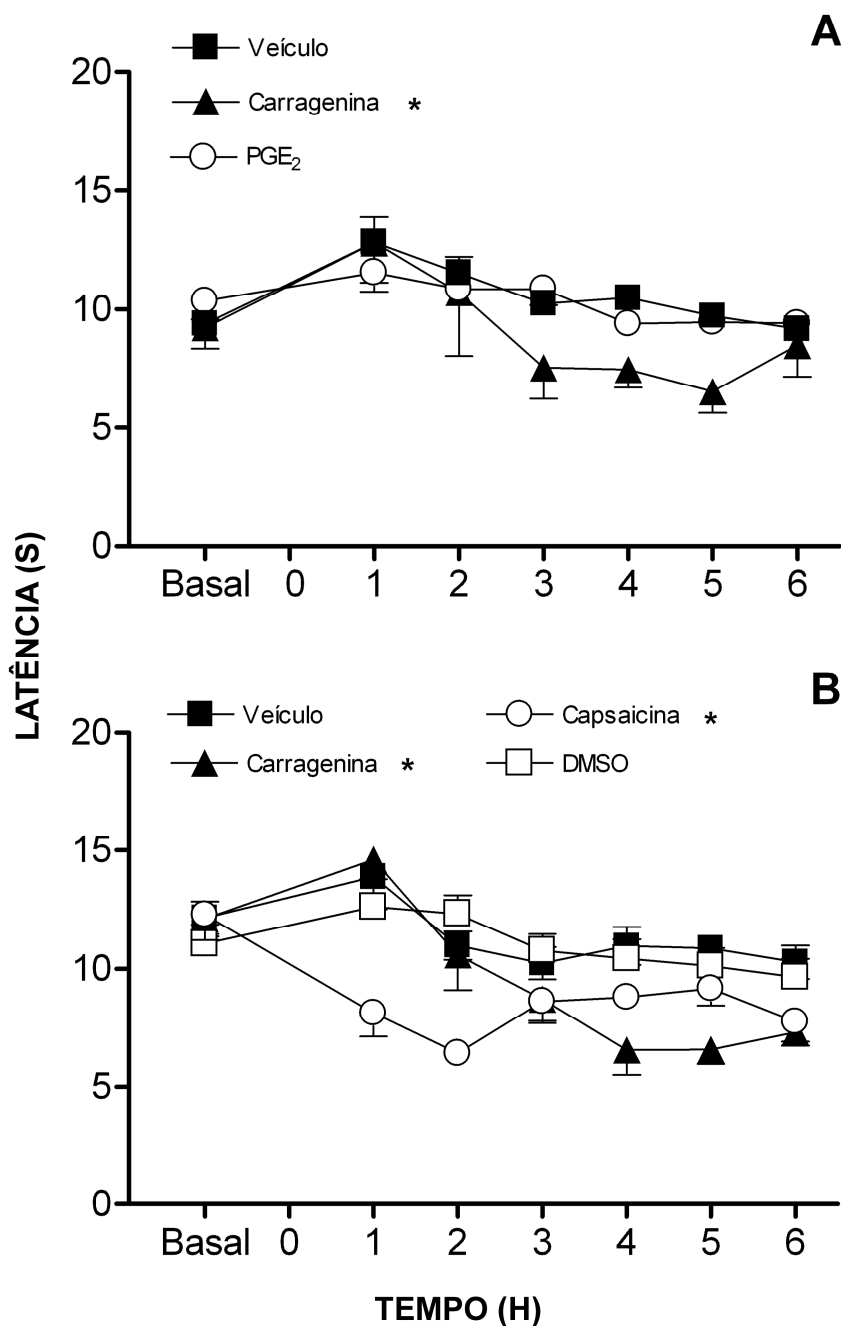


Figura 6 - Efeito de PGE₂, DMSO e capsaicina no teste de hipernociceção térmica. A latência de retirada da pata a estímulo térmico foi avaliada a cada hora, depois da aplicação de **A)** PGE₂ 350 ng/pata (i.pl.), **B)** Capsaicina 10 mM (a.t.), e DMSO 100% (a.t.). Carragenina (500 µg/pata i.pl.) foi utilizada como controle positivo. O veículo utilizado em **A** foi etanol 1,4% (i.pl.) e em **B** foi etanol 50% (a.t.). Os pontos representam média ± epm de NLSP de 6 animais. * representa $P < 0,05$ comparado com o veículo entre 2^a e 6^a hora (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls).

4.4 EFEITO DA DEGENERAÇÃO DE FIBRAS NOCICEPTIVAS TIPO C SOBRE A HIPERPATIA

O tratamento neonatal com capsaicina (TNC) em altas concentrações promove destruição de grande quantidade de fibras C e também de algumas fibras A (Lawson, 1987). Utilizamos esta ferramenta para pesquisar as fibras nociceptivas envolvidas na hiperpatia. Os animais TNC foram utilizados em experimentos de hiperpatia, em que utilizamos PGE₂ 350 ng (i.pl.), DMSO 100% (a.t.), ou capsaicina 10 mM (a.t.) como agente indutor primário. O TNC não evitou a hiperpatia promovida por injeção i.pl. de PGE₂ 350 ng (Figura 7A), mas inibiu a hiperpatia promovida por DMSO (ANOVA; $F_{(3,20)} = 40,13$) (Figura 7B). Para nossa surpresa, o TNC inibiu apenas parcialmente a hiperpatia após aplicação tópica de capsaicina (ANOVA; $F_{(3,12)} = 40,75$) (Figura 7C). É importante frisar, que todos os animais que foram submetidos ao TNC, foram submetidos ao teste oftálmico para confirmação de degeneração de fibras C antes da realização do experimento. Também observamos que a aplicação tópica de capsaicina nos animais TNC não causou comportamento nocifensivo significativo na avaliação nociceptiva imediata, mas nos animais naive sim (ANOVA; $F_{(3,19)} = 9,63$) (Figura 8). A média de eventos nocifensivos imediatamente após o tratamento tópico com capsaicina dos animais naive foi $7,67 \pm 1,70$, e dos animais TNC foi $2,83 \pm 0,79$.

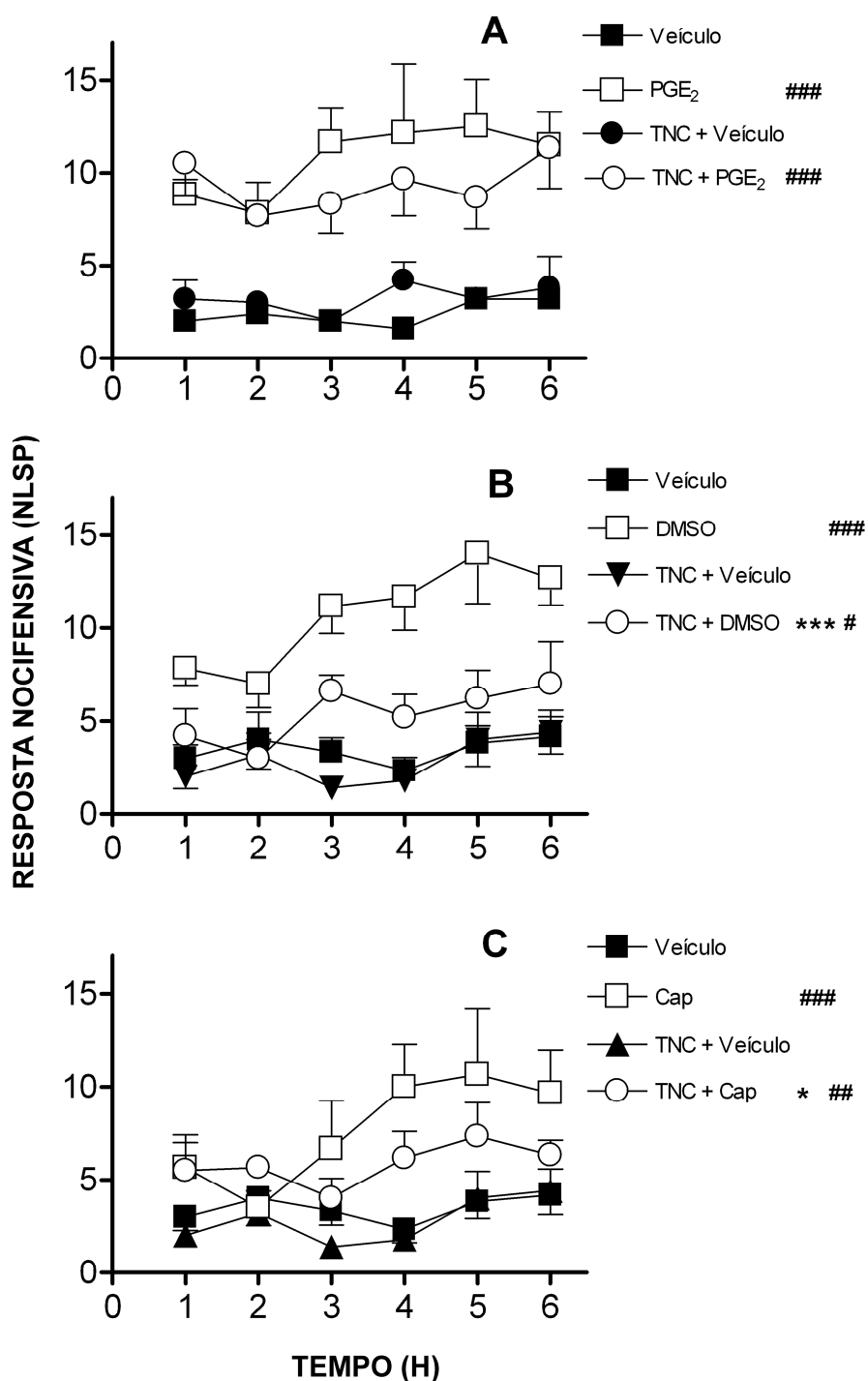


Figura 7 – Influência do tratamento neonatal com capsaicina sobre a hiperpatia. O número de eventos nocifensivos (NLSP) induzidos por estímulo térmico (50 °C / 7s) foi contabilizado em períodos de observação de 5 min, uma hora após a aplicação de **A)** PGE₂ (350 ng/pata i.pl.), **B)** DMSO 100% (a.t.), e **C)** capsaicina 10 mM (a.t.). A contagem foi realizada a cada hora até a 6^a h, em ratos de 60 dias que receberam tratamento neonatal de capsaicina (TNC) (50 mg/Kg s.c.). Os pontos representam média ± epm de NLSP de 6 animais. * e *** representam P < 0,05 e P < 0,001 entre os grupos com TNC e não-TNC; #, ##, ### representam respectivamente P < 0,05, P < 0,01 e P < 0,001 em relação ao grupo que recebeu veículo (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls).

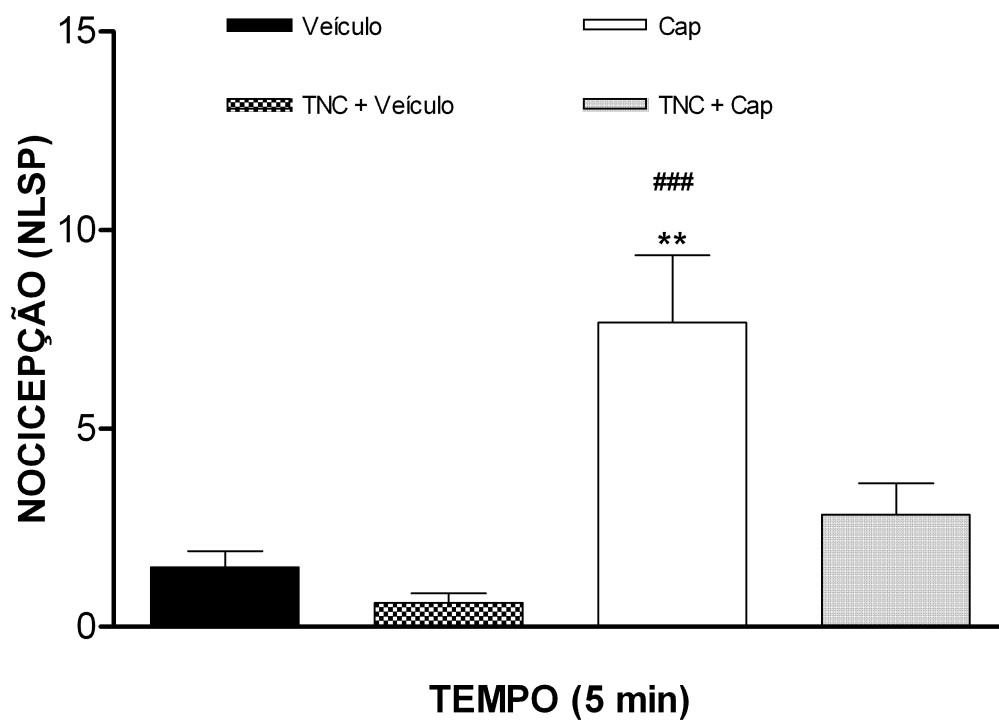


Figura 8 - Influência do tratamento neonatal com capsaicina sobre a nociceção induzida por capsaicina. O número de eventos nocifensivos (NLSP) foi contabilizado durante 5 min, imediatamente após a aplicação tópica de capsaicina 10 mM, em ratos de 60 dias que receberam tratamento neonatal de capsaicina (TNC) (50 mg/Kg s.c.), ou não. As barras representam média \pm epm de NLSP de 6 animais. ** representa $P < 0,01$ entre os TNC e não-TNC; ### representa $P < 0,001$ em relação ao grupo que recebeu veículo. ANOVA de uma via seguida por teste de Newman-Keuls.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA HISTAMINÉRGICO NO MODELO DE HIPERPATIA TÉRMICA

4.5.1 Efeito da loratadina sobre a hiperpatia após injeção intraplantar de PGE₂

Neste experimento investigamos se a resposta comportamental observada neste modelo poderia ser relacionada com prurido. Para isso verificamos se o pré-tratamento com o antagonista de receptores H1 para histamina, loratadina, interferia na hiperpatia. Loratadina 10 mg/Kg i.p. foi administrada 30 minutos antes da injeção i.pl. de PGE₂ 350 ng/pata, e não causou diminuição estatística significativa do NLSP durante as 6 h de observação (Figura 9).

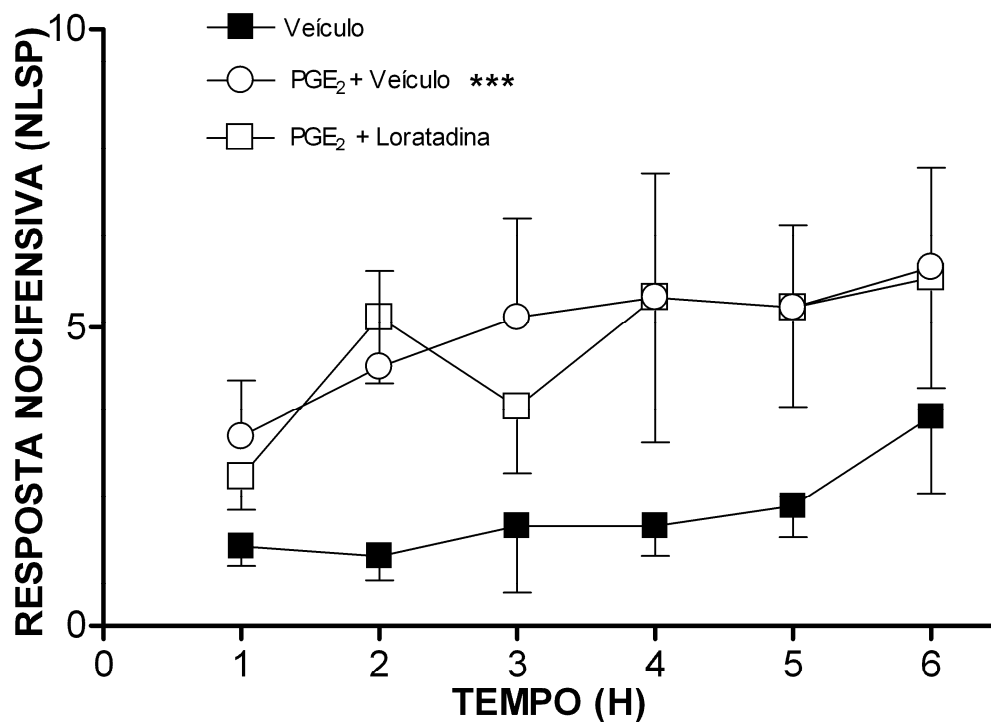


Figura 9 – Efeito da loratadina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE₂. Uma hora após aplicação de PGE₂ (350 ng/pata) a hiperpatia foi avaliada pela contagem de lambidas e sacudidas da pata (NLSP), em períodos de 5 min, a cada hora, imediatamente após imersão da pata em água a 50 °C / 7s, durante 6 horas. Lora tadina (10 mg/Kg i.p.) foi administrada 30 min antes da PGE₂. Os pontos representam média ± epm de NLSP de 6 animais. *** representa P < 0,001 entre PGE₂ e veículo (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls).

4.5.2 Hiperpatia após injeção intraplantar de histamina. Efeito da indometacina sobre essa resposta

Nós realizamos a injeção i.pl. de histamina com o objetivo de verificar se este mediador produziria uma resposta de hiperpatia semelhante à produzida pela PGE₂. Para realização de uma curva dose-resposta utilizamos histamina nas doses de 2, 20 e 200 nmol/pata (50 µl). As três concentrações utilizadas promoveram aumento no NLSP durante as 6 horas de observação (ANOVA; $F_{(3,20)} = 58,30$) (Figura 10A). Neste ponto já havíamos observado que indometacina inibe a hiperpatia após injeção i.pl. de PGE₂ e que loratadina não interfere nessa resposta. Decidimos então verificar o papel de inibidores de COX sobre a hiperpatia após injeção i.pl. de histamina. Como as várias doses de histamina promoveram hiperpatia térmica de intensidade semelhante, usamos a menor dose, ou seja, 2 nmol/pata, para a realização deste experimento. Verificamos que o pré-tratamento com indometacina (2,5 mg/Kg i.p.), 30 minutos antes da histamina, não causou redução estatística significativa do NLSP (Figura 10B). Entretanto, ocorreu um atraso na manifestação de hiperpatia, ou seja, o aumento do NLSP ocorreu somente a partir da 3ª hora de observação.

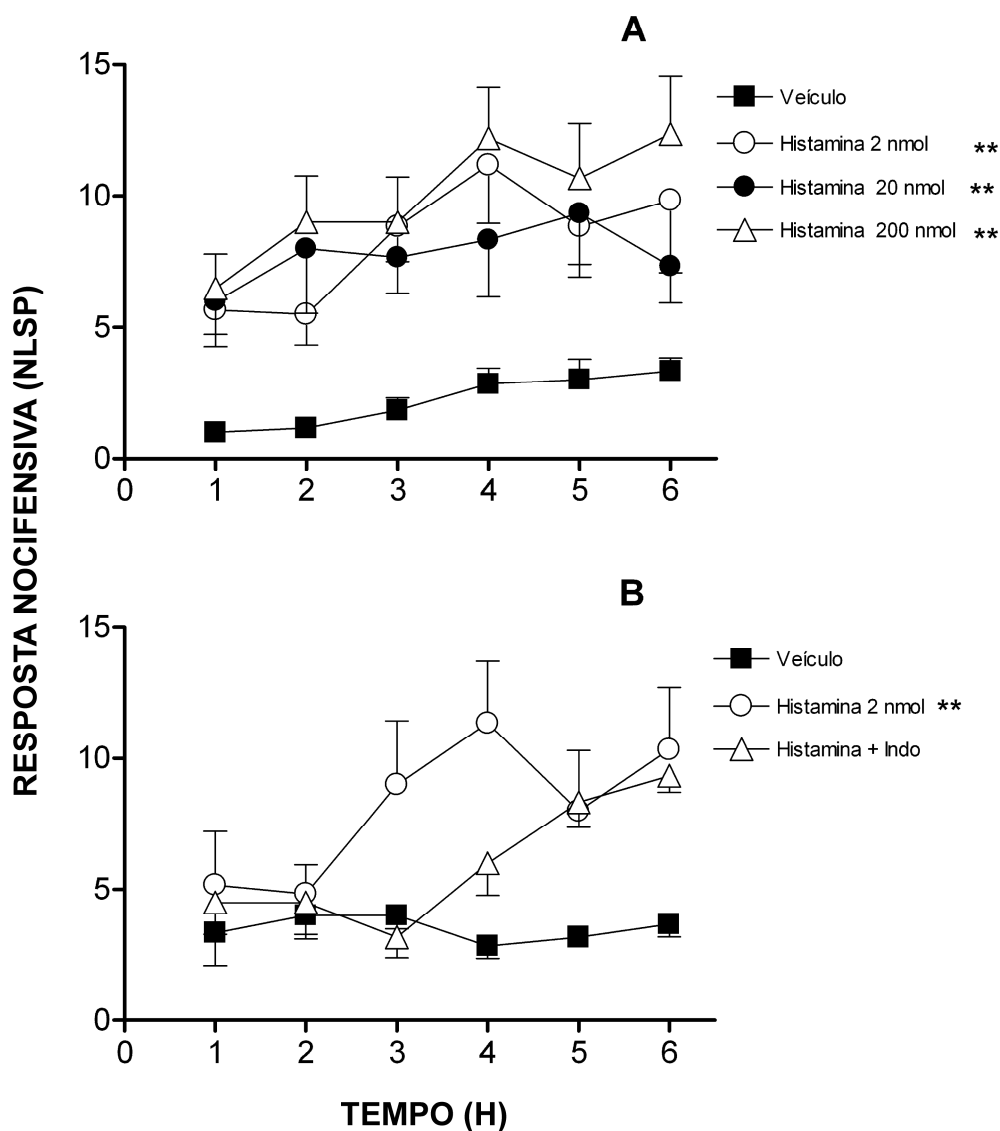


Figura 10 – Efeito da indometacina sobre a hiperpatia após sensibilização por histamina. Uma hora após aplicação de histamina i.pl. a hiperpatia foi avaliada pela contagem de lambidas e sacudidas da pata (NLSP) em períodos de 5 min, a cada hora, imediatamente após imersão da pata em água a 50 °C / 7s, durante 6 horas. **A)** Histamina (2; 20; 200 nmol/pata. **B)** Indometacina (2,5 mg/Kg i.p.) foi administrada 30 min antes da histamina (2 nmol/pata i.pl.). Os pontos representam média \pm epm de NLSP de 6 animais. ** representa $P < 0,01$ entre histamina e veículo. As curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Dunnet em **A** e teste de Newman-Keuls em **B**.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NO MODELO DE HIPERPATIA TÉRMICA

4.6.1 Efeito dos antagonistas de receptores 5HT sobre a hiperpatia após injeção intraplantar de PGE₂

Nestes experimentos, pesquisamos o envolvimento da serotonina no modelo de hiperpatia térmica. Para isso utilizamos os fármacos NAN-190, ciproheptadina e ondansetrona, que são respectivamente antagonistas seletivos de receptores 5HT1A, 5HT2 e 5HT3. Esses fármacos foram co-administrados com PGE₂ 350 ng, no volume de 50 µl. NAN-190 (0,1 e 0,2 pmol/pata), ciproheptadina (1,5 pmol/pata) e ondansetrona (0,13 e 0,26 pmol/pata) causaram redução estatística significativa do NLSP (ANOVA; $F_{(4,25)} = 44,66$; ANOVA; $F_{(4,25)} = 19,15$ e ANOVA; $F_{(4,25)} = 22,42$ respectivamente) (Figura 11A, B, C).

Também pesquisamos se o tratamento com antagonistas de receptores 5HT teria efeito hiponociceptivo após o processo de hiperpatia já ter iniciado. Administramos NAN-190 (0,1 pmol/pata), ciproheptadina (1,5 pmol/pata) ou ondansetrona (0,13 pmol/pata) uma hora após a injeção i.pl. de PGE₂ 350 ng/pata. Somente o antagonista de receptores 5HT2 ciproheptadina causou redução estatística significativa do NLSP (ANOVA; $F_{(4,25)} = 41,72$) (Figura 12).

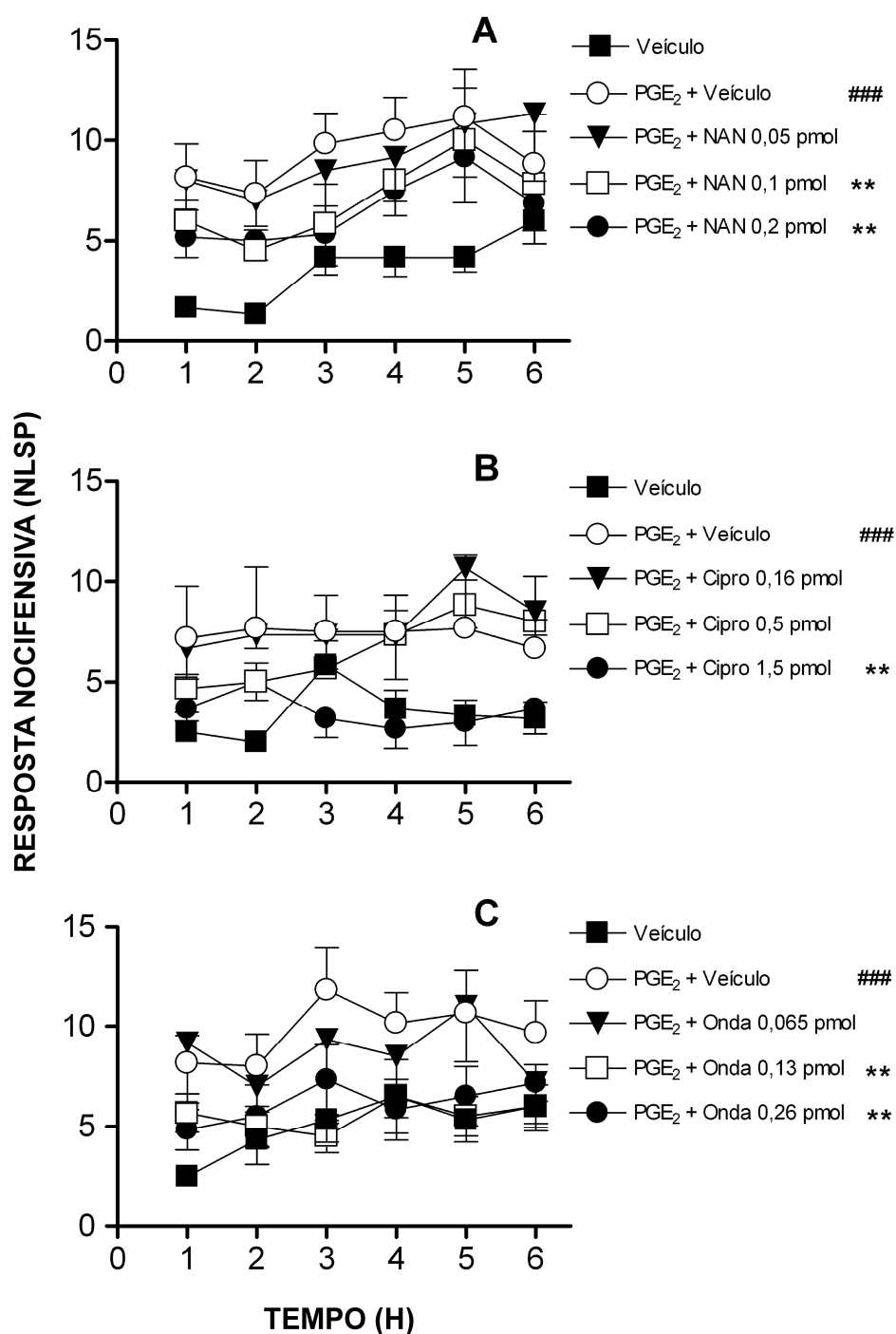


Figura 11 – Efeito hiponociceptivo periférico de antagonistas de receptores de serotonina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE₂. PGE₂ (350 ng/pata) foi associada com **A)** NAN-190 (0,05; 0,1; 0,2 pmol/pata), **B)** ciproheptadina (0,16; 0,5; 1,5 pmol/pata), **C)** ondansetrona (0,065; 0,13; 0,26 pmol/pata), e aplicadas por via i.pl. no volume de 50 μ l. A hiperpatia foi avaliada pela contagem de lambidas e sacudidas da pata (NLSP) em períodos de 5 min, a cada hora imediatamente após imersão da pata em água a 50 °C / 7s, durante 6 horas. Os pontos representam média \pm epm de NLSP de 6 animais. ** representa $P < 0,01$ entre PGE₂ e antagonista de receptor 5HT, e ### representa $P < 0,001$ entre PGE₂ e veículo (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Dunnet).

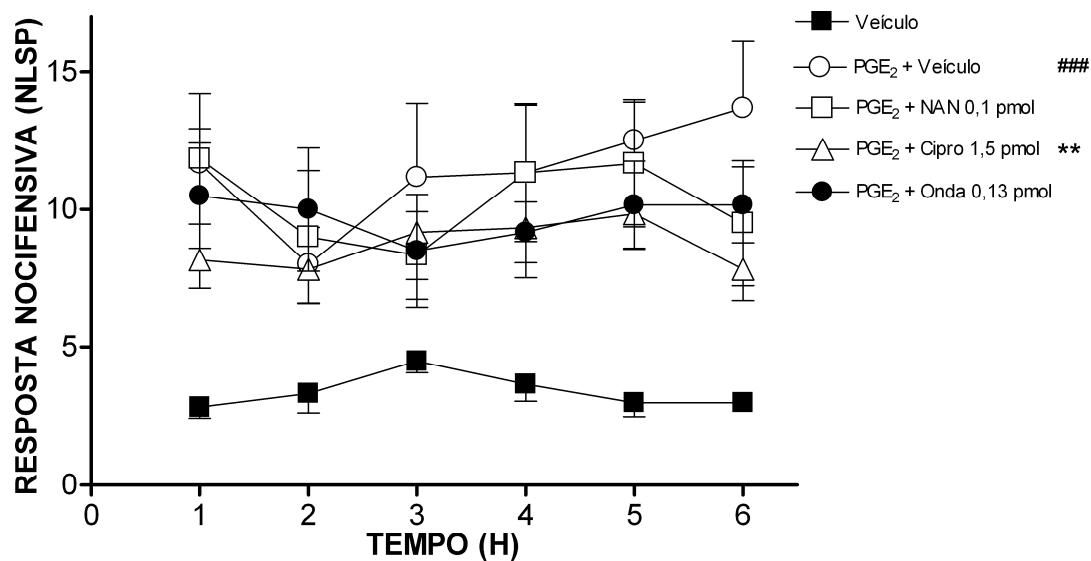


Figura 12 – Efeito do tratamento tardio periférico com antagonistas de receptores para serotonina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE₂. Uma hora após injeção i.pl. de PGE₂ (350 ng/pata), os animais receberam injeção i.pl. de NAN-190 (0,1 pmol/pata), ciproheptadina (1,5 pmol/pata), ou ondansetrona (0,13 pmol/pata). A hiperpatia foi avaliada pela contagem de lambidas e sacudidas da pata (NLSP) em períodos de 5 min, a cada hora imediatamente após imersão da pata em água a 50 °C / 7s, durante 6 horas. Essas medidas foram iniciadas uma hora após a injeção i.pl. de PGE₂. Os pontos representam média ± epm de NLSP de 6 animais. ** representa P < 0,01 entre PGE₂ e ciproheptadina, e ### representa P < 0,001 entre PGE₂ e veículo (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls).

4.6.2 Efeito de indometacina e antagonistas de receptores 5HT sobre a hiperpatia após injeção intraplantar de serotonina

Demonstramos nos experimentos anteriores que a hiperpatia após sensibilização por PGE₂, é reduzida por antagonistas de receptores 5HT. Neste experimento pesquisamos se a injeção i.pl. de serotonina também promoveria hiperpatia. Podemos verificar, observando a figura 13A, que a injeção i.pl. de serotonina (0,3 nmol/pata) também causou hiperpatia ($P < 0,05$). O tratamento com indometacina (2,5 mg/Kg i.p.) 30 minutos antes da injeção i.pl. de serotonina reduziu o NLSP entre a 2^a e a 6^a horas de observação (ANOVA; $F_{(2,12)} = 7,86$) (Figura 13A), mas não reduziu a nocicepção inicial (Figura 13B).

Realizamos também o tratamento com antagonistas de receptores 5HT uma hora após injeção i.pl. de serotonina 0,3 nmol/pata. O tratamento com NAN-190 (0,1 pmol/pata), mas não ciproheptadina (1,5 pmol/pata) ou ondansetrona (0,13 pmol/pata), causou redução estatística significativa do NLSP durante as 6 horas de observação (ANOVA; $F_{(4,25)} = 18,57$) (Figura 14).

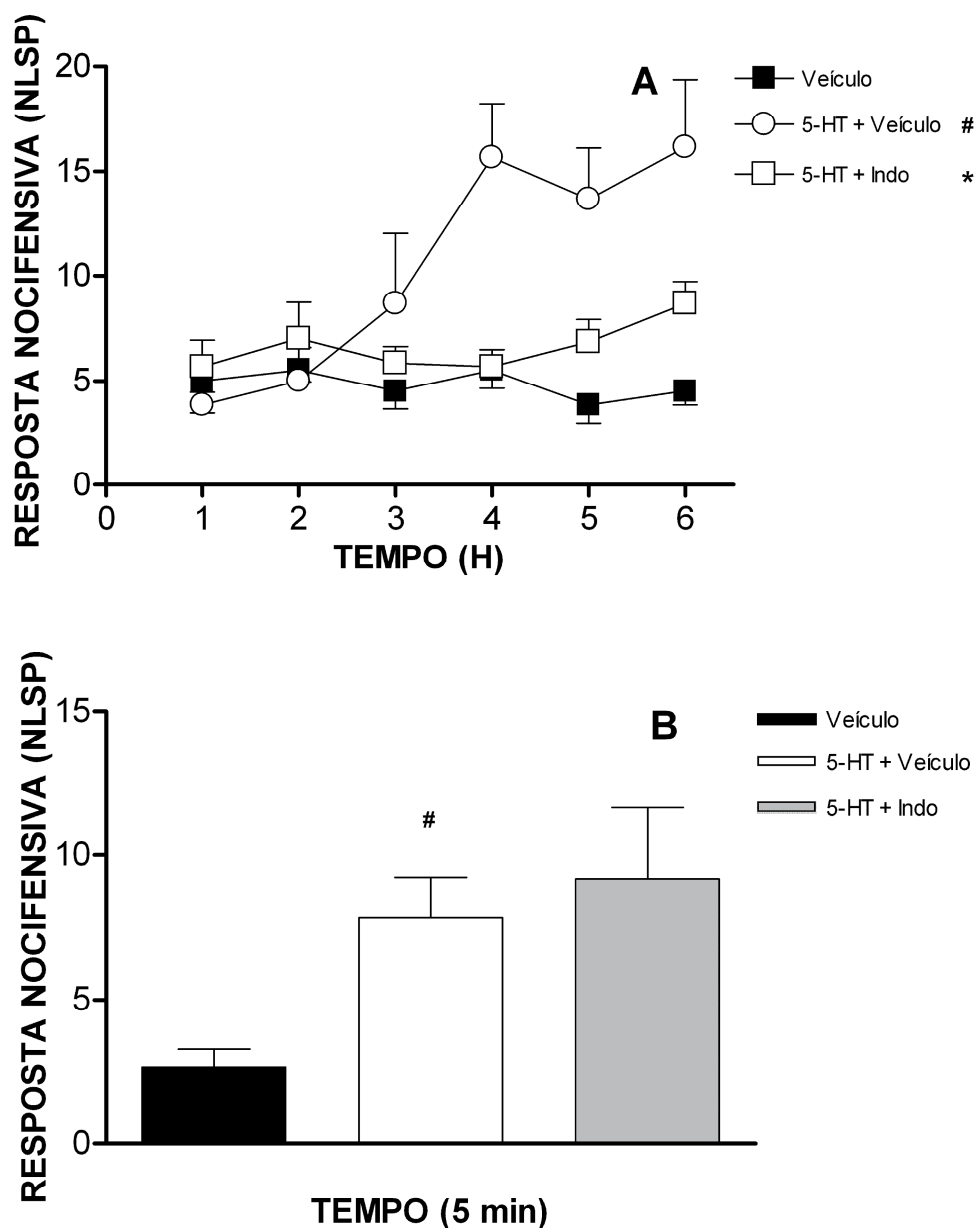


Figura 13 – Efeito da indometacina sobre a nociceção e a hiperpatia promovidas por serotonina. Indometacina (2,5 mg/Kg i.p.) foi administrada 30 min antes da injeção i.pl. de serotonina (0,3 nmol/pata). **A)** a hiperpatia foi avaliada pela contagem de lambidas e sacudidas da pata (NLSP), em períodos de 5 min, a cada hora, imediatamente após imersão da pata em água a 50 °C / 7s, durante 6 horas. **B)** a nociceção imediata foi avaliada pelo NLSP contabilizados durante 5 min imediatamente após a injeção i.pl. de serotonina. Os pontos e barras representam média \pm epm de NLSP de 6 animais. * representa $P < 0,05$ entre serotonina e indometacina entre 2^a e 6^a horas, e # representa $P < 0,05$ entre serotonina e veículo (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls).

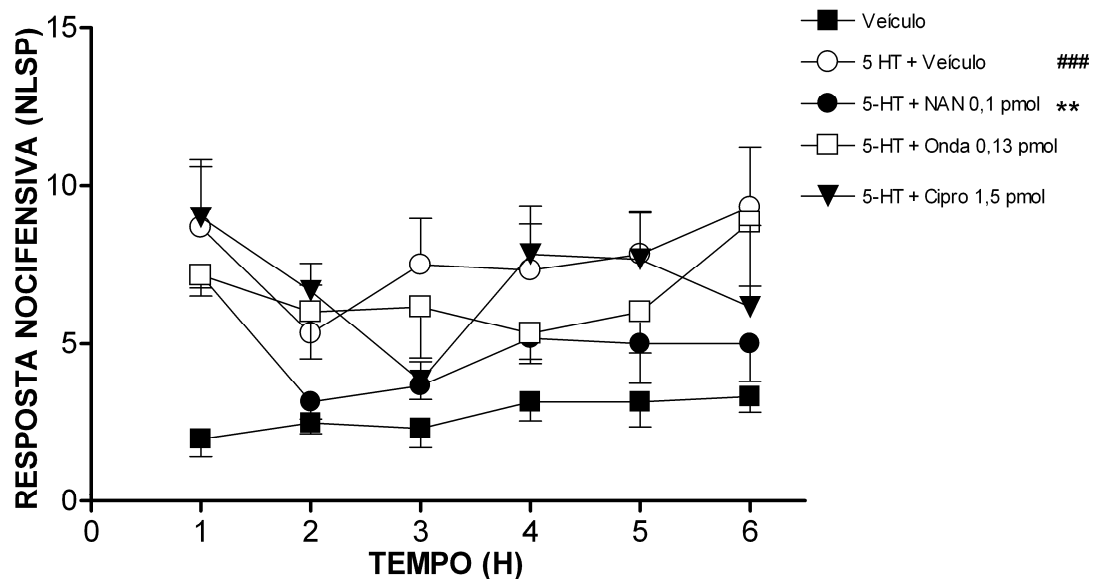


Figura 14 Efeito do tratamento tardio periférico com antagonistas de receptores para serotonina sobre a hiperpatia após sensibilização por serotonina. Uma hora após injeção i.pl. de serotonina (0,3 nmol/pata), os animais receberam injeção i.pl. de NAN-190 (0,1 pmol/pata), ciproheptadina (1,5 pmol/pata), ou ondansetrona (0,13 pmol/pata). A hiperpatia foi avaliada pela contagem de lambidas e sacudidas da pata (NLSP), em períodos de 5 min, a cada hora, imediatamente após imersão da pata em água a 50 °C / 7s. Essas medidas foram iniciadas uma hora após a injeção i.pl. de serotonina e foram feitas por 6 horas. Os pontos representam média \pm epm de NLSP de 6 animais. ** representa $P < 0,01$ entre 5HT e NAN-190, e ### representa $P < 0,001$ entre 5HT e veículo (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls).

4.7 MODULAÇÃO DA HIPERPATIA TÉRMICA, POR RECEPTORES OPIÓIDES, APÓS INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE PGE₂

4.7.1 Efeito da administração sistêmica de opióides sobre a hiperpatia após injeção intraplantar de PGE₂

Neste bloco de experimentos pesquisamos possíveis interferências do sistema opióide sobre a hiperpatia. Primeiramente fizemos o tratamento sistêmico do agonista de receptores opióides morfina, ou do antagonista de receptores opióides naloxona, ou a associação dos dois. Morfina (6 µmol/Kg s.c.) foi administrada 30 minutos antes da injeção i.pl. de PGE₂, e naloxona (2,5 µmol/Kg s.c) foi administrada 40 min antes da PGE₂. Verificamos que a morfina promoveu redução estatística significativa do NLSP durante as 6 h de observação e a naloxona bloqueou o efeito hiponociceptivo da morfina (ANOVA; $F_{(2,25)} = 18,58$) (Figura 15). Vale salientar que a naloxona não alterou a hiperpatia após injeção i.pl. de PGE₂.

4.7.2 Papel dos receptores opióides periféricos sobre a hiperpatia após injeção intraplantar de PGE₂

O objetivo deste experimento foi verificar se a ação hiponociceptiva dos agonistas opióides sobre a hiperpatia poderia ocorrer por ação periférica. Para isso, realizamos a injeção i.pl. de morfina e PGE₂ 350 ng co-administradas na mesma seringa, de maneira que o volume final administrado foi 50 µl/pata. As doses de morfina utilizadas foram 7,5, 15, ou 30 pmol/pata. Verificamos que morfina 15 e 30 pmol/pata causaram redução estatística significativa no NLSP durante as 6 h de observação (ANOVA; $F_{(4,25)} = 13,71$) (Figura 16).

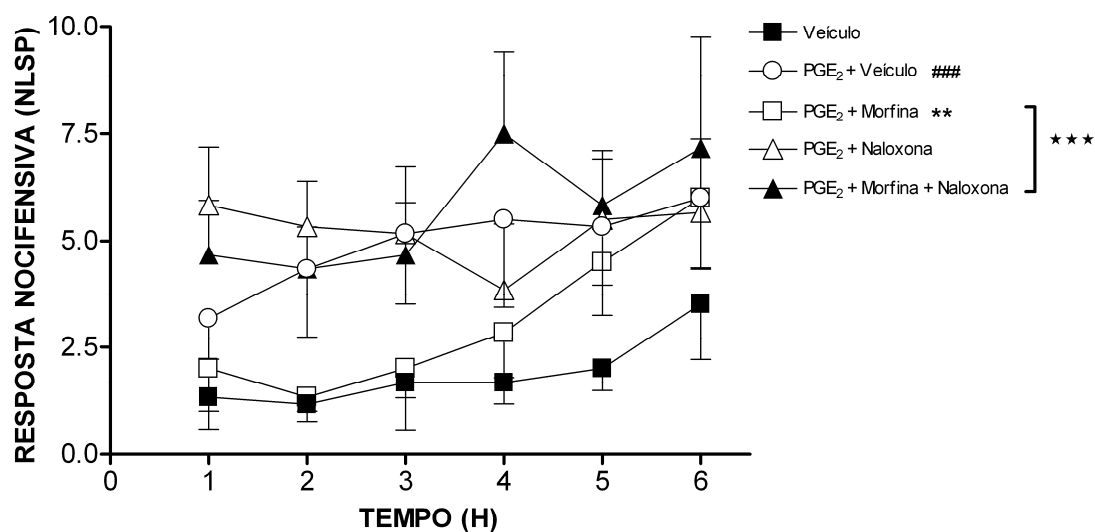


Figura 15 - Efeito da morfina e naloxona sobre a hiperpatia após injeção i.pl. de PGE₂. Uma hora após aplicação de PGE₂ (350 ng/pata) a hiperpatia foi avaliada pela contagem de lambidas e sacudidas da pata (NLSP), em períodos de 5 min, a cada hora, imediatamente após imersão da pata em água a 50 °C / 7s, durante 6 horas. Morfina (6 µmol/Kg s.c.) foi administrada 30 min antes da PGE₂, e naloxona (2,5 µmol/Kg s.c.) foi administrado 10 min antes da morfina. Os pontos representam média ± epm de NLSP de 6 animais. ** representa P < 0,01 entre PGE₂ e morfina, *** representa P < 0,001 entre morfina e morfina associada a naloxona, e ### representa P < 0,001 entre PGE₂ e veículo (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls).

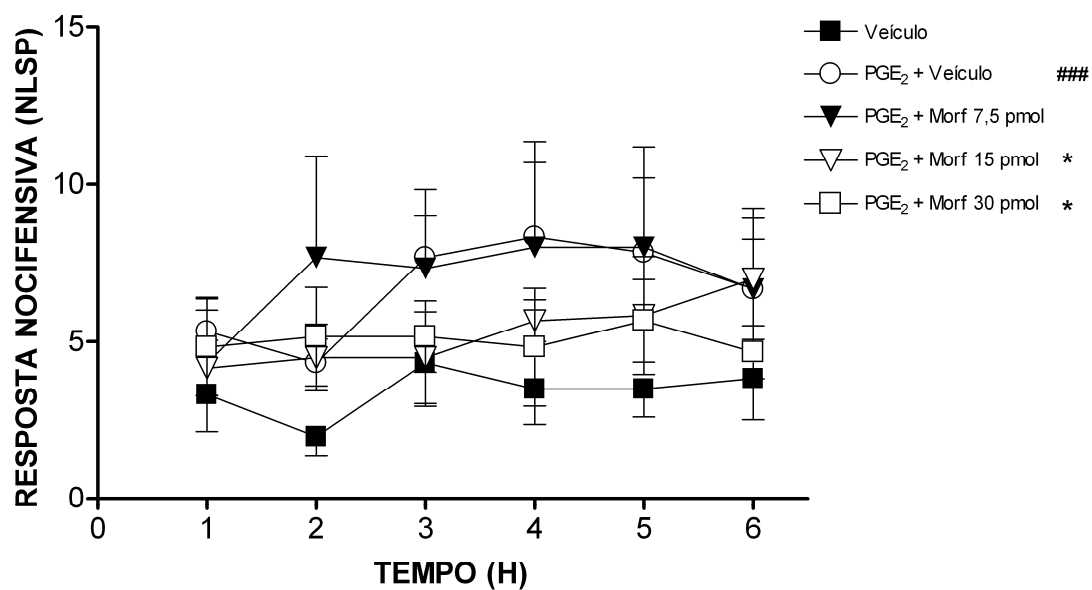


Figura 16 – Efeito da co-administração de morfina e PGE₂ sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE₂. PGE₂ (350 ng/pata) foi associada com morfina (7,5; 15; 30 pmol/pata) e aplicadas por via i.pl. no volume de 50 μ l. A hiperpatia foi avaliada pela contagem de lambidas e sacudidas da pata (NLSP), em períodos de 5 min, a cada hora, imediatamente após imersão da pata em água a 50 °C / 7s, durante 6 horas. Os pontos representam média \pm epm de NLSP de 6 animais. * representa $P < 0,05$ entre PGE₂ e morfina, e ### representa $P < 0,001$ entre PGE₂ e veículo (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Newman-Keuls).

4.7.3 Efeito do tratamento tardio com opióides sobre a hiperpatia após injeção intraplantar de PGE₂

Neste experimento investigamos se a morfina promove redução no NLSP quando administrada após o processo de hiperpatia já estar estabelecido. As doses de morfina utilizadas foram 35 e 140 nmol/pata, e sua administração foi realizada por via i.pl. após o primeiro estímulo térmico, ou seja, uma hora após a injeção i.pl. de PGE₂. As duas doses utilizadas de morfina resultaram em redução estatística significativa do NLSP durante as 6 h de observação (ANOVA; $F_{(3,20)} = 42,78$) (Figura 17).

Para confirmação da ação hiponociceptiva periférica dos opióides neste modelo animal, realizamos um experimento utilizando a loperamida. Este fármaco é agonista opióide e possui a característica de não atravessar a barreira hemato-encefálica, o que restringe suas ações ao compartimento periférico. Utilizamos também o antagonista seletivo de receptores μ -opióides naloxonazina para verificar um possível bloqueio da ação da loperamida. Na curva dose-resposta verificamos que, todas as doses de loperamida administradas uma hora após injeção i.pl. de PGE₂, causaram redução estatística significativa no NLSP (ANOVA; $F_{(4,25)} = 14,56$) (Figura 18A). Na figura 18B podemos verificar que a administração de naloxonazina (4 μ mol/Kg, s.c.), após o primeiro estímulo térmico, também causou redução no NLSP, e bloqueou a ação hiponociceptiva de loperamida (2 μ mol/Kg s.c) (ANOVA; $F_{(4,25)} = 25,46$).

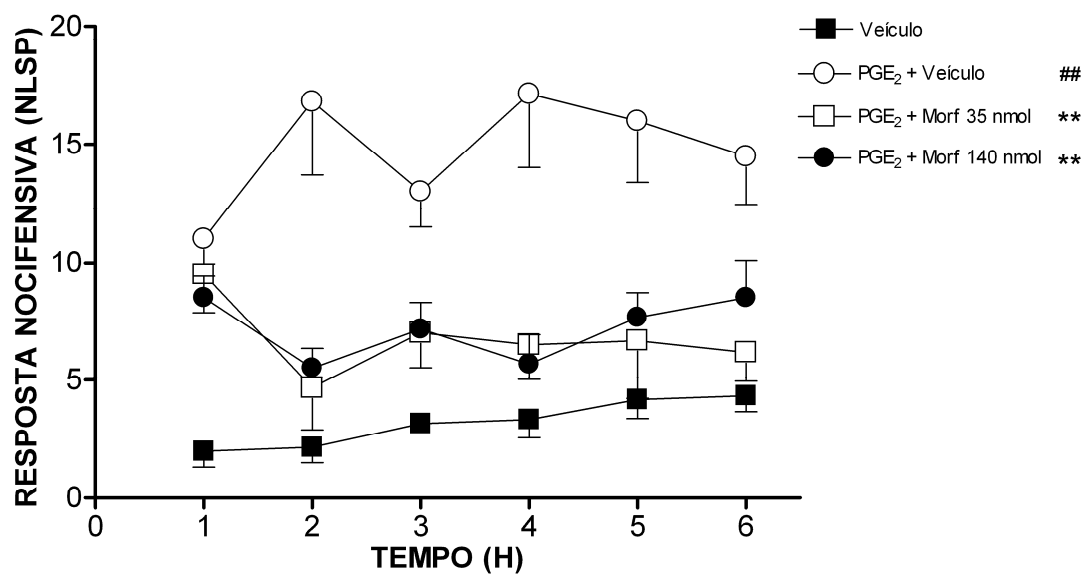


Figura 17 – Efeito do tratamento tardio com morfina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE₂. Uma hora após injeção i.pl. de PGE₂ (350 ng/pata), os animais receberam injeção i.pl. de morfina (35; 140 nmol/pata). A hiperpatia foi avaliada pela contagem de lambidas e sacudidas da pata (NLSP), em períodos de 5 min, a cada hora, imediatamente após imersão da pata em água a 50 °C / 7s, durante 6 horas. Essas medidas foram iniciadas uma hora após a injeção i.pl. de PGE₂. Os pontos representam média ± epm de NLSP de 6 animais. ** representa P < 0,01 entre PGE₂ e morfina, e ## representa P < 0,01 entre PGE₂ e veículo (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Dunnet).

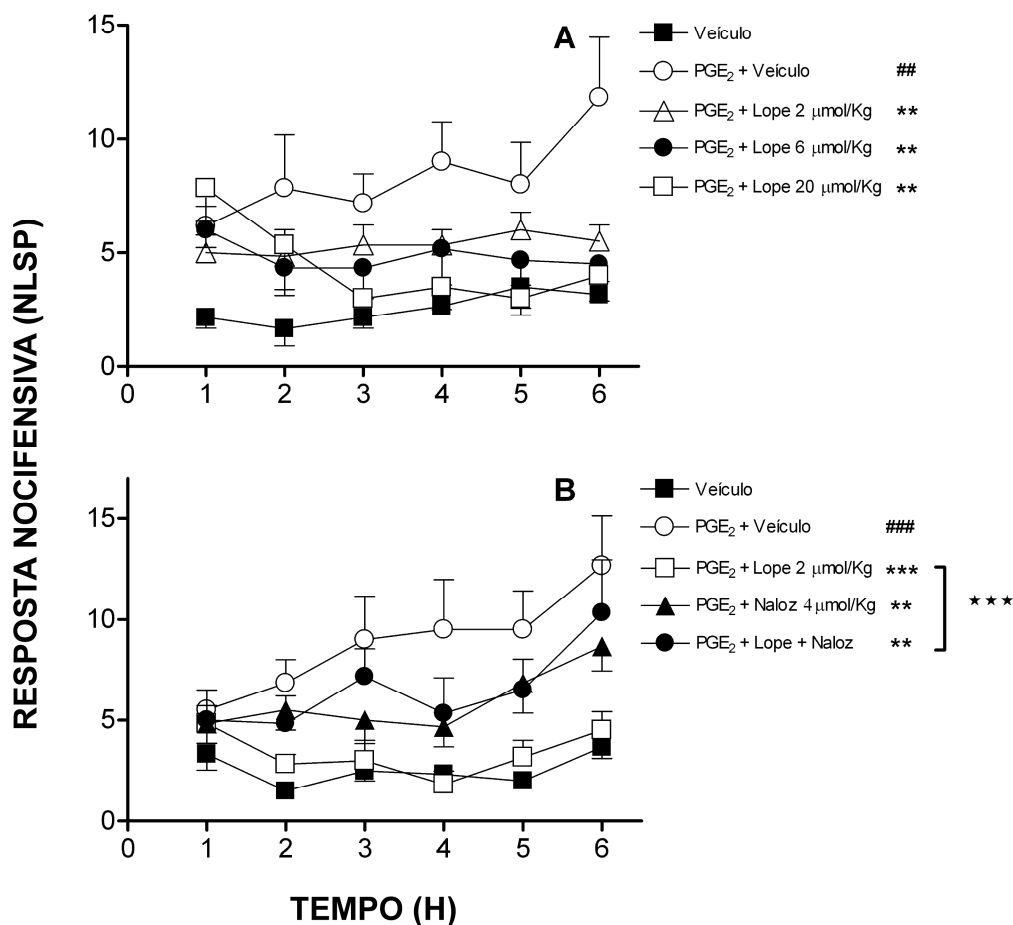


Figura 18 – Efeito do tratamento tardio com loperamida e naloxonazina sobre a hiperpatia após sensibilização por PGE₂. Uma hora após injeção i.pl. de PGE₂ (350 ng/pata), os animais receberam **A)** loperamida (2; 6; 20 µmol/Kg s.c.), **B)** loperamida (2 µmol/Kg s.c.) e naloxonazina (4 µmol/Kg s.c.). A hiperpatia foi avaliada pela contagem de lambidas e sacudidas da pata (NLSP), em períodos de 5 min, a cada hora, imediatamente após imersão da pata em água a 50 °C / 7s, durante 6 horas. Essas medidas foram iniciadas uma hora após a injeção i.pl. de PGE₂. Os pontos representam média ± epm de NLSP de 6 animais. ** e *** representam respectivamente P < 0,01 e P < 0,001 entre PGE₂ e opióides, *** representa P < 0,001 entre loperamida e loperamida associada a naloxonazina, e ## e ### representam respectivamente P < 0,01 e P < 0,001 entre PGE₂ e veículo (as curvas foram comparadas por ANOVA para medidas repetidas seguida por teste de Dunnet em **A** e de teste de Newman-Keuls em **B**).

5 DISCUSSÃO

5.1 EVIDÊNCIAS DO PAPEL SELETIVO DE FIBRAS A δ NO MODELO DE HIPERPATIA TÉRMICA

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram claramente que a administração de estímulo químico na pata, seguida por aplicação de estímulos térmicos sustentados e sucessivos, resultou em resposta comportamental consistente e duradoura. Esta resposta é ainda potencializada pela ação de PGE₂. Como a resposta nocifensiva observada ocorreu após o término do estímulo térmico, denominamos esse evento de nocicepção tardia. Como, no fenômeno clínico de hiperpatia, os pacientes relatam sensação dolorosa após o término do estímulo, nós correlacionamos a resposta nocifensiva tardia observada em nosso modelo animal com o fenômeno clínico de hiperpatia. Acreditamos que a resposta tardia ocorra por uma descarga sustentada dos nociceptores após o término do estímulo. Essa descarga nociceptiva sustentada ocorreria em consequência do fenômeno de pós-descarga (ou “after-discharge”) dos nociceptores (Devor e Seltzer, 1999; Devor et al., 2002).

Os resultados nos levam a crer que a nocicepção tardia ocorra por mecanismos diferentes dos mecanismos de diminuição de limiar térmico de resposta, visto que a dose de PGE₂ que causou hiperpatia não promoveu diminuição de limiar de resposta ao calor, no teste de retirada da pata no teste de Hargreaves (Figura 6). Este fato é indicativo de que o fenômeno de nocicepção tardia seja mais sensível aos efeitos da PGE₂ do que a diminuição de limiar nociceptivo térmico. Essa diferença de efeitos nos fez pensar que a PGE₂ poderia estar agindo em uma população distinta de fibras aferentes primárias, e ao invés de diminuir o limiar nociceptivo térmico, estivesse causando aumento de pós-descarga dessas outras fibras. Já foi demonstrado que estímulos térmicos de intensidades diferentes promovem ativação de populações distintas de fibras nociceptivas. Através de técnicas de eletrofisiologia, foi demonstrado que estímulos térmicos quentes em fibras do

tipo C causam pico de descargas iniciais que duram poucos segundos, ou seja, ocorre resposta imediata de curta duração seguida de acomodação dessas fibras. Por outro lado, após estímulo térmico quente, as fibras A δ demoram alguns segundos para disparar, e só então disparam de maneira vigorosa e duradoura, sem que ocorra adaptação (Meyer e Campbell, 1981; Treede et al., 1995). O desenvolvimento de técnicas de estimulação térmica quente tem possibilitado a discriminação entre fibras dos tipos C e A δ na mediação nociceptiva. Grupos de pesquisadores verificaram que a utilização de aquecimento lento causou ativação seletiva de fibras tipo C, enquanto o aquecimento rápido parece ativar seletivamente fibras A δ (Yeomans, et al., 1996; Yeomans e Proudfit, 1996; McMullan et al., 2004).

Em nosso protocolo experimental, a pata do animal é submersa em água a temperatura constante de 50 °C, durante 7 s, ou seja, ocorre aquecimento rápido. Deste modo, nossa hipótese é que neste protocolo, provavelmente as fibras A δ sejam as principais responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva que resulta na hiperpatia observada. Os resultados obtidos nos experimentos em que utilizamos DMSO auxiliam na sustentação de nossa hipótese. DMSO é um composto muito utilizado como diluente de fármacos não solúveis em água. Suas propriedades fisiológicas e farmacológicas não são completamente elucidadas. Sabe-se que possui capacidade de penetração através de membranas biológicas, efeitos sobre a coagulação sanguínea, atividade anticolinesterásica, indução da liberação de histamina de mastócitos (Brayton, 1986), estimula a produção de PGE₂ (Saeed et al., 1988) e sensibiliza seletivamente fibras A δ (Tzabazis et al., 2005). Em nossos experimentos, o DMSO causou hiperpatia, mas não causou diminuição de limiar no teste de retirada da pata, em equipamento regulado com rampa de aquecimento lento. Por outro lado, a administração de capsaicina, que sabidamente sensibiliza fibras C (Holzer, 1988), além de causar hiperpatia, promoveu diminuição de latência no teste de retirada de pata.

Os experimentos em que utilizamos o inibidor de COX, indometacina, foram importantes para elucidar a importância da produção endógena de prostanóides. Acreditamos que a produção de prostanóides é necessária para o desenvolvimento da hiperpatia induzida por PGE₂, DMSO e capsaicina, ao

menos inicialmente, pois quando realizamos o tratamento prévio ou a co-administração de indometacina ocorreu inibição da hiperpatia (Figuras 3 e 4). O efeito hiponociceptivo da administração periférica de indometacina e a falta de efeito do tratamento a posteriori com esse fármaco reforçam a importância da liberação local de prostaglandinas para a manifestação da hiperpatia.

As fibras sensíveis à capsaicina podem estar direta ou indiretamente envolvidas na liberação periférica de PGE_2 (Chopra et al., 2000; Averbeck et al., 2001). Portanto, é aceitável que fibras C tenham importância na hiperpatia induzida por capsaicina. A estimulação de fibras C pela capsaicina possivelmente promoveu liberação de prostaglandinas, que por sua vez sensibilizaram fibras $A\delta$, promovendo resposta nocifensiva tardia. Assim, o efeito inibitório da indometacina sobre a hiperpatia, na estimulação por capsaicina, indicaria que a hiperpatia induzida pelo vanilóide foi indireta.

Já foi demonstrado que o tratamento neonatal com capsaicina (TNC) destrói a maioria das fibras C (Lawson, 1987; para revisão ver Szallasi e Blumberg, 1999). Em nossos experimentos, o TNC não evitou a ocorrência de hiperpatia induzida por PGE_2 (Figura 7A), ou seja, a destruição de fibras C não foi suficiente para inibir a ocorrência de hiperpatia. Assim, os resultados obtidos com a utilização do TNC nos forneceram evidências de que a hiperpatia induzida por PGE_2 é mediada por fibras nociceptivas $A\delta$. Por outro lado, parece improvável que a liberação endógena de prostaglandinas induzida por injeção de PGE_2 seja mediada por fibras C, pois ocorreu efeito inibitório marcante quando do pré-tratamento com indometacina, mas não com o TNC.

Nos animais TNC que receberam aplicação tópica de capsaicina ocorreu redução significativa da hiperpatia. Entretanto, para nossa surpresa, não ocorreu inibição completa da resposta. Se considerarmos que esses animais não manifestaram reação ao vanilóide no teste oftálmico e também não apresentaram reação nocifensiva inicial imediatamente após aplicação tópica de capsaicina, podemos supor que a hiperpatia térmica ao calor, induzida por aplicação de capsaicina, pode não ser por ativação de receptores TRPV1 neuronais (Juan et al., 1980). Na verdade, já foram registrados casos de expressão de receptores TRPV1 em várias estruturas cutâneas não neuronais como, mastócitos, queratinócitos epidérmicos, vasos sanguíneos dérmicos, raiz interna e infundíbulo do folículo piloso, sebócitos diferenciados, ductos das

glândulas sudoríparas, e porção secretória de glândulas sudoríparas écrinas (Ständer et al., 2004; Gunthorpe e Szallasi, 2008). Neste caso, os mastócitos, assim como outras estruturas cutâneas mobilizadas através da ação da capsaicina em receptores TRPV1, podem constituir fontes significantes de prostaglandinas. Esta possibilidade explicaria a ocorrência de hiperpatia após aplicação tópica de capsaicina em animais TNC.

A hiperpatia induzida por DMSO foi totalmente inibida pelo tratamento prévio com indometacina e nos animais TNC. Isto é indicativo de que o DMSO também pode induzir hiperpatia indiretamente pela liberação de prostaglandinas de fibras C. Neste caso, a seletividade de DMSO em ativar fibras A δ , discutida anteriormente (Tzabazis et al., 2005), poderia ocorrer de maneira indireta, ou seja, por uma seletividade maior da PGE₂ para sensibilizar fibras A δ do que fibras C.

5.2 PESQUISA DE MEDIADORES FARMACOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA HIPERPATIA TÉRMICA

5.2.1 Sistema Histaminérgico

Quando liberada periféricamente, a histamina pode induzir a liberação por fibras aferentes primárias, de vários mediadores inflamatórios relacionados com a dor (Yoshida et al., 2005). O efeito hiponociceptivo de antagonistas de receptores H1 para histamina, administrados por via sistêmica em animais, já está bem estabelecido (Rumore e Schlichting, 1985; Rumore e Schlichting, 1986; Parada et al., 2001; Farzin e Nosrati, 2007). Ainda, estudos já demonstraram que a histamina pode estar envolvida na hiperalgesia química (Chacur et al., 2003), térmica (Massaad et al., 2004) e mecânica (Koda e Mizumura, 2002). Contribuindo com a idéia de que a resposta nocifensiva observada em nosso modelo ocorra por mecanismos diferentes dos de modelos de variação de limiar de resposta a estimulação térmica, nossos resultados mostraram que a histamina e os receptores histaminérgicos parecem não ter relevância para a manifestação da nocicepção tardia induzida por PGE₂. Verificamos que administração sistêmica de loratadina não evitou a hiperpatia promovida por PGE₂ (Figura 9), e a administração de indometacina foi capaz de retardar a hiperpatia promovida por injeção i.pl. de histamina

(Figura 10B). Nós sugerimos que este retardo na manifestação da hiperpatia tenha ocorrido pela ação inibitória da indometacina sobre a liberação de prostanóides induzida pela histamina. Mais uma vez estes resultados reforçam a importância dos prostanóides para ocorrência da hiperpatia. Entretanto, a realização de experimentos para pesquisar o efeito da loratadina sobre a hiperpatia térmica após sensibilização por histamina, poderia sugerir a função do sistema histaminérgico neste modelo.

5.2.2 Sistema Serotoninérgico

A serotonina é uma molécula extremamente importante no processamento e modulação da dor, e é liberada de plaquetas e mastócitos após lesão tecidual (Dray, 1995; Sommer, 2004). Apesar da presença de serotonina ter sido raramente observada em mastócitos de humanos (Slominski et al., 2005; Kushnir-Sukhov et al., 2007), sua presença em mastócitos de roedores é bastante consistente (Edvinsson et al., 1977). Deste modo, buscamos, em uma série de experimentos, pesquisar a importância da serotonina e alguns receptores serotoninérgicos no modelo de hiperpatia térmica. Conforme exposto anteriormente, os receptores para serotonina estão amplamente distribuídos pelo organismo, e dependendo do tipo de receptor ativado, pode ocorrer efeitos algícos ou analgésicos (Sommer, 2004). Para entendermos um pouco mais sobre a importância desses receptores na modulação periférica da hiperpatia, passamos a trabalhar com alguns antagonistas mais seletivos de receptores serotoninérgicos.

Os receptores 5HT1 estão associados com inibição de adenilil ciclase, aumento na condutância de K^+ e diminuição da condutância de Ca^{++} (Millan, 1997). Assim, a ativação desses receptores causa diminuição da excitabilidade neuronal. Estes efeitos inibitórios foram verificados pela ação hiponociceptiva central provocada por agonistas de receptores 5HT1A (Bardin et al., 2003). Entretanto, quando utilizamos o antagonista de receptores 5HT1A, NAN-190, observamos ação hiponociceptiva no modelo de hiperpatia térmica. Este resultado contradiz o mecanismo esperado para este receptor. Entretanto, foi verificado que agonista 5HT1A provocou diminuição de limiar de resposta a estímulo mecânico, e este efeito foi atenuado por antagonista 5HT1A (Taiwo e

Levine, 1992). Ainda, antagonistas de receptores 5HT1A reduziram a dor induzida por 5HT no músculo masseter de humanos (Ernberg et al., 2000). Talvez a discrepância destes achados esteja relacionada com a expressão deste receptor em diferentes tecidos e sob condições diferentes. Estudos de expressão de RNAm em neurônios do gânglio da raiz dorsal mostraram que o RNAm de receptores 5HT1A não é normalmente expresso a nível lombar (Pierce et al., 1996; Nicholson et al., 2003), mas pode ser induzido após inflamação periférica (Wu et al., 2001).

Os receptores 5HT2A e 5HT3 são expressos em fibras aferentes primárias (Fozard, 1984; Carlton e Coggeshall, 1997; Nicholson et al., 2003) e foi demonstrado que antagonistas desses receptores, administrados por via periférica, causaram efeitos hiponociceptivos em modelos de inflamação em roedores (Abbott et al., 1996; Okamoto et al., 2004 e 2006; Nakajima et al., 2009), assim como em dor miofascial e tendinopatias (Mueller e Stratz, 2004). Assim como os dados da literatura, os antagonistas de receptores 5HT2 e 5HT3 também produziram ação hiponociceptiva no modelo de hiperpatia. Verificamos que a administração i.pl. de ciproheptadina (antagonista de receptor 5HT2) ou de ondansetrona (antagonista de receptor 5HT3), causa redução do NLSP no modelo de hiperpatia (Figura 11). O efeito hiponociceptivo de antagonistas de receptores 5HT3 parece estar relacionado com a ação de substância P em hiperalgesia e dor inflamatória, principalmente em dores crônicas (Faerber et al., 2007). Os receptores de taquicininas NK1 e os receptores 5HT3 são expressos nas mesmas regiões do SNC e SNP, o que indica uma estreita relação funcional entre os neurotransmissores em questão (Conte et al., 2005). Este conceito é fortalecido pela observação de que antagonistas de receptores 5HT3 promoveram inibição na liberação de substância P, neurocinina A e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, de fibras aferentes primárias (Saria et al., 1990).

O fato de a serotonina promover nocicepção (Wheeler-Aceto et al., 1990; Sufka et al., 1992; Hong e Abbott, 1994; Parada et al., 2001; Oliveira et al., 2005) e hiperalgesia térmica (Taiwo e Levine, 1992; Hong e Abbott, 1994; Abbott et al., 1996; Parada et al., 2001) está bem documentado. No nosso modelo experimental, injeções por via i.pl. de serotonina também causaram aumento no NLSP imediatamente após a aplicação (Figura 13B), bem como

hiperpatia (Figura 13A). Em protocolos animais diferentes, foi verificado que a indometacina inibe a nocicepção espontânea (Tambeli et al., 2006) e também a hiperalgesia (Taiwo e Levine, 1992) promovidos pela administração local de serotonina. Tambeli e colaboradores sugerem que a migração de neutrófilos induzida pela 5HT contribua para a liberação local de prostaglandinas, que mediarão a nocicepção induzida por 5HT (Tambeli et al., 2006). Em relação ao efeito hiponociceptivo da indometacina sobre a nocicepção inicial induzida por serotonina, nossos resultados diferem dos achados da literatura, ao apontarem que o tratamento prévio com indometacina, por via sistêmica, não inibiu a nocicepção imediata (Figura 13B). Entretanto, a indometacina reduziu a hiperpatia entre a segunda e a sexta horas de observação, indicando que a dose utilizada de serotonina promove uma liberação mais tardia de prostanóides.

Também realizamos o tratamento a posteriori com antagonistas de receptores para serotonina. Nos animais que receberam PGE_2 i.pl., somente o antagonista de receptores 5HT₂ causou redução da hiperpatia (Figura 12). Isto sugere que mesmo após a instalação do processo de hiperpatia, a liberação de serotonina foi mantida em quantidade suficiente para a continuidade do evento. Pode ser que somente o receptor 5HT₂ esteja envolvido nesta resposta, como ocorre em hiperalgesia por lesão aguda e inflamatória induzida por serotonina em modelos de limiar de retirada da pata (Tokunaga et al., 1998). Entretanto, nos animais que receberam serotonina i.pl., somente o antagonista de receptores 5HT₁ causou redução no NLSP (Figura 14). Como verificamos pela co-administração de antagonistas de receptores 5HT, os receptores dos tipos 5HT₁, 5HT₂ e 5HT₃ estão envolvidos em estágios iniciais da resposta hiperpática induzida pela serotonina. Porém, 1 hora após seu início, os receptores do tipo 5HT₂ e 5HT₃, devem ter sinalizado processos que independem da ativação posterior deles, embora a liberação posterior de serotonina ainda seja importante para manter a ativação de receptores 5HT₁. Além disso, é possível sugerir que ocorra liberação recíproca de serotonina e prostaglandinas durante o transcorrer das estimulações térmicas repetidas, pois, 1 hora após a estimulação com PGE_2 , a hiperpatia foi inibida pelo antagonista 5HT₂. Trabalhos anteriores verificaram a importância dos receptores 5HT₁, 5HT₂ e 5HT₃ na mediação nociceptiva periférica, mas para

que isso pudesse ocorrer foi preciso utilizar doses de antagonistas de receptores cerca de mil vezes maiores do que as utilizadas neste trabalho (Sufka et al., 1992).

É importante destacar que os dados encontrados na literatura sobre receptores de serotonina relacionados com nocicepção apresentam resultados diferentes em modelos animais diferentes e também em faixas de doses de fármacos diferentes. Para a realização do protocolo de tratamento a posteriori, utilizamos as menores doses de antagonistas de receptores 5HT que causaram hiponocicepção quando co-administradas pela via i.pl. Uma possibilidade seria que as doses de antagonistas de receptores 5HT utilizadas foram muito reduzidas para o tratamento a posteriori, assim como ocorreu nos experimentos com opióides, onde precisamos utilizar doses maiores no pós-tratamento para verificação de efeito hiponociceptivo. As doses de fármacos utilizadas em experimentação animal são pontos críticos na interpretação de resultados. Isto pode ser observado nos experimentos em que administramos serotonina pela via i.pl. A dose de 0,3 nmol/pata que utilizamos equivale a 0,1 µg/pata, dose esta utilizada em modelo de hiperalgisia mecânica por Oliveira e colaboradores (0,1; 1 e 10 µg/pata) (Oliveira et al., 2007). Entretanto, as doses usualmente utilizadas para avaliar nocicepção são bem mais altas, variando de 10 a 450 µg/pata (Tokunaga et al., 1998; Oliveira et al., 2005; Tambeli et al., 2006). Na busca por uma dose adequada, foram utilizadas doses de 3 e 30 nmol/pata. Entretanto, estas doses provocaram edema de pata muito pronunciado, prejudicando a avaliação da hiperpatia. Por outro lado, esses dados nos levam a sugerir que o fenômeno de hiperpatia seja mais sensível a este mediador do que o fenômeno de abaixamento de limiar no teste de hipernocicepção térmica, a exemplo do que foi observado com a PGE₂.

Os mecanismos de nocicepção e hiperalgisia mediados por receptores serotoninérgicos é extremamente complexo e por isso controverso. Neste trabalho conseguimos demonstrar que os receptores periféricos de serotonina 5HT₁, 5HT₂ e 5HT₃ estão parcialmente envolvidos na mediação da hiperpatia.

5.2.3 Sistema Opióide

Os fármacos opióides são os analgésicos mais eficazes, sendo os fármacos de escolha no controle de dores moderadas a severas na clínica humana ou animal. Entretanto, em algumas condições patológicas esses analgésicos são efetivos somente em altas doses, o que pode resultar em tolerância, dependência e efeitos adversos indesejáveis, como sedação, disforia e constipação (para revisão ver Martin e Eisenach, 2001). Os receptores opióides são localizados no sistema nervoso central e também em terminações sensoriais periféricas. Aproximadamente um terço das fibras C possuem receptores μ ou δ , o que pode contribuir para os efeitos hiponociceptivos periféricos dos opióides (Coutaux et al., 2005). Esses receptores podem ser ativados por agonistas exógenos ou por peptídeos opióides endógenos.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os fármacos opióides causam redução da hiperpatia induzida por calor, após sensibilização por PGE₂. O efeito hiponociceptivo dos opióides ocorreu quando o tratamento foi aplicado antes (Figura 15) após a injeção de PGE₂ (Figura 17) com morfina. Também verificamos que a redução da hiperpatia causada por morfina foi prevenida pelo tratamento prévio com o antagonista de receptores opióides naloxona, o que comprovou se tratar de efeito hiponociceptivo por ação específica em receptores opióides.

A ligação de agonistas opióides a seus receptores pode resultar em diminuição da excitabilidade dos nociceptores, alterando a propagação de potenciais de ação e conseqüente inibição da liberação de neurotransmissores proinflamatórios, peptídicos e não peptídicos, das terminações de nociceptores, o que resulta em analgesia (Ferreira e Nakamura, 1979a; Stein et al., 2003). A preocupação dos clínicos com o desenvolvimento de dependência, tolerância e efeitos adversos indesejáveis tem estimulado a busca por terapias de associação de opióides a outros fármacos, como anticonvulsivantes ou bloqueadores de receptores NMDA, ou ainda por opióides de efeito periférico seletivo. Em nosso protocolo conseguimos demonstrar, de maneiras distintas, que a ação hiponociceptiva dos opióides ocorreu por ação periférica.

Primeiramente verificamos que 30 pmol/pata de morfina reduziu a hiperpatia. É pouco provável que esse efeito hiponociceptivo seja por ação central da morfina, pois a dose utilizada foi 50 mil vezes menor do que a dose utilizada por via sistêmica (6 $\mu\text{mol/Kg}$ equivale a aproximadamente a 1500 nmol/animal). Também conseguimos bloquear a hiperpatia realizando o tratamento local com morfina a posteriori da PGE₂ (Figura 17). A outra estratégia para pesquisar a ação periférica dos opióides neste modelo foi através do uso da loperamida. A loperamida é um derivado de piperidina estruturalmente similar à meperidina (Gilman et al., 1993), que possui a característica de não atravessar a barreira hemato-encefálica, portanto não tem ação no sistema nervoso central, mesmo quando administrado por via sistêmica (Wuster e Herz, 1978; Schinkel et al., 1996; Nozaki-Taguchi e Yaksh, 1999). Entretanto, em alguns trabalhos foram observados efeitos centrais da loperamida, principalmente sedação, como em cães da raça Collie (Hugnet et al., 1996), humanos (Kobayashi et al., 2005) e em camundongos da linhagem C57Bl/6 (Labuz et al., 2007), mas não em outras linhagens. Esses efeitos centrais foram atribuídos a defeitos genéticos relacionados à barreira hemato-encefálica (Hugnet et al., 2004; Skarke et al., 2003).

Trabalhos farmacológicos com naloxonazina levaram à classificação dos receptores μ -opióides (MOR) em subtipos μ_1 e μ_2 , pois este fármaco bloqueia μ_1 mas não bloqueia μ_2 (Pasternak e Wood, 1986). Mais recentemente, estudos de biologia molecular no gene OR revelaram que existem muitas variantes de MOR (Bolan et al., 2004). Entretanto, ainda não foi determinado se existe relação entre a classificação farmacológica e as variantes descobertas por biologia molecular (Andoh et al., 2008). Em nossos experimentos utilizamos a naloxonazina para bloquear a ação hiponociceptiva da loperamida com sucesso (Figura 18B). Contudo, a naloxonazina também teve ação hiponociceptiva quando administrada isoladamente. Esses resultados suportam a idéia de que a ação hiponociceptiva periférica da loperamida é via receptores opióides do tipo μ , porém indicam também que o antagonista opióide pode também apresentar efeito hiponociceptivo *per se*. Este fenômeno não é uma novidade na literatura e pode ser resultado de mecanismos periféricos (Ferreira e Nakamura, 1979b; Ferreira et al., 1982; Rios e Jacob, 1982; Bianchi et al.,

1982), bem como centrais (Ueda et al., 1986; Rochford e Stewart, 1992; Bianchi e Panerai, 1993; Tsuruoka et al., 1997).

Na pesquisa básica de dor, ainda persiste a busca por modelos animais de nocicepção que mimetizem, da maneira mais realista possível, os mecanismos das patologias dolorosas de humanos. A importância da PGE₂ nas dores inflamatórias está bem estabelecida. Porém, até o presente momento, só se tem considerado a sua importância em baixar o limiar nociceptivo térmico e mecânico. Neste trabalho enfatizamos características do processo nociceptivo induzido por PGE₂ que muitas vezes são ignoradas, mas que podem estar associadas à hiperpatia humana. O conhecimento mais detalhado das bases neurais e moleculares pode ser de grande valor não só para melhorar a conduta sobre a dor inflamatória, mas também sobre as dores neuropáticas, uma vez que a intensa hiperpatia que ocorre após lesões de nervos podem compartilhar alguns mecanismos envolvidos nesse modelo. E também, o papel das prostaglandinas em condições neuropáticas, antes negligenciada, agora está sendo considerada com mais cuidado (Ma e Quirion, 2008).

6 CONCLUSÕES

O modelo experimental que apresentamos possibilita a avaliação da resposta nocifensiva tardia à estimulação térmica de maneira simples e consistente. Esse modelo possibilita o estudo em roedores, de comportamentos nociceptivos que podem ser correlacionados com o fenômeno de hiperpatia humana. Assim, apresentamos uma ferramenta importante para o estudo em animais de mecanismos fisiopatológicos da hiperalgesia que ainda não haviam sido pesquisados.

Neste trabalho sugerimos que as fibras A δ , após serem sensibilizadas por prostaglandinas, podem ter um papel importante na dor inflamatória por suprir entradas nociceptivas depois do término de estímulos supra-limiais, ou seja, a condição hiperpática. Além disso, as fibras C poderiam atuar como fontes importantes de prostaglandina, e estas, serem responsáveis pela sensibilização de fibras A δ .

Verificamos que a PGE₂ é extremamente importante na manifestação de nocicepção tardia. Aparentemente, a PGE₂ parece ser mais específica em aumentar a duração da resposta nociceptiva do que em diminuir o limiar desta resposta. Este efeito da PGE₂ parece ser principalmente sobre fibras A δ e mediado por serotonina.

Através da utilização periférica, de antagonistas seletivos de receptores 5HT, verificamos que esses receptores participam da modulação da hiperpatia. A serotonina e prostaglandinas parecem liberar-se reciprocamente, envolvendo pelo menos os receptores 5HT1 e 5HT2.

No modelo de hiperpatia, os opióides promovem efeito hiponociceptivo periférico, e este efeito ocorre em situações onde os inibidores de COX não são mais efetivos.

O efeito **hiponociceptivo periférico** de opióides, assim como o de antagonistas de receptores serotoninérgicos representa um achado importante para estratégias terapêuticas no combate às dores crônicas. Pela via periférica,

os efeitos indesejáveis de origem central provocados por estes fármacos deixam de ocorrer, o que possibilita uma terapêutica analgésica efetiva e sem efeitos colaterais indesejáveis. Além da possibilidade de associação entre diferentes tipos de fármacos, possibilitando um efeito terapêutico melhor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F.V.; HONG, Y.; BLIER, P. Activation of 5-HT_{2A} receptors potentiates pain produced by inflammatory mediators. **Neuropharmacology**, 35(1): 99-110, 1996.
- AHMADI, S.; LIPPROSS, S.; NEUHUBER, W.L.; ZEILHOFER, H.U. PGE₂ selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. **Nat. Neurosci.**, 5(1): 34-40, 2002.
- American Pain Society. **Pain assessment and treatment in the managed care environment.** Disponível em <http://www.ampainsoc.org/advocacy/assess_treat_mce.htm> 2000.
- ANDOH, T.; YAGETA, Y.; KONNO, M.; YAMAGUCHI-MIYAMOTO, T.; TAKAHATA, H.; NOJIMA, H.; NEMOTO, H.; KURAIISHI, Y. Evidence for separate involvement of different μ -opioid receptor subtypes in itch and analgesia induced by supraspinal action of opioids. **J. Pharmacol. Sci.**, 106(4): 667-670, 2008.
- AVERBECK, B.; REEH, P.W.; MICHAELIS, M. Modulation of CGRP and PGE₂ release from isolated rat skin by alpha-adrenoceptors and kappa-opioid-receptors. **Neuroreport**, 12(10): 2097-2100, 2001.
- BARDIN, L.; TARAYRE, J.P.; MALFETES, N.; KOEK, W.; COLPAERT, F.C. Profound, non-opioid analgesia produced by the high-efficacy 5-HT_{1A} agonist F 13640 in the formalin model of tonic nociceptive pain. **Pharmacology**, 67(4): 182-194, 2003.
- BASTOS, L.C. **Modelo para estudo da nocicepção causada por extrato de espícula de *Lonomia obliqua* em ratos.** 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- BASTOS, L.C.; VEIGA, A.B.; GUIMARÃES, J.A.; TONUSSI, C.R. Nociceptive and edematogenic responses elicited by a crude bristle extract of *Lonomia obliqua* caterpillars. **Toxicon**, 43(3): 273-278, 2004.
- BENNETT, G.J. Neuropathic pain. In: WALL P.D. e MELZACK R. **Textbook of Pain.** 3ª ed. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone: 201-224, 1994.
- BIANCHI, G.; FIOCCHI, R.; TAVANI, A.; MANARA, L. Quaternary narcotic antagonists' relative ability to prevent antinociception and gastrointestinal transit inhibition in morphine-treated rats as an index of peripheral selectivity. **Life Sci.**, 30(22): 1875-1883, 1982.

- BIANCHI, M. E PANERAI, A.E. Naloxone-induced analgesia: involvement of kappa-opiate receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 46(1): 145-148, 1993.
- BISGAARD, H.; KRISTENSEN, J.K. Leukotriene B4 produces hyperalgesia in humans. **Prostaglandins**, 30(5): 791-797, 1985.
- BLACKBURN-MUNRO, G. Pain-like behaviours in animals – how human are they? **Trends Pharmacol. Sci.**, 25(6): 299-305, 2004.
- BOLAN, E.A.; PAN, Y.X; PASTERNAK, G.W. Functional analysis of MOR-1 splice variants of the mouse mu opioid receptor gene Oprm. **Synapse**, 51(1): 11-18, 2004.
- BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Vet**, 76(1): 61-90, 1986.
- BROSSEAU, L.; JUDD, M.G.; MARCHAND, S.; ROBINSON, V.A.; TUGWELL, P.; WELLS, G.; YONGE, K. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for the treatment of rheumatoid arthritis in the hand. **Cochrane Database Syst Rev**,(3): CD004377, 2003.
- CAMPBELL, J.N.; LAMOTTE, R.H. Latency to detection of first pain. **Brain Res.**, 266(2): 203-208, 1983.
- CARLTON, S.M. Peripheral excitatory amino acids, **Curr. Opin. Pharmacol.**, 1(1): 52-56, 2001.
- CARLTON, S.M.; COGGESHALL, R.E. Immunohistochemical localization of 5-HT_{2A} receptors in peripheral sensory axons in rat glabrous skin. **Brain Res.**, 763(2): 271-275, 1997.
- CASHMORE, R.G.; HARCOURT-BROWN, T.R.; FREEMAN, P.M.; JEFFERY, N.D.; GRANGER, N. Clinical diagnosis and treatment of suspected neuropathic pain in three dogs. **Aust Vet J.**, 87(1): 45-50, 2009.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389(6653): 816-824, 1997.
- CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B.; GUERRA, J.L.; TEIXEIRA, C.F.; CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from Bothrops asper snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon**, 41(6): 667-678, 2003.
- CHENITZ, J.E. Rheumatoid arthritis and its implications in temporomandibular disorders. **Cranio**, 10(1): 59-69, 1992.

- CHOPRA, B.; GIBLETT, S.; LITTLE, J.G.; DONALDSON, L.F.; TATE, S.; EVANS, R.J.; GRUBB, B.D. Cyclooxygenase-1 is a marker for a subpopulation of putative nociceptive neurons in rat dorsal root ganglia. **Eur. J. Neurosci.**, 12(3): 911-920, 2000.
- CHUANG, H.H.; PRESCOTT, E.D.; KONG, H.; SHIELDS, S.; JORDT, S.E.; BASBAUM, A.L.; CHAO, M.V.; JULIUS, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. **Nature**, 411(6840): 957-962, 2001.
- CODD, E.E.; SHANK, R.P.; SCHUPSKY, J.J.; RAFFA, R.B. Serotonin and norepinephrine uptake inhibiting activity of centrally acting analgesics: structural determinants and role in antinociception. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 274(3): 1263-1270, 1995.
- CONTE, D.; LEGG, E.D.; MCCOURT, A.C.; SILAJDZIC, E.; NAGY, G.G.; MAXWELL, D.J. Transmitter content, origins and connections of axons in the spinal cord that possess the serotonin (5-hydroxytryptamine) 3 receptor. **Neuroscience**, 134(1): 165-173, 2005.
- COSTIGAN, M. E WOOLF, C.J. Pain: Molecular Mechanisms. **J. Pain**, 1(3): 35-44, 2000.
- COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.; BARS, D.L. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, 72(5): 359-371, 2005.
- CRAIG, A.D. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. **Annu. Rev. Neurosci.**, 26: 1-30, 2003.
- CUNHA, F.Q. E FERREIRA, S.H. Peripheral hyperalgesic cytokines. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 521: 22-39, 2003.
- DEFRIN, R.; OHRY, A.; BLUMEN, N.; URCA, G. Characterization of chronic pain and somatosensory function in spinal cord injury subjects. **Pain**, 89(2-3): 253-263, 2001.
- DEROW, A.; IZYDORCZYK, I.; KUHN, A.; REEH, P.W.; PETHO, G. Prostaglandin E₂ and I₂ facilitate noxious heat-induced spike discharge but not iCGRP release from rat cutaneous nociceptors. **Life Sci.**, 81(25-26): 1685-1693, 2007.
- DEVOR, M. E SELTZER, Z. Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain. In: WALL, P.D. E MELZACK, R., editors. **Textbook of Pain**, 4^a ed. London: Churchill Livingstone: 129-164, 1999.
- DEVOR, M. Nociception in Kyoto. **Pain**, 140(3): 519-520, 2008.
- DEVOR, M.; AMIR, R.; RAPPAPORT, Z.H. Pathophysiology of trigeminal neuralgia: the ignition hypothesis. **Clin. J. Pain**, 18(1): 4-13, 2002.

- DJOUHRI, L. E LAWSON, S.N. A β -fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Res. Rev.**, 46(2): 131-145, 2004.
- DOAK, G.J. E SAWYNOK, J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Neuroscience**, 80(3): 939-949, 1997.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, 75(2): 125-131, 1995.
- DWORKIN, R.H. An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms. **Clin. J. Pain**, 18(6): 343-349, 2002.
- EDVINSSON, L.; CERVOS-NAVARRO, J.; LARSSON, L.I.; OWMAN, C.; RONNBERG, A.L. Regional distribution of mast cells containing histamine, dopamine, or 5-hydroxytryptamine in the mammalian brain. **Neurology**, 27(9): 873-883, 1977.
- ERNBERG, M.; LUNDEBERG, T.; KOPP, S. Effect of propranolol and granisetron on experimentally induced pain and allodynia/hyperalgesia by intramuscular injection of serotonin into the human masseter muscle. **Pain**, 84(2-3): 339-46, 2000.
- FAERBER, L.; DRECHSLER, S.; LADENBURGER, S.; GSCHAIEMEIER, H.; FISCHER, W. The neuronal 5-HT₃ receptor network after 20 years of research--evolving concepts in management of pain and inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, 560(1): 1-8, 2007.
- FARZIN, E.; NOSRATI, F. Modification of formalin-induced nociception by different histamine receptor agonists and antagonists. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, 17(2): 122-128, 2007.
- FERREIRA, S.H E NAKAMURA, M. III - Prostaglandin hyperalgesia: relevance of the peripheral effect for the analgesic action of opioid-antagonists. **Prostaglandins**, 18(2): 201-208, 1979b.
- FERREIRA, S.H. E NAKAMURA, M.I. II - Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. **Prostaglandins**, 18(2): 191-200, 1979a.
- FERREIRA, S.H., MOLINA N, VETTORE O. Prostaglandin hyperalgesia, V: a peripheral analgesic receptor for opiates. **Prostaglandins**, 23(1): 53-60, 1982.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CORREA, F.M. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, 53(1): 39-48, 1978a.
- FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.; ABREU CASTRO, M.S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E₂. **Prostaglandins**, 16(1): 31-37, 1978b.

- FOZARD, J.R. Neuronal 5-HT receptors in the periphery. **Neuropharmacology**, 23(12b): 1473-1486, 1984.
- GALER, B.S.; JENSEN, M.P. Development and preliminary validation of a pain measure specific to neuropathic pain: the neuropathic pain scale. **Neurology**, 48(2): 332-338, 1997.
- GALLUZZI, K.E. Managing neuropathic pain. **J. Am. Osteopath. Assoc.**, 107(6): 39-48, 2007.
- GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. The pharmacological basis of therapeutics, opioid analgesics and antagonists. JAFFE, J.H. E MARTIN, W.R. editors. 8^a ed., McGraw-Hill, New York: 485-521, 1993.
- GIORDANO, J. E SCHULTEA, T. Serotonin 5-HT(3) receptor mediation of pain and anti-nociception: implications for clinical therapeutics. **Pain Physician**, 7(1): 141-147, 2004.
- GIORDANO, J. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. **Pain Physician**, 8(3): 277-290, 2005.
- GUNTHORPE, M.J. E SZALLASI, A. Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms. **Curr. Pharm. Des.**, 14(1): 32-41, 2008.
- HAMMOND, D.L. E RUDA, M.A. Developmental alterations in nociceptive threshold, immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P, and fluoride-resistant acid phosphatase in neonatally capsaicin-treated rats. **J. Comp. Neurol.**, 312(3): 436-450, 1991.
- HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, 32(1): 77-88, 1988.
- HIURA, A. Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons. **Arch. Histol. Cytol.**, 63(3): 199-215, 2000.
- HOGAN, Q. Animal pain models. **Reg. Anesth. Pain. Med.**, 27(4): 385-401, 2002.
- HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, 43(2): 143-201, 1991.
- HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, 24(3): 739-768, 1988.
- HONG, Y. E ABBOTT, F.V. Behavioural effects of intraplantar injection of inflammatory mediators in the rat. **Neuroscience**, 63(3): 827-836, 1994.

- HOYER, D.; HANNON, J.P.; MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 71(4): 533-54, 2002.
- HUGNET, C.; BENTJEN, S.A.; MEALEY, K.L. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. **J. Vet. Pharmacol.**, 27(4): 227-229, 2004.
- HUGNET, C.; CADORE, J.L.; BURONFOSSE, F.; PINEAU, X.; MATHET, T.; BERNY, P.J. Loperamide poisoning in the dog. **Vet. Hum. Toxicol.**, 38(1): 31-33, 1996.
- JANCSÓ, G.; KIRÁLY, E.; JANCSÓ-GÁBOR, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. **Nature**, 270(5639): 741-743, 1977.
- JUAN, H.; LEMBECK, F.; SEEWANN, S.; HACK, U. Nociceptor stimulation and PGE release by capsaicin. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 312(2): 139-143, 1980.
- KAMERMANS, M. E FAHRENFORT, I. Ephaptic interactions within a chemical synapse: hemichannel-mediated ephaptic inhibition in the retina. **Curr. Opin. Neurobiol.**, 14(5): 531-541, 2004.
- KATAYAMA, K.; ASANO, K.; HAGA, K.; FUKUDA, T. High affinity binding of azasetron hydrochloride to 5-hydroxytryptamine₃ receptors in the small intestine of rats. **Jpn. J. Pharmacol.**, 73(4): 357-360, 1997.
- KHASAR, S.G.; MCCARTER, G.; LEVINE, J.D. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. **J. Neurophysiol.**, 81(3): 1104-1112, 1999.
- KOBAYASHI, M.; SAITOH, H.; YAMAGUCHI, M.; SAITO, T.; FUJITA, H.; SUNO, M.; MATSUBARA, K.; AUNGST, B.J. Relationship between loperamide-induced sedative effect and digoxin pharmacokinetics in healthy Japanese subjects. **Pharm. Res.**, 22(3): 413-418, 2005.
- KODA, H. E MIZUMURA, K. Sensitization to mechanical stimulation by inflammatory mediators and by mild burn in canine visceral nociceptors in vitro. **J. Neurophysiol.**, 87(4): 2043-2051, 2002.
- KODA, H.; MINAGAWA, M.; SI-HONG, L.; MIZUMURA, K.; KUMAZAWA, T. H₁-receptor-mediated excitation and facilitation of the heat response by histamine in canine visceral polymodal receptors studied in vitro. **J. Neurophysiol.**, 76(3): 1396-1404, 1996.
- KOPPERT, W.; REEH, P.W.; HANDWERKER, H.O. Conditioning of histamine by bradykinin alters responses of rat nociceptor and human itch sensation. **Neurosci. Lett.**, 152(1-2): 117-120, 1993.
- KRAUSE, S.J.; BACKONJA, M.M. Development of a neuropathic pain questionnaire. **Clin. J. Pain.**, 19(5): 306-314, 2003.

- KRESS, M. E ZEILHOFER, H.U. Capsaicin, protons and heat: new excitement about nociceptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, 20(3): 112-118, 1999.
- KUSHNIR-SUKHOV, N.M.; BROWN, J.M.; WU, Y.; KIRSHENBAUM, A.; METCALFE, D.D. Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 119(2): 498-499, 2007.
- LABUZ, D.; MOUSA, S.A.; SCHAFER, M.; STEIN, C.; MACHELSKA, H. Relative contribution of peripheral versus central opioid receptors to antinociception. **Brain Res.**, 1160: 30-38, 2007.
- LAWSON, S.N. E NICKELS, S.M. The use of morphometric techniques to analyse the effect of neonatal capsaicin treatment on rat dorsal root ganglia and dorsal roots. **J. Physiol.**, 303(suppl): 12P, 1980.
- LAWSON, S.N. The morphological consequences of neonatal treatment with capsaicin on primary afferent neurones in adult rats. **Acta Physiol. Hung.**, 69(3-4): 315-321, 1987.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, 53(4): 597-652, 2001.
- LOESER, J.D. E TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, 137(3): 473-477, 2008.
- MA, W. E QUIRION, R. Does COX2-dependent PGE₂ play a role in neuropathic pain? **Neurosci. Lett.**, 437(3): 165-169, 2008.
- MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S.B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat. Rev. Neurosci.**, 6(7): 521-532, 2005.
- MARTIN, H.A.; BASBAUM, A.I.; GOETZL, E.J.; LEVINE, J.D. Leukotriene B4 decreases the mechanical and thermal thresholds of C-fiber nociceptors in the hairy skin of the rat. **J. Neurophysiol.**, 60(2): 438-445, 1988.
- MARTIN, T.J. E EISENACH, J.C. Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 299(3): 811-817, 2001.
- MASSAAD, C.A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ATWEH, S.F.; JABBUR, S.J.; SAADE, N.E. Involvement of substance P, CGRP and histamine in the hyperalgesia and cytokine upregulation induced by intraplantar injection of capsaicin in rats. **J. Neuroimmunol.**, 153 (1-2): 171-182, 2004.
- MATHEWS, K.A. Neuropathic pain in dogs and cats: if only they could tell us if they hurt. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, 38(6): 1365-1414, 2008.
- MCMULLAN, S.; SIMPSON, D.A.; LUMB, B.M. A reliable method for the preferential activation of C- or A-fibre heat nociceptors. **J. Neurosci. Methods**, 138(1-2): 133-139, 2004.

- MERSKEY, H. E BOGDUK, N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Em: MERSKEY H, e BOGDUK N, editors. Task force on taxonomy. 2^a ed., Seattle, IASP Press: 39-214, 1994.
- MERSKEY, H. Nociception in Kyoto. **Pain**, 140(3): 519, 2008.
- MEYER, R.A. E CAMPBELL, J.N. Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. **Science**, 213(4515): 1527-1529, 1981.
- MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N; RAJA, S.N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. MCMAHON, S.B. e KOLTZENBURG, M. editors. **Wall and Melzack's Textbook of Pain** 5^a ed. Elsevier Churchill Livingstone, London: 3-34, 2006.
- MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, 66(6): 355-474, 2002.
- MILLAN, M.J. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. Em Dickenson, A. e Besson, J.M. Ed., **Handbook of Experimental Pharmacology, The Pharmacology of Pain**, Springer-Verlag, Berlim, Alemanha. V 130: 385–446, 1997.
- MILLAN, M.J.; CANTON, H.; GOBERT, A.; LEJEUNE, F.; RIVET, J.M.; BERVOETS, K.; BROCCO, M.; WIDDOWSON, P.; MENNINI, T.; AUDINOT, V.; HONORE, P.; RENOUEAU, A.; LE MAROUILLE-GIRARDON, S.; VERRIELE, L.; GRESSIER, H.; PEGLION, J.L. Novel benzodioxopiperazines acting as antagonists at postsynaptic 5-HT_{1A} receptors and as agonists at 5-HT_{1A} autoreceptors: a comparative pharmacological characterization with proposed 5-HT_{1A} antagonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 268(1): 337-352, 1994.
- MITCHELL, A.C. E FALLON, M.T. A single infusion of intravenous ketamine improves pain relief in patients with critical limb ischaemia: results of a double blind randomised controlled trial. **Pain**, 97(3): 275-281, 2002.
- MIZUMURA, K.; MINAGAWA, M.; KODA, H.; KUMAZAWA, T. Histamine-induced sensitization of the heat response of canine viscera polymodal receptors. **Neurosci. Lett.**, 168(1-2): 63-66, 1994.
- MUELLER, W. E STRATZ, T. Local treatment of tendinopathies and myofascial pain syndromes with the 5-HT₃ receptor antagonist tropisetron. **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, (119): 44-48, 2004.
- MUIR, W.W.; WIESE, A.J.; WITTUM, T.E. Prevalence and characteristics of pain in dogs and cats examined as outpatients at a veterinary teaching hospital. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 224(9): 1459-1463, 2004.

- NAGY, J.I.; IVERSEN, L.L.; GOEDERT, M.; CHAPMAN, D.; HUNT, S.P. Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. **J. Neurosci.**, 3(2): 399-406, 1983.
- NAKAJIMA, K.; OBATA, H.; ITO, N.; GOTO, F.; SAITO, S. The nociceptive mechanism of 5-hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. **Eur. J. Pain**, 13(5): 441-447, 2009.
- NARUMIYA, S. E FITZGERALD, G.A. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. **J. Clin. Invest.**, 108(1): 25-30, 2001.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. NIH Guide: New Directions in Pain Research I. Disponível em <<http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-98-102.html>>. 1998.
- NEGUS, S.S.; VANDERAH, T.W.; BRANDT, M.R.; BILSKY, E.J.; BECERRA, L.; BORSOOK, D. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 319(2): 507-514, 2006.
- NEUGEBAUER, V. Metabotropic glutamate receptors-important modulators of nociception and pain behavior. **Pain**, 98(1-2): 1-8, 2002.
- NEWTON, S.A.; KNOTTENBELT, D.C.; ELDRIDGE, P.R. Headshaking in horses: possible aetiopathogenesis suggested by the results of diagnostic tests and several treatment regimes used in 20 cases. **Equine Vet. J.**, 32(3): 208-216, 2000.
- NICHOLSON, R.; SMALL, J.; DIXON, A.K.; SPANSWICK, D.; LEE, K. Serotonin receptor mRNA expression in rat dorsal root ganglion neurons. **Neurosci. Lett.**, 337(3): 119-122, 2003.
- NOZAKI-TAGUCHI, N. E YAKSH, T.L. Characterization of the antihyperalgesic action of a novel peripheral mu-opioid receptor agonist – loperamide. **Anesthesiology**, 90(1): 225-234, 1999.
- OFEK, H. E DEFRIN, R. The characteristics of chronic central pain after traumatic brain injury. **Pain**, 131(3): 330-340, 2007.
- O'HAGAN, B.J. Neuropathic pain in a cat post-amputation. **Aust. Vet. J.**, 84(3): 83-86, 2006.
- OKAMOTO, K.; IMBE, H.; TASHIRO, A.; KUMABE, S.; SENBA, E. Blockade of peripheral 5HT3 receptor attenuates the formalin-induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat. **Neurosci. Lett.**, 367(2): 259-263, 2004.

- OKAMOTO, K.; KIMURA, A.; DONISHI, T.; IMBE, H.; NISHIE, Y.; MATSUSHITA, H.; TAMAIA, Y.; SENBAB, E. Contribution of peripheral 5-HT_{2A} or 5-HT₃ receptors to Fos expression in the trigeminal spinal nucleus produced by acute injury to the masseter muscle during persistent temporomandibular joint inflammation in rats. **Neuroscience**, 143(2): 597-606, 2006.
- OLIVEIRA, M.C.; PARADA, C.A.; VEIGA, M.C.; RODRIGUES, L.R.; BARROS, S.P.; TAMBELI, C.H. Evidence for the involvement of endogenous ATP and P2X receptors in TMJ pain. **Eur. J. Pain**, 9(1): 87-93, 2005.
- OLIVEIRA, M.C.; PELEGRINI-DA-SILVA, A.; PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H. 5-HT acts on nociceptive primary afferents through an indirect mechanism to induce hyperalgesia in the subcutaneous tissue. **Neuroscience**, 145(2): 708-714, 2007.
- PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, 102(4): 937-944, 2001.
- PARADA, C.A.; VIVANCOS, G.G.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 100(5): 2923-2928, 2003.
- PASTERNAK, G.W. E WOOD, P.J. Multiple mu opiate receptors. **Life Sci.**, 38(21): 1889-1898, 1986.
- PERL, E.R. Ideas about pain, a historical view. Nature reviews. **Neuroscience**, 8(1), 71-80, 2007.
- PIERCE, P.A.; XIE, G.X.; LEVINE, J.D.; PEROUTKA, S.J. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. **Neuroscience**, 70(2): 553-559, 1996.
- PITCHER, G.M. E HENRY, J.L. Cellular mechanisms of hyperalgesia and spontaneous pain in a spinalized rat model of peripheral neuropathy: changes in myelinated afferent inputs implicated. **Eur. J. Neurosci.**, 12(6): 2006-2020, 2000.
- PITCHER, G.M. E HENRY, J.L. Meloxicam selectively depresses the afterdischarge of rat spinal dorsal horn neurones in response to noxious stimulation. **Neurosci. Lett.**, 305(1): 45-48, 2001.
- PITCHER, G.M. E HENRY, J.L. Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain. **Exp. Neurol.**, 186(2): 173-197, 2004.

- PITCHER, G.M. E HENRY, J.L. NSAID-induced cyclooxygenase inhibition differentially depresses long-lasting versus brief synaptically-elicited responses of rat spinal dorsal horn neurons in vivo. **Pain**, 82(2): 173-186, 1999.
- PRICE, D.D.; HU, J.W.; DUBNER, R.; GRACEY, R.H. Peripheral suppression of first pain and central summation of second pain evoked by noxious heat pulses. **Pain**, 3(1): 57-68, 1977.
- REEH, P.W. E KRESS, M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. **Curr. Opin. Pharmacol.**, 1(1): 45-51, 2001.
- RIGBY, A.S. E WOOD, P.H. A review of assignment criteria for rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol.**, 19(1): 27-41, 1990.
- RIOS, L. E JACOB, J.J. Inhibition of inflammatory pain by naloxone and its N methyl quaternary analogue. **Life Sci.**, 31(12-13): 1209-1212, 1982.
- ROCHFORD, J. E STEWART, J. Naloxone-induced hypoalgesia: lack of involvement of the GABA-benzodiazepine receptor complex. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 43(2): 321-328, 1992.
- ROH, D.H.; KIM, H.W.; YOON, S.Y.; SEO, H.S.; KWON, Y.B.; HAN, H.J.; BEITZ, A.J.; LEE, J.H. Depletion of capsaicin sensitive afferents prevents lamina-dependent increases in spinal N-methyl-d-aspartate receptor subunit 1 expression and phosphorylation associated with thermal hyperalgesia in neuropathic rats. **Eur. J. Pain**, 12(5): 552-563, 2008.
- RUEFF, A. E DRAY, A. 5-Hydroxytryptamine-induced sensitization and activation of peripheral fibres in the neonatal rat are mediated via different 5-hydroxytryptamine-receptors. **Neuroscience**, 50(4): 899-905, 1992.
- RUMORE, M.M. E SCHLICHTING, D.A. Analgesic affects of antihistamines. **Life Sci.**, 36(5): 403-416, 1985.
- RUMORE, M.M. E SCHLICHTING, D.A. Clinical efficacy of antihistamines as analgesics. **Pain**, 25(1): 7-22, 1986.
- RUSBRIDGE, C. E JEFFERY, N.D. Pathophysiology and treatment of neuropathic pain associated with syringomyelia. **Vet. J.**, 175(2): 164-172, 2008.
- RUSCHEWEYH, R. E SANDKÜHLER, J. Role of kainate receptors in nociception. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, 40(1-3): 215-22, 2002.
- SAEED, S.A.; KARIMI, S.J.; SURIA, A. Differential effects of dimethyl sulfoxide on human platelet aggregation and arachidonic acid metabolism. **Biochem. Med. Metab. Biol.**, 40(2): 143-150, 1988.
- SAMUELSSON, B.; DAHLEN, S.E.; LINDGREN, J.A.; ROUZER, C.A.; SERHAN, C.N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**, 237(4819): 1171-1176, 1987.

- SARIA, A.; JAVORSKY, F.; HUMPEL, C.; GAMSE, R. 5-HT₃ receptor antagonists inhibit sensory neuropeptide release from the rat spinal cord. **Neuroreport**, 1(2): 104-106, 1990.
- SASAKI, M.; OBATA, H.; KAWAHARA, K.; SAITO, S.; GOTO, F. Peripheral 5-HT_{2A} receptor antagonism attenuates primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia after thermal injury in rats. **Pain**, 122(1-2): 130-136, 2006.
- SCHAIBLE, H.; EBERSBERGER, A.; VON BANCHET, G.S. Mechanisms of pain in arthritis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 966: 343-354, 2002.
- SCHINKEL, A.H.; WAGENAAR, E.; MOL, C.A. VAN DEEMETER, L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. **J. Clin. Invest.**, 97(11): 2517-2524, 1996.
- SCHMELZ, M. E HANDWERKER, H.O. Itch. Em MCMAHON, S.B. e KOLTZENBURG, M. editors. **Wall and Melzack's Textbook of Pain** 5^a ed. Elsevier Churchill Livingstone, London: 219-227, 2006.
- SCHMELZ, M.; SCHMIDT, R.; BICKEL, A.; HANDWERKER, H.O.; TOREBJÖRK, H.E. Specific C-receptors for itch in human skin. **J. Neurosci.**, 17(20): 8003-8008, 1997.
- SCOTT, D.L. E HOUSSEIN, D.A. Joint assessment in rheumatoid arthritis. **Br. J. Rheumatol.**, 35(2): 14-18, 1996.
- SELTZER, Z. E SHIR, Y. Lack of sensitization of primary afferent receptors by prostaglandins in a rat model of causalgic chronic pains. **Agents Actions**, 25(3-4): 252-254, 1988.
- SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, 43(2): 205-218, 1990.
- SHERRINGTON, C.S. The integrative action of the nervous system. New Haven, Conn.: Yale University Press, 1906.
- SHIR, Y. E SELTZER, Z. A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. **Neurosci. Lett.**, 115(1): 62-67, 1990.
- SIMONE, D.A.; ALREJA, M.; LAMOTTE, R.H. Psychophysical studies of the itchy sensation and itchy skin ("alloknesis") produced by intracutaneous injection of histamine. **Somatosens. Mot. Res.**, 8(3): 271-279, 1991.
- SKARKE, C.; JARRAR, M.; SCHMIDT, H.; KAUERT, G.; LANGER, M.; GEISSLINGER, G.; LÖTSCH, J. Effects of ABCB1 (multidrug resistance transporter) gene mutations on disposition and central nervous effects of loperamide in healthy volunteers. **Pharmacogenetics**, 13(11): 651-660, 2003.

- SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J.; TOBIN, D.J. The cutaneous serotonergic/melatonergic system: securing a place under the sun. **FASEB J.**, 19(2): 176-194, 2005.
- SMITH, H.S. Arachidonic acid pathways in nociception. **J. Support. Oncol.**, 4(6): 277-287, 2006.
- SMITH, V.A.; BEYER, C.E.; BRANDT, M.R. Neurochemical changes in the RVM associated with peripheral inflammatory pain stimuli. **Brain Res.**, 1095(1): 65-72, 2006.
- SOMMER, C. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. **Mol. Neurobiol.**, 30(2): 117-25, 2004.
- STÄNDER, S.; MOORMANN, C.; SCHUMACHER, M.; BUDDENKOTTE, J.; ARTUC, M.; SHPACOVITCH, V.; BRZOSKA, T.; LIPPERT, U.; HENZ, B.M.; LUGER, T.A.; METZE, D.; STEINHOFF, M. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. **Exp. Dermatol.**, 13(3): 129-139, 2004.
- STEIN, C.; SCHÄFER, M.; MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nat. Med.**, 9(8): 1003-1008, 2003.
- STERNER, O. E SZALLASI, A. Novel natural vanilloid receptor agonists: new therapeutic targets for drug development. **Trends Pharmacol. Sci.**, 20(11): 459-465, 1999.
- SUFKA, K.J.; SCHOMBURG, F.M.; GIORDANO, J. Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 41(1): 53-56, 1992.
- SZALLASI, A. E BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol. Rev.**, 51(2): 159-212, 1999.
- SZALLASI, A.; CORTRIGHT, D.N.; BLUM, C.A.; EID, S.R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. **Nat. Ver. Drug Discov.**, 6(5): 357-372, 2007.
- TAIWO, Y.O. E LEVINE, J.D. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. **Neuroscience**, 48(2): 485-490, 1992.
- TAMBELI, C.H.; OLIVEIRA, M.C.; CLEMENTE, J.T.; PELEGRINI-DA-SILVA, A.; PARADA, C.A. A novel mechanism involved in 5-hydroxytryptamine-induced nociception: the indirect activation of primary afferents. **Neuroscience**, 141(3): 1517-1524, 2006.
- TAYLOR-CLARK, T.E.; UNDEM, B.J.; MACGLASHAN, D.W.; GHATTA, S.; CARR, M.J.; MCALEXANDER, M.A. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). **Mol. Pharmacol.**, 73(2): 274-281, 2008.

- TOKUNAGA, A.; SAIKA, M.; SENBA, E. 5-HT_{2A} receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. **Pain**, 76(3): 349-355, 1998.
- TREEDE, R.D.; MEYER, R.A.; CAMPBELL, J.N. Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties. **J. Neurophysiol.**, 80(3): 1082-1093, 1998.
- TREEDE, R.D.; MEYER, R.A.; RAJA, S.N.; CAMPBELL, J.N. Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. **J. Physiol.**, 483(3): 747-758, 1995.
- TREEDE, R.D.; MEYER, R.A.; RAJA, S.N.; CAMPBELL, J.N. Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. **J. Physiol.**, 483(Pt3): 747-758, 1995.
- TSURUOKA, M.; HIRUMA, Y.; WILLIS, W.D. The subnucleus reticularis dorsalis is involved in antinociception produced by a low dose of naloxone during carrageenan-induced inflammation. **Brain Res.**, 762(1-2): 264-268, 1997.
- TZABAZIS, A.; KLYUKINOV, M.; MANERING, N.; NEMENOV, M.I.; SHAFER, S.L.; YEOMANS, D.C. Differential activation of trigeminal C or Delta nociceptors by infrared diode laser in rats: behavioral evidence. **Brain Res.**, 1037(1-2): 148-56, 2005.
- UEDA, H.; FUKUSHIMA, N.; KITAO, T.; GE, M.; TAKAGI, H. Low doses of naloxone produce analgesia in the mouse brain by blocking presynaptic autoinhibition of enkephalin release. **Neurosci. Lett.**, 65(3): 247-252, 1986.
- VANEGAS, H. E SCHAIBLE, H.G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Prog. Neurobiol.**, 64(4): 327-363, 2001.
- VILLARREAL, C.F.; SACHS, D.; FUNEZ, M.I.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The peripheral pro-nociceptive state induced by repetitive inflammatory stimuli involves continuous activation of protein kinase A and protein kinase C epsilon and its Na(V)1.8 sodium channel functional regulation in the primary sensory neuron. **Biochem. Pharmacol.**, 77(5): 867-77, 2009.
- WALDMANN, R. Proton-gated cation channels--neuronal acid sensors in the central and peripheral nervous system. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 502, 293-304 2001
- WALLACE, M.S.; RIDGEWAY, B.^{3RD}; LEUNG, A.; SCHULTEIS, G.; YAKSH, T.L. Concentration-effect relationships for intravenous alfentanil and ketamine infusions in human volunteers: effects on acute thresholds and capsaicin-evoked hyperpathia. **J. Clin. Pharmacol.**, 42(1): 70-80, 2002.
- WHEELER-ACETO, H.; PORRECA, F.; COWAN, A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. **Pain**, 40(2): 229-238, 1990.

- WIESE, A.J.; MUIR, W.W.; WITTUM, T.E. Characteristics of pain and response to analgesic treatment in dogs and cats examined at a veterinary teaching hospital emergency service. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 226(12): 2004-2009, 2005.
- WU, S.; ZHU, M.; WANG, W.; WANG, Y.; LI, Y.; YEW, D.T. Changes of the expression of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by complete Freund's adjuvant-induced inflammation. **Neurosci. Lett.**, 307(3): 183-186, 2001.
- WÜSTER, M. E HERZ, A. Opiate agonist action of antidiarrheal agents in vitro and in vivo-findings in support for selective action. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, 301(3): 187-194, 1978.
- YEOMANS, D.C. E PROUDFIT, H.K. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence. **Pain**, 68(1): 141-150, 1996.
- YEOMANS, D.C.; PIREC, V.; PROUDFIT, H.K. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: behavioural evidence. **Pain**, 68(1): 133-140, 1996.
- YOSHIDA, A.; MOBARAKEH, J.I.; SAKURAI, E.; SAKURADA, S.; ORITO, T.; KURAMASU, A.; KATO, M.; YANAI, K. Intrathecally-administered histamine facilitates nociception through tachykinin NK1 and histamine H1 receptors: a study in histidine decarboxylase gene knockout mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 522(1-3): 55-62, 2005.
- YOUNG, R.; KHORANA, N.; BONDAREVA, T.; GLENNON, R.A. Pizotyline effectively attenuates the stimulus effects of N-methyl-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA). **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 82(2): 404-410, 2005.
- ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, 429(1-3): 23-37, 2001.

APÊNDICE A – Artigos publicado ou em edição

BASTOS, L.C.; TONUSSI, C.R. PGE(2)-induced lasting nociception to heat: Evidences for a selective involvement of A-delta fibres in the hyperpathic component of hyperalgesia. Eur. J. Pain, 2009 [Epub ahead of print]

BASTOS, L.C.; TONUSSI, C.R. The role of serotonin and opioids on the hyperpathic component of PGE2-induced hyperalgesia. (Manuscrito em fase de edição)