

Vanessa Foletto

**ENVOLVIMENTO DOS CANAIS DE POTÁSSIO MEDULAR NO EFEITO
ANTIEDEMATOGÊNICO DA MORFINA ADMINISTRADA POR VIA
INTRATECAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi.

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

S586e Silva, Vanessa Rafaella Foletto da
Envolvimento dos canais de potássio medular no efeito
antiedematogênico da morfina administrada por via intratecal
[dissertação] / Vanessa Rafaella Foletto da Silva ;
orientador, Carlos Rogério Tonussi. - Florianópolis, SC, 2011.
72 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Edema. 3. Medula espinhal. 4. Morfina.
5. Canais de Potássio. I. Tonussi, Carlos Rogério. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

Dedico essa conquista por onde tudo começou, meus pais Waldomiro e Zita.

Ao meu esposo André Pedrini, onde minha história se fez verdadeira.

E a você Betina, por quem agora tudo é possível.

AGRADECIMENTOS

A Carlos Rogério Tonussi que sem dúvida foi muito mais que um orientador, um amigo com quem pude contar, que me ensinou os verdadeiros “valores científicos” em uma carreira profissional.

À Maria Alcina que esteve sempre presente como amiga e parceira de experimentos, sendo esse projeto o fruto dessa união.

Aos meus parceiros de bancada, Eduardo e Taciane.

A todos os professores e alunos que me auxiliaram com enorme prontidão, em especial Prof. Jamil, Regina de Sordi, Eliziane Patrício, Cláudia e Ana Beatriz.

Aos animais que tornaram esse estudo possível, meu respeito.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

“Se fui capaz de ver mais longe, é porque me apoiei em ombros de gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

A medula espinhal tem sido considerada um potencial sítio de modulação da inflamação e não apenas uma simples linha de transmissão da periferia para o cérebro. O reflexo da raiz dorsal (RRD) caracterizado pela atividade antidrômica nas fibras aferentes primárias pode interferir na inflamação periférica. Neste contexto, estudos anteriores demonstraram que a administração de morfina intratecal resulta em efeito antiedematogênico com envolvimento da via L-arginina/ Óxido Nítrico (NO)/ GMPc. O presente estudo estende esses resultados a fim de avaliar a hipótese do envolvimento dos canais de potássio em tal efeito. As drogas foram injetadas na intratecal de ratos Wistar machos em volume de 20 μ L, 30 min antes do estímulo edematogênico da carragenina (CG -150 μ g/50 μ l, subcutâneo) na pata posterior direita. A avaliação do edema foi medido como aumento de volume da pata (ml) e pelo extravasamento plasmático pelo corante azul de Evans. A migração de neutrófilos foi avaliada indiretamente pelo ensaio da mieloperoxidase (MPO). A quantificação do infiltrado inflamatório e congestão vascular ocorreu através da análise histológica. A administração de morfina (37 nmol) inibiu o edema inflamatório, o extravasamento do corante azul de Evans e a congestão vascular. Entretanto, não teve efeito na atividade da MPO e no infiltrado inflamatório. A coadministração da morfina (37 nmol) com 4-aminopiridina (10 nmol), Glibenclamida (5 nmol) e Dequalinium (10 pmol) reverteu o efeito inicial da morfina. Estes resultados suportam a idéia de que a morfina pode atuar em receptores opióides medular produzindo efeito antiedematogênico, mediado pela abertura de canais de potássio, via NO/GMPc.

Palavras-chave: Edema. Reflexo da Raiz Dorsal. Morfina. Canais de Potássio.

ABSTRACT

The spinal cord has been considered as a potential modulation site of inflammation and not just a simple transmission line from the periphery to the brain. The dorsal root reflex (RRD) characterized by antidromic activity in the primary afferents fibers can modulate the peripheral inflammation. In this context, previous studies showed that administration of morphine results in anti-edematogenic effect with involvement of L-arginine / nitric oxide (NO) / cGMP. This study extends these findings to assess the hypothesis of the involvement of potassium channels in this effect. The intrathecal drugs were injected in male Wistar rats (250-350 g) in a volume of 20 μ L and 30 min after it received carrageenan (150 μ g/50 μ l, subcutaneous) in the left hindpaw. The evaluation of edema was measured as increase in paw volume (ml) and with the plasma extravasation of Evans blue staining. The migration of neutrophils was assessed indirectly by testing the myeloperoxidase (MPO). The quantification of inflammatory infiltrate and vascular congestion were quantified by histological analysis. The administration of morphine (37 nmol) inhibited the edema, Evans blue dye leakage and vascular congestion. However, had no effect on the inflammatory infiltrate and on the MPO activity in comparison to vehicle group. The coadministration of morphine (37 nmol) with 4-aminopyridine (10 nmol), glibenclamide (5 nmol) and Dequalinium (10 pmol) reversed the effect of morphine. These results support the idea that morphine can act on spinal opioid receptors to produce antiedematogenic effect in periphery, mediated by the opening of potassium channels via NO/cGMP.

Keywords: Edema. Dorsal root reflex. Morphine. Potassium channel.

LISTA DE FIGURAS

1.1	Ilustração do Reflexo Axonal e do Reflexo da Raiz Dorsal _____	29
3.1	Figura e Foto ilustrativa da injeção intratecal _____	36
3.2	Foto ilustrativa da mensuração do edema de pata _____	37
3.3	Protocolo experimental _____	40
4.1	Efeito da morfina intratecal no aumento de volume de pata _____	41
4.2	Efeito da administração da morfina intratecal no extravasamento plasmático _____	42
4.3	Avaliação da administração da morfina intratecal na atividade da enzima mieloperoxidase _____	43
4.4	Avaliação da administração da morfina intratecal no infiltrado inflamatório e congestão vascular _____	44
4.4.1	Análise comparativa do efeito da morfina intratecal no infiltrado inflamatório e congestão vascular _____	45
4.5	Efeito dependente de dose do bloqueador de canal de potássio, dequalinium no aumento do volume de edema de pata induzido por carragenina _____	46
4.6	Efeito dependente de dose do bloqueador de canal de potássio, 4-Aminopiridina no aumento do volume de edema de pata induzido por carragenina _____	47
4.7	Efeito dependente de dose do bloqueador de canal de potássio, Glibenclamida no aumento do volume de edema de pata induzido por carragenina _____	48
4.8	Reversibilidade do efeito antiedematogênico da morfina intratecal pelo Dequalinium, 4 - Aminopiridina e Glibenclamida _____	50
6.1	Modelo esquemático da ação da morfina intratecal sobre a inflamação periférica _____	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MPO	mieloperoxidase
SP	substância P
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
VIP	polipeptídeo vasoativo intestinal
RRD	reflexo da raiz dorsal
PAD	despolarização do aferente primário
GABA	gama aminobutírico
NMDA	N-metil-D-aspartato
SNC	sistema nervoso central
NO	óxido nítrico
CG	carragenina
NOS	óxido nítrico sintase
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
K_v	canal de potássio voltagem dependente
K_{Ca}	canal de potássio ativado por Ca^{2+}
SK_{Ca}	canal de potássio ativado por Ca^{2+} de baixa condutância
IK_{Ca}	canal de potássio ativado por Ca^{2+} de intermediária condutância
BK_{Ca}	canal de potássio ativado por Ca^{2+} de alta condutância
K_{ATP}	canal de potássio sensível ao ATP
K_{IR}	canal de potássio retificador
4-AP	4-aminopiridina
TEA	tetraetilamônio
it	iintratecal
sc	subcutânea

LISTA DE SÍMBOLOS

Cl ⁻	ión cloreto
Na ⁺	sódio
K ⁺	potássio
Ca ²⁺	cálcio
μ	mu
δ	delta
κ	kappa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	INFLAMAÇÃO	23
1.1.1	Inflamação aguda	23
1.1.2	Eventos vasculares	23
1.1.3	Eventos celulares	24
1.1.4	Mediadores químicos	25
1.1.5	Mediadores neurogênicos	26
1.2	REFLEXO DA RAIZ DORSAL	28
1.3	OPIÓIDES E O EDEMA INFLAMATÓRIO	30
1.4	CANAIS DE POTÁSSIO	31
2	OBJETIVOS	33
2.2	OBJETIVOS GERAIS	33
2.2	Objetivos Específicos	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	ANIMAIS	35
3.2	INJEÇÃO INTRATECAL	35
3.3	MODELO EXPERIMENTAL: EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	36
3.4	MENSURAÇÃO DO EDEMA DE PATA	36
3.5	AVALIAÇÃO DO EXTRAVASSAMENTO PLASMÁTICO	37
3.6	DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE	37
3.7	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	38
3.8	FÁRMACOS UTILIZADOS	39
3.9	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	39
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4	RESULTADOS	41
4.1	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA INTRATECAL NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	41
4.2	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA INTRATECAL NO EXTRAVASSAMENTO PLASMÁTICO	42
4.3	AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA INTRATECAL NA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE	42
4.4	AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA INTRATECAL NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO E CONGESTÃO VASCULAR	43
4.5	EFEITO DEPENDENTE DE DOSE DO BLOQUEADOR DE CANAL DE POTÁSSIO, DEQUALINIUM, NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	46

4.6	EFEITO DEPENDENTE DE DOSE DO BLOQUEADOR DE CANAL DE POTÁSSIO, 4- AMINOPIRIDINA, NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA _____	47
4.7	EFEITO DEPENDENTE DE DOSE DO BLOQUEADOR DE CANAL DE POTÁSSIO, GLIBENCLAMIDA, NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA _____	48
4.8	REVERSIBILIDADE DO EFEITO ANTIEDEMATOGÊNICO DA MORFINA INTRATECAL PELOS BLOQUEADORES DE CANAIS DE POTÁSSIO DEQUALINIUM, 4-AMINOPIRIDINA E GLIBENCLAMIDA _____	49
5	DISCUSSÃO _____	51
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	59
	REFERÊNCIAS _____	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação é um mecanismo fisiopatológico em resposta à invasão por um agente infeccioso, ou por uma lesão de origem variada (térmica, química, física ou mecânica), ou ainda mesmo por uma reação autoimune, que resulta em um conjunto de reações locais e gerais do organismo. Este processo é composto por vários fenômenos que se associam e se complementam uns aos outros formando uma reação em cascata que envolve uma complexa interação das células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, monócitos/macrófagos, plaquetas) e vasculares (endoteliais e células da musculatura lisa) (TEDGUI; MALLAT, 2001).

A resposta inflamatória tem por objetivo destruir, diluir ou isolar o agente lesivo, sendo, portanto, uma reação de defesa, e posteriormente de reparação do dano tecidual. Ela ocorre no tecido conjuntivo vascularizado, no plasma, nas células circulantes, nos vasos sanguíneos e nos componentes extravasculares do tecido conjuntivo. As células circulantes incluem neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. Na reparação, o tecido agredido é substituído pela regeneração de células parenquimatosas ou por tecido fibroblástico (CHANDRASSOMA; TAYLOR, 1993).

Este processo inflamatório divide-se em agudo e crônico.

1.1.1 Inflamação Aguda

A inflamação aguda tem um curso relativamente curto, abrangendo alguns minutos, horas ou dias e é independente da natureza do agressor, com resposta muito similar, mesmo em grande variedade de estímulos (SIQUEIRA JÚNIOR; DANTAS, 2000) com a caracterização de sinais cardinais de calor, rubor, dor e edema. Estes sinais ocorrem devido ao aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular, exsudação leucocitária, liberação de agentes álgicos e mediadores químicos da inflamação (CÔTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; RANG et al., 2007).

Este mecanismo é retratado por três eventos principais, sendo: as alterações no calibre vascular, as mudanças estruturais na microvasculatura e a emigração de leucócitos da microcirculação ao foco de agressão (MEDEIROS et al., 1995; CÔTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000), sendo estes denominados em eventos vasculares e celulares.

1.1.2 Eventos Vasculares

Os eventos vasculares ocorrem imediatamente após um estímulo inflamatório e compreendem alterações do fluxo e do calibre dos vasos sanguíneos.

Inicialmente ocorre uma vasoconstrição em arteríolas e vênulas seguida de uma vasodilatação, que envolve em primeiro plano as arteríolas e em seguida a abertura de novos leitos capilares na região. Essa reação gera um aumento do fluxo sanguíneo, responsável pelo calor e rubor (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

A estase do sangue no foco inflamatório associada ao aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilares tem como consequência a exsudação de líquido plasmático do sangue para os tecidos.

Este extravasamento de líquido, rico em proteínas plasmáticas, reduz a pressão osmótica intravascular e aumenta a pressão osmótica do líquido intersticial. Este fenômeno, associado ao aumento da pressão hidrostática secundária a vasodilatação, contribui para a saída de líquido do sangue para o meio intersticial formando o edema inflamatório (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). Líquido que atravessa para o interstício devido a contração das células endoteliais, principalmente em vênulas, que leva à formação de lacunas (gaps) intercelulares e alargamento da junção intercelular. Esse fenômeno ocorre em virtude da contração ativa dos filamentos de actina e miosina das células endoteliais. O mecanismo é desencadeado pela histamina, bradicinina e outras classes de mediadores químicos (GARCIA LEME; HAMAMURA, 1974; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Em seguida ocorre o desencadeamento dos eventos celulares.

1.1.3 Eventos Celulares

Quando o sangue flui normalmente, as células sanguíneas seguem por um eixo axial, e o plasma segue pela periferia em contato com o endotélio. A diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo, ocasionada pela vasodilatação durante a inflamação, faz com que os leucócitos entrem em contato com a parede dos capilares e vênulas. Esse processo é chamado marginação (ALI et al., 1997).

Após a marginação, os leucócitos isolados colocam-se em fileiras e deslocam-se lentamente ao longo do endotélio no processo chamado rolagem. Após esse processo os leucócitos aderem à superfície endotelial. A adesão leucocitária é em grande parte determinada pela ligação entre as moléculas de adesão complementares nos leucócitos e nas superfícies endoteliais. Os mediadores químicos e agentes inflamatórios afetam esse processo por promoverem uma modulação na expressão superficial ou na avides destas moléculas de adesão, resultando em maior adesividade. Alguns agentes atuam, nos leucócitos, outros, sobre as células endoteliais e outros, ainda, em ambos os tipos celulares (ALI et al., 1997).

Nos leucócitos não estimulados, glicoproteínas de adesão encontram-se presentes em vesículas intracelulares e na superfície celular. Certos mediadores inflamatórios estimulam um aumento rápido dessas proteínas da superfície leucocitária, resultando em maior adesividade ao endotélio (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Depois da firme adesão os leucócitos lançam pseudópodos nas junções endoteliais e passam a se posicionar entre as células endoteliais e a membrana basal. Por fim, atravessam a membrana basal e escapam para o espaço extravascular, este processo é denominado emigração. Isso acontece com neutrófilos, basófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos (ALI et al., 1997).

Após, o extravasamento, os leucócitos migram nos tecidos para à região da agressão por um processo chamado quimiotaxia. Todos os granulócitos, monócitos e, em menor grau, os linfócitos respondem a estímulos quimiotáticos com taxas variáveis de velocidade (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Os neutrófilos merecem destaque neste processo inflamatório agudo por representarem a primeira linha de defesa (NAUSEEF, 2007). Os neutrófilos contêm quatro compartimentos intracelulares cujo conteúdo pode ser secretado durante a ativação celular: grânulos primários (azurófilos), grânulos secundários (específicos), grânulos terciários e as vesículas secretoras. Nos grânulos primários encontram-se os principais componentes citotóxicos desse sistema fagocitário, destacando-se a enzima mieloperoxidase (MPO) (PLIYEV, 2008).

A mieloperoxidase é expressa em grande quantidade nos neutrófilos e, em menor quantidade, nos monócitos ou macrófagos, participando da resposta inata pela formação de oxidantes e espécies reativas de oxigênio (MALLE et al., 2007). É visto que a MPO é um importante marcador de neutrofilia na inflamação e sepse (FAITH et al., 2007).

Tanto os eventos vasculares quanto celulares são controlados (desencadeado, conduzido e extinto) pela presença de um grupo de substâncias, os mediadores químicos, cada um com um papel específico atuando em estágios definidos da reação inflamatória. Estes mediadores podem ser exógenos e endógenos (DE PAOLA, 1988).

1.1.4 Mediadores Químicos

A sequência exata de aparecimento dos vários mediadores químicos e a dependência ou independência entre eles ainda é muito especulativa, e muitos mediadores químicos ainda serão identificados e suas funções nessa orquestra serão compreendidas (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Os mediadores podem originar-se do plasma, das células e do tecido agredido. Sendo divididos nos seguintes grupos: aminas vasoativas (histamina e serotonina); proteases plasmáticas (sistema de cinina: bradicinina, sistema complemento, sistema de coagulação - fibrinolítico); metabólitos do ácido araquidônico (via cicloxigenase, via lipoxigenase); proteases lisossômicas; radicais livres derivados do oxigênio; fatores ativadores das plaquetas (FAP); citocinas e óxido nítrico (NO) (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; RANG et al., 2007).

Neste contexto, há de se evidenciar a participação ativa das células neuronais no processo inflamatório, que não somente conduzem os estímulos dos tecidos lesados para o sistema nervoso central, como também secretam substâncias neuropeptídicas através de suas terminações periféricas, sendo essas substâncias consideradas como mediadores do componente neurogênico da inflamação nos tecidos periféricos (MAGGI; MELLI, 1988; FANTINI et al., 1995).

1.1.5 Mediadores Neurogênicos

A participação então dos neurônios sensoriais como secretores de substâncias que podem interferir no processo inflamatório periférico ocorre pela ação vasodilatadora arteriolar e pelo aumento da permeabilidade vascular (SZOLCSÁNYI, 1988), fatores provedores da formação do edema no processo inflamatório.

Os terminais aferentes primários iniciam essa participação liberando peptídeos vasoativos, denominados de substância P (SP), neurocinina A, B e K (NKA, NKB e NKK), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e o polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) (HOLZER, 1988; MAGGI, 1995; MEYER et al., 2006).

Em 1931, von Euler e Gaddum descreveram pela primeira vez a substância P. Atualmente, muitas evidências vêm se acumulando sugerindo que este undecapeptídeo, pertencente à família das taquicininas, é liberado de certas fibras sensoriais atuando como um neurotransmissor ou neuromodulador (OTSUKA; YOSHIOKA, 1993). A SP é o agonista de maior afinidade dentre as taquicininas para o receptor NK1, enquanto que NKA e NKB, exibem alta afinidade pelos receptores NK2 e NK3, respectivamente (REGOLI et al., 1994). Essas taquicininas causam extravasamento plasmático (LEMBECK; HOLZER, 1979; FERRELL; RUSSELL, 1986; JACQUES et al., 1989).

O efeito edematogênico da SP que é prevenido por antagonistas de receptor NK1 (LEMBECK et al., 1992) ocorre através de um efeito direto na vasculatura onde libera NO de células endoteliais (WEIDNER, 2000) resultando em efeito vasodilatador 100 vezes superior à histamina em idênticas concentrações molares (FOREMAN, 1987), ou indiretamente pela liberação de histamina dos mastócitos (MEYER et al., 2006). Outras ações da SP liberada periféricamente incluem o aumento da proliferação e da função das células T (PAYAN et al., 1983); ativação da produção de citocinas pelos mastócitos (JEURISSEM et al., 1994) e aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (NAKAGAWA et al., 1993). Alternativamente, pode haver mobilização de ácido araquidônico, via fosfolipase A2 e também aumento de monofosfato de adenosina cíclico, via adenilato ciclase (MITSUHASHI et al., 1994).

Altas concentrações de SP e de seu receptor preferencial NK1 são encontradas em fibras aferentes primárias (KURASHI et al., 1989; HANESCH et al., 1993). Além disso, as taquicininas participam nos interneurônios no corno dorsal da

medula espinhal, sugerindo um importante envolvimento da SP na modulação do sistema nervoso (BATTAGLIA; RUSTIONI, 1988; NOGUSHI; RUDA, 1992; CUELLO et al., 1993).

A SP está frequentemente presente num mesmo neurônio com o CGRP, e a liberação de SP pode provocar a co-liberação de CGRP ou, adicionalmente, mais SP (WALLENGREN, 1987).

O CGRP é encontrado nos nervos perivasculares e induz uma intensa vasodilatação mais lenta, progressiva e de maior duração comparada a SP (SCHOLZEN et al., 1998; WALLENGREN, 1997) por ação em receptores específicos (CGRP1R e CGRP2R) acoplados a proteína G (AIYOR; RAND; ELSHOURBAGY, 1996; LUEBKE et al., 1996; NAGHASHPOUR et al., 1997) mediante mecanismos tanto dependentes quanto independentes de óxido nítrico (WEIDNER et al., 2000; BULL et al., 1996; GOLDSMITH et al., 1996; RALEVIC et al., 1992). Sua habilidade para liberar histamina de mastócitos é fraca ou mesmo nula (WEIDNER et al., 2000; HUTTUNEN, et al. 1996). Entretanto, ele potencializa a formação de edema induzida por IL-1 e IL-8, aumenta a expressão e síntese de IL-8 em células endoteliais (ANSEL et al., 1997), é quimiotático para neutrófilos (CAPPUGI, et al. 1990) e aumenta a translocação de selectina P e a expressão de ELAM-1 (molécula de adesão) (HSIEH; LIN, 1999).

O peptídeo vasoativo intestinal (VIP) é liberado na inervação da derme e epiderme, folículos pilosos, glândulas sudoríparas, células de Merkel e em nervos perivasculares (LOTTI et al., 1995; HARTSCHUH et al., 1983). Mastócitos, leucócitos polimorfonucleares e eosinófilos também são fontes de VIP na pele (LOTTI et al., 1995). O VIP interage com vários receptores, tanto na pele quanto em outros sistemas, com afinidade variável (HARMAR e LUTZ, 1994).

A aplicação intradérmica de VIP induz a formação de pápula via liberação de histamina mastocitária (LOWMAN et al., 1988) e vasodilatação por relaxamento da musculatura lisa de vasos sanguíneos (WALLENFREN, 1997; NILSOON e MAEPEA, 1987). Mastócitos respondem ao VIP com rápida liberação de histamina (independente de IgE). A pápula eritematosa formada após injeção intradérmica é comparável àquela obtida com SP (HUTTUNE et al., 1994).

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

1.2 REFLEXO DA RAIZ DORSAL

Como paradigma da transmissão de uma informação sensorial para o sistema nervoso central através do corno dorsal da medula espinhal, pelas raízes dorsais, a atividade motora emerge a partir do corno ventral. Entretanto, sob algumas circunstâncias uma atividade pode ser detectada emergindo da medula espinhal através das raízes dorsais, ou seja, percorrendo de forma antidrômica as fibras sensoriais primárias. Esse achado foi descrito primeiramente por Gotch e Horsley em 1891 e depois redescoberto por Matthews em 1934 e Barron e Matthews em 1935. Esta descarga direta para trás de Gotch e Horsley tem sido objeto de investigações e é relatada como Reflexo da Raiz Dorsal (RRD) (WILLIS, 1999) que modula a inflamação ao causar a liberação de peptídeos vasoativos e possivelmente prostaglandina E2 (SLUKA et al., 1995b; AVERBECK et al., 2001 e CHOPRA et al., 2000) dos nociceptores nos tecidos periféricos, as quais contribuem para o processo inflamatório.

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

A inibição pré-sináptica e a PAD podem ser bloqueadas por antagonistas de receptores GABA_A , implicando a participação de interneurônios que liberam o ácido gama aminobutírico (GABA) nestes processos. A razão pelas quais os terminais aferentes são despolarizados explica-se pela alta concentração de íons Cl^- nos neurônios aferentes primários. A ativação desses receptores GABA_A permitem o efluxo destes íons, resultando em despolarização. A alta concentração de íons Cl^- no interior destas células é mantida por um cotransportador de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$, o NKCC1, que carrega dois íons Cl^- , um Na^+ e um K^+ através da membrana celular para dentro do citoplasma (WILLIS, 1999; WILLIS, 2006).

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

A manipulação espinhal de alguns neurotransmissores pode modular a despolarização das fibras aferentes e consequentemente modificar um evento

inflamatório periférico (REES et al., 1994). O bloqueio espinal de receptores GABA_A (SLUKA et al., 1993) e não-NMDA (N-metil-D-aspartato) (SLUKA et al., 1994) reduziram o edema em articulação inflamada com carragenina. O bloqueio de receptores não-NMDA também aboliu quase completamente os reflexos da raiz dorsal e preveniu o flare (região avermelhada ao redor do sítio de lesão) e o edema causados por injeção intradérmica de capsaicina (LIN et al., 1999). Uma possível explicação para este fato é que os terminais centrais dos aferentes primários liberam aminoácidos excitatórios, como o glutamato, o qual ativa receptores não-NMDA nos interneurônios GABAérgicos, causando, então, liberação de GABA que irá agir em receptores localizados nos terminais centrais dos aferentes primários (Figura 1) (SLUKA et al., 1995b; WILLIS, 1999).

Os receptores NMDA também estão presentes nestes terminais aferentes, mas são considerados auto-receptores, por responderem mais à liberação de glutamato dos próprios aferentes do que ao glutamato liberado de interneurônios (WILLIS, 1999).

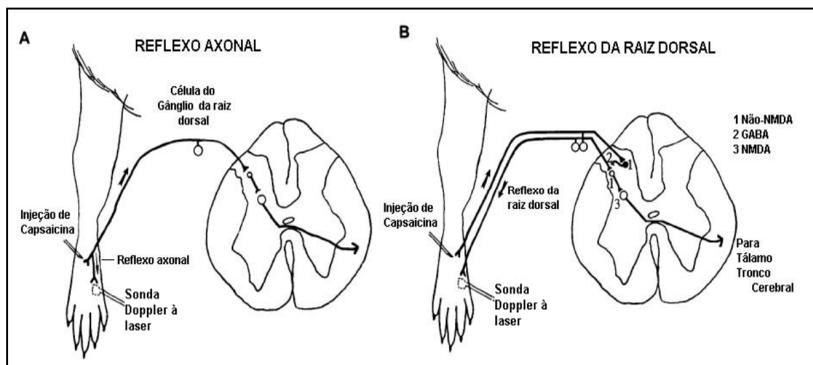


Figura 1.1: Ilustração do Reflexo Axonal e do Reflexo da Raiz Dorsal. Em **A**, a injeção intradérmica de capsaicina causa vasodilatação local por um mecanismo denominado reflexo axonal, bem como ativação da via nociceptiva na medula. Em **B**, a injeção de capsaicina ativa circuitos medulares que resultam no reflexo da raiz dorsal, o qual produz vasodilatação na região adjacente à lesão. O circuito do corno dorsal envolve receptores de glutamato não-NMDA e receptores GABA_A, e a informação nociceptiva é transmitida para neurônios de projeção via ativação de receptores NMDA (Modificado de WILLIS, 1999).

Estudos imunohistoquímicos mostram que os terminais centrais dos neurônios aferentes primários no corno dorsal da medula espinhal são imunopositivos para o glutamato, mas não para o GABA (DE BIASI; RUSTIONI, 1990; PHEND et al., 1992).

Estes dados estão de acordo com a explicação de que os terminais aferentes liberam glutamato no corno dorsal da medula espinhal, que irá agir nos

interneurônios. Por outro lado, a maioria dos interneurônios são imunopositivos para GABA (TODD; MCKENZIE, 1989). Morfologicamente, a interação dos interneurônios GABAérgicos com os terminais aferentes ocorre via sinapses axoaxônicas ou dendroaxônicas, sendo estes interneurônios pré-sinápticos, ou seja, seu conteúdo é liberado e age nas fibras dos terminais aferentes, considerados neste caso como pós-sinápticos (BARBER et al., 1978; BERNARDI et al., 1995).

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

1.3 OPIÓIDES E O EDEMA INFLAMATÓRIO

Os receptores opióides estão amplamente expressos no sistema nervoso central e sua ativação resulta em potente analgesia via inibição da transmissão nociceptiva ascendente excitatória e ativação de sistemas de inibição descendente (FIELDS et al, 2006; YAKSH, 2006). Na periferia os receptores estão localizados nos corpos celulares do gânglio da raiz dorsal das fibras aferentes primárias (WANG e WESSENDORF, 2001) com expressão também nos terminais periféricos dos neurônios aferentes primários (STEIN, 1995 e 2001).

Estudos farmacológicos identificaram os três principais subtipos de receptores opióides, sendo então o Mu (μ), o delta (δ) e o kappa (κ). Estes receptores possuem sete domínios transmembrana, são acoplados a proteína G e compartilham de homologia na sua estrutura. As endorfinas são os ligantes endógenos do receptor do tipo μ , ao qual a morfina se liga com grande afinidade. As encefalinas ligam-se aos receptores δ com grande afinidade. As dinorfinas ligam-se aos receptores κ . Os peptídeos opióides não se ligam exclusivamente a um tipo de receptor, mas apresentam afinidade maior ou menor por um determinado tipo (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001).

O papel dos receptores opióides localizados no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico, na dor inflamatória está bem estabelecido. Entretanto, é demonstrado que agonistas de receptores μ opióides podem reduzir outras manifestações da inflamação, como o edema, cujo mecanismo de ação é ainda

incerto (JORIS et al., 1990; PERROT et al., 1999; WHITESIDE et al., 2005; BROCK; TONUSSI, 2008; BOETTGER et al., 2010).

A inflamação pode modular a função desses receptores periféricos (SELLY et al., 1993; INGRAM; WILLIAMS, 1994; ANTONIJEVIC et al., 1995; MOUSA, 2003; ZOLLNER et al., 2003) e a administração sistêmica de morfina produz redução substancial do extravasamento (HARGREAVES et al., 1988; JORIS et al., 1990) e do edema (HARGREAVES et al., 1988; JORIS et al., 1990; SACERDOTE et al., 1996; WALKER et al., 1996; ALEBOUYEH et al., 2002; AMANN et al., 2002; WHITESIDE et al., 2005). Este efeito antiedematogênico é visto também pela administração de morfina intratecal em modelo de carragenina na pata (BROCK; TONUSSI, 2008) e em modelo de artrite induzida por antígeno (BOETTGER et al., 2010), o que não foi visto pela administração local (WHITESIDE et al., 2005).

A habilidade da morfina, atuando diretamente em neurônio nociceptor periférico, em bloquear a hipernocicepção inflamatória é consequente a estimulação do NO e abertura de canal K_{ATP} (CUNHA et al., 2010). A via do efeito antiedematogênico da morfina intratecal ainda é inconclusiva, mas já se demonstra o envolvimento da via L-arginina/NO/GMPc (BROCK; TONUSSI, 2008). E em contrapartida do mecanismo analgésico da morfina pode haver envolvimento também dos canais de potássio no efeito e antiedematogênico.

1.4 CANAIS DE POTÁSSIO

Os canais de potássio ocupam papel importante no potencial de membrana das células excitáveis sendo um dos canais iônicos mais amplamente distribuídos, que podem ser encontrados na membrana plasmática de quase todas as células animais, fundamentalmente mantendo o potencial de membrana onde através da sua abertura, irá restabelecer o potencial de repouso, repolarizando e portanto finalizando o período do potencial de ação, disparado anteriormente (GRISMER et al., 1997).

A atividade dos canais de K^+ é em grande parte controlada por ações que influenciam as proteínas do canal. Alguns canais de K^+ são constitutivamente ativos, mas a maior parte deles agem transitoriamente, sendo abertos por sinais fisiológicos como neurotransmissores ou segundos mensageiros. Esses canais pertencentes a uma família de proteínas de membrana, e são classificados em quatro tipos: 1) canais de potássio sensíveis à voltagem (K_v); 2) canais de potássio ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}), incluindo os de baixa (SK_{Ca}), intermediária (IK_{Ca}) e alta condutância (BK_{Ca}); 3) canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e; 4) canais de potássio retificadores (K_{IR}) (JACKSON, 2005; BARANOWSKA et al., 2007).

Os canais de potássio possuem bloqueadores como a glibenclamida que é um bloqueador de canais K_{ATP} , a 4-aminopiridina (4-AP) um bloqueador de canais K_v , o dequalinium um bloqueador de canal SK_{Ca} e o tetraetilamônio (TEA) um bloqueador inespecífico. Esses canais são modulados por segundos mensageiros, cujo mecanismo

mais comumente envolvido, é a fosforilação e desfosforilação (CATTERAL et al., 1991). Evidências ainda apontam que o NO indireta ou diretamente seria capaz de ativar múltiplos tipos de canais de potássio (KOH et al., 1995; BOLOTINA et al., 1994; ARCHER et al., 1994).

O NO é um gás difusível envolvido em numerosos processos biológicos no sistema cardiovascular, imune e nervoso. A produção do NO ocorre por meio de uma reação catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS): neuronal (nNOS ou NOS1), induzida (iNOS ou NOS2) ou endotelial (eNOS ou NOS3). A NOS utiliza como substrato a L-arginina, resultando em L-citrulina e NO (MARLETTA, 1993). O processo requer oxigênio molecular, dinucleotídeo nicotinamida adenina fosfato (reduzida) (NADPH) e co-fatores como mononucleotídeo de flavina (FMN), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), heme, e tetrahidrobiopterina (BH4). Além disso, o Ca^{2+} é requerido para a ativação das isoformas constitutivas. O NO formado, facilmente se difunde pelas células ou pelas membranas celulares, e está envolvido na ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão de GTP em GMPc. O GMPc é um segundo mensageiro que pode atuar através de proteínas quinases ou diretamente em canais iônicos, promovendo diversos efeitos conforme o tipo de célula e tecido (IGNARRO et al., 1992; MONCADA e HIGGS, 1991), caracterizando assim a modulação dos canais de K^+ de forma indireta pelo NO pela ativação de proteínas quinases dependentes de GMPc (ARCHER et al., 1994).

O mecanismo de ativação direta do canal de potássio pelo NO pode envolver a S-nitrosilação de resíduos críticos de cisteína. A S-nitrosilação modificaria a estrutura das proteínas por interação direta ou oxidação de tióis vicinais, resultando em diversos efeitos biológicos (BOLOTINA et al., 1994).

A ativação de canais de potássio permitindo um efluxo de K^+ da célula, promove redução do potencial de membrana, e hiperpolarização (NELSON; QUAYLE, 1995; JACKSON, 1998).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi investigar qual o envolvimento dos canais de potássio medular no efeito antiedematogênico da morfina administrada por via intratecal em ratos, através do modelo de edema de pata induzido por carragenina.

2.1.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da injeção intratecal de morfina sobre o edema e o extravasamento plasmático induzido por carragenina na pata de ratos;

Avaliar o efeito da injeção intratecal de morfina sobre a migração de neutrófilos através da atividade da enzima mieloperoxidase.

Avaliar o efeito da injeção intratecal de morfina sobre o infiltrado inflamatório vascular induzida por carragenina na pata de ratos;

Verificar o efeito da injeção intratecal de morfina sobre a congestão vascular induzida por carragenina na pata de ratos;

Verificar o efeito da injeção intratecal de um bloqueador de canal de potássio voltagem dependente (4-aminopiridina) co-administrado por via intratecal com morfina sobre o edema induzido por carragenina na pata de ratos;

Verificar o efeito da injeção intratecal de um bloqueador de canal de potássio sensível ao ATP (Glibenclamida) co-administrado por via intratecal com morfina sobre o edema induzido por carragenina na pata de ratos;

Verificar o efeito da injeção intratecal de um bloqueador de canal de potássio de baixa condutância (Dequalinium) co-administrado por via intratecal com morfina sobre o edema induzido por carragenina na pata de ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos e pesando entre 250-350 gramas. Os ratos oriundos do Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB, UFSC) eram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia após o desmame e, posteriormente, para o biotério do Laboratório de Neurobiologia da Nociceção (LANEN). No LANEN, os ratos foram agrupados em caixas contendo 5 animais e mantidos sob temperatura controlada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro (12 horas de claro e 12 horas de escuro) com à água e ração *ad libitum*. Como tratamento profilático os animais foram desvermifugados com albendazol dissolvido em água (0,4 mg/ml; total de 500 ml/5 ratos), durante 5 dias consecutivos ao completarem 45 dias. Não foram observadas alterações nos experimentos devido ao tratamento prévio. Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 14:00 horas, após ambientação prévia dos ratos por pelo menos 1 hora na sala de experimento. Todos os experimentos foram realizados seguindo os preceitos éticos definidos pela Associação Internacional para Estudo da Dor e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo 23080.016328/2010-81. Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de ratos utilizados nos experimentos.

3.2 INJEÇÃO INTRATECAL

A injeção de fármacos pela via intratecal foi realizada segundo o método descrito por Mestre et al. (1994). Neste procedimento, os animais foram previamente anestesiados com isofluorano (2% em oxigênio hospitalar) e, em seguida, uma agulha 29 gauge, 12,7 mm de comprimento (Seringa BD Ultra Fine®) foi cuidadosamente inserida perpendicularmente entre as vértebras L5 e L6 (Figura 3.1). Um leve bater de cauda (flick) foi observado quando a agulha entrava no espaço subaracnóideo indicando que o canal vertebral foi atingido corretamente e assim, a injeção era concluída. O procedimento de injeção intratecal era experimentado apenas uma vez. Caso não houvesse “flick” na primeira tentativa de injeção, o animal era excluído do experimento. O volume máximo injetado no espaço intratecal foi de 20 μl .

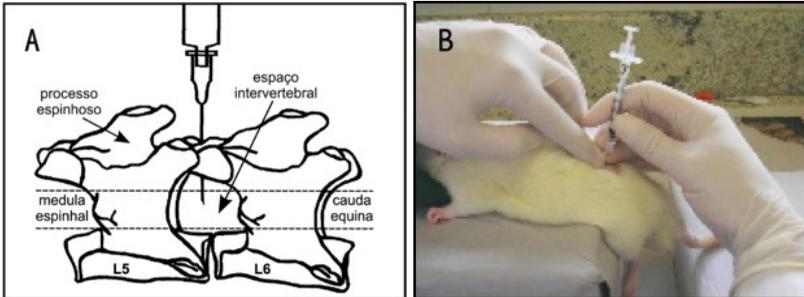


Figura 3.1: (A) Figura ilustrativa da injeção intratecal. O diagrama mostra o local de inserção da agulha no espaço intervertebral entre L5 e L6. Adaptado por Bressan, 2010 de Mestre et al., 1994. (B) Foto ilustrativa da administração intratecal.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL: EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

O edema de pata induzido pela carragenina é um modelo útil para avaliar a contribuição dos mediadores envolvidos nas mudanças vasculares e celulares associadas com a inflamação aguda (SALVEMINI et al., 1996; GARCIA-GONZALEZ et al., 2000). Embora o edema da pata alcance o pico por volta de 3 a 4 horas, persiste por mais de 12 horas depois da injeção da carragenina (SALVEMINI et al., 1996; GARCIA-GONZALEZ et al., 2000).

Utilizou-se o modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos, proposto por Winter et al., 1962. A carragenina (tipo kappa/lambda, BDH Chemicals Ltd., UK) foi diluída em PBS a uma concentração de 3 mg/ml. Os animais receberam 50 μ l (150 μ g) de carragenina intraplantar da pata posterior direita 30 minutos após a injeção intratecal. Para a administração, os ratos foram imobilizados em um cone de borracha macio apenas o período necessário para a aplicação do agente flogístico.

3.4 MENSURAÇÃO DO EDEMA DE PATA

O edema de pata induzido pela injeção de carragenina foi avaliado com auxílio de uma cubeta (10 ml) com solução de sulfato de lauril em água (2,5 %) colocada sobre uma balança eletrônica de precisão. Para tal medida, a pata do animal foi submergida dentro da cubeta até a altura da articulação tíbiotársica (Figura 3.2) e a variação de volume da pata foi calculada pelo aumento do peso da coluna líquida, considerando-se que 1 ml de água corresponde a 1 g (densidade da solução da cubeta). A fim de padronizar a altura até a qual a pata seria imersa na cubeta para as medidas repetidas, uma linha de marcação era delimitada antes das mensurações. A primeira medida do edema (medida basal) foi realizada sempre antes da injeção intratecal de drogas e, as demais medidas em tempos subsequentes (1, 2, 3 e 4 horas após a administração de carragenina na pata). Para isso, os ratos foram imobilizados em um cone de borracha macio apenas o período necessário para a

medida. Os dados são apresentados como a diferença entre o diâmetro da pata mensurado imediatamente antes da injeção intratecal e as medidas posteriores obtidas ao longo de 4 horas de avaliação.



Figura 3.2: Foto ilustrativa da mensuração do edema de pata.

3.5 AVALIAÇÃO DO EXTRAVASSAMENTO PLASMÁTICO

O extravasamento plasmático foi quantificado através do derrame do corante azul de Evans na pata. Aos animais previamente sedados com isoflurano (2% oxigênio hospitalar) foi administrado o corante azul de Evans (25 mg/kg; 0,1 ml/100 g; i.v.) anteriormente a injeção intratecal e trinta minutos antes da injeção de carragenina. Sendo utilizado como acesso venoso a veia gengival, conforme a metodologia descrita por De Oliveira et al., 2009.

Após a mensuração do edema de pata, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico com hidrato de cloral (15%) seguido de decapitação. Em seguida, foi realizada a retirada da pata posterior direita na altura da articulação tibiotársica. As patas cortadas em pequenos pedaços eram incubadas em solução aquosa de formamida (1/1, v/v) por 48 h a 37° C. A densidade óptica do sobrenadante foi medida a 600 nm em um espectrofotômetro (modelo Infinite® 200 PRO, Tecan, Männedorf, Suíça). Os resultados foram expressos como a diferença na densidade óptica entre as patas injetadas com carragenina ou salina e tratados com PBS ou morfina intratecal (extravasamento plasmático, µg/ml).

3.6 DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE

A atividade da enzima MPO, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, foi avaliada utilizando a metodologia de Mullane et al., 1985. Para isso, logo após o experimento de mensuração de edema de pata os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico com hidrato de cloral (15%) seguido de decapitação, excisão e divulsão da pele na superfície plantar da

pata posterior direita, sendo o tecido subcutâneo removido, triturado e homogeneizado com auxílio de um homogenizador do tipo Ultra-Turrax, em solução tampão 0 (EDTA/NaCl; pH 4,7). O homogenato resultante foi então centrifugado (15 min, 10.000 r.p.m., 4°C) e o precipitado foi ressuspenso em solução tampão 1 (NaCl 0,1 M; NaPO₄ 0,02 M; Na/EDTA 0,015 M; pH 7,4). Posteriormente, foi adicionado NaCl 0,2 % e após 30 segundos NaCl 1,6 % contendo glicose 5 %. A solução resultante foi centrifugada novamente (15 min, 10.000 r.p.m., 4°C) e o precipitado novamente ressuspenso em solução tampão 2 (NaPO₄ 0,5 M e 5 % de hexadeciltrimetilamônio [HTAB]; pH 5,4). As amostras obtidas foram congeladas e descongeladas por 3 vezes consecutivas em nitrogênio líquido. Na sequência, as amostras foram centrifugadas (15 min, 10.000 r.p.m., 4°C) e 25 µL do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de atividade da MPO. A reação enzimática desenvolveu-se em incubadora a 37°C por 5 minutos na presença de tetrametilbenzidina (TMB; 1,6 mM), solução fosfato de sódio (80 mM; pH 5,4) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂; 0,3 mM). A leitura da absorbância da solução final foi medida com auxílio de um espectrofotômetro (modelo Infinite® 200 PRO, Tecan, Männedorf, Suíça) em 650 nm. Os resultados foram expressos na forma de unidades de densidade óptica média ± erro padrão da média por miligrama de tecido (D.O. 650 nm / mg de tecido).

3.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A fim de quantificar o infiltrado inflamatório e congestão vascular, os animais foram logo após o experimento de mensuração de edema de pata sacrificados por aprofundamento anestésico com hidrato de cloral (15%) seguido de decapitação e excisão da pata posterior direita. Por conseguinte, as patas foram ocluídas com paraformaldeído 4% por 24 h, após esse período era realizada a divulsão da pele na superfície plantar da pata posterior direita, sendo o tecido removido e ocluído novamente em paraformaldeído 4% por 12h e até o processamento histológico as amostras foram preservadas em álcool 70%. Para o processamento os segmentos teciduais foram colocados em cápsulas de plástico e foram sucessivamente desidratados em etanol (70° GL, 80° GL e 90° GL e absoluto, respectivamente), durante 30 min em cada etapa. Em seguida, estes foram incubados consecutivamente em solução de xilol por 90 min para posterior solidificação em parafina. Cada fragmento foi envolto em um suporte quadrado metálico (de Leuckart) e imediatamente embebido em parafina líquida. Os quadrados foram então armazenados em geladeira para a completa solidificação. Os fragmentos teciduais foram cortados à espessura de 4 µm. Posteriormente, procedeu-se a desparafinação em banho-maria, e o material foi então transferido para uma lâmina de vidro. A seguir, estas lâminas foram secas em estufa à 50°C, durante 24 h e armazenadas à temperatura ambiente, para posterior coloração pela hematoxilina- eosina. Os

parâmetros histopatológicos avaliados foram a densidade do infiltrado inflamatório e congestão vascular. Dois observadores independentes (C.P.F. e A.B.W.M.) que desconheciam o tratamento, quantificaram atribuindo uma escala contínua de 0 a 3 (0 – ausente a 3 – abundante), de acordo com as escalas propostas por MOTOHIRO et al., 1986; LOSSOS et al., 2000; VIEIRA et al., 2010 e BOETTGER et al., 2008.

3.8 FÁRMACOS UTILIZADOS

- Carragenina (kappa/lambda, BDH Chemicals Ltd., UK). Veículo: solução fisiológica 0,9% (Aster, Brasil);
- Sulfato de Morfina (Dimorf®; Cristália, BRA). Veículo: PBS (*Phosphate buffered saline*, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA);
- 4-Aminopiridina (Tocris, U.S.A.). Veículo: PBS (*Phosphate buffered saline*, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA);
- Glibenclamida (Tocris, U.S.A.). Veículo: PBS (*Phosphate buffered saline*, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA);
- Dequalinium (Tocris, U.S.A.). Veículo: PBS (*Phosphate buffered saline*, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA);
- Cloral hidratado (Vetec Química Fina Ltda, Brasil). Veículo: solução fisiológica 0,9%;
- PBS (*Phosphate buffered saline*, pH 7,4; Sigma-Aldrich, USA);
- Solução fisiológica 0,9% (Aster, Brasil);
- Azul de Evans (Vetec, Brasil);
- Anestésico inalatório isoflurano (Virbac, Brasil).

3.9 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental adotado neste estudo está representado no esquema a seguir (Figura 3.3). Os parâmetros avaliados (mensuração do edema de pata, atividade da MPO, quantificação do extravasamento plasmático, infiltrado inflamatório e congestão vascular) foram realizados por estudo cego.

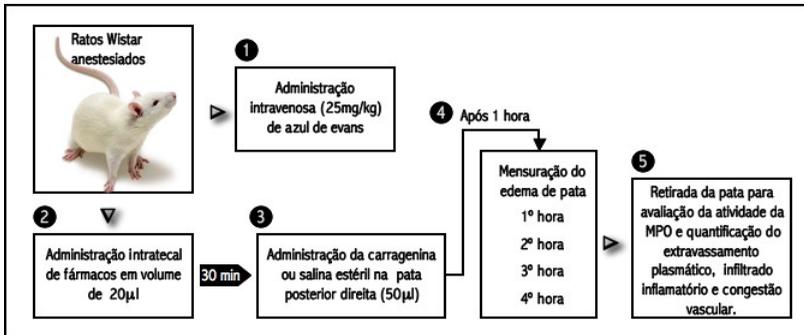


Figura 3.3: Protocolo experimental. Ratos Wistar macho previamente, ambientados, identificados, com região tibiotársica delimitada por um halo em tinta esferográfica e medida basal aferida, receberam sob efeito de anestesia, inicialmente, (1) uma injeção intravenosa de azul de evans, posteriormente (2) uma injeção intratecal com os diferentes tratamentos. (3) Após 30 minutos da injeção intratecal, administração s.c. da carragenina ou salina estéril na região plantar. Uma hora após a indução do edema, iniciou-se as medidas do volume da pata (4). Por fim, coletou-se a pata para avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e para quantificação do extravasamento plasmático por azul de evans e infiltrado inflamatório e congestão vascular por histologia (5).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M) do número de animais (n) apresentado conforme cada resultado. A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do programa Graph Pad Prism 5.0®. Primeiramente, os dados foram testados quanto a normalidade da distribuição através do teste Kolmogorov–Smirnov. Para as análises de extravasamento plasmático, avaliação histológica e atividade da MPO utilizou-se análise de variância de uma via (ANOVA) e nos demais resultados foi utilizado a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas. Posteriormente, foi empregado o teste *post hoc* de Tukey ou Dunnett.

4.RESULTADOS

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

Morfina (9,18 ou 37 nmol; 20 μ l) ou PBS (controle; 20 μ l) foram administradas por via intratecal trinta minutos antes da aplicação intraplantar de carragenina na pata posterior direita (150 μ g; 50 μ l). A maior dose de morfina (37 nmol) promoveu inibição significativa do aumento de volume de pata quando comparado ao grupo PBS (controle) ($p < 0,01$) (Figura 4.1). Observou-se um efeito máximo logo na primeira hora de registro. Doses maiores de morfina (75 e 150 nmol) também promoveram inibição significativa do aumento de volume de pata (BROCK, 2006). Entretanto, Brock, 2006 notou que após a administração das doses de 75 e 150 nmol foi possível observar alterações comportamentais nos animais, como por exemplo, agitação e agressividade. Neste contexto, a dose de 37 nmol foi utilizada para os demais experimentos, uma vez que produziu inibição significativa do aumento de volume de pata sem causar alterações comportamentais visíveis nos animais. A diferença entre o valor da mensuração do edema realizado antes e depois da injeção de carragenina corresponde ao aumento de volume representado no eixo y do gráfico.

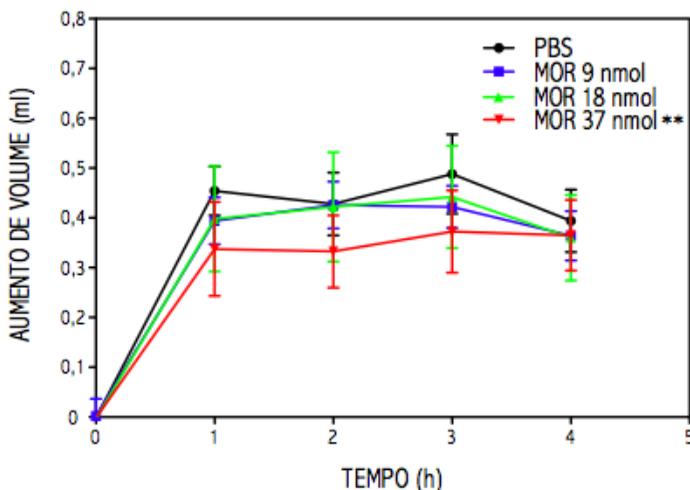


Figura 4.1: Efeito da morfina intratecal no aumento de volume de pata induzido por carragenina. Morfina (9,18 ou 37 nmol; 20 μ l, i.t.) ou PBS (controle; 20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina (tempo 0 h). O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 horas, sendo o primeiro registro realizado 1 hora após a administração de carragenina. Os pontos da curva representam a média \pm E.P.M. de 6 animais. ** indica a diferença estatística das curvas em relação ao grupo PBS com $p < 0,01$ (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Dunnett).

4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA INTRATECAL NO EXTRAVASSAMENTO PLASMÁTICO

Morfina (37 nmol; 20 μ l) ou PBS (20 μ l) foram administradas por via intratecal trinta minutos antes da aplicação subcutânea de carragenina na pata posterior direita (150 μ g; 50 μ l). Após as 4 horas de mensuração do aumento de volume da pata foi avaliado o extravasamento plasmático, através do corante de azul de Evans. A morfina promoveu inibição significativa do extravasamento plasmático comparado ao grupo CG + PBS ($p < 0,05$) (Figura 4.2). É possível observar também a diferença entre o grupo solução salina em relação aos grupos que receberam carragenina na pata, indicando a eficiência do modelo de edema ($p < 0,001$).

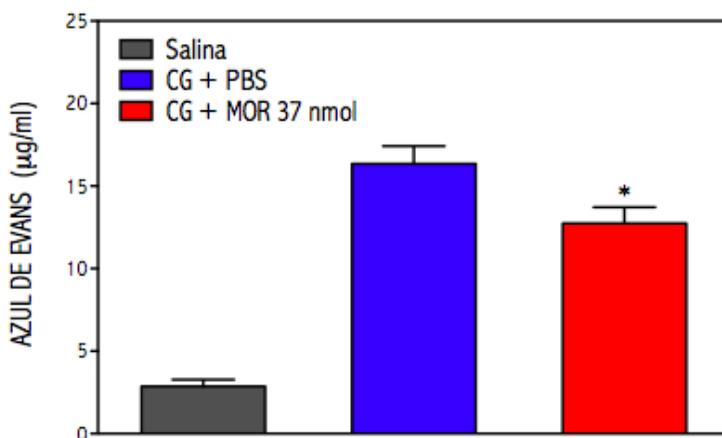


Figura 4.2: Efeito da administração da morfina intratecal no extravasamento plasmático. A morfina reduziu o extravasamento do corante de azul de Evans. Os animais foram tratados com morfina (37 nmol, 20 μ l, i.t.) ou PBS (20 μ l; i.t.) 30 min antes da injeção intraplantar de carragenina (150 μ g/50 μ l). O grupo controle do experimento recebeu somente salina estéril, concomitante a aplicação de carragenina nos demais grupos. A pata foi coletada imediatamente após a realização da última medida do aumento de volume de pata (4^o hora). Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 6 animais. Sendo relevante a diferença estatística significativa entre os grupos CG + PBS e CG + Morfina. * indica a diferença estatística em relação ao grupo CG + PBS com $p < 0,05$. (ANOVA de uma via seguida de teste Tukey).

4.3 AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA INTRATECAL NA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE

A determinação da atividade da enzima mieloperoxidase foi utilizada como medida indireta para avaliar a migração de neutrófilos para a região da pata com estímulo flogístico. A administração intratecal de morfina na dose de 37 nmol não foi

capaz de alterar a atividade da enzima MPO em comparação ao grupo que recebeu PBS intratecal após as 4 horas da administração de carragenina (Figura 4.3). Entretanto é possível observar que a atividade da MPO foi aumentada nos animais que receberam carragenina na pata em comparação aos que receberam solução salina estéril, demonstrando a eficiência do modelo inflamatório e do ensaio enzimático ($p < 0,001$) (Figura 4.3).

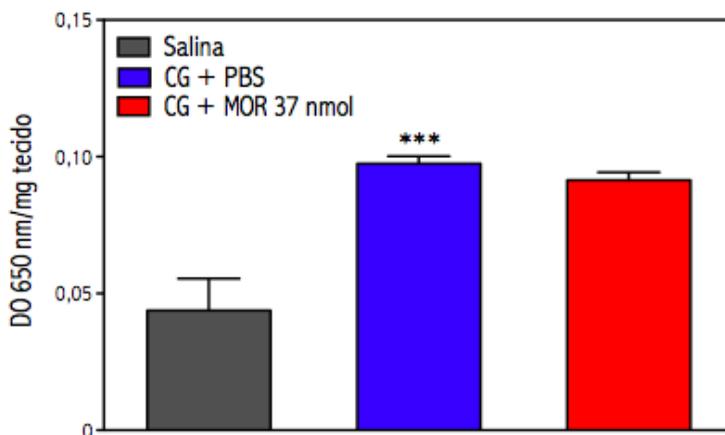


Figura 4.3: Avaliação da administração de morfina intratecal na atividade da enzima mieloperoxidase. Morfina (37 nmol; 20 μ l; i.t.) ou PBS (20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina (150 μ g/50 μ l). O grupo controle do ensaio recebeu somente salina estéril, concomitante a aplicação de carragenina dos demais grupos. O tecido da pata foi coletado imediatamente após a realização da última medida do aumento de volume de pata (4^o hora). Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 6 animais. A atividade da enzima foi expressa como densidade óptica (DO) a 650 nm por mg de tecido. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos CG + PBS e CG + Morfina. *** indica a diferença estatística em relação ao grupo salina com $p < 0,001$. (ANOVA de uma via seguida de teste Tukey).

4.4 AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA INTRATECAL NO INFILTRADO INFLAMATÓRIO E CONGESTÃO VASCULAR

O processo inflamatório foi quantificado através da avaliação histológica da densidade do infiltrado inflamatório e congestão vascular no tecido dérmico da região plantar com estímulo flogístico. A administração intratecal de morfina na dose de 37 nmol não foi capaz de alterar significativamente o infiltrado inflamatório (Figura 4.4 Painel A), porém reduziu a congestão vascular em comparação ao grupo que recebeu PBS intratecal após as 4 horas da administração de carragenina ($p < 0,05$) (Figura 4.4 Painel B). É possível observar também as diferenças entre os grupos solução

salina estéril em relação aos grupos que receberam carragenina na pata, indicando a eficiência do modelo inflamatório ($p < 0,001$).

Os sinais histopatológicos da inflamação aguda, especificamente a infiltração de células inflamatórias e a congestão vascular, que foi acentuada após 4 h em animais tratados com PBS (fig. 4.4.1 Painei B) e moderado para infiltrado inflamatório e ausente para congestão vascular nos tratados com morfina (fig. 4.4.1 Painei C) estão exemplificados na figura 4.4.1.

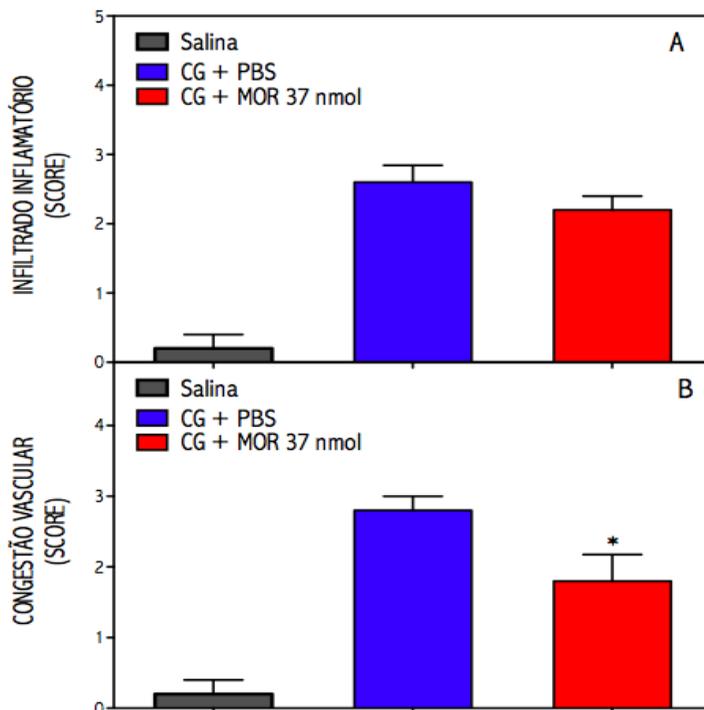


Figura 4.4: Avaliação da administração de morfina intratecal no infiltrado inflamatório e congestão vascular. Morfina (37 nmol; 20 μ l; i.t.) ou PBS (20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina (150 μ g/50 μ l). O grupo controle da avaliação recebeu somente salina estéril, concomitante a aplicação de carragenina dos demais grupos. O tecido da pata foi coletado imediatamente após a realização da última medida do aumento de volume de pata (4^o hora). As alterações histológicas em cada amostra foram analisadas em coloração hematoxilina e eosina e foram graduadas de forma contínua de 0 a 3 para o parâmetro infiltrado inflamatório (A) e congestão vascular (B). Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 5 animais. Sendo relevante a diferença estatística significativa no Painei B entre os grupos CG + PBS e CG + Morfina. * indica a diferença estatística em relação ao grupo CG + PBS com $p < 0,05$. (ANOVA de uma via seguida de teste Tukey).

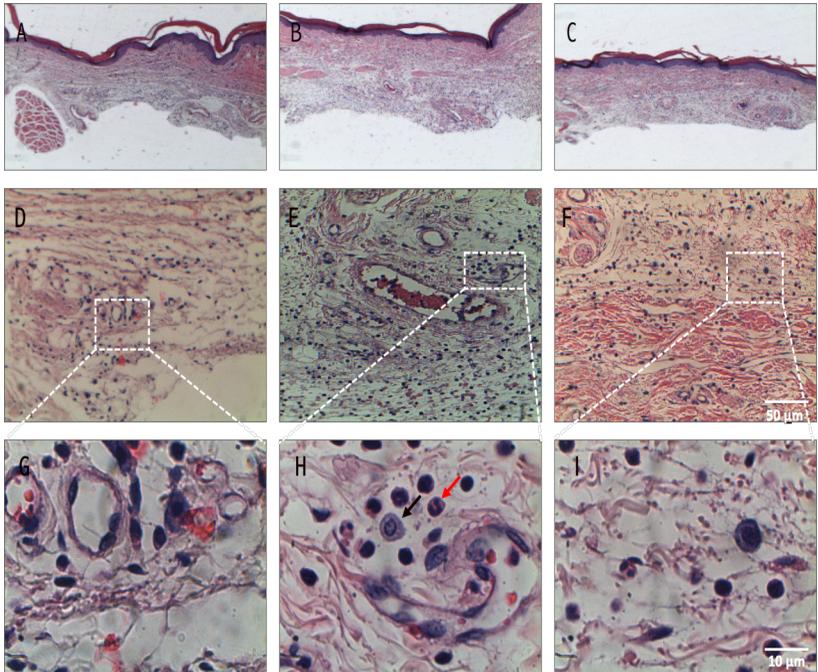


Figura 4.4.1: Análise comparativa do efeito da morfina intratecal no infiltrado inflamatório e congestão vascular. Morfina (37 nmol; 20 μ l; i.t.) ou PBS (20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina (150 μ g/50 μ l). O grupo controle da avaliação recebeu somente salina estéril, concomitante a aplicação de carragenina dos demais grupos. O tecido da pata foi coletado imediatamente após a realização da última medida do aumento de volume de pata (4^o hora). O infiltrado inflamatório em cada amostra foi analisado em coloração hematoxilina e eosina. (A) O corte histológico representativo do grupo salina revela discreto infiltrado inflamatório mononuclear com escassos neutrófilos, não havendo evidência de congestão vascular, e o infiltrado inflamatório representado nesta lâmina foi considerado score 0. Os painéis D e G correspondem a imagens amplificadas do respectivo quadrante ilustrado no painel A. (B) O corte histológico representativo do grupo CG + PBS revela acentuado infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear em derme superficial e profunda, com evidência de congestão vascular, e o infiltrado inflamatório representado nesta lâmina foi considerado score 3. Os painéis E e H correspondem a imagens amplificadas do respectivo quadrante ilustrado no painel B. (C) O corte histológico representativo do grupo CG + MOR revela moderado infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear em derme superficial e profunda, com menor evidência de congestão vascular, e o infiltrado inflamatório representado nesta lâmina foi considerado score 2. Os painéis F e I correspondem a imagens amplificadas do respectivo quadrante ilustrado no painel C. As setas indicam infiltrado de mono (preta) e polimorfonuclear (vermelha).

4.5 EFEITO DEPENDENTE DE DOSE DO BLOQUEADOR DE CANAL DE POTÁSSIO, DEQUALINIUM, NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

A administração do bloqueador de canal de potássio ativado por cálcio de baixa condutância, dequalinium, foi realizada com o objetivo de elucidar a dose subefetiva que permitisse posteriormente, verificar o envolvimento do canal de potássio no efeito antiedematogênico da morfina intratecal no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Os animais receberam doses decrescentes que variaram entre 0,001 pmol a 10 pmol (Figura 4.5). A diferença entre o valor da mensuração do edema realizado antes e depois da injeção de carragenina corresponde ao aumento de volume representado no eixo y dos gráficos.

As doses de 0,001, 0,01 e 0,1 pmol promoveram o aumento de volume de pata. Enquanto que as doses de 1 e 10 pmol não alteraram o edema induzido por carragenina. Assim, a dose escolhida para os experimentos posteriores foi de 10 pmol.

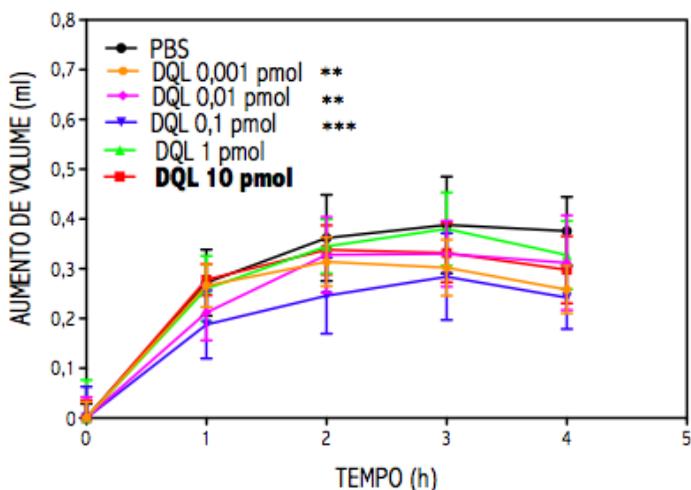


Figura 4.5: Efeito dependente de dose do bloqueador de canal de potássio, dequalinium, no aumento de volume de pata induzido por carragenina. Dequalinium (0,001 pmol -10 pmol; 20 μ l; i.t.) ou PBS (controle; 20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina (150 μ g/50 μ l) (tempo 0 h). O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 horas, sendo o primeiro registro realizado 1 hora após a administração de carragenina. Os pontos da curva representam a média \pm E.P.M. de 6 animais. ** e *** indicam a diferença estatística das curvas em relação ao grupo PBS (controle) com $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Dunnett).

4.6 EFEITO DEPENDENTE DE DOSE DO BLOQUEADOR DE CANAL DE POTÁSSIO, 4 - AMINOPIRIDINA, NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

A administração do bloqueador de canal de potássio relativamente seletivo para os membros da família dos canais de potássio voltagem dependentes, 4 - Aminopiridina, foi realizada com o objetivo de elucidar a dose subefetiva que permitisse posteriormente, verificar o envolvimento do canal de potássio no efeito antiedematogênico da morfina intratecal no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Os animais receberam doses de 10, 20 e 60 nmol (Figura 4.6). A dose de 60 nmol promoveu diminuição do aumento de volume de pata ($p < 0,05$). As doses de 10 e 20 nmol foram subefetivas, sendo a dose de 10 nmol de escolha para os experimentos subsequentes. A diferença entre o valor da mensuração do edema realizado antes e depois da injeção de carragenina corresponde ao aumento de volume representado no eixo y do gráfico.

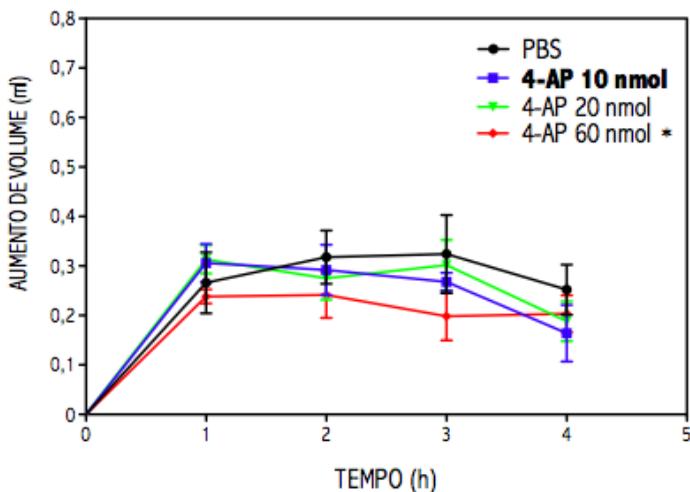


Figura 4.6: Efeito dependente de dose do bloqueador de canal de potássio, 4-Aminopiridina no aumento do volume de pata induzido por carragenina. 4-Aminopiridina (10 nmol, 20 nmol e 60 nmol, 20 μ l; i.t.) ou PBS (controle; 20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina (150 μ g/50 μ l) (tempo 0 h). O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 horas, sendo o primeiro registro realizado 1 hora após a administração de carragenina. Os pontos da curva representam a média \pm E.P.M. de 6 animais. * indica a diferença estatística da curva em relação ao grupo PBS (controle) com $p < 0,05$. (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Dunnett).

4.7 EFEITO DEPENDENTE DE DOSE DO BLOQUEADOR DE CANAL DE POTÁSSIO, GLIBENCLAMIDA, NO AUMENTO DE VOLUME DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

A administração do bloqueador de canal de potássio sensível ao ATP, Glibenclamida, foi realizada com o objetivo de elucidar a dose subefetiva que permitisse posteriormente verificar o envolvimento do canal de potássio no efeito antiedematogênico da morfina intratecal no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Os animais receberam doses de 5, 10, 20 e 40 nmol (Figura 4.7). As doses de 20 e 40 nmol promoveram aumento do volume de pata ($p < 0,05$). As doses de 5 e 10 nmol foram subefetivas, sendo a dose de 5 nmol de escolha para os experimentos subsequentes. A diferença entre o valor da mensuração do edema realizado antes e depois da injeção de carragenina corresponde ao aumento de volume representado no eixo y do gráfico.

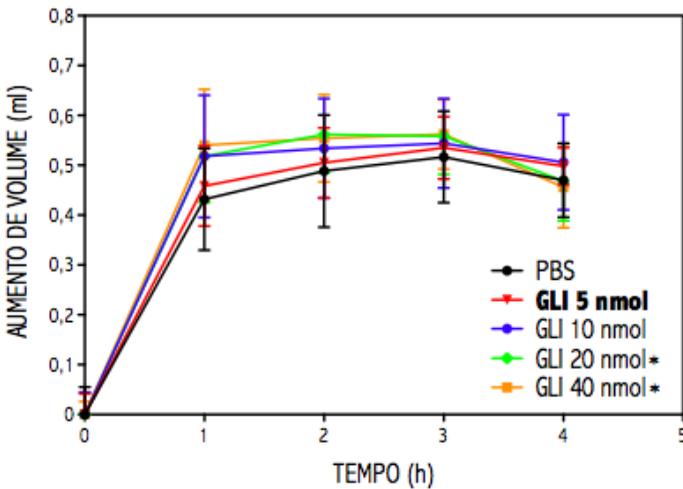


Figura 4.7: Efeito dependente de dose do bloqueador de canal de potássio, Glibenclamida no aumento do volume de edema de pata induzido por carragenina. Glibenclamida (5,10 nmol, 20 nmol e 40 nmol) ou PBS (controle; 20 μ l; i.t.) foram administradas 30 min antes da aplicação de carragenina (150 μ g/50 μ l) (tempo 0 h). O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 horas, sendo o primeiro registro realizado 1 hora após a administração de carragenina. Os pontos da curva representam a média \pm E.P.M. de 6 animais. * indica a diferença estatística da curva em relação ao grupo PBS (controle) com $p < 0,05$. (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Dunnett).

4.8 REVERSIBILIDADE DO EFEITO ANTIEDEMATOGÊNICO DA MORFINA INTRATECAL PELOS BLOQUEADORES DE CANAIS DE POTÁSSIO DEQUALINIUM, 4-AMINOPIRIDINA E GLIBENCLAMIDA

Dando continuidade a investigação do envolvimento dos canais de potássio no efeito antiedematogênico da morfina intratecal em edema de pata induzido por carragenina, foi realizado um conjunto de experimentos de co-injeção intratecal de morfina com as doses subefetivas dos bloqueadores dos canais de potássio, invariavelmente 30 minutos antes da administração intraplantar de carragenina, respeitando-se o volume total de 20 μ l; i.t. Os bloqueadores 4-Aminopiridina (10 nmol) ou Glibenclamida (5 nmol) ou Dequalinium (10 pmol) co-injetados com morfina (37 nmol) reverteram completamente o efeito antiedematogênico da morfina intratecal (Figura 4.8). A diferença entre o valor da mensuração do edema realizado antes e depois da injeção de carragenina corresponde ao aumento de volume representado no eixo y dos gráficos.

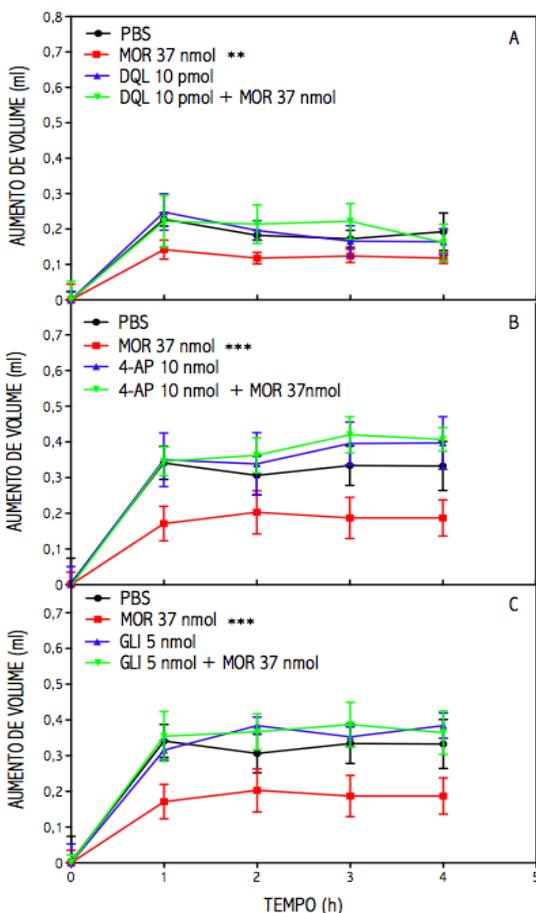


Figura 4.8: Reversibilidade do efeito antiedematogênico da morfina intratecal pelos bloqueadores de canais de potássio, Dequalinium, 4-Aminopiridina e Glibenclamida. Uma dose fixa de morfina (37 nmol) foi co-injetada na intratecal com 4-Aminopiridina (10 nmol) ou Glibenclamida (5 nmol) ou Dequalinium (10 pmol). 4-AP, Glibenclamida e Dequalinium revertem o efeito antiedematogênico da morfina quando co-injetados com morfina (Figura 4.8 Painel A, B e C, respectivamente). As drogas foram administradas 30 minutos antes da administração de carragenina. O grupo controle recebeu somente PBS (20µL). O aumento de volume de pata foi avaliado a cada hora durante 4 horas, sendo o primeiro registro realizado 1 hora após a administração de carragenina. Os pontos da curva representam a média \pm E.P.M. de 6 animais. ** e *** indicam as diferenças estatísticas das curvas em relação ao grupo PBS (controle) com $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (ANOVA para medidas repetidas seguida de teste Dunnett).

5. DISCUSSÃO

Desde de sua introdução em 1962 por Winter, Rislely e Nuss o modelo de edema de pata induzido por carragenina é amplamente utilizado para o estudo da inflamação aguda, sendo a formação de edema provavelmente um dos parâmetros mais avaliados. Com referência aos mediadores envolvidos neste modelo, é possível descrever uma fase inicial com duração de até 2 horas após a injeção de carragenina intraplantar, caracterizada pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina. Já a segunda fase do edema que percorre de 1 a 4 horas após a injeção está relacionada com a elevação da produção de prostaglandinas (DI ROSA et al., 1971; DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971). Em relação a composição celular desta resposta inflamatória, sabe-se que a migração e ativação de neutrófilos no foco inflamatório contribui para o desenvolvimento do processo e consequente formação de edema, por amplificar os mediadores inflamatórios (DI ROSA e SORRENTINO, 1968; VINEGAR et al., 1971). O pico de edema se desenvolve dentro de 3 a 4 horas, tornando-se necessária a mensuração por pelo menos 4 horas após a aplicação da carragenina.

Os mediadores neurogênicos também estão presentes durante a inflamação periférica. Os neurônios sensoriais estão conduzindo os estímulos dos tecidos para o sistema nervoso central e funcionando como eferentes neurosecretores, com a liberação de SP e CGRP pelos terminais dos aferentes primários (MAGGI e MELLI, 1988; WILLIS, 1999). Este componente neurogênico da inflamação pode ser responsável por parte da vasodilatação e do extravasamento plasmático que ocorrem após a aplicação de carragenina na pata de ratos. Neste contexto inflamatório, a atividade antidrômica em fibras aferentes primárias é um mecanismo importante pela qual a inflamação neurogênica é induzida e amplificada.

Existem muitos mecanismos pelo qual a inflamação pode aumentar a probabilidade de deflagração de reflexos da raiz dorsal (WILLIS, 1999). Sluka e colaboradores (1995b), sugeriram que a inflamação pode causar uma estimulação de mecanismos GABAérgicos no corno dorsal da medula espinhal, sendo visto um aumento de células GABA-imunoreativas após a aplicação de carragenina na pata de ratos (CASTRO-LOPES, 1994). Um aumento da liberação de GABA de interneurônios pode resultar em mais despolarização dos eferentes primários (PAD) e consequentemente maior deflagração de reflexos da raiz dorsal (WILLIS, 1999; CERVERO; LAIRD, 2003). Outro mecanismo envolvido seria o aumento na atividade do co-transportador NKCC1. Este co-transportador é responsável pela concentração elevada de íons cloreto no interior da célula aferente primária, assim, quando o GABA ativa seu receptor ionotrópico GABA_A, os canais de Cl⁻ se abrem, resultando na saída desses íons da célula, despolarizando-a. Proteínas quinases dependentes de nucleotídeos cíclicos, como o AMPc e o GMPc, são exemplos de sinais de transdução que podem regular a atividade deste co-transportador (WILLIS, 1999). Uma

interferência farmacológica na medula espinhal que possa agir nesses mecanismos de deflagração dos reflexos da raiz dorsal pode ser uma ferramenta importante no controle da inflamação periférica.

No presente estudo o efeito antiedematogênico da morfina intratecal em região lombar de ratos, visto primeiramente por Brock, 2006, pôde ser demonstrado novamente pela diminuição do edema inflamatório induzido por carragenina aplicada na pata de ratos. A morfina produz um significativo efeito antiedematogênico similar a serotonina (DAHER et al., 2005) e menos intenso que os efeitos observados com indometacina (DAHER; TONUSSI, 2003) sob essas mesmas condições.

A explicação do referido efeito possivelmente envolve a geração de reflexos da raiz dorsal (REES et al., 1994) que pode ser modulada pela morfina na medula, com então diminuição da inflamação periférica. Todos os três tipos de receptores opióides são encontrados no corpo celular do gânglio da raiz dorsal (DRG) e nas terminações periféricas de neurônios aferentes primários de humanos e animais (STEIN et al., 2001) e podem mediar a hiperpolarização causada pela morfina, impedindo assim a geração de reflexo da raiz dorsal, deflagrado por uma despolarização destes mesmos terminais (WILLIS, 1999). Estes receptores estão associados à inibição da enzima adenilato ciclase (AMPc), aumento da condutância do íon potássio e a uma inibição da condutância do íon cálcio (COLLIER; ROY, 1974). Todos estes efeitos resultam na diminuição da excitabilidade dos neurônios (LAW et al., 2000).

Levando em conta uma das características vasculares do processo inflamatório, a vasodilatação, que envolve em primeiro plano as arteríolas e em seguida a abertura de novos leitos capilares na região, resultando em aumento da vascularização local com estase do sangue, e considerando os reflexos da raiz dorsal que têm sido implicados sabidamente no aumento da atividade antidrômica da sinalização em direção à periferia (WILLIS, 1999), onde estão sendo liberados neuropeptídeos que causam extravasamento plasmático, agindo sobre a função endotelial, seria razoável que a inibição desse “feed back” para a periferia, com uma consecutiva diminuição da liberação de neuropeptídeos na área inflamada, resultaria na redução da congestão vascular, elucidando provavelmente o efeito antiedematogênico da morfina.

Neste estudo, também foi possível verificar que a morfina intratecal foi capaz de diminuir o extravasamento plasmático no modelo de edema induzido pela carragenina através da mensuração do Azul de Evans, absolutamente em paralelo à inibição do edema. Mesmo não havendo uma investigação sobre o possível mecanismo envolvido neste efeito, pelo qual a morfina reduziu a permeabilidade vascular, mas sabendo que neuropeptídeos são capazes de promover extravasamento por atuar na função endotelial, acredita-se que essa diminuição ocorreu através da inibição dos opióides na liberação de neuropeptídeos, como a SP (YAKSH et al., 1980;

YAKSH, 1988).

Sabe-se que carragenina aplicada na pata é capaz de estimular a migração de neutrófilos (DI ROSA e SORRENTINO, 1968; VINEGAR et al., 1971). Assim, testou-se a atividade da enzima MPO como medida indireta para analisar a migração de neutrófilos para a região da pata inflamada. Como resultado, observou-se que a carragenina efetivamente é promotora de migração e a morfina intratecal não foi capaz de alterar este aspecto, ao contrário da administração intratecal de ciclohexiladenosina (CHA), um agonista de receptor A1 de adenosina (BONG et al., 1996; SORKIN et al., 2003) e de um antagonista de receptor NMDA (BONG et al., 1996), os quais reduziram o acúmulo de neutrófilos em resposta a injeção intradérmica de carragenina. Fecho e colaboradores (2006) analisaram o efeito da morfina administrada sistemicamente na atividade da MPO de ratos Fischer e Lewis (linhagem que demonstram diferentes respostas inflamatórias e imunológicas) e obtiveram em ambos, uma diminuição na migração de neutrófilos na pata que recebeu carragenina. A explicação para este efeito da morfina sistêmica é incerto, mas provavelmente possa ser decorrente de uma ação periférica, já que a aplicação intratecal não promoveu nenhuma alteração.

Quanto a análise direta da migração de neutrófilos, por avaliação histopatológica do tecido da pata de ratos com estímulo flogístico, também não houve alteração significativa do infiltrado inflamatório. Boettger e colaboradores (2010), com o uso de morfina intratecal em modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA), também não observou histologicamente diferenças nos sinais de inflamação aguda, particularmente no infiltrado inflamatório, sendo constatado porém, um efeito antiinflamatório na avaliação em fase crônica. Entretanto, o processo inflamatório crônico envolve infiltrado característico mononuclear, diferente do perfil celular do processo agudo onde a presença marcante é de polimorfonucleares. Vale ressaltar assim, que possivelmente o efeito antiedematogênico da morfina intratecal ocorreu em decorrência a inibição da abertura de novos leitos capilares da região por uma ação possivelmente em tecido arteriolar, sem interferência significativa nos leitos venulares, uma vez que a migração de neutrófilos na inflamação aguda é mais proeminente em vênulas (RANG et al., 2007).

Os mecanismos pelo qual a conectividade sensorial modula a inflamação têm sido alvo de estudo em outros modelos, e similares efeitos antiinflamatórios têm sido descritos para outras substâncias aplicada espinalmente (BOYLE et al., 2006; BOYLE et al., 2002; SLUKA e WESTLUND, 1993; SLUKA et al., 1993; SORKIN et al., 1992; WALDBURGER et al., 2008; DAHER; TONUSSI, 2003; DAHER et al., 2005) e todas estas substâncias têm um resultado em comum: uma redução da excitabilidade neuronal na medula espinal, seja pré ou pós-sinápticamente (SORKIN et al., 1992; BAR et al., 2004; SASTRY, 1978; NEUGEBAUER et al., 1993). O reflexo da raiz dorsal (RRD) pode ser uma possível ligação entre o aumento da atividade neuronal nos terminais centrais das fibras aferentes primárias e o agravamento da inflamação periférica

(WILLIS, 1999). Logo, uma teoria neuromoduladora da inflamação, em que o próprio sistema nervoso pode atuar novamente no processo inflamatório.

Nesta teoria neuromoduladora da inflamação é visto que, os reflexos da raiz dorsal transmitidos retrogradamente ao longo das fibras sensoriais contribuem para o edema no joelho seguido da indução de artrite experimental em várias espécies (RESS et al., 1995; SLUKA et al., 1995b; BOETTGER et al., 2010). A administração espinal de morfina, antagonistas de receptores GABA_A, como a bicuculina intratecal e antagonistas de receptores não-NMDA e NMDA bloqueiam este edema de joelho (SLUKA et al., 1993, SLUKA et al., 1994 e BOETTGER et al., 2010). E este mesmo antagonista de receptores GABA_A intratecal, mas não antagonistas de receptores GABA_B, reduzem o edema na pele, seguido de injeção intradermal de capsaicina (LIN et al., 1999) e ao que parecem são mediados por reflexos da raiz dorsal exclusivamente em fibras sensoriais Aδ e C (LIN et al., 2000). Assim, demonstra que o edema pode ser controlado de diferentes formas pela manipulação espinal de alguns neurotransmissores, modificando o processo inflamatório periférico.

Outra consideração a ser feita é que a morfina pode agir em receptores localizados em interneurônios no corno dorsal (CHEN et al., 2005), pois os reflexos da raiz dorsal são produzidos não somente como uma função da excitabilidade do nociceptor por si mesmo, mas também como uma função da excitabilidade dos interneurônios (CERVERO; LAIRD 1996, LIN et al., 1999). Conseqüentemente, os receptores opióides no corno dorsal também podem ter um papel na inibição destes interneurônios, e conseqüentemente nos reflexos da raiz dorsal, e edema. Lembrando que existem receptores opióides também em células gliais (WATKINS et al., 2005) que de alguma forma podem estar contribuindo para o referido efeito com a morfina.

Vale enfatizar a evidência de que agonistas de receptores opióides podem estimular a função do eixo hipotálamo pituitária adrenocortical (HPA) em ratos (GONZALVEZ et al., 1991; PECHNICK, 1993). Brock, 2006 demonstrou que o efeito antiedematogênico da morfina nas mesmas condições do presente trabalho não foi revertido por pré-tratamento com aminoglutetimida, o qual sugere que um aumento nos níveis de esteróides endógenos, devido à estimulação espinal ou outras condições inesperadas de estresse, parece não ser responsável pelo efeito da morfina. Fecho e colaboradores, 2007 também observaram em animais com diferente reatividade do eixo HPA que ambos demonstraram efeito antiedematogênico da morfina em modelo de edema de pata por carragenina.

Muitos estudos vêm demonstrando que a morfina administrada sistemicamente produz redução do extravasamento plasmático (BARTHO e SZOLCSÁNYI, 1981; HARGREAVES et al., 1988; JORIS et al., 1990; BARBER, 1993) e do edema (HARGREAVES et al., 1988; JORIS et al., 1990; SACERDOTE et al., 1996; WALKER et al., 1996, FECHO et al., 2007) induzidos por inflamação. Se estes efeitos ocorrem via ativação de receptores periféricos ou centrais é ainda incerto. Para Whiteside e colaboradores, 2005 o efeito antiedematogênico da morfina ocorre

através de uma ação nos receptores localizados centralmente, pois utilizando um agonista específico de receptor opióide na periferia não houve alteração no edema inflamatório. Porém, os autores concordam que uma ativação periférica de receptores opióides pode afetar alguns componentes do processo inflamatório, tais como extravasamento plasmático dado por ativação antidrômica dos nociceptores, sem interferir no edema. No efeito antiedematogênico da morfina intratecal é pressumível que esteja ocorrendo uma ação medular e não de uma alteração sistêmica promovida pela injeção intratecal, uma vez que animais com carragenina na pata anterior que receberam morfina intratecal no mesmo segmento lombar de animais com carragenina na pata posterior, não tiveram alteração do edema em estudos de Brock (2006). A mesma afirmação de um efeito medular da morfina e não sistêmico é compartilhada por Boettger e colaboradores (2010) que registraram os efeitos da morfina, em doses de 0.6 mg/kg intratecal, enquanto que outros autores somente observaram este efeito antiedematogênico com doses sistêmicas maiores (de 2,5 a 58 mg/kg) (WALKER et al., 1996, FECHO et al., 2007). No presente estudo foram utilizadas doses de 81 µg/kg, sendo então possível assumir que o efeito da morfina intratecal no edema periférico é presumivelmente, uma ação segmentar em região lombar.

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

Durante a década de 1980 estudos eletrofisiológicos demonstraram que os agonistas de receptores opióides eram capazes de promover a abertura de canais de K^+ em neurônios, por meio da ativação de proteína G (MYAKE et al., 1989; NORTH, 1989). Estudos subsequentes demonstraram que os efeitos analgésicos da morfina intratecal foram antagonizados pela glibenclamida intratecal em diferentes modelos de dor (KANG et al., 1997; WELCH; DUNLOW, 1993; KANG et al., 1998; YANG et al., 1998) e potencializados pela administração de substâncias capazes de provocar a abertura de canal K_{ATP} como o nicorandil e a levcromakalim, sendo a glibenclamida capaz de abolir essa potencialização (WELCH; DUNLOW, 1993, ASANO et al., 2000). Esses estudos sugerem que abertura dos canais K_{ATP} desempenham um papel importante no efeito antinociceptivo da morfina por via espinal.

Outros estudos avaliaram o possível papel dos canais de K_{Ca} na antinocicepção induzida pela morfina. O bloqueador de canal K^+ de baixa condutância (SK), apamina (administrado IT) foi incapaz de modificar o efeito antinociceptivo da morfina IT no teste de retirada da cauda (WELCH; DUNLOW, 1993). Embora o número de estudos publicados até o momento possa ser considerado pequeno, os mesmos sugerem que a abertura dos canais K_{Ca+} não desempenham um papel importante na antinocicepção induzida pela morfina (OCAÑA et al., 2004).

Poucos estudos têm avaliado o papel dos canais K_v no efeito antinociceptivo da morfina. A administração intratecal de 4-aminopiridina e tetraetilamônio (4-AP e TEA) não alterou a antinociceção induzida por morfina sistêmica ou IT no teste de retirada da cauda (OCAÑA e BAEYENS, 1994; WELCH e DUNLOW, 1993). Além disso, ambos os bloqueadores de canais de K^+ (administrado na pata) foram incapazes de antagonizar a antinociceção periférica induzida por morfina no modelo de carragenina (RODRIGUES; DUARTE, 2000). Portanto, presume-se que os canais de K^+ sensíveis a 4-AP e TEA não estão envolvidos na antinociceção induzida por morfina. Entretanto, as ferramentas farmacológicas utilizadas (4-AP e TEA) não são bloqueadores seletivos de um determinado tipo de canal de K já que são capazes de bloquear canais K_v , mas em altas concentrações podem bloquear alguns K_{Ca} e, conseqüentemente, as conclusões extraídas são limitadas (MATHIE et al., 1998; KACZOWSKI e GARCIA, 1999).

Com fundamento nos resultados apresentados neste trabalho, foi possível observar o envolvimento de canais de potássio no efeito antiedematogênico da morfina IT baseado na resposta de reversibilidade deste efeito pela co-injeção de glibenclâmida, assim como com os bloqueadores dequalinium e 4-AP, assumindo que respectivos canais são igualmente importantes para a inibição do edema de pata induzido por carragenina.

Para corroborar, Bahia e colaboradores (BAHIA et al., 2005) demonstraram que os canais de SK em vias sensoriais estão em maior quantidade em lâminas I, II e III e que esses canais possuem um papel importante no controle da entrada de estímulos sensoriais para a medula espinhal, considerando que as respostas neuronais são inibidas quando a atividade do canal SK é aumentada. Fernandes et al. (2002, 2005) em modelo de edema de pata induzido por carragenina observaram que o tetraetilamônio (TEA), um bloqueador não-seletivo de canais de K , aboliu completamente o efeito antiedematogênico de NO.

A participação da via L-arginina/ NO/ GMPc no efeito antiedematogênico da morfina intratecal pode ser demonstrada pelos estudos prévios em nosso laboratório por Brock, 2006. Os efeitos antiedematogênicos observados com o uso de um doador e um precursor de NO (SNAP e L-arginina, respectivamente) em edema de pata induzido por carragenina foram prevenidos pelo inibidor da síntese de NO (L-NNA) e por um inibidor da síntese de GMPc (ODQ) (BROCK e TONUSSI, 2008). Os resultados de Fernandes et al (2002) também demonstram que o efeito inibitório do NO sobre o edema de pata é dependente de GMPc, uma vez que o efeito foi prevenido por um inibidor clássico da guanilato ciclase solúvel, o azul de metileno (AM). Essa dependência ao GMPc porém, ocorre nas primeiras horas após a injeção de doadores de NO, sendo o efeito prolongado dependente dos canais de K^+ . Assim, o efeito de longa duração do NO parece estar estreitamente relacionado com a ativação de canais de K^+ (FERNANDES, 2002).

O envolvimento do NO na ativação dos canais de K⁺ de forma direta (BOLOTINA et al., 1994), ou via GMPc (ARCHER et al., 1994) vêm sendo documentada nos últimos anos. Por fim, como estaria a morfina estimulando a produção de NO? Mesmo sendo bem reconhecida a ativação da síntese de NO por cálcio/calmodulina, mecanismos alternativos estão sendo propostos. Um desses mecanismos seria a via de sinalização PI3K/AKT (DIMMELER et al., 1999; FULTON et al., 1999; CUNHA et al., 2010) cujo mRNA de PI3K γ (membro da família PI3K) foi identificado no gânglio da raiz dorsal (DRG) de ratos (BARTLETT et al., 1999). Nesta via, a subunidade $\beta\gamma$ da proteína Gi do receptor opióide por exemplo, ativa PI3K γ /AKT que estimula a produção de NO (STEPHENS et al., 1994). O aumento da indução da produção de NO pela morfina nos neurônios no DRG de ratos foi bloqueado pelo inibidor seletivo de PI3K γ (AS605240), bem como pelo inibidor seletivo de AKT. Este mesmo inibidor seletivo de PI3K γ e AKT na intratecal de ratos e nos animais knockdown para PI3K γ tiveram inibição do efeito antinociceptivo da morfina periférica. Neste mesmo estudo, foi demonstrado um aumento na condutância de K⁺ em neurônios de baixo calibre (<30 μ m) na presença de morfina, que foi prevenido por glibenclamida, L-NMMA (inibidor de NOS), naloxona ou ambos inibidores seletivos de PI3K γ e AKT (CUNHA et al., 2010). Assim, a abertura dos canais de K⁺ pela morfina pode ocorrer devido à sua capacidade em ativar proteína G, promovendo a produção de NO e a ativação de GMPc que promove a abertura de canais de K⁺. Esta via por sua vez causa uma hiperpolarização dos neurônios nociceptivos, contrariando sua excitabilidade.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A administração de morfina intratecal promoveu efeito antiedematogênico com envolvimento dos canais de potássio como mecanismo de ação. Visto que, o efeito foi revertido por bloqueadores de canais de potássio;

- O extravasamento plasmático foi reduzido pela morfina intratecal através da avaliação do corante de Azul de Evans;

- A morfina intratecal demonstrou também uma diminuição na congestão vascular pela avaliação histológica do tecido inflamado;

- A migração de neutrófilos e o infiltrado inflamatório avaliados de forma direta e indireta na inflamação aguda, não foram alterados pela morfina intratecal em modelo de edema de pata induzido por carragenina.

Como sugestão do mecanismo envolvido no efeito antiedematogênico da morfina e do envolvimento dos canais de K^+ pela via NO/ GMPc, temos na Figura 6.1 um modelo esquemático demonstrando uma possível via de ação para os resultados obtidos.

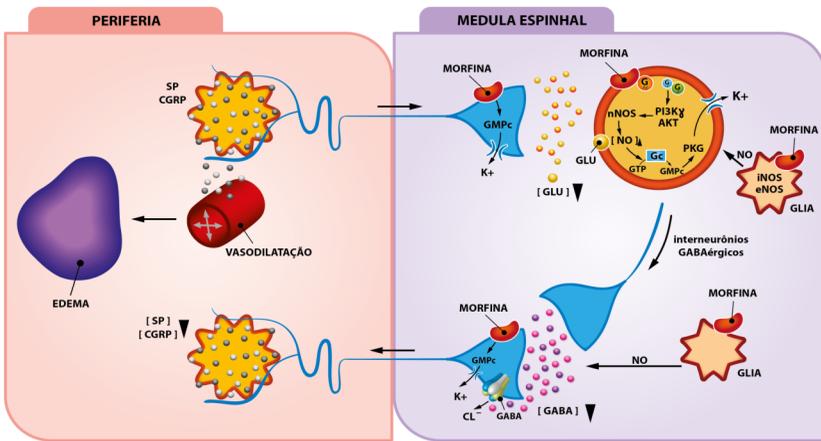


Figura 6.1 Modelo esquemático da ação da morfina intratecal sobre a inflamação periférica. Um processo inflamatório na periferia têm por consequência, a ativação direta dos neurônios aferentes primários com liberação de neuropeptídeos vasodilatadores (SP e CGRP) no foco, e glutamato (GLU) na medula. O GLU por sua vez ativa interneurônios GABAérgicos promovendo a liberação de GABA. Os receptores GABAérgicos ocupados favorecem a saída de íons Cl⁻ resultando em despolarização dos aferentes primários, que acentua a liberação de neuropeptídeos na periferia. A morfina, administrada por via intratecal, pode se ligar a receptores localizados nos aferentes primários e/ou nos interneurônios GABAérgicos, hiperpolarizando estas células, diminuindo a liberação de neurotransmissores neste circuito, e por consequência reduzindo a liberação de neuropeptídeos na periferia. O mecanismo de ação da morfina parece envolver a ativação de NO e GMPc com abertura de canais de K⁺. A origem de NO neste circuito pode ser extraneuronal, como as células gliais; ou derivado da ativação de PI3Kγ/AKT.

REFERÊNCIAS

- ALI, H. et al. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **Medical Clinics of North America**, v. 81, n.1, p. 1-28, 1997.
- AIYAR, N.; RAND, K.; ELSHOURBAGYI, N. A. A cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide type 1 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 11325-9, 1996.
- ALEBOUYEH, M.; POURPAK, Z.; AHAMADIANI, A. Increase in serum level of interleukin-1 alpha mediates morphine anti-inflammatory effect in carrageenan- induced paw oedema in mice. **Cytokine** 19:102–105, 2002.
- AMANN, R.; LANZ, I.; SCHULIGOI, R. Effects of morphine on oedema and tissue concentration of nerve growth factor in experimental inflammation of the rat paw. *Pharmacology*, v. 66, p.169–172, 2002.
- ANSEL, J. C. et al. Interactions of the skin and nervous system. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 2, p. 23-6, 1997.
- ANTONIJEVIC, I.; MOUSE, S. A.; SCHAFER, M.; STEIN, C. Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. **Journal of Neuroscience**, v.15, p. 165–172, 1995.
- ARCHER, S.L.; HUANG, J.M.; NELSON, D.P.; SHULTZ, P.J.; WEIR, E.K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of charybdotoxin-sensitive K channels by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 91, p. 7573-7587, 1994.
- ASANO, T.; DOHI, S.; IIDA, H. Antinociceptive action of epidural K⁺ ATP channel openers via interaction with morphine and an α_2 -adrenergic agonist in rats. **Anesthesia & Analgesia**, v. 90, p. 1146-1151, 2000.
- 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**, v. 12, p. 2097–2100, 2001.
- BAHIA, P. K.; SUZUKI, R; BENTON; D. C. H; JOWETT, A. J; CHEN, M. X; TREZISE, D. J; DICKENSON, A. H; MOSS, G. W. J. A functional role for small-conductance calcium-activated potassium channel in sensory pathways including nociceptive processes. **Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 3489-3498, 2005.
- BAR, K. J; NATURA, G.; TELLERIA-DIAZ, A.; TESCHNER, P.; VOGEL, R.; VASQUEZ, E.; SCHAIBLE, H. G.; EBERSBERGER, A. Changes in the effect of spinal prostaglandin E₂ during inflammation: prostaglandin E (EP1–EP4) receptors in spinal nociceptive processing of input from the normal or inflamed knee joint. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 642– 651, 2004.
- BARANOWSKA, M.; KOZŁOWSKA, H.; KORBUT, A.; MALINOWSKA, B. Potassium channels in blood vessels: their role in health and disease. **Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)**, v. 61, p. 596-605, 2007.
- BARBER, A. μ - and μ -opioid receptor agonists produce peripheral inhibition of neurogenic plasma extravasation in rat skin. **European Journal of Pharmacology**, v. 236, p. 113-120, 1993.
- BARBER, R. P.; VAUGHN, J. E.; SAITO, K.; MCLAUGHLIN, B. J.; ROBERTS, E. GABAergic terminals are presynaptic to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. **Brain Research**, v. 141, p. 35-55, 1978
- BARTHO, L.; SZOLCSANYI, J. Opiate agonists inhibit neurogenic plasma extravasation in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 73, p. 101-104, 1981.
- BARTLETT, S. E.; REYNOLDS, A. J.; TAN, T.; HEYDON, K.; HENDRY, I. A. Differential mRNA

expression and subcellular locations of PI3-kinase isoforms in sympathetic and sensory neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 56, p. 44–53, 1999.

BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal horn root ganglion neurons of the rat and the monkey. *The Journal of Comparative Neurology*. v. 277, p. 302-312, 1988.

BERNARDI, P. S.; VALTSCHANOFF, J. G.; WEINBERG, R. J.; SCHMIDT, H. H. W.; RUSTIONI, A. Synaptic interactions between primary afferent terminals and GABA and nitric oxide-synthesizing neurons in superficial laminae of the rat spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 1363-1371, 1995.

BOETTGER, M. K.; HENSELLEK, S.; RICHTER, F.; GAJDA, M.; STOCKIGT, R.; SEGOND VON BANCHET, G.; BRAUER, R.; SCHAIBLE, H-G. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, p. 2368–2378, 2008.

BOETTGER, M. K.; WEBER, K.; GAJDA, M.; BRAUER, R.; SCHAIBLE, H-G. Spinally applied ketamine or morphine attenuate peripheral inflammation and hyperalgesia in acute and chronic phases of experimental arthritis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, p. 474-485, 2010.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 362, p. 850-853, 1994.

BONG, G. W.; ROSENGREN, S.; FIRESTEIN, G. S. Spinal cord adenosine receptor stimulation in rats inhibits peripheral neutrophil accumulation: the role of *N*-methyl-D-aspartate receptors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 98, p. 2779-2785, 1996.

BOYLE, D. L.; JONES, T. L.; HAMMAKER, D.; SVENSSON, C. I.; ROSENGREN, S.; ALBANI, S.; SORKIN, L. S.; FIRESTEIN, G. S. Regulation of peripheral inflammation by spinal p38 MAP kinase in rats. **PLoS Medicine**, v. 3, p. 338, 2006.

BOYLE, D. L.; MOORE, J.; YANG, L.; SORKIN, L. S.; FIRESTEIN, G. S. Spinal adenosine receptor activation inhibits inflammation and joint destruction in rat adjuvant- induced arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, p. 3076–3082, 2002.

BREDT, D.S; SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, v. 8, p. 3- 11, 1992.

BROCK, S. C. Envolvimento da via L-ARGININA/ NO/ GMPc medular no efeito anti-edematogênico da morfina administrada por via intratecal, 2006. 89f. **Dissertação** (Mestrado em Farmacologia) — Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis: 2006.

BROCK, S. C.; TONUSSI, C. R. Intrathecally injected morphine inhibits inflammatory paw edema: the involvement of nitric oxide and cyclic-guanosine monophosphate. **Anesthesia & Analgesia**, v. 106, p. 965-71, 2008.

BULL, H. A. et al. Neuropeptides induce release of nitric oxide from human dermal microvascular endothelial cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 106, p. 655-60, 1996.

CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELLI, E.; BUTTERFIELD, D. A.; STELLA, A. M. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p. 766-775, 2007.

CAPPUGI, P. et al. Esperienze preliminari sull'attività del CGRP con lo skin window test. **Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia**, v. 125, p. 135-8 1990.

(Abstract).

- CASTRO-LOPES, J. M.; TAVARES, I.; TOLLE, T. R.; COIMBRA, A. Carrageenan- induced inflammation of the hind foot provokes a rise of GABA-immunoreactive cells in the rat spinal cord that is prevented by peripheral neurectomy or neonatal capsaicin treatment. **Pain**, v. 56, p.193-201, 1994.
- CATTERALL, W. A.; SNUTCH, T. P.; THOMSEN, W.; ROSSIE, S. Structure and modulation of voltage-gated ion channels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 625, p. 174-180, 1991.
- CERVERO, F., LAIRD, J. M. Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. **Pain**, v. 68, p. 13-23, 1996.
- CERVERO, F.; LAIRD, J. M. From acute to chronic pain. In: BOUNTRA, C.; MUNGLANI, R.; SCHMIDT, W. **Pain**. Marcel Dekker: New York, 2003.
- CHANDRASSOMA, P; TAYLOR, C. **Patologia Básica**. São Paulo: Prentice Hall do Brasil, 1993. p. 31-41.
- CHEN, Y. P.; CHEN, S. R.; PAN, H. L. Effect of morphine on deep dorsal horn projection neurons depends on spinal gabaergic and glycinergic tone: implications for reduced opioid effect in neuropathic pain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, p. 696-703, 2005.
- 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 sub- population of putative nociceptive neurons in rat dorsal root ganglia. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 911–920, 2000.
- CHOU, T. C. Anti-inflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan- evoked thermal hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, p. 1146-1152, 2003.
- CHOU, T. C.; CHANG, L. P.; LI, C. Y.; WONG, C. S.; YANG, S. P. The antiinflammatory and analgesic effects of baicalin in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. **Anesthesia & Analgesia**, v. 97, p. 1724-1729, 2003.
- COLLIER, H. O.; ROY, A. C. Morphine-like drugs inhibit the stimulation of E prostaglandins of cyclic AMP formation by rat brain homogenate. **Nature**, v. 248, p. 24–27, 1974.
- CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 200. 1251 p.
- CUELLO, A. C.; RIBEIRO-DA-SILVA, A.; MA, W.; DEKONINCK, Y.; HENRY, J. L. Organization of substance P primary sensory neurons: ultrastructural and physiological correlates. **Regulatory Peptides**, v.46, p. 155-164, 1993.
- CUNHA et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K /AKT/nNOS/NO/K_{ATP} signaling pathway. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 107, p. 4442-4447, 2010.
- DAHER, J. B.; MELO, M. D.; TONUSSI, C. R. Evidence for a spinal serotonergic control of the peripheral inflammation in the rat. **Life Science**, v. 76, p. 2349-59, 2005.
- DAHER, J. B.; TONUSSI, C. R. A spinal mechanism for the peripheral anti-inflammatory action of indomethacin. **Brain Research**, v. 962, p. 207-12, 2003.
- DE OLIVEIRA, D. T.; SOUZA-SILVA, E.; TONUSSI, C. R. Gingival vein puncture: a new simple technique for drug administration or blood sampling in rats and mice. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 36, p. 109-113, 2009.
- DE PAOLA, D. **Mecanismos Básicos das Doenças**. São Paulo: Atheneu, 1988. P. 47-71.
- DI ROSA, M. Pharmacological properties of carrageena. **Journal Pharmacokinetics and**

Pharmacodynamics, v. 24, p. 89-102, 1972.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenan.

European Journal of Pharmacology, v. 4, p. 40-342, 1968.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine.

Journal of Pathology, v. 104, p. 15-29, 1971.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A. Screens for antiinflammatory drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 23, p. 297-300, 1971.

DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; ZEIHNER, A. M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, v. 399, p. 601–605, 1999.

DUBINSKY, J.M.; OXFORD, G.S. Dual modulation of potassium channels by thyrotropin-releasing hormone in clonal pituitary cells. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v. 90, p. 9659-9663, 1985.

DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase in biology and disease. **The FASEB Journal**, v. 12, p. 1063-1073, 1998.

FAITH, M. et al. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? **Clinica Chimica Acta**, v. 396, p. 23-25, 2008.

FANTINI, F.; MAGNONI, C.; PINCELLI, C.; GIANNETTI, A. Neurogenic inflammation and the skin: neural modulation of cutaneous inflammatory reactions. **European Journal of Dermatology**, v. 5, p. 349-357, 1995.

FECHO, K.; MANNING, E. L.; MAIXNER, W.; SCHMITT, C. P. Effects of carrageenan and morphine on acute inflammation and pain in Lewis and Fischer rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, article in press, 2006.

FERNANDES, D.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; ASSREUY, J. Nitric oxide-induced inhibition of mouse paw edema: involvement of soluble guanylate cyclase and potassium channels. **Inflammation Research**, v. 51, p. 377-384, 2002.

FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Involvement of guanylate cyclase and potassium channels on the delayed phase of mouse carrageenan-induced paw oedema. **European Journal of Pharmacology**, v. 501, p. 209-214, 2004.

FERRELL, W. R. RUSSELL, N. J. Extravasation in the knee induced by antidromic stimulation of articular C fibre of the anaesthetized cat. **The Journal of Physiology**, v. 379, p. 407-416, 1986.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; HEINRICHER, M. M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Melzack and Wall: **Text Book of Pain**. 5 ed. Churchill Livingstone, Edinburgh: 125-142, 2006.

FOREMAN J. C. Peptides and neurogenic inflammation. **British Medical Bulletin**, v. 43, p. 386-400, 1987.

FULTON, D. et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, v. 399, p. 597–601, 1999.

GARCIA LEME, J. et al. Pharmacological analysis of acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and heping. **British Journal of Pharmacology**, v. 48, p. 88-96, 1973.

GARCIA LEME, J.; HAMAMURA, L. Formation of a factor increasing vascular permeability during electrical stimulation of the saphenous nerve in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.

51, n. 3, p. 383-389, 1974.

GARCIA-GONZALEZ, A. et al. Superoxide dismutase and Naproxan® in the very late phase of carrageenan induced edema in rats. **Revista de Investigación Clínica**, v. 52, n. 2, p. 156-160, 2000.

GOEBELER, M.; HENSELEIT, U.; ROTH, J.; SORG, C. Substance P and calcitonin gene-related peptide modulate leukocyte infiltration to mouse skin during allergic contact dermatitis. **Archives for Dermatological Research**, v. 286, p. 341–346, 1994.

GOLSMITH, P. C. et al. Inhibitors of nitric oxide in human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 106, p. 113-8, 1996.

GONZALVEZ, M.L.; MILANES, M.V.; VARGAS, M.L. Effects of acute and chronic administration of mu- and delta-opioid agonists on the hypothalamic pituitary adrenocortical (HPA) axis in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 200, p. 155-158, 1991.

HANESCH, U.; PFROMMER, U.; GRUBB, B. D.; HEPPELMANN, B.; SCHABLE, H. G. The proportion of CGRP-immunoreactive and SP-mRNA containing dorsal root ganglion cells is increased by a unilateral inflammation of the ankle joint of the rat. **Regulatory Peptides**, v. 46, p. 202-203, 1993.

HARGREAVES, K. M.; DUBNER, R.; JORIS, J. Peripheral actions of opiates in the blockade of carrageenan-induced inflammation, in **Proceeding of the Vth World Congress on Pain** (Dubner R, Gebhart GF, and Bond MR eds) p 55–60, Elsevier Science Publishers, New York, 1988.

HARMAR, T.; LUTZ, E. Multiple receptors for PACAP and VIP. *Trends Pharmacology Science*, v. 15, p. 97-9, 1994.

HARTSCHUH, W.; WEIHE, E.; YANAIHARA, N.; RENECKE, M. Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in Merkel cells of various mammals: evidence for a neuromodulator function of the Merkel cell. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 81, p. 361-4, 1983 (Abstract).

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachikinin, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v. 24, p. 739-768, 1988.

HSIEH, S. T.; LIN, W. M. Modulation of keratinocyte proliferation by skin innervation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, p. 579-86, 1999.

HUTTUNEN, M. et al. Neuropeptide and capsaicin-induced histamine release in skin monitored with the micro-dialysis technique. **Acta Dermato Venereologica**, v. 76, p. 205-9, 1996.

IGNARRO, L. J. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. **Biochemical Society Transactions**, v. 20, p. 465-469, 1992.

INGRAM, S. L.; WILLIAMS, J. T. Opioid inhibition of Ih via adenylyl cyclase. **Neuroscience**, v. 13, p. 179–186.

JACKSON, W. F. Potassium channels in the peripheral microcirculation. **Microcirculation**, v. 12, p. 113-127, 2005.

JACQUES, L.; COUTURE, R.; DRAPEAU, G.; REGOLI, D. Capillary permeability induced by intravenous neurokinins. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 340, p. 170-179, 1989.

JEURISSEN, F. et al. Monocytes express a non-neurokin substance P receptor that is functionally coupled to MAP kinase. *Journal of Immunology*, v. 152, p. 2987-2994, 1994.

- JORIS, J.; COSTELLO, A.; DUBNER, R.; HARGREAVES, K. M. Opiates suppress carrageenan-induced edema and hyperthermia at doses that inhibit hyperalgesia. **Pain**, v. 43, p. 95–103, 1990.
- KACZOROWSKI, G.J.; GARCIA, M.L. Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. **Current Opinion of Chemistry and Biology**, v., 3, p. 448– 458, 1999.
- KANG, Y. M.; ZHAN, Z. H.; YANG, S. W.; QIAO, J. T.; DAFNY, N. ATP- sensitive K⁺ channels are involved in the mediation of intrathecal norepinephrine- or morphine-induced antinociception at the spinal level: a study using EMG planimetry of flexor reflex in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 45, p. 269–273, 1998.
- KANG, Y.; ZHANG, C.; QIAO, J. Involvement of endogenous opioids and ATP-sensitive potassium channels in the mediation of carbachol- induced antinociception at the spinal level: a behavioral study in rats. **Brain Research**, v. 761, p. 342–346, 1997.
- KOH, S. D.; CAMPBELL, J. D.; CARL, A.; SANDERS, K. M. Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 489, p. 735–743, 1995.
- KURASHI, Y.; HIROTA, N.; SSATO, Y.; HANSHIMA, N.; TAKAGI, H.; SATOH, M. Stimulus specificity of peripherally evoked substance P release from the rabbit dorsal horn in situ. **Neuroscience**, v. 30, p. 241-250, 1989.
- LAW, P.; WONG, Y. H.; LOH, H. H. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 40, p. 389-430, 2000.
- LEMBECK, F.; DONNERER, J.; TSUCHIYA, M. NAGAHISA, A. The nonpeptide tachykinin antagonist CP-96, 345 is a potent inhibitor of neurogenic inflammation. *British Journal of Pharmacology*, v. 105, p. 527-530, 1992.
- LEMBECK, F.; HOLZER, P. SP as a neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 310, p. 175-183, 1979.
- LIN, Q.; WU, J.; WILLIS, W.D. Dorsal root reflexes and cutaneous neurogenic inflammation after intradermal injection of capsaicin in rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 82, p. 2602-2611, 1999.
- LIN, Q.; ZOU, X.; WILLIS, W. D. A δ and C primary afferents convey dorsal root reflexes after intradermal injection of capsaicin in rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 84, p. 2695-2698, 2000.
- LOSSOS, I.S.; IZBICKI, G.; OR, R.; GOLDSTEIN, R.H.; BREUER, R. The effect of suramin on bleomycin-induced lung injury. **Life Science**, v. 67, p. 2873-2881, 2000.
- LOTTI, T.; HAUTMANN, G.; PANCONESI. Neuropeptides in skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 33, p. 482-96, 1995.
- LOWMAN, M. A.; BEBYON, R. C.; CHURCHU, M. K. Characterization of neuropeptide-induced histamine release from human dispersed skin mast cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 95, p. 121-30, 1988.
- LUEBKE, A. E.; DAHL, G. P.; ROOS, B. A.; DICKERSON, I. M. Identification of a protein that confers calcitonin gene-related peptide responsiveness to oocytes by using a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator assay. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 93, p. 2455-60, 1996.
- MAGGI, C. A. Tachikins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters

released from peripheral endings of sensory nerves. **Progress in Neurobiology**, v. 45, p. 1-98, 1995.

MAGGI, C. A.; MELLI, A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. **General Pharmacology**, v. 19, p. 1-43, 1988.

MALLE, E. et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 838-854, 2007.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 268, p. 12231-12234, 1993

MATHIE, A.; WOOLTORTON, J.R.; WATKINS, C.S.. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. **General Pharmacology**, n. 30, v.13–24, 1998.

MEDEIROS, M. V. et al. Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 285, p. 109-114, 1995

MESTRE, C.; PELISSIER, T.; FIALIP, J.; WILCOX, G.; ESCHALIER, A. A method to perform direct transcuteaneous intrathecal injection in rats. **Journal of Pharmacology Toxicology Methods**, v.32, p. 197–200, 1994.

MEYER, R.A. et al. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: Melzak and Wall: **Text Book of Pain**. 5 ed. Elsevier: London, 2006.

MITSUHASHI, M.; OHASHI, Y.; SHICHILO, S.; CHRISTIAN, C.; SUDDUTH, K. J.; HARROWE, G.; PAYAN, D. G. Multiple intracellular signaling pathways of the neuropeptide substance P receptor. **Journal of Neuroscience Research**, v. 32, p. 437-443, 1994.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 21, p. 361-374, 1991.

MOTOHIRO, A.; FURUKAWA, T.; YASUMOTO, K.; INOKUCHI, K. Mechanisms involved in acute lung edema induced in dogs by oleic acid. **European Surgery Research**, v. 18, p. 50-57, 1986.

MOUSA, S. A. Morphological correlates of immune-mediated peripheral opioid analgesia. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 521, p. 77–87, 2003.

MULLANE, K.M.; KRAEMER, R.; SMITH, B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. **Journal of Pharmacology Methods**, v.14, p. 157-67, 1985.

MYAKE, M.; CHISTIE, M. J.; NORTH, R. A. Single potassium channels opened by opioids in rat locus ceruleus neurons. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 86, p. 3419-3422, 1989.

NAGHASHPOUR, M.; ROSENBLATT, M. I.; DICKERSON, I. M.; DAHL, G. P. Inhibitory effect of calcitonin gene-related peptide on myometrial contractility is diminished at parturition. **Endocrinology**, v. 138, p. 4207-14, 1997.

NAKAGAWA, N.; IWATO, I.; YOSHIDA, S. Effect of substance P on the expression of an adhesion molecule ICAM-1 in human vascular endothelial cells. **Regulatory Peptides**, v. 46, p. 223-224, 1993.

NAUSEEF, W. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. **Immunological Reviews**, v. 219, p. 88-102, 2007.

NEUGEBAUER, V.; LUCKE, T.; SCHAIBLE, H. G. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists block the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. **Journal of Neurophysiology**, v. 70, p. 1365–1377, 1993.

NILSSON, S. P. E.; MAEPEA, O. Comparison of the vasodilatory effects of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and peptide HI (PHI) in the rabbit and the cat. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 129, p.17-26, 1987.

NOGUSHI, K.; RUDA, M. A. Gene regulation in an ascending nociceptive pathway: inflammation-induced increase in preprotachykinin m RNA in rat lamina I spinal projection neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 12, p. 2563-2572, 1992.

NORTH, R. A. Drug receptors and the inhibition of nerve cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 98, p. 13-28, 1989.

OCAÑA, A. M.; DEL POZO, E.; BARRIOS, M.; ROBLES, L. I.; BAEYENS, J. M. An ATP-dependent potassium channel blocker antagonises morphine analgesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 186, p. 377-378, 1990.

OCAÑA, M.; BAEYENS, J. M. Role of ATP-sensitive K⁺ channels in antinociception induced by R-PIA, an adenosine A1 receptor agonist. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 350, p. 57–62, 1994.

OCAÑA, M.; CENDA, C. M.; COBOS, E. J.; ENTRENA, J. M.; BAEYENS, J. M. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *European Journal of Pharmacology*, v. 500, p. 203-219, 2004.

OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiological Reviews**, v. 73, p. 229-308, 1993.

PAYAN, D. G.; BREWSTER, D. R.; GOETZL, E. J. Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. **Immunology**, v. 131, p. 1613-1615, 1983.

PECHNICK, R.N. Effects of opioids on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 33, p. 353-382, 1993.

PERROT, S.; GUILBAUD, G.; KAYSER, V. Effects of intraplantar morphine on paw edema and pain-related behaviour in a rat model of repeated acute inflammation. **Pain**, v. 83, p. 249–257, 1999.

PHEND, K.D.; WEINBERG, R.J.; RUSLIONI, A. Techniques to optimize postembedding single and double staining for amino acid neurotransmitters. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 40, p. 1011-1020, 1992.

PIOMELLI, O.; VOLTERRA, A.; DALE, N.; SIEGLEBAUM, S.A.; KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J. H.; BELARDETTI, F. Lipoxygenase metabolites or arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of Aplysia cells **Nature**, v. 328, p. 38-43, 1987.

PLIYEV, B. K. Chemotactically active proteins of neutrophils. **Biochemistry**, v. 73, p. 970-984, 2008.

PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, 429:79-91, 2001.

RALEVIC, V.; KHALIL, Z.; DUSTING, G. J.; HELME, R. D. Nitric oxide and sensory nerves are involved in the vasodilator response to acetylcholine but not calcitonin gene-related peptide in rat skin microvasculature. **British Journal of Pharmacology**, v.106, p. 650-5, 1992.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. **Rang & Dale's Farmacologia**. 6 ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2007. 844 p.

REES, H.; SLUKA, K. A.; WESTLUND, N.; WILLIS, W. D. The role of glutamate and GABA receptors in the generation of dorsal root reflexes by acute arthritis in the anesthetized cat. **Journal of Physiology**, v. 484, p. 437-445, 1995.

REES, H.; SLUKA, K.A.; WESTLUND, K.N.; WILLIS, W.D. Do dorsal root reflexes augment peripheral inflammation? **NeuroReport**, v. 5, p. 821-824, 1994.

REGOLI, D.; BOUDON, A.; FAUCHERE, J. L. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacological Reviews**, v. 46, p. 551-599, 1994.

ROANE, D.S.; BOYD, N.E. Reduction of food intake and morphine analgesia by central glibenclamide. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 46, p. 205-207, 1993.

RODRIGUES, A. R. A.; DUARTE, I. D. G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 110-14, 2000.

SACERDOTE, P.; BIANCHI, M.; PANERAI, A. E. Involvement of β -endorphin in the modulation of paw inflammatory edema in the rat. **Regulatory Peptides**, v. 63, p. 79–83, 1996.

SALVEMINI, D. et al. Nitric Oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British of Pharmacology**, v. 118, p. 829- 838, 1996.

SASTRY, B. R. Morphine and met-enkephalin effects on sural Adelta afferent terminal excitability. **European Journal of Pharmacology**, v. 50, p. 269–273, 1978.

SCHOLZEN, T. et al. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroen- dochrine and the skin immune systems. **Experimental Dermatology**, v. 7, p. 81-96, 1998.

SCOTT, J. R.; TAMURA, R. N.; MUANGMAN, P.; ISIK, F. F.; XIE, C.; GIBRAN, N. S. Topical substance P increases inflammatory cell density in genetically diabetic murine wounds. **Wound Repair Regeneration**. v. 16, p. 529–533, 2008.

SELLEY, D. E.; BREIVOGEL, C. S.; CHILDER, S. R. Modification of G protein-coupled functions by low-pH pretreatment of membranes from NG108–15 cells: increase in opioid agonist efficacy by decreased inactivation of G proteins. **Molecular Pharmacology**, v. 44, p. 731–741, 1993.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 238 p.

SLUKA, K. A.; WESTLUND, K. N. Centrally administered non-NMDA but not NMDA receptor antagonists block peripheral knee joint inflammation. **Pain**, v. 55, p. 217–225, 1993.

SLUKA, K. A.; WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. The role of dorsal reflexes in neurogenic inflammation. **Pain Forum**, v. 4, p. 141-149, 1995a.

SLUKA, K.A.; JORDAN, H.H.; WESTLUND, K.N. Reduction in joint swelling and hyperalgesia following post-treatment with a non-NMDA glutamate receptor antagonist. **Pain**, v. 59, p. 95-100, 1994.

SLUKA, K.A.; REES, H.; WESTLUND, N.; WILLIS, W.D. Fiber types contribute to dorsal root reflex induced by joint inflammation in cats and monkeys. **Journal of Neurophysiology**, v. 74, p. 981-989, 1995b.

SLUKA, K.A.; WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Joint inflammation and hyperalgesia are reduced by spinal bicuculline. **NeuroReport**, v. 5, p. 109-112, 1993b.

SORKIN, L. S.; MOORE, J.; BOYLE, D. L.; YANG, L.; FIRESTEIN, G. S. Regulation of peripheral inflammation by spinal adenosine: role of somatic afferent fibers. **Experimental Neurology**, v. 184, p. 162-168, 2003.

SORKIN, L. S.; WESTLUND, K. N.; SLUKA, K. A.; DOUGHERTY, P. M.; WILLIS, W. D. Neural

changes in acute arthritis in monkeys. IV. Time-course of amino acid release into the lumbar dorsal horn. **Brain Research Review**, v. 17, p. 39–50, 1992.

STEELE R.H., WILHELM D.L. The inflammatory reaction in chemical injury. Increased vascular permeability and erythema induced by various chemicals. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 47, p. 612-23, 1966.

STEIN, C. MACHELSKA, H.; BINDER, W.; SCHJFFER, M. Peripheral opioid analgesia. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 62-65, 2001.

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

STEPHENS, L.; et al. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. **Cell**, v. 77, p. 83–93, 1994.

SZOLCSÁNYI, J. Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. **Agents Actions**, v. 23, p. 4-11, 1988.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circulation Research**, v. 11, p. 877-887, 2001.

TODD, A. J.; MACKENZIE, J. GABA-immunoreactive neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. **Neuroscience**, v. 31, p. 799-806, 1989.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97-120, 1998.

VIEIRA et al. Vascular Endothelial Growth Factor Overexpression Positively Modulates the Characteristics of Periprosthetic Tissue of Polyurethane-Coated Silicone Breast Implant in Rats. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 126, p. 1899-1910, 2010.

VINEGAR, R.; MACKLIN, A.W.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L. Histopathological and pharmacological study of carrageenin inflammation in the rat. **Pharmacologist**, v.13, p. 284-290, 1971.

WALDBURGER, J. M.; BOYLE, D. L.; EDGAR, M.; SORKIN, L. S.; LEVINE, Y. A.; PAVLOV, V. A.; TRACEY, K.; FIRESTEIN, G. S. Spinal p38 MAP kinase regulates peripheral cholinergic outflow. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, p. 2919–2921, 2008.

WALKER, J. S.; CHANDLER, A. K.; WILSON, J. L.; BINDER, W.; DAY, R. O. Effect of μ -opioids morphine and buprenorphine on the development of adjuvant arthritis in rats. **Inflammation Rescue**, v. 45, p. 299–302, 1996.

WALLENFREN, J. Vasoactive peptides in the skin. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 2, p. 49-55, 1997.

WALLENGREN, J.; HAKÁNSON, R. Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory-mediated responses. **European Journal Pharmacology**, v. 143, p.267-73, 1987.

WANG, H.; WESSENDORF, M. W. Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 429, p. 590–600, 2001.

WATKINS, L. R.; HUTCHINSON, M. R.; JOHNSTON, I. N.; MAIER, S. F. Glia: novel counter-regulators of opioid analgesia. **Trends in Neurosciences**, v. 12, p. 661-669, 2005.

WEIDNER, C. et al. Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin - a microdialysis study. **Journal of Investigative Dermatology**, v.115, p.1015-20, 2000.

WEIDNER, C.; KLEDE M.; RUKWIED R.; LISCHETZKI, G.; NEISIUS, U.; SKOV, P.S.; PETERSEN, L. J.; SCHMELZ, M. Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin -

a microdialysis study. **Journal of Investigative Dermatology**, v.115, p.1015-20, 2000.

WELCH, S. P.; DUNLOW, L. D. Antinociceptive activity of intrathecally administered potassium channel openers and opioid agonists: a common mechanism of action? **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 267, p. 390–399,1993.

WHITESIDE, G. T.; BOULET, J. M.; WALKER, K. The Role of Central and Peripheral μ Opioid Receptors in Inflammatory Pain and Edema: A Study Using Morphine and DiPOA ([8-(3,3-Diphenyl-propyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triaza- spiro[4.5]dec-3-yl]-acetic Acid). **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, p. 1234-1240, 2005.

WILLIS, W. D. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double edged sword. **Experimental Brain Research**, v. 124, p. 395-421, 1999.

WILLIS, W.D. John Eccles' studies of spinal cord presynaptic inhibition. **Progress in Neurobiology**, v. 78, p. 189-214, 2006.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of rats as an assay method for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** , v. 111, p. 544-547, 1962.

YAKSH T.L. Central pharmacology of nociceptive transmission. In: Melzak and Wall: **Text Book of Pain**. 5 ed. Churchill Livingstone, Edinburg: 371-414, 2006.

YAKSH, T.L. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. **Brain research**, v. 458, p. 319-324, 1988.

YAKSH, T.L.; JESSELL, T. M.; GAMSE, R.; MUDGE, A. W.; LEEMAN, S.E. Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo. **Nature**, v. 286, p. 155-156, 1980.

YANG, S. W.; KANG, Y. M.; GUO, Y.Q.; QIAO, J. T.; DAFNY, N. ATP- sensitive potassium channels mediate norepinephrine- and morphine- induced antinociception at the spinal cord level. **International Journal of Neuroscience**, v. 93, p. 217 – 223, 1998.

YATANI, A.; CODINA, J.; BROWN, A. M.; BIRNBAUMER, L. Direct activation of mammalian atrial muscarinic potassium channels by GTP regulatory protein GK. **Science**, v. 235, p. 207-211, 1987.

ZOLLNER, C.; SHAQURA, M. A.; BOPAIAH, C. P.; MOUSA, S.; STEIN, C.; SCHAFFER, M. Painful inflammation-induced increase in μ -opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. **Molecular Pharmacology**, v. 64, p. 202–210, 2003.