

EDUARDO SOUZA SILVA

**O NEUROPEPTÍDIO Y (NPY) NA MEDULA ESPINHAL
MEDEIA O EFEITO HIPONOCICEPTIVO DA ATIVAÇÃO DE
RECEPTORES H1 HISTAMINÉRGICOS NA ARTICULAÇÃO
DO JOELHO DE RATOS**

Florianópolis- SC

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**O NEUROPEPTÍDIO Y (NPY) NA MEDULA ESPINHAL
MEDEIA O EFEITO HIPONOCICEPTIVO DA ATIVAÇÃO DE
RECEPTORES H1 HISTAMINÉRGICOS NA ARTICULAÇÃO
DO JOELHO DE RATOS**

EDUARDO SOUZA SILVA

Tese apresentada ao Curso
de Pós-graduação em
Farmacologia do Centro de
Ciências Biológicas da
Universidade Federal de
Santa Catarina, como
requisito à obtenção do Título
de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi

Florianópolis/SC, 2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Eduardo
O NEUROPEPTÍDIO Y (NPY) NA MEDULA ESPINHAL MEDEIA O
EFEITO HIPONOCICEPTIVO DA ATIVAÇÃO DE RECEPTORES H1
HISTAMINÉRGICOS NA ARTICULAÇÃO DO JOELHO DE RATOS / Eduardo
Silva ; orientador, Carlos Rogério Tonussi -
Florianópolis, SC, 2013.
85 p.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Artrite. 3. Dor . 4. Histamina. 5.
Neuropeptídeo Y. I. Rogério Tonussi, Carlos. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Em especial aos meus pais **Elmarion S. Silva e Maria José S. Silva**, meus irmãos **Leonardo S. Silva e Ricardo S. Silva**. Pessoas sempre presentes em minha vida, pelos seus exemplos de dedicação, força, persistência, competência e caráter.

A minha esposa **Fabiana Noronha Dornelles** que me ensina todos os dias o caminho da felicidade.

Ao meu mestre e Prof. Dr. **Carlos Rogério Tonussi**, por ter aberto as portas da carreira científica, pelo exemplo de caráter e fé, e por estimular o meu crescimento como ser humano.

Aos amigos de laboratório **Taciane Stein, Carol Eto, Lucas Mascarin, Franciele Finn e Máira Assunção Bicca** que me ajudaram a construir este trabalho. Em especial, agradeço ao amigo **Daniel Teixeira de Oliveira** que ingressou comigo neste projeto científico e dividiu grande parte da construção deste conhecimento científico.

A todos os **professores e funcionários** do Departamento de Farmacologia.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)** e ao **Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ)** pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIações

2-PEA	- 2-Piridiletilamina
5-HT	- Serotonina
AINES	- Antiinflamatórios não esteroidais
ANOVA	- Análise de variância
ATM	- Atmosfera
BHE	- Barreira hemato-encefálica
CD	- Corno Dorsal
CV	- Corno Ventral
CET	- Cetirizina
CGRP	- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	- Cicloxigenase
CMH	- Fibras C responsivas a estímulo mecânico e calor
CROMO	- Cromoglicato de sódio
DA	- Diâmetro articular
EP	- Extravasamento plasmático
EPM	- Erro padrão da média
F1	- Fase 1 da resposta à formalina
F2	- Fase 2 da resposta à formalina
FIG	- Figura
FS	- Fluído Sinovial
GABA	- Ácido gama aminobutírico
GRD	- Gânglio da Raiz Dorsal
hPa	- Hectopascal
I.A.	- Intra-articular
I.P.	- Intraperitoneal
I.PT	- Intraplantar

I.T	- Intratecal
I.V.	- Intravenoso (veia gengival)
IASP	- International Association for the Study of Pain
LOR	- Loratadina
MMCP	- Mastócitos de mucosa ricos em sulfato de condroitina
NMDA	- N-Methyl-D-aspartate
NPY	- Neuropeptídeo Y
AO	- Osteoartrite
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PAG	- Substância cinzenta periaquedutal
PBS	- Salina tamponada com fosfato
R.P.M	- Rotações por minuto
SNC	- Sistema Nervoso Central
SP	- Substância P
TEP	- Tempo de elevação da pata
TBS	- Salina tamponada com tris
VIP	- Peptídeo intestinal vasoativo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -Papel dos mastócitos na artrite.
- Figura 2 -Injeção intra-articular.
- Figura 3 -Injeção intratecal.
- Figura 4 -Seqüência do principal protocolo experimental utilizado na tese.
- Figura 5 -Efeito da administração sistêmica de cetirizina no teste de incapacitação articular induzido por formalina.
- Figura 6 -Efeito da administração sistêmica de cetirizina no teste de retirada da cauda induzido por estímulo térmico.
- Figura 7 -Efeito da administração local de cromoglicato de sódio na presença e na ausência de loratadina administrada de forma sistêmica na incapacitação articular induzida por formalina.
- Figura 8 -Efeito da administração local da tele-metilhistamina co-administrada com formalina na incapacitação articular.
- Figura 9 -Efeito da co-administração do agonista do receptor H1 com formalina ou com a administração sistêmica de cetirizina no comportamento nociceptivo induzido por formalina intra-articular.
- Figura 10 -Efeito da co-administração do agonista do receptor H1 com formalina na pata.
- Figura 11 -Efeito da morfina administrada sozinha na medula espinhal ou com 2-PEA intra-articular na incapacitação articular induzida por formalina.

- Figura 12 -Efeito da administração de agonista e antagonista do receptor Y1 na medula espinhal na incapacitação articular induzida por formalina e a reversão do efeito hiponociceptivo do 2-PEA no joelho pela administração de BIBO 3304 na medula espinhal.
- Figura 13 -Níveis de expressão total da proteína do receptor Y1 no segmento lombar (L4-L5).
- Figura 14 -Efeito da administração da neurotoxina NPY-sap na nocicepção articular induzida pela formalina.
- Figura 15 -Hiponocicepção da tripsina co-administrada com formalina intra-articular, inefetividade de BIBO 3304 e a reversão do efeito hiponociceptivo da tripsina por naloxona.
- Figura 16 -Proposta do mecanismo de hiponocicepção evocada pela ativação intra-articular de fibras articulares.

LISTA DE IMAGENS

- A - Equipamento eletrônico para análise do TEP
- B - Sapatilha acoplada a pata do animal

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -Divisão das fibras aferentes primárias que inervam a articulação do joelho de gatos.
- Tabela 2 -Principais compostos utilizados.
- Tabela 3 -Efeito da administração de cetirizina, cromoglicato de sódio e loratadina no edema e extravasamento plasmático induzida por formalina intra-articular.
- Tabela 4 -Efeito da administração de 2-PEA co-administrado com formalina e cetirizina sistêmica no edema e extravasamento plasmático intra-articular.

A histamina é encontrada no líquido sinovial de indivíduos saudáveis e pacientes com diversos tipos de artrite e anti-histamínicos H1 potencializaram o comportamento nociceptivo no teste de formalina articular. É sabido que a histamina provoca coceira nos tecidos cutâneos, no entanto, em tecidos profundos a sua função sensorial não está clara. Nosso objetivo foi elucidar as estruturas envolvidas com o mecanismo de hipernocicepção dos anti-histamínicos H1 e ao contrário, a hiponocicepção observada com a histamina na incapacitação articular após injeção de formalina em joelhos de ratos. A incapacitação articular foi medida através da contagem do tempo de elevação da pata (TEP; s) durante o período de 1 min de caminhada forçada, a cada 5 minutos, durante uma sessão experimental de 60 min. O edema articular foi avaliado pelo aumento de diâmetro articular, (DA; cm), e o extravasamento de plasma foi medido pela quantidade de azul de Evans (25 mg / kg, i.v., 30 min antes do teste) no líquido sinovial (EP; mg / ml) 1 hora após a injeção de formalina. A formalina 1,5 % evoca duas fases de incapacitação, aumento do DA e EP. A cetirizina, 1 hora antes da formalina, causou somente hipernocicepção na 2ª fase do teste da formalina. Cromoglicato de sódio coadministrado com formalina preveniu o efeito hipernociceptivo da loratadina. Nenhum dos tratamentos alterou o DA e o EP. Tele-metihistamina e 2-PEA coadministrados com formalina promoveram hiper e hiponociceptivo, respectivamente. Somente a maior dose de 2-PEA aumentou o TEP. A cetirizina, 1 h antes da formalina preveniu a hiponocicepção do 2-PEA. Nenhum tratamento alterou o DA e o EP. A dose subefetiva de morfina na medula espinhal foi potencializada em seu efeito hiponociceptivo pela dose subefetiva de 2-PEA coadministrado com formalina no joelho. Leu³¹ Pro³⁴ NPY e BIBO 3304 administrados na medula espinhal diminuí e aumentou o TEP, respectivamente. A dose subefetiva de BIBO 3304 na medula espinhal preveniu o efeito hiponociceptivo do 2-PEA coadministrado com formalina no joelho. A neurotoxina NPY-sap diminuiu a expressão do receptor Y1 no segmento lombar (L4-L5) e preveniu o efeito hiponociceptivo de 2-PEA coadministrado com formalina. Tripsina coadministrado com formalina diminuiu o TEP, e ao contrário do BIBO 3304 administrado na medula espinhal, a naloxona administrada de forma subcutânea preveniu o efeito hiponociceptivo da tripsina coadministrada com formalina no joelho. Estes dados mostram que a liberação de

histamina articular a partir de mastócitos, atuando em receptores H1 tem um papel hiponociceptivo independente de qualquer efeito vascular. Além disso, estes resultados sugerem que o mecanismo hiponociceptivo evocado pela ativação do receptor H1 e não pelo receptor PAR-2 articular, provavelmente envolve a liberação de NPY na medula espinhal. Portanto, o conjunto de resultados sugere um novo mecanismo que pode ser coadjuvante no tratamento de inflamação articular.

ABSTRACT

Histamine is found in synovial fluid from healthy individuals and patients with various types of arthritis and H1 antihistamines potentiated the nociceptive behavior in the formalin test joint. It is known that histamine causes itching in the skin, however, in deep tissues its sensory functions is not clear. Our goal was to elucidate the structures involved in the mechanism of hypernociception H1 antihistamines and unlike hyponociception observed with histamine in articular incapacitation after formalin injection in rat knees. The articular incapacitation was measured by counting the paw elevation time (PET; s) during the period of 1 min walk forced, every 5 minutes during a 60-min experimental session. The joint swelling was evaluated by the increase in articular diameter (AD; mm) and plasma leakage (PL; mg / ml) was measured by the quantity of Evans blue (25 mg / kg, iv 30 minutes before the test) in synovial fluid 1 hour after the formalin injection. Formalin 1.5% evokes two phases of incapacitation (PET), increased AD and PL. Cetirizine, 1 hour before formalin caused hypernociception in phase 2 of the formalin test. Cromolyn sodium co-injected with formalin prevented the hypernociceptive effect of loratadine and none of the treatments changed the AD and PL. Tele-metilhistamine and 2-PEA co-administered with formalin promoted hyper and hyponociception, respectively. Only the highest dose of 2-PEA increased the PET. Cetirizine, 1 hour before formalin, prevented hyponociception effect of 2-PEA. No treatment altered the AD and PL. The subeffective dose of morphine in spinal cord was potentiated by subeffective dose of 2-PEA co-injected with formalin. Leu³¹ Pro³⁴ NPY and BIBO 3304 in spinal cord, decreased and increased the PET, respectively. The subeffective dose of BIBO 3304 prevented the effect of hyponociceptive 2-PEA. The pre-treatment 14 days before with neurotoxin NPY-sap in spinal cord decreased the Y1 receptor expression in the lumbar segment (L4-L5) and prevented the hyponociceptive effect of 2-PEA co-injected with formalin. Trypsin co-injected with formalin decreased the TEP and unlike of BIBO 3304 in spinal cord, naloxone subcutaneous prevented this trypsin hyponociceptive effect. These data support that histamine release from articular mast cells on H1 receptors have a hyponociceptive role without vascular effect. Furthermore, these results suggest that the hyponociceptive mechanism of histamine and not trypsin, involves the NPY release in spinal cord. Therefore, the set of results

suggests a new mechanism that may be useful in the treatment of joint pain.

SUMÁRIO

I- INTRODUÇÃO.....	1
1. NEUROFISIOLOGIA DA NOCICEPÇÃO.....	2
1.1 NEURÔNIOS AFERENTES ARTICULARES.....	2
1.2 MEDULA E SISTEMA SUPRA-MEDULAR.....	5
2. DOR EM CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS.....	5
2.1 NEURÔNIOS AFERENTES PRIMÁRIOS.....	6
2.2 MODULAÇÃO DA DOR NA MEDULA ESPINHAL.....	7
3. FATORES RELACIONADOS À DOR ARTICULAR.....	8
3.1 FATORES MECÂNICOS.....	8
3.2 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.....	9
II- OBJETIVOS	17
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
III- MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1- ANIMAIS.....	19
3.2- COMPOSTOS UTILIZADOS.....	19
3.3-LOCAL DE ADMINISTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS.....	20
3.4-MODELO EXPERIMENTAL.....	21
3.5-OUTROS TESTES NOCICEPTIVOS UTILIZADOS.....	24
3.6- WESTERN BLOT.....	25
3.7- PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	27
3.8- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27

IV- RESULTADOS.....	29
V- DISCUSSÃO.....	51
5.1- ESQUEMA ILUSTRATIVO FINAL.....	62
VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
VII- ANEXOS.....	85

1- INTRODUÇÃO

As patologias músculo-esqueléticas são a causa mais frequente de incapacitação funcional no mundo moderno (OMS, 2003; IASP, 2009), e a prevalência destas enfermidades está subindo a níveis alarmantes. Os motivos do surgimento de novos casos podem ser atribuídos a dois fatores: o primeiro é fisiológico e refere-se ao desgaste tecidual decorrente do passar dos anos, sendo diretamente associado à progressiva perda de função, com desfecho final à incapacitação definitiva. O segundo, epidemiológico, é a constante projeção do envelhecimento populacional (OMS, 2010).

Dentre as diversas doenças músculo-esqueléticas, as afecções articulares compõem enorme parcela. Estima-se que a osteoartrite, uma doença articular degenerativa, afetará ao menos uma articulação em uma parcela superior a 90% das pessoas acima de 65 anos de idade, que terão ainda mais articulações acometidas com o passar do tempo (IASP, 2009). Essa previsão é ainda mais desconfortável se levarmos em consideração que a dor é o sintoma mais prevalente dessas afecções, sendo normalmente acompanhado de outros clássicos sinais inflamatórios, como o edema, o calor, o rubor e a impotência funcional (Teixeira *et al.*, 2006). Apesar de afetar milhões de pessoas pelo mundo, o motivo da ocorrência da dor nas articulações permanece apenas parcialmente esclarecido. Dessa maneira, são comuns os relatos de pacientes insatisfeitos com os tratamentos disponíveis, tanto pela falta de efetividade quanto pelos significativos efeitos adversos.

Nas afecções articulares, a dor é caracterizada por uma sensação desagradável que atua como um mecanismo de alarme e defesa do organismo (Schaible, 2009). Enquanto modalidade de percepção, a dor constitui-se num sistema de proteção a uma potencial ou real lesão tecidual. E através da ativação de mecanismos que envolvem vias reflexas espinhais e supraespinhais o organismo busca inibir ou facilitar a transmissão dolorosa (Dray, 1994; Julius e Basbaum, 2001).

Desde (1906) que Sherrington introduziu a ideia da existência de fibras receptoras nervosas que detectavam e codificavam a sensação dolorosa, conhecidas como nociceptores, vários estudos demonstraram que a ativação de tais fibras por estímulos periféricos nocivos, capazes ou não de gerar danos teciduais, promoveriam impulsos nervosos. Esses impulsos,

transmitidos ao sistema nervoso central, teriam como principal objetivo informar as condições do tecido periférico (IASP, 2008). Assim, a dor articular — que normalmente ocorre em exercícios ou até mesmo durante as atividades da vida diária — é atribuída a uma complexa interação entre as diferentes células residentes ou migratórias à articulação com os nociceptores e também a codificação, interpretação e reação que o sistema nervoso central promove ao estado do ambiente articular.

1. NEUROFISIOLOGIA DA NOCICEPÇÃO

1.1 Neurônios aferentes articulares

Apesar deste trabalho não lidar diretamente com fibras aferentes primárias, particularmente nociceptores, os estudos de nocicepção *in vivo* pressupõem a ativação destas fibras. Assim, faremos uma breve revisão da anatomia e da fisiologia sensorial dos neurônios, principalmente na articulação femuro-tibial, com ênfase aos nociceptores e como os estudos associam a ativação destas fibras com a sensação de dor.

As fibras aferentes primárias articulares apresentam terminações nervosas periféricas livres ou podem estar associadas a estruturas sensoriais especializadas que detectam estímulos de movimento proprioceptivo estático, e/ou dinâmico, ou ainda nocivas, ou potencialmente nocivas (McDougall *et al.*, 2006). Os corpos celulares dos aferentes sensoriais articulares estão localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD), localizados próximos às raízes nervosas dos aferentes primários que adentram a medula espinhal.

Na articulação do joelho, os estudos eletrofisiológicos permitiram a identificação dos nociceptores através de estímulos mecânicos. Desse modo, as fibras nervosas sensoriais articulares puderam ser definidas em quatro categorias, de acordo com sua velocidade de condução (Willis, 1992).

Tabela 1: Divisão das fibras aferentes primárias que inervam a articulação do joelho de gatos.

Fibras	Velocidade de condução	Estímulos de ativação na articulação
Tipo I	65 - 100 m/s	Movimentos inócuos
Tipo II	21 - 65 m/s	Movimentos inócuos e normalmente ativados por estímulos de pressão
Tipo III	2.5 - 20 m/s	55% são ativadas apenas por movimentos nocivos e aproximadamente 45% (nociceptores silenciosos)
Tipo IV	< a 2.5 m/s	70% são ativadas apenas por movimentos e aproximadamente 30% (nociceptores silenciosos) não respondem mesmo a este estímulo.

Essa divisão foi atribuída aos dois nervos articulares, medial e posterior, que inervam o joelho (Willis, 1992), e das aproximadamente 650 fibras aferentes encontradas em cada nervo, cerca de 80% das fibras do joelho são consideradas nociceptores (Langford, 1983; Hildebrand *et al.*, 1991). De acordo com a propriedade de ativação das fibras nervosas aferentes sensoriais articulares, acredita-se que as fibras com grande velocidade de condução I e II, ou seja, fibras A β , têm como função primária, na ausência de lesão tecidual ou nervosa, detectar e transmitir

informações mecânicas de baixa intensidade, da articulação ao sistema nervoso central, codificando e transmitindo sinais proprioceptivos, que podem ser interpretados como dinâmico (sensações de movimento) ou estático (Dorn, 1991). Por outro lado, as fibras do tipo III e IV, ou seja, fibras A δ e C, poderiam ser consideradas como nociceptoras, pois possuem alto limiar de ativação, comparadas às fibras do tipo I e II, e funcionariam como detectoras e transmissoras das informações mecânicas de alta intensidade, da articulação ao sistema nervoso central.

A questão de como um estímulo mecânico doloroso pode ser convertido em sinal elétrico a ser propagado ao longo dos nervos sensoriais para o sistema nervoso central ainda é incerta. É proposto que a exposição das terminações sensoriais livres provavelmente resulte em extensão significativa do axolema durante um determinado movimento articular (McDougall *et al.*, 2006). Estudo eletrofisiológico identificou canais iônicos sensíveis a estímulos mecânicos em fibras aferentes do tipo III e tipo IV do joelho. Isso pode ser o primeiro desenho sobre os mecanismos fisiológicos responsáveis pela transdução mecânica em articulações (Heppelmann, 2005). A presente teoria mostra que o movimento da articulação promove tensões de cisalhamento no axolema das terminações livres dos neurônios periféricos, resultando na abertura desses canais iônicos. Isso permitiria uma despolarização do terminal nervoso e a geração de potenciais de ação, que são posteriormente transmitidos ao sistema nervoso central e codificados como sensação mecânica. Se um movimento nocivo é aplicado à articulação, a taxa de disparo do nervo aferente aumenta e o sistema nervoso central interpreta esta atividade nociceptiva como dor (Schaible e Schmidt 1983; Grigg *et al.*, 1986). A ciência que estuda os nociceptores não está restrita à estimulação mecânica e à sua característica morfofuncional a este tipo de estímulo. Tal conhecimento tem avançado consideravelmente com a introdução de técnicas *in vitro* de eletrofisiologia do aferente primário (Cervero e Sann, 1989; Cohen e Perl, 1990; Kumazawa e Mizumura, 1983; Reeh, 1986), ou ainda em técnicas de cultura de neurônios aferentes primários (Nicolson *et al.*, 2002). Desse modo, inúmeros trabalhos mostram que a maioria das fibras sensoriais nociceptivas normalmente responde a múltiplas formas de energia (térmica, mecânica e química) que produzem lesão, conhecidas, assim, como polimodais, ou ainda respondem preferencialmente a determinadas substâncias químicas, ou a determinadas temperaturas (para revisão ver Millan, 1999).

1.2. Medula espinhal e sistema nervoso supramedular

A informação sensorial nociceptiva percorre os aferentes primários, entrando no sistema nervoso central através da sinapse com os neurônios de segunda ordem, localizados no corno dorsal (CD) da medula espinhal. Esses neurônios são classificados em: a) nociceptivos específicos, b) de amplo espectro dinâmico e c) receptores mecânicos de baixo limiar. Os primeiros são ativados exclusivamente por estímulos nocivos, ao contrário dos últimos que respondem somente à estimulação táctil inócua. Por outro lado, os neurônios de amplo espectro dinâmico são ativados por ampla faixa de intensidades, desde estímulos inócuos até nocivos (para revisão ver Millan, 1999).

A substância cinzenta da medula espinhal pode ser dividida em uma base cito-arquitetônica em 10 lâminas. Destas, as lâminas I (camada marginal), II (substância gelatinosa), III e IV (núcleo proprius) e V e VI (camadas profundas) compreendem o corno dorsal. A lâmina VII corresponde à substância cinzenta intermediária, as lâminas VIII e IX compreendem o corno ventral (CV) medial e lateral, respectivamente, enquanto que X é a lâmina da região em torno do canal (Deve-se notar que a lâmina VI é claramente definida apenas no alargamento lombo-sacral e cervical). As duas maiores lâminas superficiais, I e II (a parte externa da lâmina II), em conjunto com as lâminas mais profundas, V e VI, e lâmina X constituem as regiões implicadas na recepção, processamento e transmissão de informação nociceptiva. As fibras nociceptivas não mielinizadas, com origem em tecidos profundos, como articulações, músculos e vísceras, projetam-se primariamente para a lâmina I e V/VI (Rexed, 1952; Besson, 1987; Willis e Coggeshall, 1992).

2. FISIOLOGIA DA DOR EM CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS

2.1 Neurônios aferentes primários

Algumas evidências indicam claramente que um dos fatores de origem para a dor da artrite ocorre pela liberação de mediadores periféricos. Além disso, durante o processo inflamatório, grandes mudanças ocorrem na plasticidade dos sistemas nervoso periférico e central, que diminuem os limiares de dor, dando origem à alodinia (dor em resposta a um estímulo normalmente inócua) e hiperalgesia

(agravada a intensidade da dor em resposta a um estímulo normalmente doloroso).

Um meio pelo qual a dor é gerada nas articulações artríticas é através da estimulação dos chamados nociceptores silenciosos. Essas fibras nervosas aferentes são silenciosas em articulações normais. No entanto, após a lesão do tecido ou indução de inflamação, tais nociceptores se tornam ativos e começam a enviar informação nociceptiva para o sistema nervoso central (Grigg, *et al.*, 1986; Schaible e Schmidt, 1985). Esses disparos complementares, oriundos da periferia, são fatores que contribuem e são responsáveis pela geração da dor da artrite. A diminuição do limiar de dor na artrite também está relacionada a outro fenômeno importante, conhecido como sensibilização (Schaible, 2009). A sensibilização de fibras aferentes primárias é gerada pela ação de mediadores inflamatórios nos terminais livres dos nociceptores (Flake e Gold, 2005), e esta situação é possível já que, no tecido periférico, diferentes substâncias neuroativas são liberadas de células específicas em resposta às lesões (Schaible, 2006).

Na sensibilização ocorrem alterações funcionais de neurônios nociceptivos. Tais alterações podem ser explicadas como:

- Respostas exacerbadas do neurônio a estímulos que estariam dentro da faixa normal de seu limiar de ativação;
- Ativação de neurônio desencadeada por estímulo que normalmente não a causaria;

Diferente dos nociceptores cutâneos, sensibilizados a estímulos térmicos, os nociceptores em tecidos profundos somáticos, como articulações e músculos, são sensibilizados, respectivamente, a estímulos mecânicos de movimento articular ou contração muscular. Além de mecanicamente sensibilizados, os nociceptores articulares podem ser sensibilizados por diferentes mediadores químicos liberados durante o processo inflamatório. Do ponto de vista da eletrofisiologia, a sensibilidade química dos nociceptores explicaria a atividade contínua durante o processo inflamatório, o que poderia causar, ou facilitar, a dor em condições de repouso. Por exemplo, alguns mediadores inflamatórios produzem intensa sensibilização dos nociceptores ao calor, de modo que seu limiar de ativação poderia cair o suficiente para se situar dentro da faixa de temperatura do corpo (Koltzenburg *et al.*, 1992). Isso significa que a dor poderia ser resultante do estímulo térmico, devido ao calor do próprio corpo, que localmente pode ser intensificado pela hiperemia inflamatória. Portanto, a maior

compreensão dos mecanismos e mediadores responsáveis pela geração e manutenção da sensibilização articular pode conduzir ao desenvolvimento de novos alvos de drogas que poderiam aliviar ou mesmo abolir a dor da artrite.

2.2 Modulação da dor na medula espinhal

A dor é indispensável para a sobrevivência. Entretanto, a excessiva estimulação periférica dos nociceptores ativa áreas e vias inibitórias que objetivam regular a dor no sistema nervoso central (SNC). Head e Holmes postularam influências modulatórias da dor e propuseram o tálamo como a região central em que a dor é percebida e, por outro lado, o neocórtex a região em que a dor é discriminada, e isto poderia interferir na resposta do tálamo aos estímulos nocivos (Head e Holmes, 1911). Mais tarde, em 1954, Hagbarth e Kerr apresentaram as primeiras evidências diretas de que os sítios supramedulares controlariam as vias descendentes (presumivelmente sensoriais), e Carpenter e colaboradores (1965) demonstraram o controle descendente dos eferentes sensoriais para as vias ascendentes. No entanto, a existência de um sistema modulatório específico da dor só foi claramente articulada em 1965, na teoria de controle do “portão” da dor, proposta por Wall e Melzack. De acordo com essa teoria, os interneurônios da lâmina II da medula espinhal (chamada de substância gelatinosa) poderiam inibir ou facilitar os fluxos dos aferentes dentro do corno dorsal, antes de eles evocarem a resposta e a percepção da dor.

As vias modulatórias da dor controlam a liberação de neurotransmissores dos terminais nociceptivos das fibras aferentes primárias, no corno dorsal da medula espinhal. A ativação das vias descendentes inibitórias bloqueia direta e indiretamente os neurônios de projeção no corno dorsal. Diretamente, através de seus eferentes serotoninérgicos e catecolaminérgicos (Westlund *et al.*, 1990) e, indiretamente, através da inibição dos interneurônios excitatórios (Light e Kavookjian, 1988) ou da excitação dos interneurônios inibitórios que contêm neurotransmissores GABA (ácido gama aminobutírico) e glicina (Todd *et al.*, 1993). É amplamente conhecido que a estimulação aferente periférica de fibras A β (aferentes primários com baixo limiar de ativação mecânica) é responsável por modular a dor em nível medular. No entanto, estudo mais recente mostra que alguns nociceptores, como fibras sensíveis à capsaicina, após serem estimulados periféricamente, também são responsáveis por ativar interneurônios gabaérgicos localizados na lâmina II (Polgár *et al.*, 2010), sugerindo

a existência de um mecanismo de inibição nociceptiva, possivelmente através da estimulação periférica.

3. FATORES RELACIONADOS COM A DOR ARTICULAR

A dor articular é principalmente percebida quando fazemos uso das articulações. Os fatores que alteram a sensibilidade mecânica articular e promovem a nocicepção podem ser divididos em dois grupos distintos: os fatores mecânicos e os mediadores inflamatórios.

3.1 Fatores mecânicos

Articulações diartroidais são envolvidas por uma cápsula fibrosa que contém fluido sinovial, e o volume da articulação normal do joelho de humanos varia entre um e quatro milímetros. Após a lesão articular ou durante a inflamação, os vasos sanguíneos sinoviais tornam-se mais permeáveis às proteínas do plasma, que pode extravasar para fora do vaso e se acumular no espaço intra-articular. O deslocamento subsequente das forças de Frank-Starling promove fluidez da exsudação para o interior da articulação, com a formação subsequente do edema. Como a articulação é um espaço fechado, essa efusão provoca um aumento da pressão intra-articular. Em articulações normais, a pressão intra-articular varia entre -2 a -10 mmHg (Reeves, 1966; Levick, 1979). No entanto, na artrite reumatoide o volume do fluido sinovial nos joelhos pode subir até 60 ml ou mais, com concomitante aumento da pressão intra-articular para cerca de 20 mmHg (Jayson e St Dixon, 1970). Um estudo realizado com a infusão de uma solução de dextrose e salina na articulação do joelho revelou que a pressão intra-articular subiu mais abruptamente em pacientes com artrite do que em indivíduos normais (Jayson e St Dixon, 1970), provavelmente devido a uma perda de viscoelasticidade capsular. A ocorrência de *panus* invasor faz a pressão intra-articular aumentar, e os participantes do estudo relataram maior aperto em torno de seu joelho e, finalmente, a dor era experimentada de forma moderada. Os estudos em animais (Andrew e Dodt, 1953; Ferrel *et al.*, 1986) demonstraram que uma elevação da pressão intra-articular resulta em disparo de aferentes articulares, e a frequência de tais descargas neuronais correlaciona-se com o nível de pressão efetuada. Assim, o aumento da pressão intra-articular associado à formação de edema nas articulações artríticas provavelmente ativa nociceptores articulares, levando à dor.

3.2 Mediadores inflamatórios

Após uma lesão ou infecção, as articulações normalmente apresentam uma resposta inflamatória natural que afeta principalmente a sinóvia (sinovite). Esse processo é necessário para a reparação dos tecidos danificados, possibilitando que a articulação recupere a normalidade funcional. Mediadores inflamatórios liberados na articulação, de diferentes fontes (nervos, imunócitos sinoviais), ajudam o endotélio vascular a orquestrar as respostas de cura.

Esses mesmos mediadores inflamatórios também atuam em nervos sensoriais comuns. Deste modo, é observado que a aplicação local de vários compostos em articulações normais provoca maior frequência de disparos em aferentes, que é semelhante aos registros observados em joelhos artríticos. A identificação dos agentes inflamatórios que evocam a nocicepção está em andamento, e os resultados, a partir destes estudos, estão tendo grande valor terapêutico para revelar alvos que podem inibir a sensibilização periférica e, portanto, a dor. O que se segue é um resumo de alguns dos principais mediadores inflamatórios que são associados com a nocicepção articular.

3.2.1 Eicosanoides

Prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas, tromboxanos e endocanabinoides são estudados em relação à inflamação das articulações e à dor (McQueen, 1999; Kean e Buchanan, 2005). O campo da dor tem geralmente focado na atividade das prostaglandinas e na formação das duas isoformas de ciclooxigenase, COX-1 e COX-2 (para revisão, ver Smith *et al.*, 1996). Como a COX-2 é a isoforma não constitutiva e encontrada em quantidades significativas na sinóvia, nos macrófagos e nas células endoteliais dos pacientes com artrite reumatóide (Crofford *et al.*, 1994; Siegle *et al.*, 1998), acreditava-se que a sua inibição seletiva teria um melhor valor terapêutico, comparado às drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINES) tradicionais. Pensou-se inicialmente que outra vantagem para uso do coxib estaria relacionada com a menor toxicidade gastrointestinal em comparação com os AINEs (Bombardier *et al.* 2000). Embora a capacidade anti-inflamatória e analgésica dos coxibes na artrite seja convincente, um certo número destes agentes produziu severos efeitos colaterais, como infarto do miocárdio, hipertensão arterial e insuficiência renal crônica.

3.2.2 Medidores liberados de neurônios

Os principais mediadores liberados dos neurônios envolvidos com a dor articular são os neuropeptídeos substância P - SP, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - CGRP, o peptídeo intestinal vasoativo - VIP e o neuropeptídeo Y - NPY. Esses mediadores são armazenados e liberados a partir dos terminais de nervos autônomos e/ou de aferentes primários e estão relacionados à inflamação neurogênica. Foram todos imunolocalizados em tecidos articulares, e seus níveis aumentam durante a artrite (McDougall *et al.*, 1993; Ahmed *et al.* 1993;1995). Ao contrário do co-transmissor simpático NPY, que diminui as respostas de fibras aferentes primárias na articulação do rato (Just e Heppelmann, 2001), todos os outros neuropeptídeos estão envolvidos na geração e promoção da dor no joelho, em maior ou menor grau e de acordo com o modelo experimental (McDougall, 2006).

3.3.3 Mediadores de mastócitos

Há muito tempo os mastócitos e seus mediadores foram reconhecidos como atuantes na articulação normal de humanos. Os mastócitos constituem cerca de 3% das células nucleadas localizadas na superfície e no fluido sinovial (FS) (Castor, 1963). Estudos com mastócitos na sinóvia mostram uma estreita proximidade com fibras aferentes do tipo III e tipo IV do joelho (McNeil e Gotis-Graham, 2000; Zhao *et al.*, 2005), bem como a capacidade de influenciar a infiltração de leucócitos nas articulações (Balazs *et al.*, 1989; Theoharides *et al.*, 2001). Os mastócitos não estão localizados dentro da camada de revestimento sinovial em si e raramente são observados no encontro entre a cartilagem com a membrana sinovial (Janes e McDonald, 1948; Castor, 1960; Crisp *et al.*, 1984), mas preenchem o tecido conjuntivo subsinovial frouxo e o tecido adiposo articular, que se aglomeram perto de vasos sanguíneos e nervos. A concentração de mastócitos na camada subsinovial é maior que em zonas mais afastadas da articulação, o que implica uma espécie de especificidade de ação no revestimento das articulações e também na cavidade articular (Gotis-Graham e McNeil, 1997).

Os mastócitos são classificados com base no teor de protease neutra dos seus grânulos citoplasmáticos (Gurish e Austen, 2001). O fenótipo dos mastócitos sinoviais mostra heterogeneidade regional. Por exemplo, mastócitos perto de vasos sanguíneos possuem maior marcação para MMCP-5, ao passo que em

mastócitos próximos do revestimento sinovial essa marcação se torna mais vaga, sugerindo regulação microambiental do fenótipo celular dentro da sinóvia normal (Shin *et al.*, 2006). A contribuição dos mastócitos sinoviais para a fisiologia articular normal é desconhecida, mas estudos de microscopia eletrônica em humanos revelam evidências morfológicas de degranulação em cerca de um a cinco por cento (1-5%) de mastócitos, sugerindo uma liberação basal dos mediadores com potencial contribuição para a homeostase da articulação. Em comparação com os mastócitos isolados a partir da pele humana, do pulmão e do coração, os mastócitos sinoviais apresentam particularmente respostas rápidas após a administração de substância P (De Paulis *et al.*, 1996). Ao contrário dos encontrados no tecido cutâneo, os mastócitos sinoviais em modelos de osteoartrite (OA) não respondem à anafilatoxina C5a (De Paulis *et al.*, 1996), ou morfina (Verbsky *et al.*, 1996). Essas observações corroboram a ideia de que os mastócitos sinoviais apresentam um perfil funcional distinto dos mastócitos de outros tecidos.

A participação dos mastócitos foi investigada em diversos modelos de artrite induzidos em animais, como carragenina, iodoacetato monossódico, antígenos, entre outros (Kohn *et al.*, 1962; Van Arman *et al.*, 1970; Pircio *et al.*, 1975; Brackertz, 1977; Coderre e Wall, 1987; Fernihough *et al.*, 2004; Schuelert e Mcdougall, 2009). Já a expansão dos mastócitos no tecido sinovial em humanos é observada em pacientes com condições patológicas na articulação (Nigrovic e Lee, 2004). Desse modo, constata-se que os mastócitos (Fig. 1) têm participação em todas as etapas do processo de degeneração articular que ocorre durante o processo inflamatório.

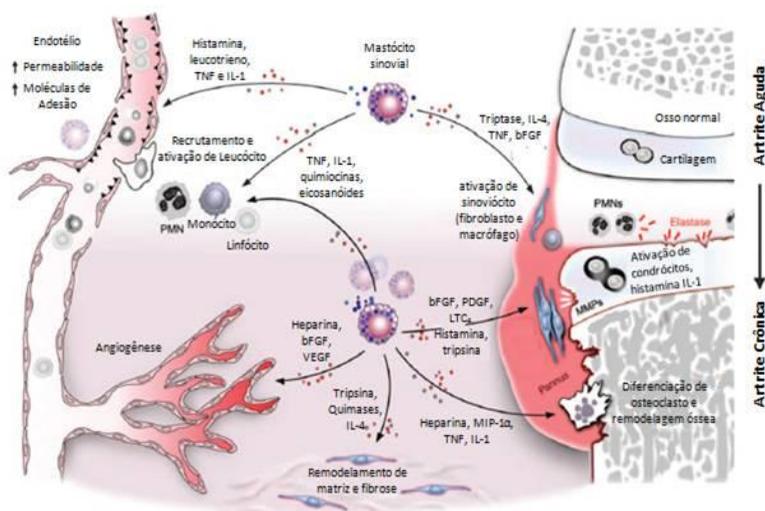


Figura 1: Envolvimento de mastócitos com as diferentes fases (aguda e crônica) da artrite (adaptada de Nigrovic e Lee, 2004).

O efeito dessas células em qualquer estado patológico é frequentemente associado ao processo de degranulação, embora algumas ações, independentes da degranulação, sejam documentadas (Galli *et al.*, 2005). A liberação dos mediadores dos mastócitos respeita uma ordem sequencial temporária. Através do processo de exocitose, inicialmente os grânulos liberam — em questão de segundos, após serem estimulados — histamina, proteoglicanos, proteases neutras (Horigome *et al.*, 1993, Dray *et al.*, 1994; Nigrovic e Lee, 2004) e serotonina, em ratos (Kushnir-sukhov *et al.*, 2007; Ringvall *et al.*, 2008). Em uma fase intermediária, aproximadamente em 30 minutos, os mastócitos iniciam a síntese de eicosanóides oriundos da clivagem de ácido araquidônico de fosfolipídios de membrana. Após essas fases iniciais, em horas e dias, os mastócitos promovem a transcrição e tradução de novos genes que geram uma série de citocinas e quimiocinas consideradas importantes nas diferentes fases do processo inflamatório (Gilfillan e Tkaczyk, 2006).

Ao contrário dos proteoglicanos e proteases neutras que permanece incerto seus mecanismos de ação na artrite, a serotonina e a histamina são aminas comumente estudadas e consideradas como importantes no desenvolvimento da inflamação articular. A serotonina (5-HT) está presente no líquido sinovial de articulações

artríticas, sendo uma amina participante no processo e modulação da dor. Trata-se de um neurotransmissor presente em neurônios serotoninérgicos centrais e periféricos, e assim como em outros tecidos, acredita-se que sua principal fonte de liberação na articulação ocorra principalmente a partir de mastócitos e em menor escala de plaquetas (Anden et al., 1967; Lehtosalo et al., 1984; Alstegren et al., 1997).

Sabe-se que a 5-HT liberada de estruturas centrais superiores como o tronco encefálico é capaz de causar analgesia em nível medular, sendo este mecanismo considerado como parte do sistema inibitório descendente (Yaksh et al., 1979). Todavia, perante situações nocifensivas como lesão neuronal, tecidual ou inflamação a 5-HT é capaz de participar da sensibilização dolorosa periférica e de alterações vasculares, sendo considerada uma substância pró-inflamatória (Kessler et al., 1992; Doak et al., 1997). Esta participação poderá ocorrer diretamente através da sensibilização de fibras aferentes primárias e/ou indiretamente, por meio da sua interação com células encontradas no local de lesão e a conseqüente liberação de substâncias algogênicas. Tais ativações são dependentes de pré-requisitos como a presença de 5-HT em níveis normais ou aumentados, e a presença de alguns dos seus receptores (Sommer, 2004).

Designada como autacóide (grego para “automedicação”), a histamina tem participação em diversos processos fisiológicos, tais como prurido, regulação vascular, regulação de secreção gástrica e broncoconstrição, dentre outros, atuando em seus receptores H1, H2, H3 (Hill, 1997) e recentemente sobre o subtipo H4 (Coruzzi et al., 2007; Dunford et al., 2007).

A relação da histamina com os estágios da dor vem sendo discutida desde o início do século passado (Rosenthal, 1939) onde vários autores sugerem que a histamina exerce um papel de mediador na dor cutânea, tanto em observações clínicas quanto laboratoriais.

Essa interpretação foi construída principalmente pela ação de alguns anti-histamínicos (Raffa et al., 2001). Por outro lado, somente em doses elevadas ou ainda, aplicadas em tecido cutâneo pré-sensibilizado a histamina promove nocicepção (Baron, 2001), pois normalmente a sensação evocada pela histamina é apenas de prurido (Ikoma et al., 2006). Atualmente o papel da histamina tem sido fortalecido por experimentos em camundongos com deleção gênica (knockout) para o receptor H1 da histamina (Mobarakeh et al., 2000, 2002) e para a própria histamina endógena (Yoshida et al.,

2005), que apresentaram resposta nociceptiva significativamente menor em testes de nocicepção térmica, química e mecânica quando comparados com animais normais (wildtype), sugerindo que a interrupção de circuitos histaminérgicos centrais estão relacionados à nocicepção.

A histamina atua em quatro diferentes tipos de receptores H1-H4 (Hill, 1997). O receptor H1 está localizado em diferentes tecidos de mamíferos, onde possui papel estimulatório, contribuindo para o extravasamento de plasma nas fases iniciais dos processos inflamatórios (Hill, 1997). Além disso, o receptor H1 também se encontra localizado em fibras nervosas sensoriais periféricas (Kashiba et al., 1999) onde a histamina promove a despolarização dos aferentes primários (Ständer et al., 2003). Segundo Kashiba (2001) este receptor está expresso em fibras C, sendo exclusivo a fibras peptidérgicas que expressam neuropetídio Y e não substância P e CGRP.

Em nível periférico, a maioria dos trabalhos envolvendo mediação histaminérgica e nocicepção estão relacionados à sua participação no tecido superficial, sendo somente relatados os efeitos pró-nociceptivos da histamina (Parada et al., 2001). Entretanto, nos modelos animais atualmente utilizados não é possível fazer-se uma distinção clara entre prurido e nocicepção, apenas pelos comportamentos observados (Kuraishi et al., 1995). Já em tecidos profundos, a participação da histamina está diretamente vinculada, em conjunto com os mastócitos, somente a estágios avançados do processo de degeneração articular (Nigrovic e Le, 2004) e pouco se sabe a respeito da função sensorial da histamina no tecido articular (Herbert et al., 2001; Ting et al., 2007).

O conhecimento atual mostra que os mastócitos e seus mediadores sinoviais estão relacionados principalmente nas respostas inflamatórias vasculares e celulares da artrite (Nigrovic e Lee, 2004). No entanto, deixa incerta a participação de alguns desses mediadores com os mecanismos da dor articular e a relação dessas células com a condição inicial inflamatória. Assim, o teste de formalina se torna uma ferramenta experimental importante para avaliar a participação dos mastócitos e seus mediadores em uma fase inicial do processo doloroso, com características inflamatórias. Esse teste originalmente foi caracterizado a partir da administração desse agente irritante no tecido subcutâneo, constituindo um modelo bifásico de dor persistente, no qual a duração do comportamento nociceptivo é de aproximadamente uma hora (Debuisson e Dennis, 1977). A primeira fase da resposta nocifensiva da formalina (dor

aguda) está relacionada à ativação direta dos nociceptores, devido à estimulação química periférica (Wheeler-Aceto e Cowan, 1991; Taylor *et al.*, 2000). Na segunda fase (dor tônica), o comportamento nociceptivo é gerado pela estimulação contínua dos nociceptores, ocasionado por mediadores inflamatórios locais e pela hiperexcitabilidade da medula espinhal, induzida pela primeira fase, que é a sensibilização central (Dickenson e Sullivan, 1987;Coderre *et al.*, 1990; Tjolsen *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1995). O intervalo entre a primeira e a segunda fase é denominado de quiescência, sendo resultante da inibição da transmissão nociceptiva através de circuitos supraespinhais e espinhais (Kaneko e Hammond, 1997), em resposta ao estímulo da primeira fase.

Dessa forma, esse teste experimental vem sendo amplamente utilizado para avaliar o efeito de fármacos analgésicos e a neurofisiologia das estruturas periféricas e centrais que controlam a dor, sendo considerado um modelo de dor inflamatória tônica (Tjolsen *et al.*, 1992; Carstens, 1997). A dor, elicitada pela formalina, é apenas um dos componentes de uma reação inflamatória local, sendo influenciada direta ou indiretamente pelos mediadores oriundos de mastócitos (Shibata *et al.*, 1989; Parada *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2006; Souza-Silva *et al.*, 2013).

A utilização de diferentes modelos e também do teste de formalina demonstrou que a serotonina contribui como um mediador pró-nociceptivo (Cervantes-Durán *et al.*, 2012), inclusive no tecido profundo articular (De Oliveira, 2010). Diferentes trabalhos mostram que a histamina evoca coceira, e não dor (Kuraishi *et al.*, 1995; Schmelz *et al.*, 1997; Ikoma., 2003; Shimada e La Motte, 2008; La Motte *et al.*, 2011) e a partir da utilização do teste de formalina, resultados obtidos pelo nosso grupo mostraram que a administração de um anti-histamínico do receptor H1, loratadina, promoveu um inesperado efeito hipernociceptivo na fase inflamatória (Martins *et al.*, 2006) e, ao contrário, a administração de histamina promoveu hiponocicepção (Souza-Silva, 2009).

Além dos efeitos nociceptivos causados pela formalina, esta substância também gera edema local e extravasamento de plasma, induzido direta ou indiretamente por este agente (Hong e Abbott, 1995; Souza-Silva *et al.*, 2013), sendo tal processo evidenciado pelo aumento da circulação sanguínea nos vasos articulares, com subsequente aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de proteínas do plasma, através das fenestrações nos capilares subsinoviais para o interior da articulação. Em consequência, ocorre a modificação local dos mecanismos de

Frank-Starling, onde a pressão oncótica intra-articular fica maior do que nos vasos sanguíneos adjacentes, promovendo a exsudação de plasma para o interior da articulação (Pietruck *et al.*, 2003). Esse fenômeno, aliado ao aumento da pressão hidrostática secundária à vasodilatação, leva à saída de líquido e seu acúmulo no tecido intersticial, contribuindo também para formação de edema.

Como parte da resposta nociceptiva em eventos inflamatórios está associada a outros sinais inflamatórios, como edema e extravasamento plasmático, explorar a participação do receptor de histamina (H1) no modelo de nocicepção articular induzida pela formalina pode ajudar a explicar os mecanismos de dor articular, bem como a participação de alguns mediadores que são liberados após uma estimulação química periférica.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral investigar a participação do receptor H1 na nocicepção articular induzida pela formalina. Além disso, busca-se desvendar as estruturas envolvidas com os efeitos hipernociceptivos observados com antagonistas H1 nesse modelo, e qual seria a contribuição que esses mecanismos podem proporcionar, relacionados com alvos farmacológicos para o tratamento de doenças inflamatórias, como a artrite.

2.2 Objetivos específicos

a) Avaliar a participação do receptor H1, através da administração de anti-histamínico no comportamento nociceptivo, edema e extravasamento plasmático induzido por formalina intra-articular.

b) Avaliar a participação do anti-histamínico H1, administrado por via sistêmica, no teste térmico de retirada da cauda (*tail flick*).

c) Avaliar a participação do agonista do receptor H1 (2-piridiletilamina) coadministrado com formalina na nocicepção, no edema e no extravasamento plasmático.

d) Avaliar a participação dos mastócitos articulares na nocicepção, no edema e no extravasamento plasmático induzido pela formalina intra-articular.

e) Avaliar o potencial terapêutico do efeito antinociceptivo, observado com a histamina articular.

f) Avaliar a participação de estruturas da medula espinhal sobre os mecanismos envolvidos com a hipernocicepção mostrada com anti-histamínicos periféricos.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os procedimentos experimentais foram realizados com ratos *Wistar* em idade aproximada de três meses e peso variando entre 250 e 350 g. Os animais foram criados e mantidos em biotério sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e luz (ciclo claro/escuro de 12 horas), dispendo de livre acesso à água e ração. Foram removidos do biotério para ambientação de uma hora antes de quaisquer procedimentos experimentais, sendo estes realizados num espaço de tempo entre sete e dezenove horas.

A pressão barométrica média na cidade de Florianópolis é de 1 ATM = 760 mmHg ou (1013 hPa). Resultados prévios do próprio laboratório demonstraram que em pressão barométrica abaixo de 1012 ou acima de 1015 hPa diminui ou aumenta, respectivamente, o comportamento nociceptivo no teste de formalina intra-articular (De Oliveira *et al.*, 2009). Assim, os experimentos nesse estudo foram realizados com pressão barométrica que variou entre 1012 e 1015 hPa. Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo comitê de ética local para o uso de animais (CEUA), sob o número 23080.034306/2009-69. Além disso, todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1983).

3.2 Compostos utilizados

Tabela 2: Principais compostos utilizados

Composto	Fornecedor	Mecanismo de ação
Loratadina	Galena Química Farmacêutica LTDA, Brasil	Antagonista do receptor H1 da histamina
Cetirizina	Galena Química Farmacêutica LTDA, Brasil	Antagonista do receptor H1 da histamina
Cromoglicato de Sódio	Galena Química Farmacêutica LTDA, Brasil	Estabilizador de membrana de mastócitos
2-Piridiletilamina (2-PEA)	Sigma, EUA	Agonista do receptor H1
Maleato de Morfina	Laboratório Cristália, Brasil	Agonista dos receptores opioides

BIBO 3304	Tocris, EUA	Antagonista do receptor Y1
Leu ³¹ Pro ³⁴ NPY	Tocris, EUA	Agonista do receptor Y1
Naloxona	Tocris, EUA	Antagonista dos receptores opioides
Tripsina	Sigma, EUA	Ativador do receptor PAR-2
Tween 80 a 5%	Tocris, EUA	Dissolução da Loratadina
Solução salina 0,9 %	Aster, Brasil	Dissolução das demais drogas
Blank-saporina	Advanced Targeting Systems, EUA	Proteína inativa do ribossomo, saporina
NPY-saporina	Advanced Targeting Systems, EUA	Conjugado do neuropeptídeo Y com a proteína inativa do ribossomo, saporina
Anticorpo policlonal de ratos para receptor Y	Abcam, Cambridge, MA, EUA	Imunomarcação para o receptor Y1
Anticorpo secundário anti-ratos de coelhos	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA	Imunomarcação contra o anticorpo primário
Anticorpo monoclonal de camundongos para β -actin	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA	Imunomarcação para a proteína β -actin

3.3 Local de administração de substâncias

3.3.1 Injeção intra-articular

A injeção intra-articular (i.a.) de substâncias e drogas foi realizada através do tendão infrapatelar, para dentro da cavidade sinovial, imediatamente após a realização de procedimentos de antisepsia com solução de álcool iodado. O volume máximo de drogas injetadas na cavidade articular foi de 50 μ l.

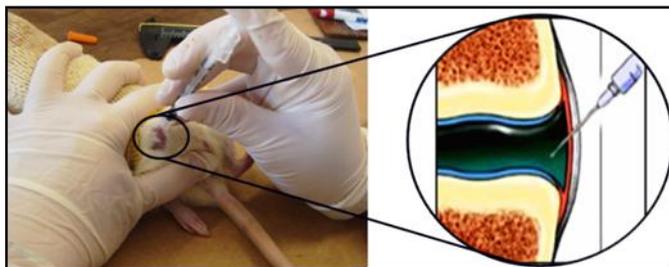


Figura 2: Injeção intra-articular. O diagrama mostra o local da inserção da agulha.

3.3.2 Injeção intraplantar

Os animais receberam injeção de formalina de forma subcutânea (50µl), na região plantar (i.pt.) da pata direita. Imediatamente após a aplicação, os animais foram colocados, individualmente, em caixa acrílica de observação (29 x 29 x 29 cm) para avaliação da resposta nocifensiva.

3.3.3 Injeção intratecal

As drogas foram injetadas na medula espinhal (i.t.), nível lombar L4-L5, utilizando o método previamente descrito por Mestre e colaboradores (1994). Nesse procedimento, os animais foram previamente anestesiados com halotano, e uma agulha de calibre 23 foi introduzida perpendicularmente entre as vértebras L4 e L5. Uma movimentação rápida da cauda (*tail flick*) foi percebida, indicando que o canal medular foi atingido. Os animais que não apresentaram o movimento rápido de cauda foram descartados. O volume máximo injetado pela via intratecal foi de 20 µl.

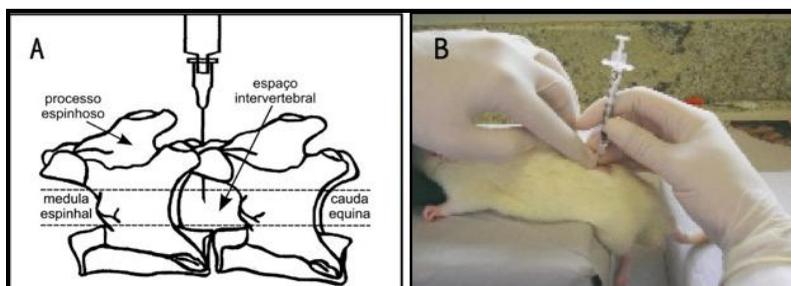


Figura 3: Injeção intratecal. O diagrama mostra o local da inserção da agulha.

3.4 Modelo experimental

3.4.1 Teste de incapacitação articular

O modelo de nocicepção empregado neste estudo foi o de incapacitação articular induzida por formalina (Martins *et al.*, 2006). O sistema de registro da nocicepção articular (Tonussi e Ferreira, 1992) consiste de um aparato eletrônico que permite avaliar o estado funcional das articulações colocando-se os animais sobre um cilindro em rotação. O equipamento consiste de: 1) Um cilindro (30 cm de altura e 30 cm de diâmetro) revestido por malha trançada em aço inox (2 mm), com separadores para formarem três trilhas sobre

ele; 2) Sapatilhas metálicas (confeccionadas em folha de flandres), que são adaptadas às patas traseiras dos animais e conectadas, por fios de aço revestidos, à porta paralela de um microcomputador PC compatível; 3) Microcomputador. Todo o conjunto pode ser visualizado nas imagens abaixo:

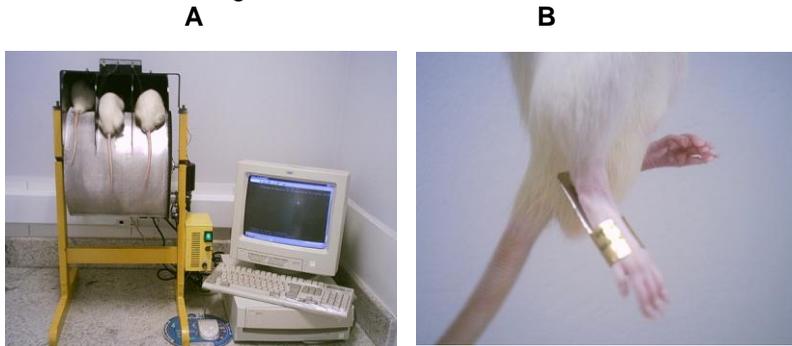


Imagem 1:

A – Equipamento para análise do TEP.

B – Sapatilha acoplada à pata do animal.

3.4.2 Indução de incapacitação articular por formalina

O aperfeiçoamento do modelo experimental de incapacitação articular induzido por formalina (Martins *et al.*, 2006) foi obtido através da realização de uma curva de formalina, em concentrações crescentes (0,5; 1,5; 2 e 3%), administrada pela via intra-articular (Souza-Silva, 2009). Paralelamente à nocicepção foram avaliados a variação do edema e o extravasamento plasmático induzido pela formalina. Após verificarmos que a formalina, nas diferentes concentrações, induziu ao comportamento nociceptivo em padrão bifásico, variação no edema e no extravasamento plasmático em relação ao grupo controle (salina) de maneira dose-dependente, a concentração de 1,5 % de formalina, por atingir um nível intermediário nos três parâmetros, foi tomada como padrão de indução de comportamento nociceptivo (Souza-Silva, 2009). Assim, neste estudo a incapacitação articular foi induzida pela injeção intra-articular de formalina (1,5 %; 50 μ l) e o sítio de injeção (joelho direito) foi previamente submetido à antisepsia com solução de álcool iodado. Imediatamente após a injeção de formalina, foi realizada a primeira medida da incapacitação articular.

3.4.3 Avaliação da incapacitação articular

Com o cilindro em rotação (3 r.p.m.), o animal colocado em sua trilha caminha objetivando permanecer no topo. Através de *software* específico, a perda de função de apoio do membro afetado é registrada, ou seja, o tempo em que a sapatilha adaptada na pata posterior direita do animal deixa de fazer contato com a superfície metálica do cilindro é registrado no computador.

Acumulando-se o tempo em que essa pata não toca o cilindro durante o tempo de observação de 60 segundos, obtemos o **tempo de elevação da pata**, ou **TEP**. Nesse modelo, o TEP de animais sem qualquer estimulação articular varia em torno de 10 segundos, enquanto a injeção intra-articular de substâncias algogênicas causa elevação deste valor indicando o desenvolvimento de incapacitação articular, oriunda da nocicepção. Em todos os procedimentos experimentais, os animais são treinados a caminhar no aparelho de registro no dia anterior ao teste, quando seus valores basais são registrados, identificado nas figuras pelo valor "C". Durante os experimentos, a medida do TEP foi realizada a cada cinco minutos, durante um minuto, por um período máximo de uma hora. Os dados do TEP são apresentados como a média entre os valores de pelo menos seis animais.

3.4.4 Avaliação do edema articular

A avaliação do edema articular induzido pela formalina 1,5% foi realizada através da variação da média de 3 medidas latero-laterais do diâmetro articular, de forma que valores foram mensurados na direção proximal à distal no joelho e comparados: uma média mensurada imediatamente antes da injeção de formalina e outra 60 minutos após. Para isso, os animais foram cuidadosamente imobilizados dentro de um cone de polietileno, de maneira que fosse possível ter acesso apenas ao joelho direito, do qual foi obtida a medida do diâmetro da articulação do joelho, com o auxílio de um paquímetro. Os dados são apresentados como a diferença média entre o valor obtido imediatamente antes da injeção de formalina e o valor do diâmetro articular, obtidos 60 minutos após (Variação do Diâmetro Articular, DA, cm).

3.4.5 Avaliação do extravasamento plasmático

Sob anestesia por halotano, os animais receberam uma injeção intravenosa (i.v; veia gengival) (De Oliveira *et al.*, 2009) de Azul de Evans (25 mg/kg; 0,1 ml / 100 g), 30 minutos antes da

injeção de formalina. O Azul de Evans é um corante com alta afinidade pela proteína albumina plasmática, formando um complexo corante-albumina que extravasa através da barreira endotelial lesada (Steele e Wilhem, 1966). Pôde-se, então, avaliar a intensidade de extravasamento plasmático por análise da concentração de Azul de Evans no tecido pesquisado.

Uma hora após a injeção de formalina 1,5%, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento de anestesia com hidrato de cloral 15%, seguido de deslocamento cervical. Em seguida, foi realizada a lavagem articular com 100 µl de solução fisiológica 0,9% com 4 µl do anticoagulante E.D.T.A a 5%. A seguir foi feita a coleta do líquido sinovial com auxílio de uma pipeta. O líquido sinovial foi diluído em solução fisiológica 0,9% (1:50) e centrifugado (3000 r.p.m; 15 min) para retirada de hemácias. O sobrenadante foi utilizado para leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (630 nm). Esses valores foram expressos como a média ± EPM (µg/ml).

3.5 Outros testes nociceptivos utilizados

3.5.1 Indução de nocicepção na pata por formalina

A nocicepção da pata foi induzida pela injeção intraplantar de formalina (1,5 %; 50 µl). Imediatamente após a administração de formalina e a colocação dos animais na caixa de acrílico, o comportamento nocifensivo foi avaliado pela contagem do tempo (s) a cada cinco minutos, durante 60 minutos dos eventos nociceptivos manifestados pelo animal: lambar, sacudir e retirar a pata do solo.

3.5.2 Resposta de retirada da cauda por estímulo térmico (Teste do "tail flick")

O algesiômetro de calor radiante (Albarsch, Rabo-Flick Analgesia Meter) foi usado para medir a latência de retirada da cauda de acordo com o método descrito por D'Amour e Smith (1941). Os animais foram colocados em cima do aparelho e, com a ajuda do experimentador, a porção final da cauda foi exposta ao feixe de luz térmico para a determinação do limiar térmico basal. O tempo transcorrido entre o início da aplicação do estímulo e a manifestação de retirada da cauda foi cronometrado automaticamente pelo aparelho, em segundos, e interpretado como índice de limiar de retirada da cauda à estimulação térmica. Redução ou aumento no tempo de retirada da cauda caracteriza, respectivamente, o aparecimento de hiper ou hiponocicepção ao

calor. As latências basais de retirada da cauda foram de aproximadamente 12 segundos. Vinte segundos foram adotados como o tempo máximo de reação para evitar possíveis danos aos tecidos. O limiar de retirada da cauda foi calculado como a média de resposta a três aplicações consecutivas, em intervalos de cinco minutos.

3.6 Western blot

3.6.1 Coleta de tecido para a realização dos experimentos de *western blot*

Com o objetivo de avaliar a expressão do receptor Y1 no segmento lombar (L4-L5) da medula espinhal para o *western blot*, alguns grupos experimentais foram eutanasiados com hidrato de cloral 15 % imediatamente após os experimentos comportamentais, e a porção da medula espinhal (L4-L5) foi removida e lavada com solução salina (NaCl 0,9% - 4° C). Imediatamente após serem retirados, os segmentos lombares foram congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenados em freezer a -70° C até o momento do uso.

3.6.2 Preparação do extrato celular total

As amostras de medula (L4-L5) foram homogeneizadas manualmente (com auxílio de micro pistilos) em tampão RIPA gelado, composto por Nonidet P-40 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), deoxicolato de sódio 0,5%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, tampão PBS (pH 7,4) na presença dos seguintes inibidores enzimáticos: leupeptina 20 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, pepstatina A 20 µg/ml e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1 mM. Após a homogeneização, as amostras foram incubadas em gelo por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas (10.000 g, 4° C, durante 10 minutos). O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado sob as mesmas condições. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi coletado, sendo este o extrato celular total contendo as proteínas dissolvidas no meio. Os extratos celulares totais foram armazenados em freezer a -70° C, até o momento do uso.

3.6.3 Técnica de *western blot*

Após os procedimentos anteriores, as amostras de proteína do segmento lombar (L4-L5) foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro do fabricante *Nano Drop Technologies* (ND-1000),

através do método A280, conforme descrição do fabricante. Rapidamente, um volume de 2 μ l de cada amostra foi adicionado ao aparelho, onde registrou-se a quantidade de proteínas em absorbância de 280 nm. A concentração de proteína de cada amostra (50ug) foi colocada em diferentes poços e separada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (10%). Em seguida, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando um sistema de células Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. A análise de *western blot* foi efetuada utilizando anticorpo policlonal NPY1R rato (1:1000; Abcam, Cambridge, MA, EUA), incubadas durante a noite. Após, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário específico antirrato de coelho, conjugado a peroxidase (1:25000; tecnologia de sinalização celular, Danvers, MA, EUA). Os imunocomplexos foram visualizados utilizando o sistema de detecção de substrato quimioluminescente SuperSignal West Femto (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) e filme radiográfico (Hyperfilm ECL) (GE Healthcare, São Paulo, SP, Brasil), segundo recomendações do fabricante. Os valores densitométricos foram normalizados utilizando como controle as bandas imunorreativas contra o anticorpo anti- β -actina. Os filmes foram digitalizados e os níveis de proteína foram quantificados por densidade óptica utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA) e os valores expressos como unidades arbitrárias em relação a β -actina.

3.7 Protocolo experimental

A figura abaixo ilustra o principal protocolo experimental comportamental utilizado para a realização deste trabalho, dividido em duas etapas.

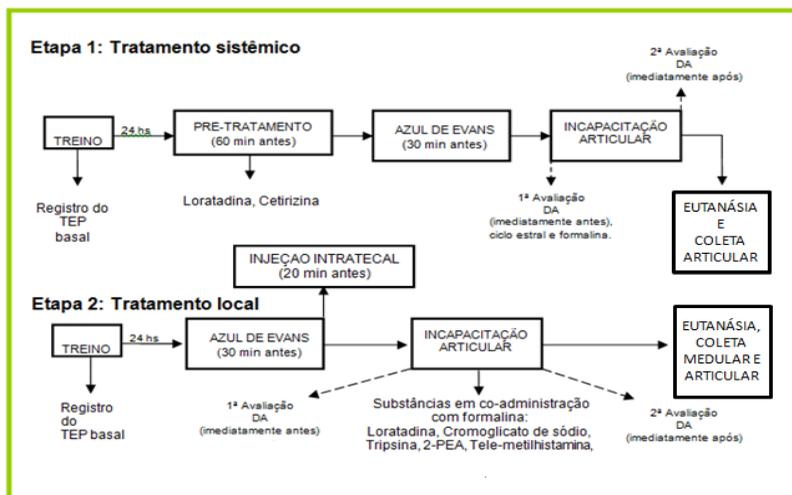


Figura 4 – Sequência do principal protocolo experimental utilizado na tese.

3.8 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando *GraphPad Prism* versão 5 (<http://www.graphpad.com>) ou software *Statística 7.0*®. Os resultados da nociceção em cada seção estão expressos em média + - erro padrão da média (EPM) de um número (n) de seis animais por grupo. No teste de formalina, na primeira fase (F1 tempo 0 min) as comparações entre os grupos foram feitas através da análise de variância (ANOVA) de uma via simples. Quando um nível de significância de pelo menos $P < 0,05$ foi detectado, foi seguido pelo teste de Duncan para comparações múltiplas. Na segunda fase (F2 a partir do tempo cinco minutos) a comparação das curvas dos grupos experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias e, quando um nível de significância de pelo menos $P < 0,05$ foi detectado, foi seguido pelo teste de Duncan para comparações múltiplas. Em todas as análises de testes nociceptivos, quando comparamos somente dois grupos experimentais, foi utilizado o teste t não-

pareado e o resultado foi considerado estatístico quando um nível de significância de pelo menos $P < 0,05$ foi detectado. Como em nenhum dos resultados observamos alteração na primeira fase do teste de formalina, a representação dos resultados nos gráficos está relacionada somente à segunda fase (F2: 5- 35 min) do teste de formalina intra-articular. Somente no teste de formalina na pata a análise ocorreu na segunda fase (F2: 10- 25 min).

A análise estatística que compara a variação do DA, bem como o resultado da densidade óptica do EP foi feita através da análise de variância (ANOVA) de uma via simples e, quando um nível de significância de pelo menos $P < 0,05$ foi detectado, foi seguido pelo teste de Duncan para comparações múltiplas. Entretanto, quando se comparou somente dois grupos experimentais, foi utilizado o teste t não pareado e o resultado foi considerado estatístico quando um nível de significância de pelo menos $P < 0,05$ foi detectado. A análise estatística que compara a expressão da proteína do receptor Y1 foi feita através da análise de variância (ANOVA) de uma via simples. Quando um nível de significância de pelo menos $P < 0,05$ foi detectado, foi seguido pelo teste de Newman keuls para comparações múltiplas.

4- RESULTADOS

4.1 - Efeito da administração sistêmica da cetirizina na resposta nociceptiva, edema e extravasamento plasmático induzida por formalina intra-articular.

Após se verificar que a administração de loratadina de forma sistêmica e local foi somente hipernociceptiva (Martins *et al.*, 2006; Souza-Silva, 2009) e com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre o papel do receptor H1 no modelo de nocicepção articular induzida por formalina 1,5%, foram administradas diferentes concentrações de outro antagonista periférico do receptor H1, cetirizina (0,01; 0,1; 1; 10 mg/kg – i.p.), uma hora antes da administração de formalina, e avaliou-se a nocicepção, o edema e o extravasamento plasmático. Os resultados demonstram que a cetirizina (1; 10 mg/kg – i.p. $P < 0,05$) somente potencializou a nocicepção (Fig. 5) e nenhuma dose alterou o edema e o extravasamento de plasma (Tabela 3) induzido pela formalina intra-articular.

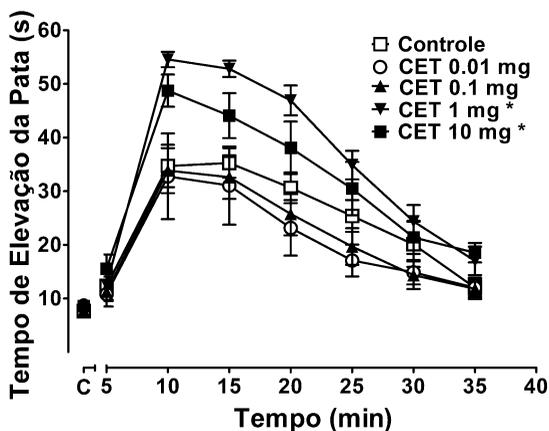


Figura 5 - Efeito da administração sistêmica de cetirizina no teste de incapacitação articular induzido por formalina. CET (mg/kg) foi administrada pela via intraperitoneal uma hora antes da formalina. Somente ocorreu alteração no comportamento nociceptivo na segunda fase (F2 5-35 min.) comparado ao grupo-controle (formalina). CET significa cetirizina. Valores são apresentados como a média de seis animais (n=6). Os resultados representam a média \pm EPM e * indica a diferença estatística significativa em nível de $P < 0,05$. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Duncan.

4.2 - Efeito da administração sistêmica da cetirizina na resposta nociceptiva térmica no teste de retirada da cauda.

Em virtude de observarmos o efeito hipernociceptivo dos antagonistas do receptor H1 de histamina, após o estímulo nociceptivo químico induzido pela formalina no tecido profundo articular, fomos observar se através de outro tipo de estímulo nociceptivo experimental, o perfil de resposta se mantinha. Desse modo, administrou-se a mesma dose de cetirizina (1 mg/kg – i.p) que foi hipernociceptiva no teste de formalina articular, e a cetirizina não alterou o limiar de retirada da cauda induzido por estímulo nociceptivo térmico no teste do “*tail flick*” (Fig. 6).

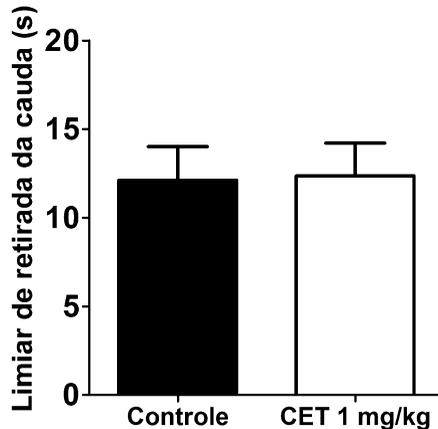


Figura 6 - Efeito da administração sistêmica de cetirizina no teste de retirada da cauda induzido por estímulo térmico. CET (mg/kg) foi administrada pela via intraperitoneal uma hora antes da exposição ao primeiro estímulo térmico. Foi realizada a média de latência (s) de retirada da cauda após três avaliações para cada animal. CET significa cetirizina. Valores são apresentados como a média de seis animais (n=6). Os resultados representam a média \pm EPM e foram analisados por teste t não pareado.

4.3 - Efeito da administração local do estabilizador de membrana de mastócito na resposta nociceptiva, edema e extravasamento plasmático induzida por formalina intra-articular.

A influência dos antagonistas do receptor H1 na nocicepção da formalina e os resultados prévios em que a administração de baixas doses de histamina foi hiponociceptiva, neste mesmo modelo (Souza-Silva, 2009), sugere que a liberação de histamina endógena esteja fazendo o papel hiponociceptivo. Tendo em vista que os mastócitos liberam histamina na articulação após sua estimulação, verificou-se se a administração intra-articular do estabilizador de membrana de mastócitos, cromoglicato de sódio (0,8; 1,6; 2,4 mg/joelho), comprometeria a nocicepção articular induzida por este agente irritante. Somente a maior dose de cromoglicato de sódio (2,4 mg/joelho $P < 0,05$) causou hiponocicepção articular comparado à formalina (controle) (Fig. 7A). Nenhuma dose de cromoglicato de sódio (0,8; 1,6; 2,4 mg/joelho) alterou o edema e o extravasamento de plasma induzido pela formalina intra-articular (Tabela 3). A partir desse conjunto de informações, foi verificado se o efeito hipernociceptivo do antagonista H1 periférico dependia, de alguma forma, da estimulação de mastócitos. Desse modo, foi coadministrada uma dose subefetiva de cromoglicato de sódio (1,6 mg/joelho) com formalina intra-articular, com o tratamento prévio de uma conhecida dose hipernociceptiva de loratadina (10 mg/kg) (Souza-Silva, 2009). A administração de cromoglicato de sódio (1,6 mg/joelho) articular preveniu o efeito hipernociceptivo da loratadina (10 mg/kg) (Fig. 7B).

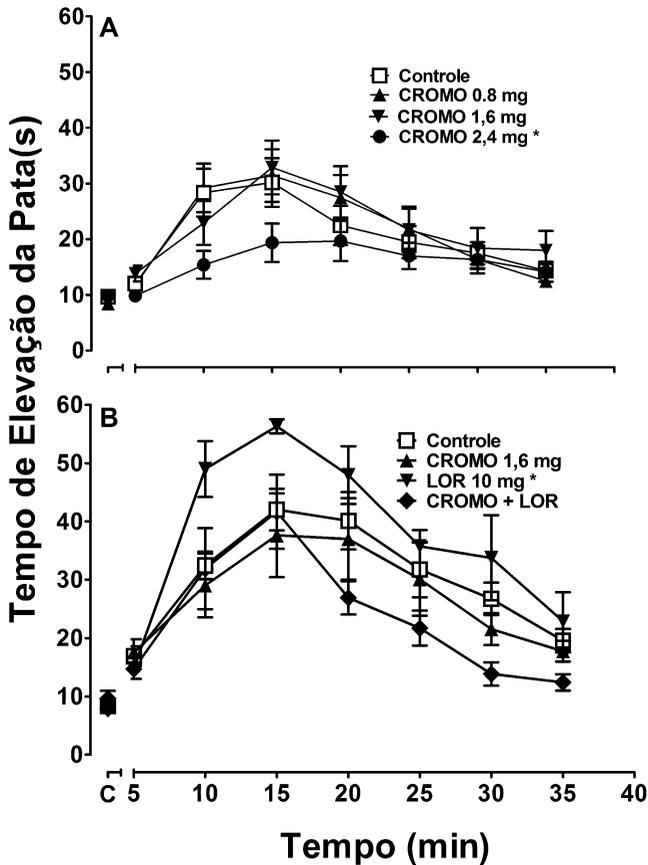


Figura 7 - Efeito da administração local de cromoglicato de sódio na presença e na ausência de loratadina administrada de forma sistêmica na incapacitação articular induzida por formalina. (A) CROMO (mg/joelho) foi coadministrado com formalina. (B) LOR (mg/kg) foi administrada pela via intraperitoneal uma hora antes da formalina. Somente ocorreu alteração no comportamento nociceptivo na segunda fase (F2 5-35 min.), comparado ao grupo-controle (formalina). CROMO e LOR significam Cromoglicato de sódio e Loratadina, respectivamente. Valores são apresentados como a média de seis animais (n=6). Os resultados representam a média \pm EPM e * indica a diferença estatística significativa em nível de $P < 0,05$. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Duncan.

Tabela 3 - Efeito da administração de cetirizina, cromoglicato de sódio e loratadina no edema e extravasamento plasmático induzida por formalina intra-articular.

Tratamento	Dose	DA (mm)	EP ($\mu\text{g/ml}$)
CET (mg/kg, i.p.)	0	$0,2 \pm 0,02$	$13,5 \pm 2,5$
	0,01	$0,3 \pm 0,04$	$13,6 \pm 1,1$
	0,1	$0,2 \pm 0,04$	$10,4 \pm 1,6$
	1	$0,3 \pm 0,04$	$11,4 \pm 2,4$
	10	$0,3 \pm 0,06$	$10,0 \pm 0,6$
Cromoglicato de sódio (mg/joelho)	0	$0,54 \pm 0,06$	$21,5 \pm 3,6$
	0,8	$0,6 \pm 0,1$	$18,9 \pm 1,7$
	1,6	$0,8 \pm 0,1$	$16,4 \pm 2,7$
	2,4	$0,5 \pm 0,07$	$20,2 \pm 0,7$
Cromoglicato de sódio (mg/joelho)	1,6	$0,5 \pm 0,1$	$16,5 \pm 2,8$
LOR (mg/kg, i.p.) + Cromoglicato de sódio (mg/joelho)	10 + 1,6	$0,5 \pm 0,1$	$13,0 \pm 1,1$

Tabela 3 – Abreviações: CET, cetirizina; LOR, Loratadina; DA, diâmetro articular; EP, extravasamento plasmático. Em todos os grupos, administrouse 1.5% de formalina intra-articular. Os Valores são apresentados como a média de seis animais (n=6). Dose = 0 significa o grupo tratado com o respectivo veículo (controle). Tratamentos i.p. (mg/kg) foram administrados uma hora antes da formalina. Cromoglicato de sódio foi coadministrado com formalina Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Duncan.

4.4 – Efeito da administração local da telemetilhistamina e do agonista do receptor H1 na resposta nociceptiva, edema e extravasamento plasmático articular.

Resultados prévios do nosso grupo evidenciam que a histamina pode promover efeitos antagônicos de acordo com a dose administrada (Souza-Silva, 2009). Brevemente, foi mostrado que a histamina — em doses baixas (0,2 e 20 nmol/joelho) na articulação — não promoveu comportamento nociceptivo. Ao contrário, somente com a administração de doses altas (200 e 20.000 nmol/joelho) o comportamento nociceptivo ficou evidenciado. Por outro lado, quando a histamina foi coadministrada em doses baixas (0,2 e 20 nmol/joelho), com formalina, foi observada uma redução do tempo de elevação da pata (TEP), quando comparado ao grupo-controle (formalina) e as doses altas de histamina (200 e 20.000 nmol/joelho) com formalina não tiveram efeito sobre o TEP. Esse resultado relacionado à dose sugere que a potencialização da nocicepção articular induzida pela histamina pode, de alguma forma, estar vinculada ao processo de metabolização desta substância. Assim, verificou-se qual o papel do metabólito da histamina intra-articular. A telemetilhistamina (10 pmol/joelho $P < 0,05$), coadministrada com formalina, somente aumentou a incapacitação articular quando comparada ao controle (formalina) (Fig. 8).

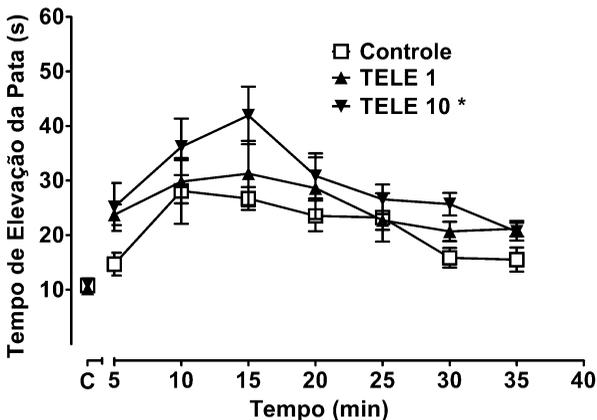


Figura 8 - Efeito da administração local da telemetilhistamina coadministrada com formalina na incapacitação articular. TELE (pmol/joelho) foi coadministrado com formalina. Ocorreu alteração no comportamento nociceptivo na segunda fase (F2 5-35 min.) comparado ao grupo-controle (formalina). TELE significa telemetilhistamina. Valores são apresentados como a média de seis animais (n=6). Os resultados

representam a média \pm EPM e * indica a diferença estatística significativa em nível de $P < 0,05$. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Duncan.

Por outro lado, a observação que a coadministração de histamina em doses baixas (0,2 e 20 nmol/joelho), com formalina, reduziu o tempo de elevação da pata (TEP) quando comparado ao grupo-controle (formalina) (Souza-Silva, 2009), somado ao conjunto de resultados que mostram o envolvimento do receptor H1 na resposta da formalina intra-articular, estimulou a análise do papel do agonista do receptor H1 (2-PEA), coadministrado com formalina intra-articular. A administração de 2-PEA em doses baixas (0,05; 0,5 e 5 nmol/joelho) promoveu hiponocicepção ($P < 0,05$). Ao contrário, somente a dose mais alta de 2-PEA (500 nmol/joelho) aumentou o TEP induzido pela formalina ($P < 0,05$) (Fig. 9A). A administração de cetirizina (0.1 mg/kg - i.p.), uma hora antes, preveniu o efeito hiponociceptivo do 2-PEA (5 nmol/joelho), combinado com formalina intra-articular (Fig. 9B). Nenhum tratamento afetou o extravasamento plasmático ou o diâmetro articular induzido por formalina (Tabela 4).

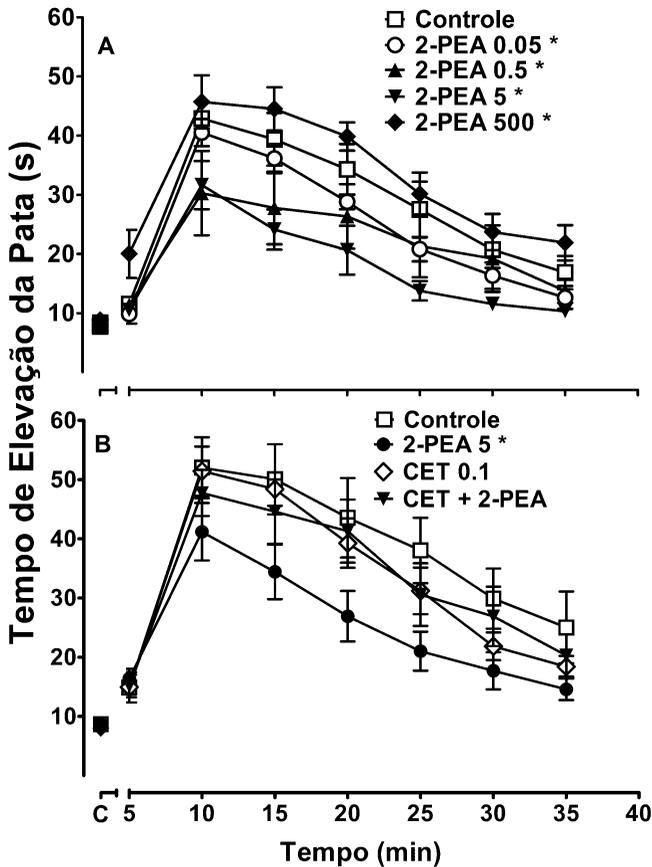


Figura 9 - Efeito da coadministração do agonista do receptor H1 com formalina (A) ou com a administração sistêmica de cetirizina (B) no comportamento nociceptivo induzido por formalina intra-articular. 2-PEA (nmol/joelho) foi coadministrado com formalina. CET (mg/kg - ip) foi administrado uma hora antes da formalina. Somente ocorreu alteração no comportamento nociceptivo na segunda fase (F2 5-35 min.) comparado ao grupo controle (formalina). 2-PEA e CET significam 2-piridiletilamina e cetirizina. Valores são apresentados como a média de seis animais (n=6). Os resultados representam a média \pm EPM e * indica a diferença estatística significativa em nível de $P < 0,05$. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Duncan.

4.5 - Efeito do agonista do receptor H1 na pata coadministrado com formalina sobre a resposta nociceptiva.

A partir desse conjunto de observações, somado aos resultados com os anti-histamínicos H1 no modelo de formalina, no tecido profundo articular, avaliou-se a participação do receptor H1 durante o mesmo tipo de estímulo químico, porém no tecido superficial da pata. Ao contrário do observado no joelho, a coadministração da mesma dose de 2-PEA (5 nmol/pata $P < 0,05$) com formalina aumentou os comportamentos nociceptivos quando comparado ao grupo-controle (formalina) (Fig. 10).

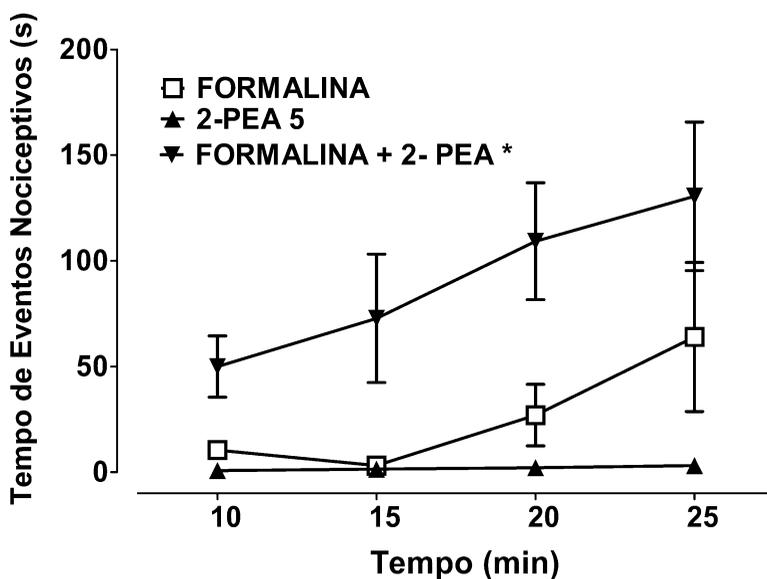


Figura 10 - Efeito da coadministração do agonista do receptor H1 com formalina na pata. 2-PEA (nmol/pata) foi administrado sozinho ou coadministrado com formalina intraplantar. Somente ocorreu alteração no tempo de comportamentos nociceptivos na segunda fase (F2 10-25 min.), comparado ao grupo-controle (formalina 1,5 %). 2-PEA significa 2-piridiletilamina. Valores são apresentados como a média de seis animais (n=6). Os resultados representam a média \pm EPM e * indica a diferença estatística significativa em nível de $P < 0,05$. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Duncan.

Tabela 4- Efeito da administração de 2-PEA coadministrado com formalina e cetirizina sistêmica no edema e extravasamento plasmático intra-articular.

Tratamentos	Dose	DA (mm)	EP ($\mu\text{g/ml}$)
2-PEA (nmol/joelho)	0	0,4 \pm 0,04	19,2 \pm 1,8
	0,05	0,2 \pm 0,03	23,3 \pm 4,2
	0,5	0,2 \pm 0,04	18,5 \pm 1,1
	5	0,3 \pm 0,06	17,5 \pm 2,5
	500	0,3 \pm 0,05	21,4 \pm 2,1
CET (i.p.) + 2-PEA	0,1 + 5	0,3 \pm 0,07	16,6 \pm 2,4

Tabela 4 - Abreviações: CET, cetirizina; 2-PEA, 2-piridiletilamina; DA, diâmetro articular; EP, extravasamento plasmático. Exceto a histamina sozinha, todos os outros tratamentos no joelho foram coadministrados com formalina. Dose = 0 significa o grupo tratado com o respectivo veículo (controle). Tratamentos i.p. foram administrados uma hora antes da formalina. Os valores são apresentados como a média de seis animais (n=6). Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Duncan.

4.7 – Efeito da administração de morfina na medula espinhal ou como coadjuvante da hiponocicepção evocada pelo agonista H1 coadministrado com formalina intra-articular.

A partir dos resultados anteriores em que se verificou que o extravasamento de plasma não está diretamente relacionado ao efeito hiponociceptivo da histamina ou do agonista H1 (2-PEA), coadministrado com formalina intra-articular, foi verificado se essa inesperada hiponocicepção poderia, de alguma maneira, ser um coadjuvante nos tratamentos de nocicepção articular já existentes. É amplamente conhecido que a morfina administrada na medula espinhal atua em neurônios que controlam as aferências nociceptivas periféricas (Millan, 1999). A faixa de dose para morfina (24 e 90 nmol/medula), referenciada na literatura (Brock e Tonussi, 2008), foi antinociceptiva neste modelo (dados não mostrados). A dose de morfina (9 nmol/medula $P < 0.05$) foi antinociceptiva e doses mais baixas (0,09 e 0,009 nmol/medula) não apresentaram efeito (Fig. 11A). Em seguida, verificou-se que a administração de uma dose subefetiva de morfina (0,009 nmol/medula) foi potencializada pela administração de uma também subefetiva dose de 2-PEA (0,005 nmol/joelho) intra-articular (Fig. 11B $P < 0,05$).

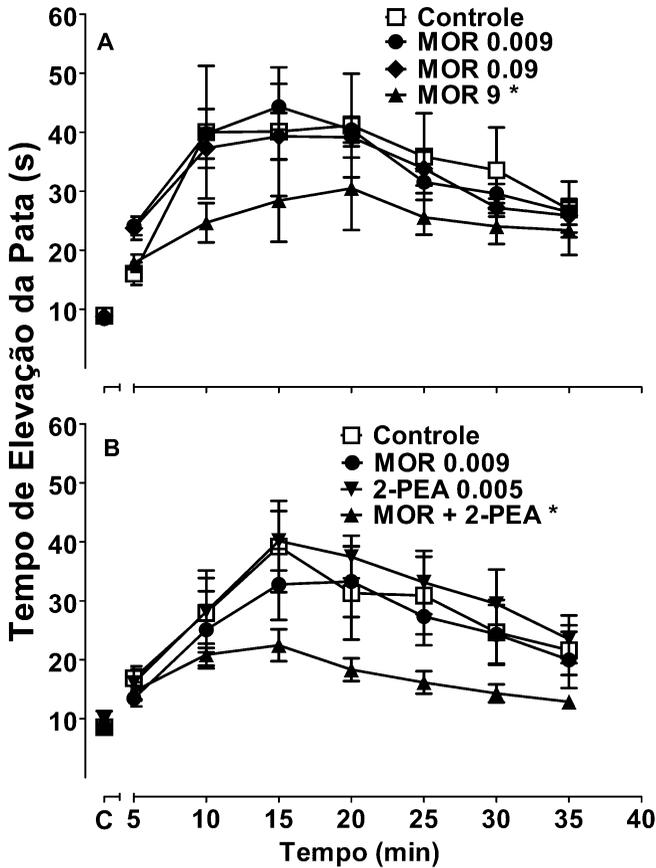


Figura 11 - Efeito da morfina administrada sozinha na medula espinhal ou com 2-PEA intra-articular na incapacitação articular induzida por formalina. MOR (nmol/medula) foi administrada pela via intratecal 20 minutos antes da formalina. 2-PEA (nmol/joelho) foi coadministrado com formalina. Somente ocorreu alteração no comportamento nociceptivo na segunda fase (F2 5-35 min.), comparado ao grupo-controle (formalina). MOR e 2-PEA significam morfina e 2-piridiletilamina, respectivamente. Valores são apresentados como a média de seis animais (n=6). Os resultados representam a média \pm EPM e * indica a diferença estatística significativa em nível de $P < 0,05$. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Duncan.

4.8 – Efeito do antagonista e do agonista do receptor Y1 na medula espinhal na nocicepção evocada pela administração de formalina intra-articular e a reversão do efeito hiponociceptivo do 2-PEA no joelho pela administração de BIBO 3304 na medula espinhal.

A partir do conjunto de resultados mostrados, investigou-se o mecanismo pelo qual a estimulação do receptor H1 articular estaria promovendo hiponocicepção. Na literatura, é mostrado que o receptor de histamina tipo H1 está localizado no gânglio da raiz dorsal (GRD), em fibras de pequeno diâmetro e marcadas com neuropeptídeo Y (NPY) (Kashiba *et al.*, 2001). Uma vez que o NPY demonstra ser antinociceptivo na medula espinhal (Smith *et al.*, 2007), hipotetizamos que a ativação articular do receptor H1 poderia liberar NPY na medula espinhal e, assim, estar-se-ia observando o efeito hiponociceptivo.

Inicialmente observou-se que as doses mais baixas de ambas as substâncias, Leu³¹ Pro³⁴ NPY (0,07 µmol) agonista Y1 e BIBO 3304 (0,4 µmol) antagonista Y1, não tiveram efeito. As doses de Leu³¹ Pro³⁴ NPY (0,7; 7 µmol/medula) diminuíram o TEP evocado pela administração intra-articular de formalina (Fig. 12A P<0,05). As doses referenciadas para o antagonista (Smith, 2007; Solway *et al.*, 2011) foram vistas como antinociceptivas no atual modelo. Por essa razão, utilizamos doses mais baixas de BIBO 3304 (4 µmol/medula P<0,05), que foram hipernociceptivas (Fig. 12B). Em seguida, verificou-se que a administração de uma dose subefetiva de BIBO 3304 (0,4 µmol/medula) preveniu o efeito hiponociceptivo do agonista H1 2-PEA (5 nmol/joelho) (Fig. 12C) coinjectado com formalina intra-articular, sugerindo que o NPY na medula espinhal está envolvido com a antinocicepção evidenciada pela ativação do receptor H1 no joelho.

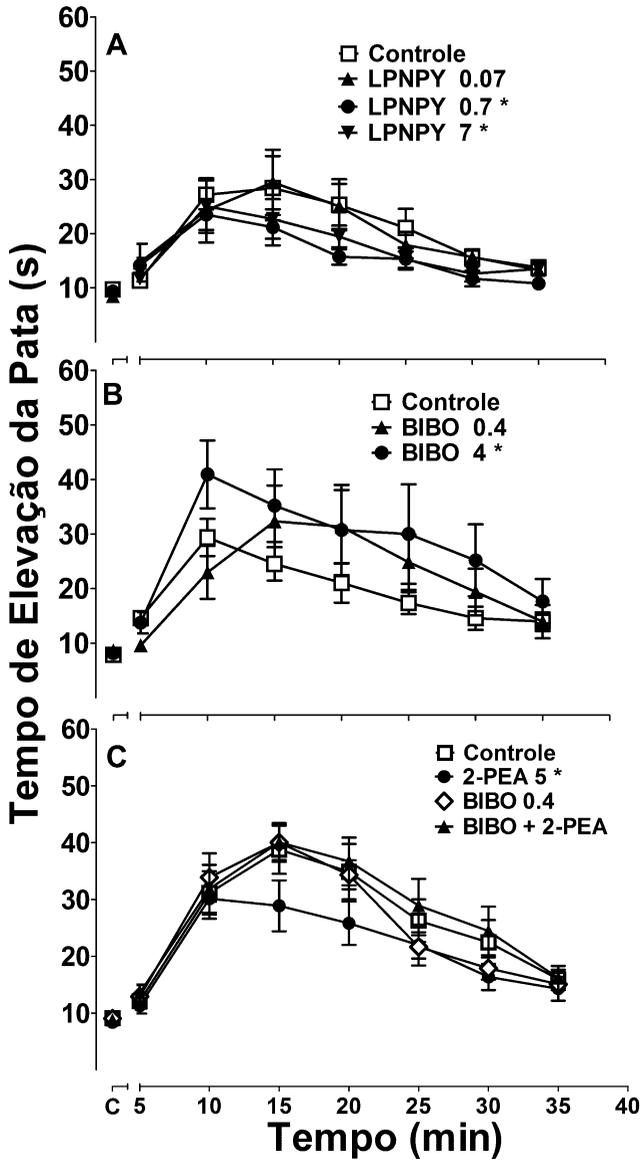


Figura 12 - Efeito da administração de agonista (A) e antagonista (B) do receptor Y1 na medula espinal na incapacitação articular induzida por

formalina e a reversão do efeito hiponociceptivo do 2-PEA no joelho pela administração de BIBO 3304 na medula espinhal (C): LPNPY ($\mu\text{mol}/\text{medula}$) e BIBO ($\mu\text{mol}/\text{medula}$) foram administrados pela via intratecal 20 minutos antes da formalina intra-articular. 2-PEA foi coadministrado com formalina. Somente ocorreu alteração no comportamento nociceptivo na segunda fase (F2 5-35 min.), comparado ao grupo controle (formalina). LPNPY, BIBO e 2-PEA significam Leu³¹ Pro³⁴ NPY, BIBO 3304 e 2-piridiletilamina, respectivamente. Valores são apresentados como a média de seis animais (n=6). Os resultados representam a média \pm EPM e * indica a diferença estatística significativa em nível de $P < 0,05$. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Duncan.

4.9 – Efeito da administração da neurotoxina NPY-SAP na medula espinhal sobre a expressão do receptor Y1 na medula espinhal e também sobre o efeito hiponociceptivo do 2-PEA articular.

Os resultados anteriores evidenciaram que a hiponocicepção mostrada com a administração intra-articular do agonista H1 está de algum modo sendo modulada pelo receptor Y1 na medula espinhal. Assim, verificou-se, através da técnica *western blot*, a expressão do receptor Y1 na medula espinhal, e se a ausência deste receptor no segmento lombar da medula espinhal poderia influenciar a hiponocicepção observada pelo agonista H1. Utilizando um tratamento de sucesso, relatado na literatura (Wiley *et al.*, 2009), um grupo de animais recebeu a administração intratecal do conjugado da neurotoxina NPY-sap (750 ng) na medula espinhal (L4-L5), 14 dias antes do teste experimental. Os resultados mostraram que o receptor Y1 é expresso na medula espinhal de animais *naive* (PBS), e nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos-controle PBS e Blank-sap (750 ng). No entanto, a administração espinhal da neurotoxina NPY-sap (750 ng) diminuiu a expressão do receptor Y1 no segmento lombar (L4-L5), comparado ao grupo-controle (Blank-sap 750 ng $P < 0,05$). A mesma diferença foi observada nos animais que receberam 2-PEA e formalina no joelho (Fig. 13). A diminuição da expressão do receptor Y1 no grupo NPY-sap (750 ng) preveniu a nocicepção evocada pela formalina intra-articular e também promoveu a perda do efeito hiponociceptivo observado pelo agonista do receptor H1 (2-PEA 5 nmol/joelho), coadministrado com formalina intra-articular, comparado ao grupo controle Blank-sap (750 ng) e 2-PEA no joelho (Fig. 14).

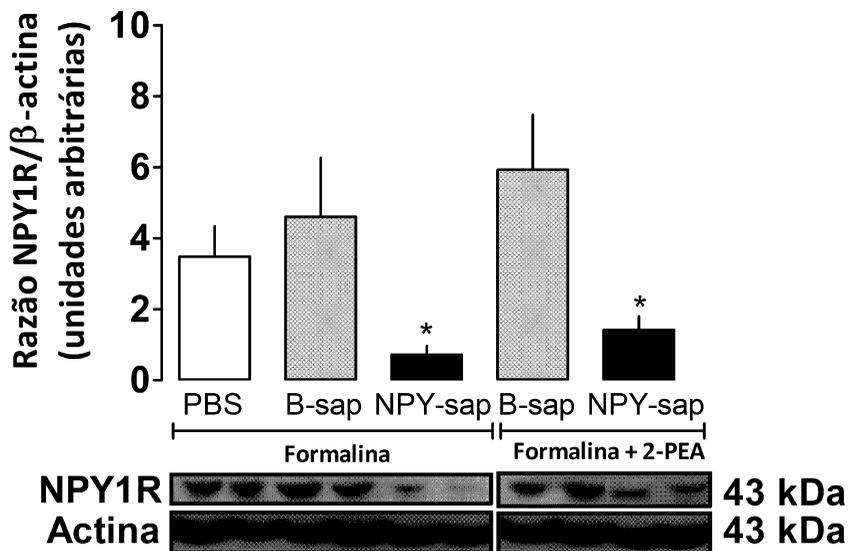


Figura 13 - Níveis de expressão total da proteína do receptor Y1 no segmento lombar (L4-L5): PBS, B-sap (750 ng/medula) e NPY-sap (750 ng/medula) foram administrados pela via intratecal 14 dias antes da formalina. 2-PEA (5 nmol/joelho) foi coadministrado com formalina. Os painéis NPY1R e Actina mostram a expressão de ambas as proteínas em dois animais por cada grupo. Os valores das barras mostram a razão entre a expressão do receptor Y1 e a actina, e os resultados são apresentados como a média \pm EPM de 3-5 animais ($n= 3-5$). * indica a diferença estatística significativa em nível de $P<0,05$. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Kills.

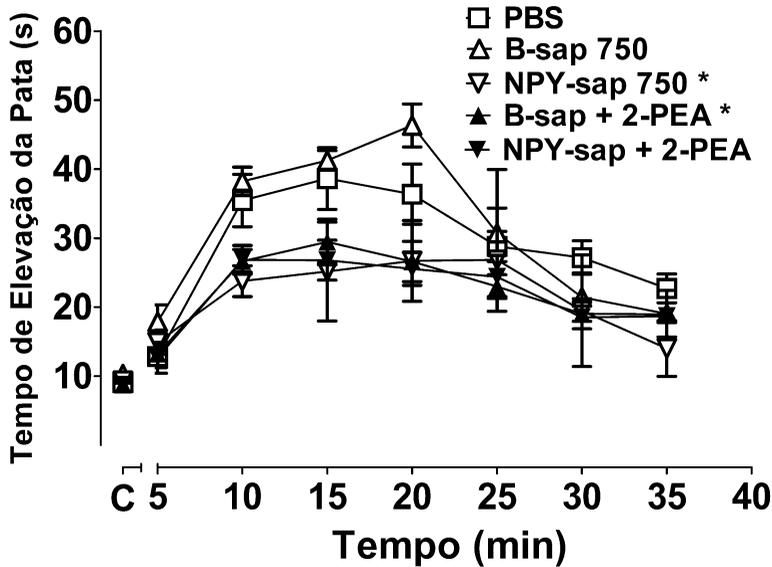


Figura 14 - Efeito da administração da neurotoxina NPY-sap na nocicepção articular induzida pela formalina. PBS, B-sap (750 ng/medula) e NPY-sap (750 ng/medula) foram administrados pela via intratecal 14 dias antes da formalina. 2-PEA (5 nmol/joelho) foi coadministrado com formalina. Valores são apresentados como a média de seis animais (n=6). Os resultados representam a média \pm EPM e * indica a diferença estatística significativa em nível de $P < 0,05$. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Duncan.

4.11 – Hiponocicepção da tripsina coadministrada com formalina intra-articular e a reversão por naloxona.

Até o presente momento os resultados apontam para a existência de um mecanismo antinociceptivo envolvendo a medula espinhal após a estimulação articular do receptor H1. Tendo em vista a noção que o receptor H1 é relacionado com a sensação de prurido na pele (Schmelz, 1997), verificou-se se a ativação de outro receptor, considerado pruritogênico no tecido cutâneo PAR-2 (Steinhoff *et al.*, 2000; 2003), poderia ter um perfil de ação semelhante após a administração articular. A dose mais baixa de tripsina (0,04 pmol/joelho), agonista do receptor PAR-2, coadministrado com formalina, não proporcionou efeito. No entanto, as doses altas de tripsina (4 e 400 pmol/joelho $P < 0,05$) diminuíram o TEP quando comparado ao grupo-controle (formalina) (Fig. 15A). Assim, fomos verificar o envolvimento do receptor Y1 medular nesse efeito antinociceptivo. A administração na medula espinhal de BIBO 3304 (0,4 μ mol/medula), 20 minutos antes, na mesma dose mostrada que reverte o efeito hiponociceptivo do agonista H1 no joelho, não alterou o efeito hiponociceptivo da tripsina (400 pmol/joelho $P < 0,05$) coadministrado com formalina intra-articular (Fig. 15B). Porém, a mesma dose do antagonista opioide naloxona (1 mg/kg), que preveniu a antinocicepção da morfina (4 mg/kg $P < 0,05$), também preveniu o efeito hiponociceptivo da tripsina (400 pmol/joelho $P < 0,05$) intra-articular (Fig. 15C).

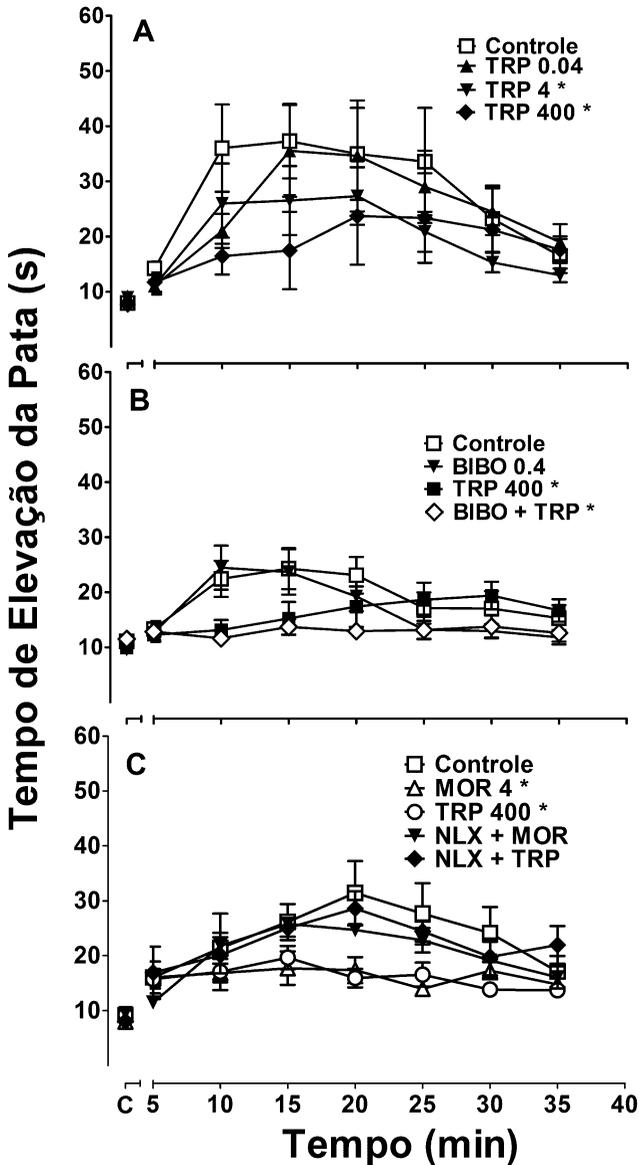


Figura 15 - Hiponocicepção da tripsina (A) coadministrada com formalina intra-articular, inefetividade de efeito do BIBO 3304 (B) e a reversão do efeito hiponociceptivo da tripsina por naloxona (C). TRP

(pmol/joelho) foi coadministrado com formalina intra-articular. BIBO ($\mu\text{mol}/\text{medula}$) foi administrado pela via intratecal (20 min.). MOR (mg/kg) e NLX (1mg/kg) foram administrados pela via subcutânea (30 min.) antes da formalina. Somente ocorreu alteração no comportamento nociceptivo na segunda fase (F2 5-35 min.) comparado ao grupo-controle (formalina). TRP, BIBO, MOR e NLX significam tripsina, BIBO 3304, morfina e naloxona, respectivamente. Valores são apresentados como a média de seis animais ($n=6$). Os resultados representam a média \pm EPM e * indica a diferença estatística significativa em nível de $P<0,05$. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Duncan.

5- DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que o antagonista do receptor H1 periférico, cetirizina, potencializou o comportamento nocifensivo evocado pela formalina sem alterar o edema e o extravasamento plasmático induzido por este agente irritante. Resultados prévios do nosso grupo já haviam mostrado que a administração de outros antagonistas do receptor H1 — meclisina, prometazina e também loratadina, que pouco ultrapassa a BHE — potencializaram a nocicepção articular induzida pela substância química formalina (Martins *et al.*, 2006; Souza-Silva, 2009). Tínhamos especulado que o efeito bloqueador do antagonista do receptor H1 sobre as células endoteliais vasculares poderia dificultar a drenagem de formalina do espaço sinovial, e o efeito hipernociceptivo do antagonista do receptor H1 periférico passaria a ser observado (Martins *et al.*, 2006). No entanto, o conjunto de resultados descartou essa possibilidade e, apesar de o bloqueio local do receptor H1 marginalmente influenciar o extravasamento plasmático (Souza-Silva, 2009), tais resultados suportam a ideia de que os dois fenômenos não estão diretamente relacionados neste modelo. Além disso, demonstrou-se que o bloqueio da degranulação de mastócitos foi importante para modular a nocicepção induzida pela formalina e também a hipernocicepção observada com o antagonista do receptor H1, sem qualquer influência sobre o edema e o extravasamento plasmático. Desse modo, pode-se sugerir que o efeito hipernociceptivo dos anti-histamínicos H1 deva envolver os receptores H1 localizados em fibras sensoriais articulares e, além disso, também sugerir um papel hiponociceptivo para a histamina liberada dos mastócitos atuando sobre o receptor H1 na articulação.

Desde o início do século passado, no entanto, postula-se que a histamina é um mediador pró-nociceptivo, atuando em fibras sensoriais periféricas (Rosenthal *et al.*, 1939; Mobarakeh *et al.*, 2000; 2002; Parada *et al.*, 2001). Essa relação começou a ser construída inicialmente pela ação da substância conhecida na época como 2786 R.P, que manifestava ser antagonista das ações da histamina. Nesses experimentos, foi observado que a administração de 2786 R.P abolia a resposta nociceptiva provocada por beliscão, picadas ou corte em animais (Rosenthal *et al.*, 1939). Posteriormente, Dews e colaboradores (1946) conduziram um estudo em que demonstraram que o composto 2786 R.P, conhecido atualmente como pirlamina, tinha potencial analgésico oito vezes maior que narcóticos, em ratos, e tais efeitos foram considerados como semelhante à ação da lidocaína. Desse modo, inicialmente foi

sugerido um papel pró-nociceptivo para histamina no tecido periférico, e estudos subsequentes avançaram no intuito de desvendar os mecanismos pelo qual a histamina atua na nocicepção.

Estudos mais atuais, entretanto, mostram que a pirilamina, além de bloquear o receptor H1, também atua como anestésico local (Rumore *et al.*, 1985; Hazem *et al.*, 2009). Evidenciar um papel pró-nociceptivo para histamina no tecido periférico, a partir da ação antagonista de alguns fármacos anti-histamínicos, principalmente os de primeira geração, após uma administração local se torna complicado devido à baixa seletividade que algumas destas drogas têm sobre o receptor H1 (Raffa, 2001). De modo geral, o que é observado com a administração de fármacos anti-histamínicos H1, mas não todos, é um efeito antinociceptivo em diferentes modelos de dor (Raffa, 2001). No entanto, essa ação é atribuída aos fármacos de primeira geração que, devido à sua lipossolubilidade têm capacidade de atingir o sistema nervoso central (SNC). O acesso ao sistema nervoso central poderia explicar os resultados antinociceptivos e, ao contrário, pró-nociceptivo, de acordo com a dose, observado com alguns anti-histamínicos H1 com ação central após a administração sistêmica (Martins *et al.*, 2006; Souza-Silva, 2009). A mesma dose de cetirizina que observamos promover hipernocicepção no teste de formalina, no tecido profundo não alterou o limiar nociceptivo de retirada da cauda no teste térmico do “*tail flick*”. Isso poderia sugerir um papel exclusivo dos anti-histamínicos H1 sobre a nocicepção em tecido articular. Entretanto, o efeito analgésico dos anti-histamínicos com ação central, com alta seletividade para o receptor H1, é perdido em testes como o “*tail flick*”, em que o mecanismo de reflexo nociceptivo ocorre através da ativação de estruturas periféricas e medulares, não envolvendo regiões supramedulares (Raffa, 2001). Esses achados — somados aos resultados em que se observa o aumento da nocicepção após a administração local do agonista H1 nas estruturas cerebrais envolvidas no controle de dor, substância cinzenta periqueductal (PAG) e núcleo magno da *rafe*, nos mais variados tipos de testes de dor (Malmberg-Aiello, 1998) — não descartam a eficiência de alguns anti-histamínicos H1 de primeira geração em promover analgesia quando atuam no SNC, mas indica a noção de que a histamina, no tecido periférico, não está envolvida com a sensação de dor (Schmelz *et al.*, 1997).

Além da função analgésica, os anti-histamínicos do receptor H1 com ação central também possuem reconhecida função

antialérgica, o que sugere a histamina como responsável por atuar centralmente sobre diferentes sensações de origem periférica, e que estruturas comuns no cérebro estão envolvidas na mediação do prurido e dor. No entanto, o conhecimento clínico mostra que os anti-histamínicos do receptor H1 de segunda geração possuem somente função antialérgica e não analgésica. Isso reforça um papel pró-nociceptivo para histamina no SNC. Porém, deixa incerto o papel da histamina com a dor no tecido periférico.

Nossos resultados demonstraram que a administração local do agonista H1 (2-PEA) potencializou o efeito da formalina no tecido cutâneo da pata, e isto poderia evidenciar um papel pró-nociceptivo para histamina na pele (Parada *et al.*, 2001). No entanto, outra fonte de ação que não pode ser descartada é o prurido. Na pele de animais, ele não é adequadamente diferenciado de nocicepção nos modelos comportamentais (Shimada e La Motte 2008; La Motte *et al.*, 2011). Contudo, inúmeros trabalhos que mostram o disparo de fibras aferentes primárias pela histamina (Schmelz *et al.*, 1997; Herbert *et al.*, 2001; Nicolson *et al.*, 2002) relacionam essa ação com a sensação de coceira, e não com dor, em humanos (Schmelz *et al.*, 1997). Desse modo, a soma de comportamentos semelhantes após a administração de substâncias na pata poderia ser mal interpretada como sensibilização (Schmelz *et al.*, 1997).

Além das contradições sobre a interpretação dos resultados comportamentais após a administração de histamina no tecido periférico cutâneo de animais (Kuraishi *et al.*, 1995; Shimada e La Motte., 2008; La Motte *et al.*, 2011), os comportamentos evidenciados como nociceptivos são principalmente observados após uma elevada concentração de histamina administrada tanto no tecido cutâneo (Parada *et al.*, 2001) quanto na articulação (Ting *et al.*, 2009; Souza-Silva, 2009) de animais. Isso se encontra acima da concentração de histamina que poderia ser liberada de maneira endógena, após um estímulo químico nos tecidos (Hardwick, 1954). Desse modo, o conjunto de resultados suporta a ideia de que ao menos no tecido profundo articular a histamina endógena pode ser antinociceptiva. Apesar de ser difícil precisar a exata concentração de histamina liberada por mastócitos articulares em um momento de degranulação, é bem conhecido que as células do peritônio de ratos, além de histamina, contêm serotonina com uma proporção aproximada de 100 – 30 (Enerbäck e Wingren, 1980). A concentração de ambas na pele é relativamente menor quando comparada ao peritônio (Beaven *et al.*, 1983; Enerbäck e Wingren, 1980). Assim, é razoável concluir que os mastócitos cutâneos de

rato liberam entre 10 – 30 pg de histamina por célula (Soll, 1981; Beaven, 1983). Na ausência de artrite, os mastócitos estão localizados dispersamente no tecido conjuntivo, formando até 3% de todas as células da articulação (Nigrovic e Le, 2004). Como a concentração de mastócitos no tecido articular é menor, se comparada à pele, é provável que a concentração de histamina disponível na articulação seja inferior à observada no tecido cutâneo. Isso sugere que a concentração de histamina administrada intra-articular, que evoca comportamento nociceptivo (Ting *et al.*, 2009; Souza-Silva, 2009), não esteja relacionada à concentração endógena de histamina.

Em estudo eletrofisiológico no joelho de gatos, é claramente mostrado que a concentração de histamina administrada intra-articular está diretamente relacionada ao tipo de aferente primário ativado (Herbert *et al.*, 2001). Esse estudo evidenciou que a dose de histamina que promove resposta nociceptiva (Ting *et al.*, 2009) ultrapassou a concentração de histamina que ativa a fibra aferente primária com menor sensibilidade a este agente químico (Herbert *et al.*, 2001). Além disso, algumas das fibras articulares respondem à histamina com concentrações muito baixas, cerca de um bilhão de vezes menor que a dose administrada na articulação nos ensaios comportamentais nociceptivos habituais (Ting *et al.*, 2009). Adlesic e colaboradores (2007) mostram que a faixa de concentração de histamina normalmente encontrada no fluido sinovial de humanos com ou sem artrite é, no mínimo, 1000 vezes menor que a dose utilizada para provocar nocicepção (Ting *et al.*, 2009). Esses achados reforçam a ideia de que a concentração de histamina utilizada nos ensaios nociceptivos pode não condizer com a função fisiológica da histamina na articulação.

Os resultados demonstraram que o estabilizador de membrana de mastócitos, cromoglicato de sódio, modulou a nocicepção induzida pela formalina, bem como a hipernocicepção observada com o antagonista do receptor H1, sem qualquer influência sobre o edema e o extravasamento plasmático. Esse resultado reforçou a ideia de ação hiponociceptiva para a histamina endógena na articulação. Os achados demonstram que a serotonina possui característica pró-nociceptiva, inclusive no teste de formalina intra-articular (De Oliveira, 2010). Sugerem que, após a estimulação dos mastócitos, esses mediadores tendem a produzir efeitos antagônicos na articulação de ratos e que, aparentemente, um balanço na concentração de ambos pode definir o caminho da nocicepção. Além disso, resultados prévios do nosso grupo

apontaram que, em doses próximas ao que se poderia encontrar após uma liberação endógena, a administração de histamina (0.2 e 20 nmol) não apresentou comportamento nociceptivo. Ao contrário, somente com a administração de doses elevadas (200 nmol e 20 μ mol), bem acima da concentração fisiológica articular, o comportamento nociceptivo ficou evidenciado (Souza-Silva, 2009). Segundo Adlesic e colaboradores (2007), a faixa de concentração de histamina encontrada no tecido articular de humanos — com ou sem artrite, quando administrada no joelho de animais *naive* — não é capaz de desenvolver qualquer tipo de resposta inflamatória articular (Adlesic *et al.*, 2007). Isso reforça a hipótese que em concentrações fisiológicas a histamina não atua como mediador pró-nociceptivo ou até mesmo pró-inflamatório. Ao contrário, os achados mostram que a administração de agonista seletivo do receptor H1 promoveu efeito anti-inflamatório, diminuindo a migração de neutrófilos. Já a inibição da produção de algumas citocinas pró-inflamatórias (Bury *et al.*, 1992; Hirasawa *et al.*, 1991) pode sugerir que a liberação de histamina endógena contribua para resolução do quadro inflamatório e também possa influenciar negativamente a nocicepção articular.

A administração de doses baixas de histamina intra-articular, em concentração próxima à encontrada no fluido sinovial (Adlesic *et al.*, 2007), que sozinha não promoveu efeito nociceptivo, quando coadministrada com formalina foi hiponociceptiva (Souza-Silva, 2009). Além disso, nossos resultados mostram que o agonista seletivo do receptor H1 (2-PEA) promoveu hiponocicepção, e este efeito foi revertido pela administração sistêmica da cetirizina. Desse modo, nosso conjunto de resultados evidencia que a histamina intra-articular, através da ativação do receptor H1, pode modular negativamente a nocicepção evocada pela formalina e a ausência de efeito vascular pela histamina (Souza-Silva, 2009), como também pelo agonista H1, sugere que este efeito ocorra provavelmente em fibras sensoriais articulares que expressam este receptor.

Em estudo de cultura de aferentes primários de roedores adultos, alguns subtipos de neurônios sensoriais com pequeno diâmetro apresentaram aumento da concentração de cálcio intracelular após a administração de histamina em baixas doses (Nicolson *et al.*, 2002). Nestes, a magnitude do influxo de cálcio no meio intracelular não foi alterado pelo aumento de agonistas, sugerindo a existência de um processo de saturação dos neurônios. No entanto, quando é aumentada a concentração de histamina, outros neurônios passam a responder com o influxo de cálcio

(Nicolson *et al.*, 2002). Tais achados mostram que doses altas de histamina não são capazes de alterar o influxo de cálcio em uma fibra, mas sim recrutar outros tipos de neurônios anteriormente insensíveis a doses baixas. Talvez o recrutamento de diferentes subtipos de neurônios pela histamina, relacionado à dose, possa explicar o comportamento nociceptivo observado pela administração de altas doses de histamina (Souza-Silva, 2009) e também pelo agonista H1 (2-PEA), como também já foi observado em outros estudos com animais (Parada *et al.*, 2001; Ting *et al.*, 2009) e em humanos (Baron *et al.*, 2001). O influxo de cálcio evocado pela histamina foi bloqueado pelo antagonista do receptor H1 e nenhum efeito foi observado com o antagonista do receptor H2 e H3, ou ainda com antagonistas serotoninérgicos (Nicolson *et al.*, 2002). Isso reforça nossa idéia de que através da ativação do receptor H1 a histamina module negativamente a nocicepção.

Um dos principais problemas encontrados com a correta interpretação farmacológica, após a utilização de histamina em experimentos nociceptivos, é a possibilidade de uma ação direta facilitatória sobre o receptor NMDA. O receptor NMDA possui diferentes subtipos, sendo que o mais predominante em neurônios aferentes primários de ratos é o que contém a subunidade NR2B (Li *et al.*, 2004). Após o processo de metabolização, a histamina é convertida por enzimas específicas em dois metabólitos: ácido imidalozacético e telemetilhistamina. Este último é o principal metabólito da histamina e um agonista seletivo do sítio de histamina no receptor NMDA localizado na subunidade NR2B, porém não atua sobre os receptores de histamina (Burban *et al.*, 2010). A injeção de grandes quantidades de histamina no tecido provavelmente resulta em elevada concentração deste metabólito e os resultados dos nossos experimentos demonstraram que a coinjeção de telemetilhistamina no joelho somente potencializou a nocicepção elicitada pela formalina. Assim, é concebível que esse efeito facilitador sobre os receptores NMDA promova comportamento nociceptivo e também potencialize a nocicepção evocada por agentes irritantes, como a formalina.

Neste estudo, a ideia de modulação da nocicepção pela ativação de neurônios periféricos através da histamina no tecido articular pode ser partilhada pela proposta de alguns pesquisadores que evidenciam a existência de um mecanismo de interação na medula espinhal, entre as vias de prurido e dor no tecido cutâneo (Craig, 2002; Ikoma *et al.*, 2003; 2006). Nesta proposta é mostrado que a percepção de coceira faz parte de uma via específica

prurito gênica que envolve estruturas no sistema nervoso periférico e central (Schmelz *et al.*, 1997; Andrew e Craig, 2003; Davidson *et al.*, 2007). Assim, a sensação de prurido evocada pela histamina pode ser bloqueada tanto pelo ato de coçar como também por diferentes estímulos dolorosos (mecânicos, térmicos e químicos) que ativam os nociceptores (Ward *et al.*, 1996). Segundo as afirmações de Nilson e colaboradores (1997), a estimulação elétrica no tecido cutâneo reduz o prurido induzido pela administração de histamina na pele, em uma área que excede a região estimulada eletricamente por até 10 centímetros, o que sugere a ideia de um mecanismo de ação central.

A administração sistêmica ou intraespinhal de morfina tem, em alguns casos, o resultado adverso de prurido, e essa sensação de coceira não está relacionada a qualquer estímulo periférico em aferente primário (Andrew *et al.*, 2003). Ao contrário, é visto que a administração de antagonistas μ -opioide têm ação antiprurito gênica em protocolos de prurido experimental e, muitas vezes, são utilizados para o tratamento do prurido crônico (Heyer *et al.*, 1997). É importante notar que os neurônios espinhais sinalizadores das informações de prurido ao tálamo não possuem atividade espontânea na ausência de estímulos periféricos (Ikoma *et al.*, 2003). Assim, os neurônios na medula espinhal, que transmitem a informação nociceptiva, provavelmente possuem atividade contínua e acredita-se ser este o mecanismo responsável por suprimir a atividade de neurônios de projeção que transmitem a informação prurito gênica ao tálamo (Ikoma *et al.*, 2003). Nessa visão, a atividade da via de processamento da dor previne que a sensação de coceira seja sentida continuamente. Desse modo, é proposto que a inibição dos neurônios que processam a dor na medula espinhal (ex. agonista opioide) torna insuficiente a supressão dos neurônios envolvidos com a via de coceira no segmento espinhal que, por sua vez, passa a ser observada (Ikoma *et al.*, 2003).

Esse conjunto de informações favorece a ideia de que a nocicepção tem uma relação antagonica com o prurido. E, aparentemente, o balanço entre esses dois sistemas determinará qual será a sensação prevalente final por um mecanismo de silenciamento recíproco em nível medular. Portanto, acredita-se que embora não promova a mesma sensação observada na pele, é plausível que substâncias consideradas prurito gênicas, quando liberadas no tecido profundo articular, ativem um mecanismo homólogo ao encontrado no tecido cutâneo e isto exerça uma modulação negativa sobre as vias nociceptivas na medula espinhal.

As fibras articulares com sensibilidade à histamina apresentam baixa velocidade de condução (Herbert *et al.*, 2001) e possuem semelhanças aos tipos de fibras sensíveis à histamina encontradas nos estudos de microneurografia em pele humana (Schmelz *et al.*, 1997). Como a marcação do receptor H1 somente são observadas em aproximadamente 15% dos neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro, trigeminal e lombar (Kashiba *et al.*, 1999), sugere-se o envolvimento desse subtipo de fibra no efeito hiponociceptivo da histamina na articulação. No corpo celular (GRD) de neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro, os níveis de NPY são muito baixos (Gibson *et al.*, 1984), mas foram colocalizados com o receptor H1 em um subconjunto de fibras com pequeno diâmetro em *guinea pigs* (Kashiba *et al.*, 2001).

Os resultados mostraram que o bloqueio farmacológico ou a diminuição do receptor Y1 na medula espinhal impediram o efeito antinociceptivo produzido pela administração intra-articular do agonista do receptor H1 (2-PEA). Desse modo, esses resultados apoiam a hipótese da existência de um mecanismo na medula espinhal envolvido com a antinocicepção induzida pela ativação do receptor H1 articular.

Os resultados decorrentes dos atuais estudos também mostram que o NPY é liberado de maneira endógena durante a dor articular persistente induzida pela formalina na articulação e produz um efeito inibidor que paralisa os mecanismos pró-nociceptivos na medula espinhal, de maneira semelhante ao que foi observado após estimulação subcutânea por formalina (Solway *et al.*, 2011). Ainda existe pouca informação sobre como a ativação periférica dos receptores H1 poderia conduzir a liberação de NPY na medula espinhal. Uma hipótese interessante é que o receptor H1, localizado em um grupo de aferentes primários de pequeno diâmetro contendo NPY, poderia desempenhar tal papel, e a ativação do receptor H1 na articulação do joelho, diretamente, liberaria NPY na medula espinhal. Ainda não se tem informações suficientes para concluir sobre a existência de um mecanismo de ação hiponociceptivo que envolva a articulação do joelho e a medula espinhal. No entanto, há evidência, citada anteriormente, de um subconjunto de neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro que expressam receptores H1 e neuropeptídeo Y (NPY) (Kashiba *et al.*, 2001) pode sugerir que estas fibras, submetidas à ativação pelo receptor H1 na extremidade periférica, poderiam promover a liberação de NPY na medula espinhal. Um subtipo de neurônios aferentes primários semelhantes aos encontrados em *guinea pigs* (Kashiba *et al.*, 2001) ainda não foi

observado em ratos, mas alguns trabalhos mostram que o NPY foi detectado no nervo ciático e no GRD de ratos (Roddy *et al.*, 1990; Brumovsky *et al.*, 2007). Portanto, esses achados podem sugerir a existência de fibras sensoriais semelhantes, que também poderiam ser adequadas como candidato nesta espécie.

Na coluna vertebral, o NPY foi detectado em neurônios na lâmina II (Ji *et al.*, 1994) e frequentemente colocalizado com o GABA (Laing *et al.*, 1994; Polgár *et al.*, 2010). Recentemente, após a injeção de capsaicina na pata traseira, foi demonstrado que aproximadamente 40% das células que contêm o NPY, mas não outros tipos de neurônios GABA, aumentaram a expressão de cinases (pERK) fosforiladas, que são reguladas por sinais extracelulares (Polgár *et al.*, 2010), o que sugere uma ativação neuronal específica (Ji *et al.*, 1999). Estudos eletrofisiológicos em fibras periféricas que apresentam sensibilidade especial à histamina têm mostrado uma subpopulação de fibras com insensibilidade a estímulos mecânicos, que também responde à capsaicina (Schmelz *et al.*, 1997). Esses dados em conjunto nos sugerem que uma fibra aferente periférica sensível à histamina possa também promover especificamente a liberação de NPY de interneurônios da medula espinhal.

Acredita-se que a principal fonte de NPY na medula espinhal sejam os interneurônios do corno dorsal (Gibson *et al.*, 1984). Nesse local ocorre um aumento dos níveis do RNAm de NPY durante o estado inflamatório periférico (Ji *et al.*, 1994). No entanto, o locus cerúleos emite projeções noradrenérgicas para a medula espinhal e poderia também ser uma fonte de liberação de NPY (Everitt *et al.*, 1984; Holets *et al.*, 1988), seja durante as condições de estresse (Valentino *et al.*, 1993; Sved *et al.*, 2002) ou dor (Szabadi, 2012), e ambas se encaixam ao estímulo nociceptivo tônico da administração periférica da formalina. O efeito hiperalgésico observado após a administração do antagonista do receptor Y1 na medula espinhal sugere que o NPY é liberado durante a estimulação de formalina administrada no joelho e atua como um inibidor da sinalização nociceptiva. Assim, a ação do NPY liberado de aferentes primários e/ou sob diferentes condições em interneurônios poderia ter um efeito antinociceptivo, ambos inibindo interneurônios excitatórios pós-sinápticos, através do receptor Y1 (Brumovsky *et al.*, 2005).

O receptor Y1 é encontrado em neurônios pós-sinápticos do corno dorsal, nas lamínas I-VI (Brumovsky *et al.*, 2007). No entanto, alguns receptores Y1 também são encontrados pré-sinápticamente nas lamínas I-III, particularmente em terminais de aferentes

primários sensíveis à capsaicina (Giuliani *et al.*, 1989; Hokfelt *et al.*, 2007). O efeito antinociceptivo induzido pela liberação de NPY na medula espinhal poderia ocorrer nas fibras que expressam receptores Y1 (Gibbs *et al.*, 2004). Porém, estudo eletrofisiológico sugere que a ativação do receptor Y1 não inibe a transmissão excitatória de aferentes primários através de uma ação pré-sináptica (Smith *et al.*, 2007).

Neurônios que expressam o receptor NK1 são abundantes nas LI e LIII-IV (Mantyh *et al.*, 1995; Todd *et al.*, 2000) e têm um papel importante na transmissão nociceptiva para os centros superiores do cérebro (Mantyh, 2002). Uma grande proporção desses neurônios recebe contato sináptico direto dos interneurônios inibitórios GABA-NPY (Polgár *et al.*, 1999; 2010), sugerindo que eles também expressem receptores de NPY. No entanto, apesar de haver muitos neurônios que expressam o receptor Y1 em lâminas III-V do corno dorsal (Brumovsky *et al.*, 2006) nenhum deles têm morfologia para o receptor NK1 (Brumovsky *et al.*, 2007). Além disso, a injeção do conjugado NPY-saporina na medula espinhal, que se acredita destruir os neurônios que expressam o receptor Y1, não alterou o conteúdo de receptores NK1 na medula espinhal (Wiley *et al.*, 2009). Portanto, provavelmente o efeito antinociceptivo do NPY não seja devido a uma ação direta nessas projeções de neurônios.

O efeito antinociceptivo do agonista do receptor H1 foi perdido em animais pré-tratados com a injeção do conjugado NPY-saporina, na medula espinhal. Isso reforça ainda mais esta proposta de trabalho referente à existência de um mecanismo de modulação espinhal responsável pelo efeito antinociceptivo da ativação do receptor H1 articular. Uma vez que é necessário para a saporina acessar ao soma neuronal com o objetivo de produzir citotoxicidade (Wiley e Lappi, 1994), a ausência de efeito sobre os receptores Y1 do GRD, observado após a administração medular de Npy-sap (Wiley *et al.*, 2009), sugere que a neurotoxina não é internalizada nos axônios e terminais centrais de neurônios do GRD que expressam o receptor Y1 ou, uma vez internalizada, a neurotoxina Npy-sap não é transportada pelo axônio para os corpos celulares do GRD.

Algumas evidências sugerem que o receptor Y1 é expresso em interneurônios excitatórios da substância gelatinosa, contendo glutamato (Brumovsky *et al.*, 2007). Isso é consistente com a observação do efeito inibitório do agonista do receptor Y1 em neurônios dessa lâmina e também com os dados comportamentais

indicando a antinocicepção com agonista do receptor Y1, mas não com os agonistas do receptor Y2 injetados na medula espinhal (Taiwo e Taylor, 2002; Moran *et al.*, 2004; Miyakawa *et al.*, 2005).

Os resultados mostraram que o bloqueio da antinocicepção promovida pelo agonista H1, pela injeção espinhal do conjugado NPY-saporina, concomitantemente reduziu a expressão da imunorreatividade do receptor Y1 na medula espinhal. Essa neurotoxina foi mostrada por Wiley e colaboradores (2009), provocar a destruição dos neurônios marcados ao receptor Y1, principalmente os superficiais encontrados na lâmina II. O último estudo também mostrou que o conjugado NPY-saporina não alterou a expressão do receptor μ -opioide na medula espinhal (Wiley *et al.*, 2009). Essas observações apoiam a hipótese de que o efeito antinociceptivo, produzido pela ativação do receptor H1 na articulação do joelho, pode ser mediado por interneurônios da lâmina II na medula espinhal que expressam o receptor Y1. A observação que uma dose não analgésica de morfina na medula espinhal foi potencializada pela ativação articular do receptor H1 sugere que este mecanismo sinérgico possa ser mais bem explorado.

Esses achados nos levaram a supor que outras substâncias consideradas pruriginosas no tecido cutâneo poderiam promover o mesmo tipo de efeito observado pela histamina no tecido profundo articular. Assim como o receptor H1, o receptor PAR-2 é expresso no GRD de fibras não mielinizadas de pequeno diâmetro. Já no sistema sensorial periférico, vem sendo indicado que sua ativação denota um intenso prurido em seres humanos e animais (Steinhoff *et al.*, 2000; 2003; Hoogerwerf *et al.* 2001; Macfarlane, 2001; Vergnolle *et al.*, 2003; 2001; Shimada *et al.*, 2006. Ue *et al.*, 2006).

Esse receptor pode ser ativado tanto por triptase (a partir da degranulação dos mastócitos) como também por tripsina (de pâncreas e/ou fontes extrapancreáticas) (Corvera *et al.*, 1997; Cottrell *et al.*, 2004). Nosso resultado mostrou que a administração de tripsina reduziu o tempo de elevação da pata, induzido pela formalina. Porém, diferente da histamina, esse efeito antinociceptivo aparentemente não envolve as mesmas vias de ativação medular, uma vez que a administração de BIBO 3304 na medula espinhal não teve efeito. Por outro lado, a antinocicepção da tripsina provavelmente envolve uma via opioidérgica, que deve ser mais bem explorada já que o bloqueio de receptores opioides pela naloxona preveniu este efeito. Não sabemos se existe a liberação endógena de encefalinas na medula espinhal, induzida pela ativação do receptor PAR-2, como especulamos ocorrer com o NPY pela

ativação articular do receptor H1. Tampouco sabemos se a tripsina atua sobre os mesmos subtipos de aferentes primários articulares que a histamina. No entanto, semelhante ao observado no tecido cutâneo (Sun e Chen, 2007; Nakano *et al.*, 2008; Tsujii, *et al.*, 2008), nossos resultados apontam para a existência de mecanismos paralelos como responsáveis por essas respostas na articulação (Fig. 16). Desse modo, são concebíveis que vias independentes no joelho sejam as responsáveis pela ação antinociceptiva da histamina e tripsina, nas quais podem ser exploradas para melhorar os procedimentos analgésicos.

5.1 Esquema ilustrativo final

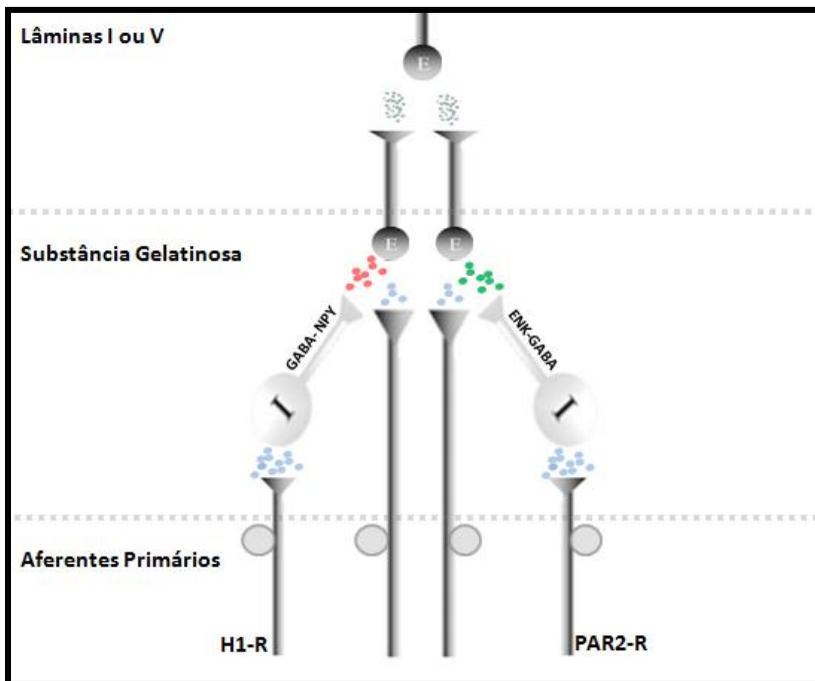


Figura 16- Proposta do mecanismo de hiponociceção evocada pela ativação intra-articular de fibras sensíveis à histamina ou à tripsina, que através do receptor H1 ou PAR-2, respectivamente, poderiam liberar NPY ou ENK na medula espinal. (Círculos Azuis - Glutamato, Vermelhos – Neuropeptídio Y, Verdes – Enkefalina. GABA - Ácido gama-aminobutírico); (I- neurônios medulares inibitórios, E- neurônios medulares excitatórios).

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLESIC M., VERDRENGH M., BOKAREWA M., DAHLBERG L., FOSTER SJ, TARKOWSKI A. Histamine in Rheumatoid Arthritis. *Scand. Journal of Immunol.* 65: 530–537, 2007.

AHMED M., BJURHOLM A., KREICBERGS A., SCHULTZBERG M. Neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase, and vasoactive intestinal polypeptide- immunoreactive nerve fibres in the vertebral bodies, discs, dura mater, and spinal ligaments of the rat lumbar spine. *Spine*, 18:268-273, 1993.

AHMED M., BJURHOLM A., SCHULTZBERG M., THEODORSSON E., KREICBERGS A. Increased levels of substance P and calcitonin generelated peptide in rat adjuvant arthritis. A combined immunohistochemical and radioimmunoassay analysis. *Arthritis Rheum.*, 38:699-709, 1995.

AHN HS., BARNETT A. Selective displacement of [3H] mepyramine from peripheral vs. central nervous system receptors by loratadine, a non-sedating antihistamine. *Eur J Pharmacol.* 127:153-5, 1986.

AKIYAMA T., IODI CARSTENS M., CARSTENS E. Transmitters and pathways mediating inhibition of spinal itch-signaling neurons by scratching and other counterstimuli. *PLoS One.* 7: 1-10, 2011.

ALSTEGREN P., KOPP S. Pain and synovial concentration of serotonin in arthritic temporomandibular joints. *Pain*, 72:137-143, 1997.

ANDEN N.E., OLSSON Y. 5-hydroxytryptamine in normal and sectioned rat sciatic nerve. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 70:537-540, 1967.

ANDERSSON M., PERSSON CG., SVENSSON C., CERVIN-HOBERG C., GREIFF L. Effects of loratadine on red wine-induced symptoms and signs of rhinitis. *Acta Otolaryngol.* 123:1087-1093, 2003.

ANDREW BL., DODT E. The deployment of sensory nerve endings at the knee joint of the cat. *Acta Physiol Scand*, 28:8287- 8296, 1953.

ANDREW D., CRAIG AD. Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive histamine: a central neural pathway for itch. *Nature Neuroscience*. 4:72-77, 2001.

ANDREW D., SCHMELZ M., BALLANTYNE JC. Itch – mechanisms and mediators. IASP Press, Scattle. 213-216, 2003.

BALAZS M., ILLYES G., VADASZ G. Mast cells in ulcerative colitis. Quantitative and ultrastructural studies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 57: 353–360, 1989.

BARON R., SCHWARZ K., KLEINERT A., SCHATTSCHNEIDER J., WASNER G. Histamine-induced itch converts into pain in neuropathic hyperalgesia. *Neuroreport*. 12: 3475-3478, 2001.

BEAVEN MA., AIKEN, DL., WOLDEMUSSE E., SOLLI AH., Changes in histamine synthetic activity, histamine content and responsiveness to compound 48/80 with maturation of rat peritoneal mast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224: 620-626, 1983.

BESSION JM. Anatomical and biochemical strategy of pain suppressing systems. *Cephalgia*, 7:19-22, 1987.

BLESSING WW., OLIVER JR., HODGSON AH., JOH TH., WILLOUGHBY JO. Neuropeptide Y-like immunoreactive C1 neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rabbit project to sympathetic preganglionic neurons in the spinal cord. *J Auton Nerv Syst* 18:121–129, 1987.

BOMBARDIER C., LAINE L., REICIN A., SHAPIRO D., BURGOS-VARGAS R., DAVIS B., DAY R., FERRAZ MB., HAWKEY CJ., HOCHBERG MC., KVIEN TK., SCHNITZER TJ.; VIGOR STUDY GROUP. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. *New Engl J Med*. 343:1520-1528, 2000.

BRACKERTZ D., MITCHELL GF., MACKAY IR. Antigen-induced arthritis in mice: Induced of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum*, 20:841-50, 1977.

BROCK SC, TONUSSI CR Intrathecally injected morphine inhibits inflammatory paw edema: the involvement of nitric oxide and cyclic-guanosine monophosphate. *Anesth Analg*. 106:965-71, 2008.

BRUMOVSKY P., HOFSTETTER C., OLSON L., OHNING G., VILLAR M., HOKFELT T. The neuropeptide tyrosine Y1R is expressed in interneurons and projection neurons in the dorsal horn and area X of the rat spinal cord. *Neuroscience* 138:1361–1376, 2006.

BRUMOVSKY P., SHI TS., LANDRY M., VILLAR MJ., HÖKFELT T. Neuropeptide tyrosine and pain *Trends Pharmacol. Sci.* 28:93-102, 2007.

BRUMOVSKY P., STANIC D., SHUSTER S., HERZOG H., VILLAR M., HÖKFELT T. Neuropeptide Y2 receptor protein is present in peptidergic and nonpeptidergic primary sensory neurons of the mouse. *J Comp Neurol*. 489: 328-48, 2005.

BURBAN A., FAUCARD R., ARMAND V., BAYARD C., VOROBYEV V., ARRANG JM. Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate receptors by interacting with an allosteric site distinct from the polyamine binding site. *J Pharmacol Exp Ther*. 332:912-21, 2010.

Cabrele C., Beck-Sickinger AG. Molecular characterization of the ligand-receptor interaction of the neuropeptide Y family. *J Pept Sci*. 6: 97-122, 2000.

CARPENTER D., ENGBERG I., LUNDBERG A. Differential supraespinhal control of inhibitory and excitatory action from the FRA to ascending spinal pathways . *Acta Physiol. Scand* ., 63: 103-110, 1965.

CARTENS E. Responses of rat spinal dorsal horn neurons to intracutaneous microinjection of histamine, capsaicin, and other irritants. *J Neurophysiol*, 77:2499-514,1997.

CASTOR W. The microscopic structure of normal human synovial tissue. *Arthritis Rheum*;3:140–151, 1960.

CERVERO F., SANN H. Mechanically evoked response of afferent fibres innervating the guinea-pigs ureter – an in vitro study. *J. Physiol.* 412: 245-266, 1989.

CODERRE TJ., VACCARINO AL., MELZACK R. Central nervous system plasticity in the tonic response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res*, 535: 155-8, 1990.

CODERRE TJ., WALL PD. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freud's adjuvant. *Pain*, 28:379-93,1987.

COGGESHALL RE., CARLTON SM. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Res. Rev.* 24: 28-66, 1997.

COHEN RN., PERL ER. Contributions of arachidonic acid derivatives and substance P to the sensitization of cutaneous nociceptors. *J. Neurophysiol.* 64: 457-464, 1990.

CORUZZI G., ADAMI M., GUAITA E., DE ESCH I.J., LEURS R. Antiinflammatory and antinociceptive effects of the selective histamine H4-receptor antagonists JNJ7777120 and VUF6002 in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 563:240-4, 2007.

CRAIG AD. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Nature Reviews Neuroscience* 3:655-666, 2002.

CRISP AJ., CHAPMAN CM., KIRKHAM SE., SCHILLER AL., KRANE SM. Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 27:845–851, 1984.

CROFFORD LJ., WILDER RL., RISTIMAKI AP., SANO H., REMMERS EF., EPPS HR., HLA T. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1

beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest*, 93:1095-1101,1994.

D'AMOUR, FE; SMITH, DL. A method for determining loss of pain sensation *J. Pharmacol Exp Ther* 72: 74–78, 1941.

DAVIDSON S., ZHANG X., YOON CH. KHASABOV SG., SIMONE DA., GIESLER GJ. JR. The itch-producing agents histamine and cowhage activate separate populations of primate spinothalamic tract neurons. *The Journal of Neuroscience* 27:10007–10014, 2007.

DEBUISSON D., DENNIS SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4:161-4, 1977.

DE OLIVEIRA DT., SOUZA-SILVA E., TONUSSI CR. Gingival vein Punction: A new simple technique for drug administration or blood sampling in rats and mice. *Scand. J. Lab. Anim. Sci* 36: 2009.

DE OLIVEIRA DT., SOUZA-SILVA E., TONUSSI CR. Natural barometric pressure variation can influence the joint pain-related behavior in rats. Poster apresentado no congresso da Sociedade Brasileira de ciência em animais de laboratório (SBCAL), 2009.

DE OLIVEIRA DT. Efeito hipernociceptivo da serotonina articular. Dissertação de mestrado. Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2010.

DE PAULIS A., MARINÒ I., CICCARELLI A., DE CRESCENZO G., CONCARDI M., VERGA L., ARBUSTINI E., MARONE G. Human synovial mast cells. Ultrastructural *in situ* and *in vitro* immunologic characterization. *Arthritis Rheum.* 39:1222-33, 1996.

DEWS PB., GRAHAM JP. The antihistamine substance 2786 RP. *Brit J Pharmacol Chemother, Hampshire.* 1:278-286, 1946.

DICKENSON AH., SULLIVAN AF. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurons. *Neurosci Lett*, 83:207-11,1987.

DIMITRIADOU V., ROULEAU A., TRUNG TUONG MD., NEWLANDS GJ., MILLER HR., LUJAU G., SCHWARTZ JC., GARBARG M., Functional relationships between sensory nerve fibers and mast cells of dura mater in normal and inflammatory conditions. *Neuroscience* 77: 829-839, 1997.

DOAK G.J., SAWYNOK J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience* 80:939-949, 1997.

DORN T., SCHAIBLE HG., SCHMIDT RF. Response properties of thick myelinated group II afferents in the medial articular nerve of normal and inflamed knee joints of the cat. *Somatosens Mot Res.*;8:127-36,1991.

DRAY A., URBAN L., DICKENSON A. Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol Sci*, 15:190-7, 1994.

DUNFORD P.J., WILLIAMS K.N., DESAI P.J., KARLSSON L., MCQUEEN D., THURMOND R.L. Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. *J. Allergy Clin Immunol.* 119:176-83, 2007.

EPIDEMIOLOGY OF MUSCULOSKELETAL PAIN. Global year of musculoskeletal pain – fact sheets. IASP, 2009.

ENERBÄCK L., WINGREN U. Histamine content of peritoneal and tissue mast cells of growing rats. *Histochemistry* 66, 113-124, 1980.

EVERITT BJ., HÖKFELT T., TERENIUS L., TATEMOTO K., MUTT V., GOLDSTEIN M. Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat. *Neuroscience*.11: 443-62, 1984.

FERNIHOUGH J., GENTRYA C., MALCANGIOA M., FOXA A., REDISKE J., PELLASB T. Pain related behavior in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain*, 112:83-93, 2004.

FERRELL WR., NADE S., NEWBOLD PJ. The interrelation of neural discharge, intra-articular pressure, and joint angle in the knee of the dog. *J Physiol*, 373:353-365, 1986.

FLAKE NM., GOLD MS. Inflammation alters sodium currents and excitability of temporomandibular joint afferents. *Neurosci Lett.*, 384:294-9, 2005.

GALLI SJ., NAKAE S., TSAI M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 6:135-42, 2005.

GIBBS J., FLORES CM., HARGREAVES KM. Neuropeptide Y inhibits capsaicin-sensitive nociceptors via a Y1-receptor-mediated mechanism. *Neuroscience*. 125:703–9, 2004.

GIBSON SJ., POLAK JM., ALLEN JM., ADRIAN TE., KELLY JS., BLOOM SR. The distribution and origin of a novel brain peptide, neuropeptide Y, in the spinal cord of several mammals. *JComp Neurol*. 227: 78–91, 1984.

GILFILLAN AM., TKACZYK C. Integrated signaling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol*, 6: 218-30, 2006.

GIULIANI S., MAGGI CA., MELI A. Prejunctional modulatory action of neuropeptide Y on peripheral terminals of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Br J Pharmacol*. 98:407-12, 1989.

GOTIS-GRAHAM I., MCNEIL HP. Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression. *Arthritis Rheum*;40:479–489, 1997.

GRIGG P., SCHAIBLE HG., SCHMIDT RF. Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee. *J Neurophysiol.*, 55:635-643, 1986.

GURISH MF., AUSTEN KF. The diverse roles of mast cells. *J Exp Med*;194:F1–F5, 2001.

GUSTAFSON EL., SMITH KE., DURKIN MM., WALKER MW., GERALD C., WEINSHANK R., BRANCHEK TA. Distribution of the

neuropeptide Y Y2 receptor mRNA in rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res.* 46:223–235, 1997

HAGBARTH KE., KERR DIB. Central influences on spinal afferent conduction. *J. Neurophysiol.*, 17: 295-307, 1954.

HÄGERMARK O., RAJKA G., BERGVIST U., Experimental itch in human elicited by rat mast cell chymase. *Acta Dermato-venereologica* 52:125-128, 1972.

HAMMOND DL. Inhibitory neurotransmitters and nociception: role of GABA and glycine. In: *The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology*, 130: pp. 361± 384. Eds. A. Dickenson and J.-M. Besson. Springer-Verlag, Berlin, 1997.

HANDWERKER HO., FORSTER C., KIRCHHOFF C., 1991. Discharge patterns of human C-fibers induced by itching and burning stimuli. *J. Neurophysiol.* 66: 307-315, 1991.

HARDWICK DC. Age changes in the histamine content of rat skin. *J. Physiol.* 28: 157-165, 1954.

HAZEM ADEL ASHMAWI, LEANDRO MAMEDE BRAUN, ANGELA MARIA SOUSA, IRIMAR DE PAULA POSSO. Analgesic effects of H1 receptor antagonists in the rat model of formalin-induced pain. *Rev. Bras. Anesthesiol* 59: 661-470, 2009.

HEAD H., HOLMES G. Sensory disturbances from cerebral lesions. *Brain* 34: 102-254, 1911.

HEPELMANN B., MCDUGALL JJ. Inhibitory effect of amiloride and gadolinium on fine afferent nerves in the rat knee: evidence of mechanogated ion channels in joints. *Exp Brain Res.*, 167:114-118, 2005.

HERBERT MK., SCHMIDT RF. Histamine excites groups III and IV afferents from the cat knee joint depending on their resting activity. *Neurosc. Letters* 305: 95-98, 2001.

HEYER G., DOTZER M., DIEPGEN TL., HANDWERKER HO.
Opiate and H1 antagonist effects on histamine induced pruritus and
alloknesis. *Pain* 73: 239-243, 1997.

HILDEBRAND C., OQVIST G., BRAX L., TUISK F. Anatomy of rat
knee joint and composition of a major articular nerve. *Anat Rec*,
229:545-555, 1991.

HILL S.J., GANELLIN C.R., YOUNG J.M., SCHUNACK W., LEVI R.,
HASS H.L. Classification of histamine receptors. *Pharmacol. Review*.
49: 253-270, 1997.

HIRASAWA N., WATANABE M., MUE S., TSURUFUJI S., OHUCHI
K. Downward regulation of neutrophil infiltration by endogenous
histamine without affecting vascular permeability responses in air-
pouch-type carrageenin inflammation in rats. *Inflammation*. 15:117-
26, 1991.

HOLETS VR., HÖKFELT T., RÖKAEUS A., TERENIUS L.,
GOLDSTEIN M. Locus coeruleus neurons in the rat containing
neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase or galanin and their efferent
projections to the spinal cord, cerebral cortex and hypothalamus.
Neuroscience. 24:893-906, 1988.

HÖKFELT T., BRUMOVSKY P., SHI T., PEDRAZZINI T., VILLAR M.
NPY and pain as seen from the histochemical side. *Peptides*. 28:
365-72, 2007.

HONG Y., ABBOTT FV. Peripheral opioid modulation of pain and
inflammation in the formalin test. *Eur J Pharmacol*, 277:21-8, 1995.

HORIGOME K., PRYOR JC., BULLOCK ED., JOHNSON EM.
Mediator release from mast cells by nerve growth factor.
Neurotrophin specificity and receptor mediator. *J Biol Chem* 268:
148881-7, 1993.

HUNSKAAR S., FASMER OB., HOLE K. Formalin test in mice, a
useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci
Methods*. 14:69-76, 1985.

IKOMA A., RUKWIED R., STÄNDER S., STEINHOFF M., MIYACHI Y., SCHMELZ M. Neurophysiology of pruritus: interaction of itch and pain. *Arch Dermatol.* 139:1475-8, 2003.

IKOMA A., STEINHOFF M., STÄNDER S., YOSIPOVITCH G., SCHMELZ M. The neurobiology of itch. *Nat. Rev. Neurosci.* 7:535-47, 2006.

JANES J., McDONALD JR. Mast cells: their distribution in various human tissues. *Arch Pathol*;45:622-634, 1948.

JAYSON MI., ST DIXON AJ. Intra-articular pressure in rheumatoid arthritis of the knee. I. Pressure changes during passive joint distension. *Ann Rheum Dis*, 29:261-265, 1970.

JI RR., ZHANG X., WIESENFELD-HALLIN Z., HOKFELT T. Expression of neuropeptide Y and neuropeptide Y (Y1) receptor mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia following peripheral tissue inflammation. *J Neurosci.* 14:6423-6434, 1994.

KANEKO M., HAMMOND L. Role of spinal gamma-aminobutyric acid receptors in formalin-induced nociception in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 282:928-38, 1997.

KASHIBA H., FUKUI H., MORIKAWA Y., SENBA E. Gene expression of histamine H1 receptor in guinea pig primary sensory neurons: a relationship between H1 receptor mRNA-expressing neurons and peptidergic neurons. *Mol. Brain Res.* 66: 24-34, 1999.

KASHIBA H., FUKUI H., SENBA E. Histamine H1 receptor mRNA is expressed in capsaicin-insensitive sensory neurons with neuropeptide Y-immunoreactivity in guinea pigs. *Brain Res.* 1-2: 85-93, 2001.

KEAN WF., BUCHANAN WW. The use of NSAIDs in rheumatic disorders 2005: a global perspective. *Inflammopharmacology*, 13: 343-370, 2005.

KESSLER W., KIRCHHOFF C., REEH P.W., HANDWERKER H. O. Excitation of cutaneous afferent nerve endings in vitro by a

combination of inflammatory mediators and conditioning effect of substance P. *Exp. Brain. Res.* 91:467–476, 1992.

KOHN NN., HUGHES RE., McCARTY DJ. Jr., FAIRES JS. The significance of calcium phosphate crystals in the synovial fluid of arthritic patients: the pseudogout syndrome. II. Identification of crystals. *Ann Intern Med*, 56:738-45, 1962.

KOLTZENBURG M., KRESS M., REHH PW. The nociceptor sensitization by bradykinin does not depend on sympathetic neurones. *Neuroscience* 46: 465-473, 1992.

KURASHI Y., NAGASAWA T., HAYASHI K., SATOH M. Scratching behaviour induced by pruritogenic but not algesciogenic agents in mice. *Europ. J. Pharmacol.* 275: 229-233, 1995.

KUMAZAWA T., MIZUMURA K. Temperature dependency of the chemical responses of the polymodal receptors units *in vitro* *Brain Res.* 278: 305-307, 1983.

KUSHNIR-SUKHOV NM., BROWN JM., WU Y., KIRSHENBAUM A., METCALFE DD. Human mast cells are capable of serotonin syntheses and release. *J. Allergy Clin Immunol*, 119:498-9, 2007.

LAING I., TODD AJ., HEIZMANN CW., SCHMIDT HH. Subpopulations of GABAergic neurons in laminae I-III of rat spinal dorsal horn defined by coexistence with classical transmitters, peptides, nitric oxide synthase or parvalbumin. *Neuroscience* 61:123–132, 1994.

LAMOTTE RH., SHIMADA SG., SIKAND P. Mouse models of acute, chemical itch and pain in humans. *Experimental Dermatology*, 20: 778–782, 2011.

LANGFORD LA. Unmyelinated axon ratios in cat motor, cutaneous and articular nerves. *Neurosci Lett*, 40;19-22, 1983.

LANGFORD LA., SCHMIDT RF. Afferent and efferent axons in the medial and posterior articular nerves of the cat. *Anat Rec*, 206:71-78, 1983.

LEHTOSALO J.I., UUSITALO H., LAAKSO J., PALKAMA A., HARKONEN M. Biochemical and immunohistochemical determination of 5-hydroxytryptamine located in mast cells in the trigeminal ganglion of the rat and guinea pig. *Histochemistry* 80: 219-223, 1984.

LEVICK JR. An investigation into the validity of subatmospheric pressure recordings from synovial fluid and their dependence on joint angle. *J Physiol.* 289:55-67, 1979.

LIGHT AR., KAVOOKJIAN AM. Morphology and ultrastructure of physiologically identified substantia gelatinosa (lamina II) neurons with axons that terminate in deeper dorsal horn laminae (III-V). *J. Comp. Neurol.* 267: 172-189, 1988.

LOESER JD., TREEDE RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, 137:473-477, 2008.

MANTYH PW. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *J Clin Psychiatry.* 11:6-10, 2002.

MANTYH PW., ALLEN CJ., GHILARDI JR., ROGERS SD., MANTYH CR., LIU H., BASBAUM AI., VIGNA SR., MAGGIO JE. Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: substance P evoked internalization of its receptor in the rat striatum in vivo. *Proc Natl Acad Sci, U S A.* 92:2622-6, 1995.

MALMBERG-AIELLO P., LAMBERTI C., IPPONI A., BARTOLINI A., SCHUNACK W. Evidence for hypernociception induction following histamine H1 receptor activation in rodents. *Life Sci.* 63: 463-76, 1998.

MARTINS MA., BASTOS LC., TONUSSI CR. Formalin injection into knee joint of rats: Pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. *The journal of pain.* 7:100-107, 2006.

McDOUGALL JJ., BRAY RC., SHARKEY KA. A morphological and immunohistochemical examination of nerves in normal and injured collateral ligaments of rat, rabbit and human knee joints. *Anat Rec*, 248:29-39, 1997.

McDOUGALL JJ. Arthritis and pain: Neurogenic origins of joint pain. *Arthritis Res Ther*, 8:220, 2006.

McNEIL HP., GOTIS-GRAHAM I. Human mast cell subsets – distinct functions in inflammation? *Inflamm Res.*; 49:3–7, 2000.

McQUEEN DS. Inflammatory pain and the joint. In *Pain and Neurogenic Inflammation*. Edited by Brain SD, Moore PK. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag; 137-166, 1999.

MESTRE C., PÉLISSER T., FIALIP J., WILCOX G., ESCHALIER A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol Toxicol Methods* 32: 197-200, 1994.

MILLAN MJ. The induction of pain: an integrative review *Progress in Neurobiology* Vol. 57, pp. 1 to 164, 1999.

MIYAKAWA A, FURUE H, KATAFUCHI T, JIANG N, YASAKA T, KATO G, YOSHIMURA M. Action of neuropeptide Y on nociceptive transmission in substantia gelatinosa of the adult rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 134:595–604, 2005.

MOBARAKEH JI., SAKURADA S., KATSUYAMA S., KUTSUWA M., KURAMASU A., LIN ZY., WATANABE T., HASHIMOTO Y., YANAI K. Role of histamine H(1) receptor in pain perception: a study of the receptor gene knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* 391, 81-89, 2000.

MOBARAKEH JI., SAKURADA S., HAYASHI T., ORITO T., OKUYAMA K., SAKURADA T., KURAMASU A., WATANABE T., YANAI K. Enhanced antinociception by intrathecally-administered morphine in histamine H1 receptor gene knockout mice. *Neuropharmacology.* 42:1079-1088, 2002.

MORAN TD., COLMERS WF., SMITH PA. Opioid-like actions of neuropeptide Y in rat substantia gelatinosa: Y1 suppression of inhibition and Y2 suppression of excitation. *J Neurophysiol* 92: 3266–3275, 2004.

MUNGLANI R., HUDSPITH MJ., HUNT SP. The therapeutic potential of neuropeptide Y. *Drugs* 52: 371-389, 1996.

NAVEILHAN P., HASSANI H., LUCAS G., BLAKEMAN KH., HAO JX., XU XJ., WIESENFELD-HALLIN Z., THOREN P., ERNFORS P. Reduced antinociception and plasma extravasation in mice lacking a neuropeptide Y receptor. *Nature* 409:513–517, 2001.

NICOLSON TA., BEAVEN S., RICHARD CD. Characterisation of the calcium responses to histamine in capsaicin-sensitive and capsaicin-insensitive sensory neurons *Neuroscience* 110:329-338, 2002.

NIELSEN PN., SKOV PS., POULSEN LK., SCHMELZ M., PETERSEN LJ. Cetirizine inhibits skin reactions but not mediator release in immediate and developing late-phase allergic cutaneous reactions. A double-blind, placebo-controlled study *Clin Exp Allergy*. 31:1378-84, 2001.

NIGROVIC PA., LEE DM. Mast cells in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*; 7:1-11, 2004.

NILSSON HJ., LEVINSSON A., SCHOUENBORG J. Cutaneous field stimulation (CFS): a new powerful method to combat itch. *Pain*. 71:49-55, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 919:1-201-218, 2003.

PAALZOW GH., PAALZOW LK. Promethazine both facilitates and inhibits nociception in rats: effect of the testing procedure. *Psychopharmacology*. 85: 31-36, 1985.

PARADA CA., TAMBELI CH., CUNHA FQ., FERREIRA SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neurosci*. 102: 937-944, 2001.

PIETRUCK C., GROND S., XIE GX, PALMER PP. Local anesthetics differentially inhibit sympathetic neuron-mediated and C fiber-mediated synovial neurogenic plasma extravasation. *Anesth Analg*, 96:1397-402, 2003.

PIRCIO AW., FEDELE CT., BIERWAGEN ME. A new method for evaluation of analgesic activity using adjuvant-induced arthritis in the rat. *Eur J Pharmacol*, 31:207-15, 1975.

POLGÁRE., SARDELLA TCP., WATANABE M., TODD AJ. Quantitative Study of NPY-Expressing GABAergic neurons and axons in rat spinal dorsal horn. *The Journal of Comparative Neurology* 519:1007–1023, 2010.

POLGÁR E., SHEBAB AS, WATT C, TODD AJ. GABAergic neurons that contain neuropeptide y selectively target cells with the neurokinin 1 receptor in laminae III and IV of the rat spinal cord. *J. Neurosci* 19: 2637-2646, 1999

RAFFA RB. Antihistamines as analgesics. *J. Clin Pharm Ther.* 26:81-5, 2001.

REEH PW. Sensory receptors in mammalian skin in an *in vitro* preparation. *Neurosci. Lett.* 66: 141-146, 1986.

REEVES B. Negative pressures in knee joints. *Nature*, 212-1046, 1966.

REXED B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *The journal of comparative neurology*, 96: 414-495, 1952.

RINGVALL M., RÖNNBERG E., WERNERSSON S., DUELLI A., HENNINGSSON F., ABRINK M. GARCÍA-FAROLDI G., FAJARDO I., PEJLER G. Serotonin and histamine storage in mast cell secretory granules is dependent on serglycin proteoglycan. *J Allergy Clin Immunol.* 6:218-30, 2006.

RODDY DR., YAKSH TL., AIMONE D LISA., GO VLW. Distribution of neuropeptide Y in the spinal cords of cat, dog, rat, man and pig. *Regulatory Peptides* 29: 81-92, 1990.

ROSENTHAL SR., MINARD D. Experiments on histamine as the chemical mediator for cutaneous pain. *J. Exp. Med.* 70:415-425, 1939.

RUDA MA., BENNETT GJ., DUBNER R. Neurochemistry and neural circuitry in the dorsal horn. Prog. Brain Res. 66: 219-268. 1986.

RUMORE MM., SCHLICHTING DA. Analgesic effects of antihistaminics. Life Sci. 5:403-416, 1985.

SCHAIBLE HG., SCHMIDT RF. Activation of groups III and IV sensory units in medial articular nerve by local mechanical stimulation of knee joint. J Neurophysiol, 49:35-44, 1983.

SCHAIBLE HG., SCHMIDT RF. Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. J Neurophysiol 54:1109-1122, 1985.

SCHAIBLE HG. Basic mechanisms of deep somatic pain. Text book of pain, 5th edition. Elsevier, 2006.

SCHAIBLE HG. Neuronal mechanisms of joint pain. Current topics in pain: 12th world congress on pain. Seattle: IASP Press, 2009.

SCHMELZ M. Specific C – receptors for itch in human skin. Journal of Neuroscience 17:8003-8008, 1997.

SCHMELZ M. Chemical response pattern of different classes of C nociceptors to pruritogens and algogens. Journal of Neurophysiology 89: 2441-2448, 2003.

SCHMELZ M., HANDWERKER HO. Itch – Text book of pain 5th Edition Ed. Stephen McMahon and Martin Koltzenburg Chapter 13: p 219. 2006.

SCHUELERT N., McDOUGALL JJ. Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptores in the knee joint of the rat. Neurosci Lett, 465:184-8, 2009.

SEYBOLD VS., MCCARSON KE., MERMELSTEIN PG., GROTH RD., ABRAHAMS LG. Calcitonin gene-related peptide regulates expression of neurokinin1 receptors by rat spinal neurons. J Neurosci. 23:1816-24, 2003.

SHIBATA M., OHKUBO T., TAKAHASHI H., INOKI R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38:347-52, 1989.

SHIMADA SG., LAMOTTE RH. Behavioral differentiation between itch and pain in mouse *Pain*. 3: 681-687. 2008.

SHIN K., GURISH MF., FRIEND DS., PEMBERTON AD., THORNTON EM., MILLER HR., LEE DM. Lymphocyte-independent connective tissue mast cells populate murine synovium. *Arthritis Rheum*; 54: 2863–2871, 2006.

SHI TJ., LI J., DAHLSTROM A., THEODORSSON E., CECCATELLI S., DECOSTERD I., PEDRAZZINI T., HOKFELT T. Deletion of the neuropeptide Y Y1 receptor affects pain sensitivity, neuropeptide transport and expression, and dorsal root ganglion neuron numbers. *Neuroscience* 140:293–304, 2006.

SIEGLE I., KLEIN T., BACKMAN JT., SAAL JG., NUSING RM., FRITZ P. Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases. *Arthritis Rheum* 41:122-129, 1998.

SMITH PA., MORAN TD., ABDULLA F., TUMBER KK., TAYLOR BK. Spinal mechanisms of NPY analgesia. *Peptides*. 28:464-74, 2007.

SMITH WL., GARAVITO RM., DEWITT DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*. 271:33157-33160, 1996.

SOLL AH., LEWIN KJ., BEAVEN MA. Isolation of histamine containing cells from rat gastric mucosa: biochemical and morphological differences from mast cells. *Gastroenterology* 80: 717-727, 1981.

SOLWAYA B., SOMA CB., GREGORY C., RENEE RD., BRADLEY KT. Tonic inhibition of chronic pain by neuropeptide Y. *PNAS* 17: 7224-7229, 2011.

SOMMER, C. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. *Mol neurobiol*. 30:117-25, 2004.

- SOUZA-SILVA E. Efeito hiponociceptivo da histamina articular. Dissertação de mestrado. Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2009.
- SOUZA-SILVA E., DE OLIVEIRA DT., ETO C., STEIN T., TONUSSI CR. Histamine produces opposing effects to serotonin in the knee joint of rats. *The J. Pain*. In Press, 2013.
- STÄNDER S., STEINHOFF M., SCHMELZ M., WEISSHAAR E., METZE D., LUGER T. Neurophysiology of pruritus: cutaneous elicitation of itch. *Arch. of Dermatol.* 11: 1463-1470, 2003.
- STEELE RH., WILHELM DL. The inflammatory reaction in chemical injury. I. Increased vascular permeability and erythema induced by various chemicals. *Br J Exp Pathol.*47:612-23, 1966.
- SVED AF., CANO G., PASSERIN AM., RABIN BS. The locus coeruleus, Barrington's nucleus, and neural circuits of stress. *Physiol Behav.*77:737-42, 2002.
- SZABADI E. Modulation of physiological reflexes by pain: role of the locus coeruleus. *Front Integr Neurosci.* 6:94. Epub 2012.
- TATEMOTO, K. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 5485–5489, 1982.
- TAIWO OB., TAYLOR BK. Antihyperalgesic effects of intrathecal neuropeptide Y during inflammation are mediated by Y1 receptors. *Pain* 96:353–363, 2002.
- TAYLOR BK., PETERSON MA., BASBAUM AI. Persistent cardiovascular and behavior nociceptive response to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *J Neurosci*, 15:7575-84, 1995.
- TAYLOR EL., SELLON DC., WARDROP KJ., HINES MT., KINGSTON JK. Effects of intravenous administration of formaldehyde on platelet and coagulation variables in healthy horses. *Am J vet Res*, 61: 1191-6, 2000.

TEIXEIRA MJ., YENG LT., KAZIYAMA HHS. Dor – Síndrome dolorosa miofascial e dor músculo-esquelética. São Paulo: Roca, 2006.

THEOHARIDES TC., KEMPURAJ D., SANT GR. Mast cell involvement in interstitial cystitis: a review of human and experimental evidence. *Urology* 57: 47–55, 2001.

TING E., ROVERONI RC., FERRARI LF., LOTUFO CM., VEIGA MC., PARADA CA., TAMBELI CH. Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. *Life Sci.* 9:765-71, 2007.

TJOLSEN A., BERGE OG., HUNSKAAR S., ROSLAND JH., HOLE K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51:5-17, 1992.

TODD AJ., HUGHES DI., POLGÁR E., NAGY GG., MACKIE M., OTTERSEN OP., MAXWELL DJ. The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *Eur J Neurosci* 17:13–27, 2003.

TODD AJ, MCGILL MM, SHEHAB SA. Neurokinin 1 receptor expression by neurons in laminae I, III and IV of the rat spinal dorsal horn that project to the brainstem. *Eur J Neurosci* 12:689–700, 2000.

TODD AJ., SPIKE RC. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog. Neurobiol.* 41: 609- 646. 1993.

TONUSSI CR., FERREIRA SH. Rat knee-joint carrageenan incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain* 48: 421-427, 1992.

VALENTINO RJ., FOOTE SL., PAGE ME. The locus coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Ann N Y Acad Sci.* 697:173-88, 1993.

VAN ARMAN CG., CARLSON RP., RISLEY EA., THOMAS RH., NUSS GW. Inhibitory effects of indomethacin, aspirin and certain other drugs on inflammations induced in rat and dog by carrageenan, sodium urate and ellagic acid. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 175:459-68, 1970.

VERBSKY JW., MCALLISTER PK., MALONE DG. Mast cell activation in human synovium explants by calcium ionophore A23187, compound 48/80, and rabbit IgG anti-human IgE, but not morphine sulfate. *Inflamm Res.* 45: 35–41, 1996.

WANG CC., WILLIS WD., WESTLUND KN. Ascending projections from the area around the spinal cord central canal: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in rats. *J Comp Neurol.* 415:341-67, 1999.

WARD L., WRIGTH E., MCMAHON SBA. Comparasion of the effects of noxious and innocuous counter stimuli on experimentally induced itch and pain. *Pain* 64:129-138, 1996.

WESTLUND KN., SORKIN LS., FERRINGTON DR., CARLTON SM., WILLCOCKSON HH., WILLIS WD. Serotonergic and noradrenergic projections to the ventral posterolateral nucleus of monkey thalamus. *J. Comp. Neurol.*, 295: 197-207, 1990.

WILEY RG., LAPPI DA. Suicide transport and immunolesioning. Austin, TX: R.G. Landes Co. Molecular Biology Intelligence Unit., 1994.

WILEY RG., LEMONS LL., IV KLINE KH. Neuropeptide Y receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nocifensive reflex responses to heat and formalin. *Neuroscience* 161: 139–147, 2009.

WILLIS WD., COGGESHALL RE. Sensory mechanisms of the spinal cord. 2nd edn. p. 595. Plenum Press, New York. 1992.

WHEELER-ACETO H., COWAN A. Neurogenic and tissue-mediated components of formalin-induced edema: evidence for supraspinal regulation. *Agents Act*, 34:264-9, 1991.

XU IS., HAO JX, XU XJ, HOKFELT T, WIESENFELD-HALLIN Z. The effect of intrathecal selective agonists of Y1 and Y2 neuropeptide Y receptors on the flexor reflex in normal and axotomized rats. *Brain Res.* 833:251–7, 1999.

YAKSH T., TYCE G. Microinjections of morphine into the periaqueductal gray evokes the release of serotonin from spinal cord. *Brain Res.*171: 176-181, 1979.

YOSHIDA A., MOBARAKEH J.I., SAKURAI E., SAKURADA S., ORITO T., KURAMASU A., KATO M., YANAI K. Intrathecally-administered histamine facilitates nociception through tachykinin nk1 and histamine h1 receptors: a study in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* 522: 55-62, 2005.

ZHAO W., OSKERITZIAN CA., POZEZ AL., SCHWARTZ LB. Cytokine production by skin-derived mast cells: endogenous proteases are responsible for degradation of cytokines. *J Immunol* 2005;175:2635–2642, 2005.

ZHANG X., TONG YG., BAO L., HÖKFELT T. The neuropeptide Y Y1 receptor is a somatic receptor on dorsal root ganglion neurons and a postsynaptic receptor on somatostatin dorsal horn neurons. *Eur J Neurosci.* 11:2211–2225, 1999.

7- ANEXOS

7.1- ARTIGOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS A TESE

7.1.1 - Pharmacological antagonism of spinal Y1 receptors or its ablation by npy-saporin conjugate prevented the antinociceptive effect of h1 receptor agonist injection in the rat knee-joint. Pain. Article submitted, 2013.

Eduardo Souza-Silva, Taciane Stein, Lucas Zanon Mascarin, Maira Assunção Bicca, Carlos Rogério Tonussi

Abstract:

Low dose injections of histamine or an H1R agonist into of knee-joint decreased articular nociception induced by formalin in rats. There is evidence that H1R is expressed in a subtype of peptidergic fine afferent which also contains neuropeptide Y (NPY) in DRG of guinea-pigs. NPY plays an antinociceptive role in spinal cord. Thus, in this study we tested the hypothesis that spinal cord Y1R could be mediating the hyponociceptive effect of the knee-joint H1R activation. Articular incapacitation, after intra-articular 1.5% formalin injection, was measured by counting the paw elevation time (PET; s) during a 1 min period of stimulated walk every 5 min for 60 min. The Y1R agonist Leu³¹ Pro³⁴-NPY (0.07; 0.7; and 7 µmol/i.t) and Y1R antagonist BIBO 3304 (0.4; and 4 µmol/i.t) were administered 20 min before formalin injection. Either NPY-saporin or blank-saporin conjugates (750 ng/i.t.) were administered 14 days prior to the experiment. The H1R agonist 2-PEA (5 nmol/i.a.) was co-injected with formalin. The Y1R agonist decreased and the antagonist increased the nocifensive response induced by formalin. The H1R agonist inhibited incapacitation, and such effect was reversed by i.t. administration of a sub-effective dose of Y1R antagonist. NPY-saporin (750 ng/i.t.) decreased spinal Y1R expression and prevented the antinociceptive effect of 2-PEA. These results support the notion that the spinal release of NPY by acting in Y1R mediates the hyponociceptive effect of intra-articular H1 receptor activation.

Keywords: articular pain, H1 receptor, neuropeptide Y, formalin test, spinal cord

7.1.2 – Histamine produces opposing effects to serotonin in the knee joint of rats. The Journal of Pain, article in press 2013.