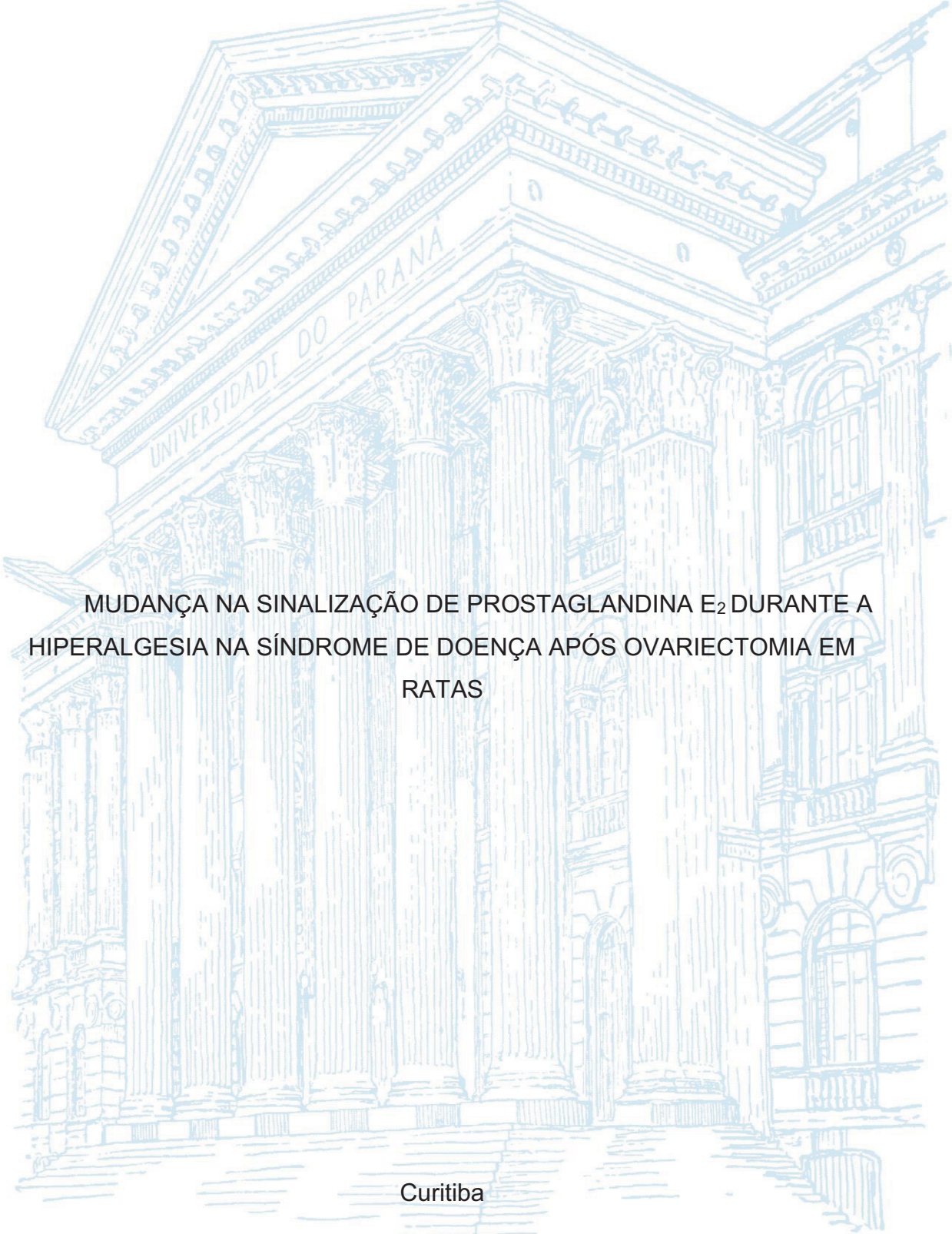


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELLA KAROLINE MABA



MUDANÇA NA SINALIZAÇÃO DE PROSTAGLANDINA E₂ DURANTE A
HIPERALGESIA NA SÍNDROME DE DOENÇA APÓS OVARIECTOMIA EM
RATAS

Curitiba

2018

ISABELLA KAROLINE MABA

MUDANÇA NA SINALIZAÇÃO DE PROSTAGLANDINA E₂ DURANTE A
HIPERALGESIA NA SÍNDROME DE DOENÇA APÓS OVARIECTOMIA EM
RATAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio

Curitiba

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Maba, Isabella Karoline

Mudança na sinalização de prostaglandina E₂ durante a hiperalgesia na
síndrome de doença após ovariectomia em ratas. / Isabella Karoline
Maba. – Curitiba, 2018.

69 p.: il.

Orientador: Aleksander Roberto Zamprônio

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Hiperalgesia 2. Prostaglandinas 3. Proteínas quinases I. Título II.
Zamprônio, Aleksander Roberto III. Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 612.88



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ISABELLA KAROLINE MABA** intitulada: **MUDANÇA NA SINALIZAÇÃO DE PROSTAGLANDINA E2 DURANTE A HIPERALGESIA NA SÍNDROME DE DOENÇA APÓS OVARIETOMIA EM RATAS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 20 de Dezembro de 2018.

ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRONIO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

CARINA FERNANDA MATTEDI NONES
Avaliador Externo (UFPR)

ALEXANDRA ACCO
Avaliador Interno (UFPR)

*O medo cega... são palavras certas, já
éramos cegos no momento em que cegamos,
o medo nos cegou, o medo nos fará
continuar cegos.*

*José Saramago, em Ensaio Sobre a
Cegueira*

Agradecimentos

À Deus, peço perdão pela pressa quando vou conversar Contigo e agradeço por nunca me sentir sozinha, pois tenho a Ti.

Aos meus pais, por serem toda essa garra, toda essa força, toda essa fortaleza, todo esse amor. A vocês, devo minha vida. Amo vocês.

Às minhas irmãs, Fernanda e Geovanna, que sempre foram o que de melhor carregou em mim, espelhos da minha herança.

Às minhas sobrinhas amadas, Júlia e Cecília, por serem meus pedacinhos de amor e a alegria dos nossos dias.

Ao Cristiano, pela paciência, amor, compreensão, incentivo e conselhos. A você, todos os meus dias.

À minha família, minha fortaleza onde sempre encontro amparo. Não posso citar todos aqui porém cada um sabe do valor que tem pra mim. Obrigada por existir!

Aos meus amigos, poucos porém valiosíssimos.

À Juliana Varella, Ju, Juju, a melhor pessoa desse laboratório! Obrigada por ser uma ouvinte sensacional, uma amiga maravilhosa e a melhor parceira de mestrado que eu poderia pedir. Sem você essa dissertação não aconteceria. Obrigada!

À Mariane e ao Luis, como bons veteranos me ensinaram muitas coisas que com certeza não aprenderia sozinha, tanto na vida pessoal quanto acadêmica. E também à Letícia, por ser essa pessoa consciente, sensata e com uma visão de mundo que vai muito além da vida acadêmica! Obrigada pelas tardes infinitas de cirurgias, sem sua ajuda seria bem mais difícil! Gratidão!

Ao meu orientador Aleksander Zampronio, cientista brilhante, professor como poucos até hoje vi. Obrigada por ter sido o primeiro a acreditar em mim como estudante, e por não ter desistido mesmo em meio a tantos dramas. Muito obrigada!

À todos do Laboratório de Inflamação e Febre, obrigada!

À banca, por contribuir com este trabalho, obrigada!

À UFPR, da qual sou filha e me orgulho por isso.

Aos funcionários desta Universidade, pela dedicação e carinho.

Ao CNPq e à Capes, pelo auxílio financeiro.

Lista de Siglas e Abreviaturas

AINE- Anti-inflamatório não-esteroidal

ATP- Adenosina Trifosfato

AMPc- Monofosfato Cíclico de Adenosina

COX-1- Ciclooxygenase 1

COX-2- Ciclooxygenase 2

DAG- Diacilglicerol

DE- Diestro

Epac- Proteína Trocadora Ativada por AMPc

EPR- Receptor de Prostaglandina E

ESI-09- Inibidor específico de Epac- 09

H-89-(N-[2-[[3-(4-bromofenil)-2-propeno-1-il]amino]etil]-5-isoquinolinasulfonamida)

IASP- Associação Internacional Para o Estudo da Dor

I.c.v.- Intracerebroventricular

IL-6 – Interleucina 6

IL-1 β - Interleucina- 1 β

I.p.- Intraperitoneal

IP₃- Trifosfato de inositol

IRAK1- quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1

LPS- Lipopolissacarídeo

MYD88- Fator de diferenciação mieloide 88

OVX- ovariectomizada

PAG- Substância Cinzenta Periaquedutal

PAMPs- Padrões moleculares associados a patógeno

PE- Proestro

PGE₂- Prostaglandina E₂

PGH₂- Prostaglandina H₂

cPGES- PGE sintase citosólica

mPGES-1 – PGE sintase microsomal 1

mPGES-2 – PGE sintase microsomal 2

PKA- Proteína Quinase A

PKC- Proteína Quinase C

RANKL- Ligante do receptor ativador do NF- κ B

RVM- Bulbo Rostroventromedial

SNC- Sistema Nervoso Central

TLR4- Receptor do tipo *Toll* 4

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TRAF6- fator 6 associado ao receptor de TNF

TRPV1- Receptor de Potencial Transitório Vaniloide 1

Lista de Figuras

FIGURA 1: Aspecto microscópico das fases do ciclo estral de roedores.....	27
FIGURA 2: Linha do tempo para o primeiro conjunto de experimentos.....	30
FIGURA 3: Linha do tempo para o segundo conjunto de experimentos.....	30
FIGURA 4: Linha do tempo para o terceiro conjunto de experimentos.....	31
FIGURA 5: Linha do tempo para o quarto conjunto de experimentos.....	32
FIGURA 6: Mudança no peso corporal, limiar mecânico basal e latência basal na placa aquecida de ratas falso-operadas em PE e DE e ratas OVX.....	34
FIGURA 7: Hiperalgisia mecânica e térmica induzida por injeção intraperitoneal de LPS em ratas falso-operadas e OVX.....	37
FIGURA 8: Hiperalgisia mecânica e térmica induzida por i.c.v. injeção de PGE ₂ em ratas falso-operadas e OVX.....	39
FIGURA 9: Efeito do inibidor de PKA, H-89, na hiperalgisia mecânica e térmica induzida por PGE ₂ em ratas falso-operadas e OVX.....	41
FIGURA 10: Efeito do inibidor de EPAC, ESI-09, na hiperalgisia mecânica e térmica induzida por PGE ₂ em ratas falso-operadas e OVX.....	43
FIGURA 11: Efeito do inibidor de PKA, H-89, na hiperalgisia mecânica e térmica induzida por LPS em ratas falso-operadas e OVX.....	45
FIGURA 12: Efeito do inibidor de Epac, ESI-09, na hiperalgisia mecânica e térmica induzida por LPS em ratas falso-operadas e OVX.....	47
FIGURA 13: Resumo dos achados deste estudo.....	58

RESUMO

A síndrome de doença é uma resposta adaptativa caracterizada por um grupo de sinais e sintomas que incluem febre e hiperalgesia generalizada, além de outras alterações comportamentais, autonômicas e endócrinas que permitem que o hospedeiro tente eliminar infecções. Embora a resposta febril seja uma resposta bem estudada, os mecanismos envolvidos na hiperalgesia observada durante a síndrome de doença são pouco compreendidos. Ainda, o dimorfismo sexual na dor é bem conhecido, embora as diferenças relacionadas ao sexo na hiperalgesia observada durante a síndrome de doença não tenham sido ainda bem exploradas. Este estudo teve como objetivo investigar a hiperalgesia durante a síndrome de doença em ratas e possíveis diferenças relacionadas às flutuações dos hormônios sexuais femininos. Foram utilizados ratos Wistar fêmeas, falso-operadas e ovariectomizadas (OVX). A hiperalgesia mecânica e térmica foi avaliada nos mesmos animais, três semanas após a cirurgia de ovariectomia ou sham, utilizando um analgesímetro eletrônico na pata traseira direita e placa aquecida para avaliar comportamento nocifensivo, respectivamente. A hiperalgesia foi induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de lipopolissacarídeo (LPS) ou por prostaglandina E₂ (PGE₂) intracerebroventricular (i.c.v.) e o limiar mecânico ou o tempo de latência na placa aquecida foi avaliado após a injeção de LPS ou PGE₂. Não foram encontradas diferenças nos limiares mecânico e térmico basal entre animais falso-operados, nas fases diestro ou proestro do ciclo estral e nos animais OVX. Da mesma maneira, não se observou diferença entre a hiperalgesia térmica ou mecânica produzida pela injeção i.p. de LPS em ratos OVX e falso-operados. No entanto, enquanto a injeção i.c.v. de PGE₂ produziu uma hiperalgesia mecânica rápida (30 min) e intensa em ratas falso-operadas, a resposta em animais OVX se estabeleceu mais lentamente (60-90 min). Resultados semelhantes foram observados na hiperalgesia térmica. As ratas foram então tratadas com o inibidor de proteína quinase A (PKA), H-89 ou com inibidor de proteína trocadora ativada por AMPc (Epac), ESI-09 ou os respectivos veículos, por via i.c.v. 15 min antes da injeção de PGE₂ ou LPS. O tratamento com H-89 reduziu a hiperalgesia térmica e mecânica induzida por PGE₂ e LPS em animais OVX, embora não tenha sido observado qualquer efeito em animais falso-operados. De modo oposto, o tratamento de animais falso-operados com ESI-09, reduziu tanto a hiperalgesia térmica quanto mecânica induzida por PGE₂ e LPS, enquanto nenhum efeito foi observado em animais OVX. Estes resultados sugerem que a hiperalgesia induzida por LPS, observada durante a síndrome de doença tem diferentes mecanismos de sinalização, particularmente relacionados à PGE₂, em animais falso-operados e OVX. Enquanto em fêmeas com ciclo estral preservado há uma resposta mediada pela ativação da via de sinalização AMPc-Epac, a hiperalgesia induzida pela injeção de LPS ou PGE₂ em ratas OVX ativa a via de sinalização de AMPc-PKA. O conhecimento destas vias de sinalização em fêmeas em diferentes fases hormonais pode contribuir para terapêuticas diferenciadas em cada fase.

Palavras-chave: hiperalgesia, prostaglandina, proteína quinase A, Epac.

ABSTRACT

The sickness syndrome is an adaptive response characterized by a group of signs and symptoms that include fever and generalized hyperalgesia, as well as other behavioral, autonomic and endocrine changes that allow the host to eliminate infections. Although the febrile response is a well-studied response, the mechanisms involved in the hyperalgesia observed during the sickness syndrome are poorly understood. Furthermore, sexual dimorphism in pain is well known, although the sex-related differences in hyperalgesia observed during the sickness syndrome have not yet been well explored. This study aims to investigate hyperalgesia during the sickness syndrome in rats and possible differences related to fluctuations in female sex hormones. Female, sham-operated and ovariectomized Wistar rats (OVX) were used. The mechanical and thermal hyperalgesia was evaluated in the same animals using an electronic analgesimeter in the right hind paw and hot plate apparatus to evaluate nocifensive behavior, respectively. Hyperalgesia was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of lipopolysaccharide (LPS) or by intracerebroventricular (i.c.v.) prostaglandin E₂ (PGE₂) and the mechanical threshold or the time of latency on the hot plate was evaluated after the injection of LPS or PGE₂. No differences were found in baseline mechanical and thermal thresholds between sham-operated animals, in the diestrus or proestrus phases of the estrous cycle and in OVX animals. Likewise, no difference was observed between the thermal or mechanical hyperalgesia produced by the i.p. of LPS in OVX and sham-operated rats. However, while the i.c.v. injection of PGE₂ produced rapid (30 min) and intense mechanical hyperalgesia in sham-operated rats, the response in OVX animals was established later (60-90 min). Similar results were observed in thermal hyperalgesia. The rats were then treated with the protein kinase A (PKA) inhibitor, H-89 or with cAMP activated exchange protein inhibitor (Epac), ESI-09 or the respective vehicles, by i.c.v. route 15 min before injection of PGE₂ or LPS. Treatment with the PKA inhibitor, H-89 reduced thermal and mechanical hyperalgesia induced by PGE₂ and LPS in OVX animals, although no effect was observed in sham-operated animals. Oppositely, the treatment of sham-operated animals with the Epac ESI-09 inhibitor reduced both thermal and mechanical hyperalgesia induced by PGE₂ and LPS, whereas no effect was observed in OVX animals. These results suggest that the LPS-induced hyperalgesia observed during the sickness syndrome has different signaling mechanisms, particularly related to PGE₂, in sham-operated and OVX animals. While in rats with preserved estrous cycle there is a response mediated by the activation of the cAMP-Epac signaling pathway, the hyperalgesia induced by the injection of LPS or PGE₂ in OVX rats activates the cAMP-PKA signaling pathway. The knowledge of these signaling pathways in rats in different hormonal phases can contribute to differentiated therapies in each phase.

Key words: sickness syndrome hyperalgesia, prostaglandin, protein kinase A, Epac

SUMÁRIO

1 Introdução	11
2 Objetivos	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3 Material e métodos	24
3.1 Animais.....	24
3.2 Drogas.....	24
3.3 Esterilização.....	25
3.4 Ovariectomia.....	25
3.5 Avaliação do ciclo estral.....	26
3.6 Implante de cânula no ventrículo lateral.....	27
3.7 Hiperalgisia mecânica.....	28
3.8 Hiperalgisia térmica.....	29
3.9 Delineamento experimental.....	29
3.10 Análise estatística.....	32
4 Resultados	33
4.1 Ganho de peso, limiar mecânico basal e latência basal na placa aquecida de animais falso-operados em DE e PE e OVX.....	33
4.2 Efeito da injeção intraperitoneal de LPS na hiperalgisia mecânica de animais falso-operadas OVX.....	35
4.3 Efeito da injeção intraperitoneal de LPS na hiperalgisia térmica em ratas falso-operadas e OVX.....	35

4.4 Efeito da injeção intracerebroventricular de PGE ₂ na hiperalgesia mecânica e térmica em ratas falso- operadas e OVX.....	38
4.5 Efeito do H-89, inibidor da PKA, na hiperalgesia induzida por PGE ₂	39
4.6 Efeito do ESI-09, inibidor Epac, na hiperalgesia induzida por PGE ₂	42
4.7 Efeito do H-89, inibidor da PKA, na hiperalgesia induzida por LPS.....	44
4.8 Efeito do ESI-09, inibidor Epac, na hiperalgesia induzida por LPS.....	46
5 Discussão.....	48
6 Conclusão.....	57
7 Referências.....	59

1 INTRODUÇÃO

A maioria das pessoas experimenta vários episódios de doença infecciosa aguda durante a vida, porém, apesar da multiplicidade de organismos que causam essas doenças e dos diferentes tecidos afetados, um conjunto similar de sintomas e sinais é comumente observado, denominado de síndrome de doença. A síndrome de doença é uma condição produzida pela presença de infecção, e é parte da resposta imune inata, de maneira a eliminar o agente patogênico e reestabelecer a homeostasia (DE LUCA *et al.* 2016). Esses sintomas incluem febre, dor ou hiperalgesia, perda de apetite e sonolência, entre outras alterações autonômicas, endócrinas e comportamentais que são uma resposta adaptativa para combater a infecção (SAPER *et al.*, 2012).

Entre os sintomas da síndrome de doença, a febre é um dos mais importantes e mais bem estudados. Acredita-se que o aumento da temperatura observado durante a febre possa ser importante para reduzir a proliferação bacteriana ou viral e para melhorar mecanismos de defesa do hospedeiro (CANNON, 2013). Assim, há uma vasta gama de evidências que apontam para a eficiência aumentada do sistema imunológico, atrelada à menor mortalidade e maior taxa de resolução de infecções, enquanto o uso de antipiréticos, por exemplo, está relacionado à uma mortalidade 5% maior em pacientes infectados com vírus influenza (EARN *et al.*, 2013).

A hiperalgesia, a fadiga e sonolência, sintomas ocorrem durante a síndrome de doença, acabam forçando o indivíduo a se manter em repouso, auxiliando na conservação de energia que é necessária para combater a infecção e elevar a temperatura do corpo, uma vez que o processo de aumento

da temperatura corporal é energeticamente custoso. Além disso, esses sinais servem para alertar ao indivíduo que eventos potencialmente danosos estão em curso. A maior parte destas respostas é controlada pelo sistema nervoso central (SNC) em resposta aos mediadores inflamatórios produzidos durante a infecção, e neste sentido as citocinas e prostaglandinas ocupam um papel de destaque (ELMQUIST *et al*, 1997). Deste modo, fica claro que estas respostas tem um valor adaptativo importante para a espécie.

No presente trabalho, o objeto de estudo foi a hiperalgesia observada durante a síndrome de doença, um importante sintoma cujas características são bem menos conhecidas do que a febre.

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano”. Ainda, a IASP define hiperalgesia como sensibilidade aumentada ao estímulo doloroso, excluindo-se os sentidos especiais (IASP, 2018).

A sensibilização periférica é um traço natural da inflamação (REN, DUBNER, 2010) e as células da glia estão ativas no SNC mesmo durante a inflamação periférica (HANNESTAD *et al.*, 2012, SANDIEGO *et al.*, 2015). Na síndrome de doença, esta hiperalgesia é controlada e modulada em diversos níveis do neuroeixo, desde a medula espinhal até centros encefálicos superiores (SAPER E ROMANOVSKY, 2012). O hipotálamo parece ter papel importante nesse controle, sendo, portanto, uma estrutura central nas respostas da síndrome de doença, justamente por integrar e coordenar a resposta febril e a hiperalgesia nesta condição. O hipotálamo, mais especificamente a região pré-

óptica medial (SAPER *et al*, 2013), tem esse papel, também, por modular a atividade da substância cinzenta periaquedutal (PAG), estrutura conhecida por mediar respostas relacionadas à modulação da dor (UCHASKOV *et al.*, 2007). A PAG, por sua vez, emite projeções para o bulbo rostroventromedial (RVM), e o eixo PAG-RVM é extensamente estudado por seu papel na modulação da dor/analgesia, principalmente por ser uma estrutura rica em receptores opioides do tipo μ (LOYD E MURPHY, 2009), bem como por ser sensível a agentes canabinoides (LAU E VAUGHAN, 2014). Os neurônios do núcleo magno da rafe e do núcleo gigantocelular reticular, que compõe o bulbo rostroventromedial (RVM), projetam-se para o corno dorsal da medula, de modo a aumentar ou diminuir direta ou indiretamente o trânsito nociceptivo, alterando a experiência da dor. Além destas estruturas, a amígdala e o locus coeruleus também têm papel importante neste sistema de modulação, sendo o locus coeruleus responsável por enviar projeções descendentes inibitórias noradrenérgicas para a medula (Fields, 2005). Assim, está bem estabelecido que a inflamação sistêmica modula a dor por diminuir sua inibição, e há fatores importantes que podem afetar essas respostas, sendo um deles o sexo (KARSHIKOFF *et al*, 2016). Apesar dessas diferenças serem conhecidas, inclusive em termos de dificuldade terapêutica, há poucos estudos nos quais se direciona atenção ao dimorfismo sexual na dor (KAVALIERS AND INNES, 1988).

Recentemente, as diferenças sexuais emergiram como um fator importante na incidência e progressão de doenças associadas ao sistema imune, particularmente a inflamação, com implicações importantes para uma melhor abordagem terapêutica (PACE *et al.*, 2017). O reconhecimento de que a percepção da dor depende de um equilíbrio dinâmico de mecanismos inibitórios

e excitatórios, aponta para o problema das diferenças individuais na dor, uma vez que mulheres e homens não têm a mesma percepção de dor (BERKELEY, 2009), e embora a causa subjacente dessas diferenças permaneça incompletamente compreendida, os hormônios sexuais certamente estão envolvidos (ROSEN *et al.*, 2017). A baixa hormonal que ocorre, por exemplo, na menopausa também pode representar outra fase diferente na percepção da dor e nos mecanismos envolvidos nessa percepção.

O modelo mais utilizado para o estudo de febre e da hiperalgesia associada à síndrome de doença é a injeção sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas. O LPS participa de diversas funções para aumentar a sobrevivência bacteriana (ELLIS, KUEHN, 2010; ZHANG *et al.*, 2013) e é uma molécula que pode ser classificada como padrão molecular associado ao patógeno, os PAMPs, que são reconhecidos pelo sistema imune inato e desencadeiam a resposta inflamatória de maneira rápida. Os PAMPs são reconhecidos por ligarem-se a uma família específica de receptores, conhecidas por receptores do tipo *Toll*, e o LPS se liga especificamente ao receptor do tipo *Toll* 4, presente principalmente em células do sistema imune, incluindo células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células dendríticas). A ligação do LPS ao domínio extracelular do receptor inicia uma cascata complexa de eventos. O domínio intracelular dos receptores do tipo *Toll* é comum a toda a família de receptores, e é essencial para a sinalização subsequente. Este domínio, uma vez ativado, liga-se ao fator de diferenciação mieloide 88 (MYD88), que é necessária ao recrutamento da quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK1) e IRAK6, e o fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6) para o complexo (MEDZHITOV, 2001). Outra via também

ativada por este receptor é a do receptor induzido por interferon- β com domínio TIR (TRIF), também conhecida como via independente de MYD88. Ambas ativam uma cascata de proteínas quinases que tem como resultado comum a ativação do fator nuclear KB (NF- κ B), levando ao aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (MILLER *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que a injeção intraperitoneal, portanto sistêmica e não local, de LPS ou de citocinas como IL-1 β e TNF- α aumenta a sensibilidade nociceptiva em roedores sugerindo que um processo hiperalgésico sistêmico está ocorrendo (MAIER *et al.*, 1993, WATKINS *et al.*, 1995)

A injeção de LPS também ativa a produção de ciclooxigenase-2 (COX-2) com conseqüente aumento da produção de prostanoídes, entre eles as prostaglandinas, foco deste trabalho. Assim, o LPS produz todos os sintomas e sinais da síndrome de doença, tornando a administração sistêmica de LPS um bom modelo animal para o estudo dessa condição (DE LUCA *et al.*, 2016), sendo a administração tanto intraperitoneal quanto endovenosa, eficaz para o desenvolvimento da síndrome.

Os sintomas inflamatórios, como febre e hiperalgesia, são frequentemente tratados com antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs). Essas drogas reduzem a produção de prostanoídes bloqueando tanto a ciclooxigenase (COX) -1 quanto a COX-2. A prostaglandina E₂, é gerada a partir da protaglandina H₂, um produto da COX, por pelo menos três isomerases: a versão citosólica, PGE sintase citosólica (cPGES), e outras duas ligadas à membrana, PGE sintase-1 e -2 microsomal (mPGE-1 e -2). A mPGE-1 tem sua expressão aumentada, assim como a COX-2, em casos de estímulo inflamatório (KAWABATA, 2011). A

produção de PGE₂ pelo endotélio no cérebro foi identificada há algum tempo, e sabe-se que essa produção é crítica para a progressão da febre causada pela injeção de LPS, uma vez que estudos com animais nocaute seletivo para COX-2, nas células endoteliais localizadas no SNC, não apresentaram resposta febril frente à exposição a este pirogênio (ENGSTRÖM, 2012). Assim, acredita-se que essas células sejam importantes também para a resposta de hiperalgesia observada na síndrome de doença.

Entre os prostanoides formados pela COX, a PGE₂ parece ser a mais importante no processamento da dor. A PGE₂ promove seu efeito biológico por meio de quatro tipos distintos de receptores, sendo eles EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄. Estes receptores são acoplados à proteína G, sendo EP₁ acoplado à proteína G_q, portanto sua ativação produzindo trifosfato de inositol (IP₃), e diacilglicerol (DAG), seguido de mobilização intracelular de cálcio e ativação da proteína quinase C (PKC). Por outro lado, EP₂ e EP₄ são acoplados à proteína G_s, portanto sua ativação gera aumento de cAMP seguido de ativação de PKA ou, em alguns casos, ativação da proteína trocadora ativada por AMPc (Epac). O receptor EP₃ é o único acoplado à proteína G_i, e como consequência, em geral, sua ativação leva à diminuição de AMPc, porém o efeito pode ser estimulatório se o receptor em questão for uma variante de *splicing* alternativo do receptor EP₃ (KAWABATA, 2011)

A hiperalgesia causada pela injeção de PGE₂ pode ser bloqueada, periféricamente, pelo análogo de adenosina inativo 3', 5'-monofosfato cíclico, Rp-AMPc (TAIWO, LEVINE, 1991). AMPc, que é sintetizado a partir de adenosina trifosfato (ATP) por enzimas localizadas na membrana, atua ativando a proteína quinase A dependente de AMPc (PKA) para fosforilar diretamente

proteínas alvo (WALSH *et al.*, 1968, BEAVO, BRUNTON, 2002) ou através de ações em canais iônicos dependentes de nucleotídeos cíclicos (Matuleff, Zagotta, 2003). A contribuição da proteína quinase A (PKA) ativada por AMPc para a dor inflamatória periférica tem sido também extensivamente descrita (TAIWO AND LEVINE, 1991, ALEY AND LEVINE, 1999). Além disso, tem sido demonstrado que o AMPc pode ativar a proteína trocadora diretamente ativada pelo AMPc (Epac), levando à hiperalgesia (HUANG, GU, 2017). Portanto, sinalização por AMPc desempenha um papel fundamental na sinalização de alguns tipos de dor (WEI *et al.*, 2002).

Já foi também demonstrado que a injeção i.c.v. de LPS induziu hiperalgesia térmica e mecânica na pata traseira de ratos 6 h e 24 h após a administração. Esta resposta foi acompanhada por uma resposta febril, como era esperado, caracterizando a síndrome de doença. Todas estas respostas foram abolidas pela administração central de indometacina (WALKER *et al.*, 1996). Estes dados sugerem que a hiperalgesia térmica e mecânica observada durante a síndrome de doença, naquele modelo, envolve mecanismos centrais e a participação de prostaglandinas. Neste sentido, a hiperalgesia induzida por doença, parece envolver os mesmos mecanismos observados na resposta febril. Quando o LPS foi injetado por via endovenosa também observou-se uma hiperalgesia inicial seguido de algumas horas por hipoalgesia (HORI *et al.*, 2000). Outros estudos demonstraram que mesmo em doses relativamente baixas, a injeção intravenosa de LPS promoveu uma diminuição da latência para resposta ao calor nocivo (ABE *et al.*, 2001).

HORI *et al.* (2000) e ABE *et al.*, (2001) demonstraram ainda que a administração intra-hipotalâmica de inibidores da cicloxigenase reduzem a

hiperalgesia térmica induzida pela administração periférica de LPS (HORI *et al.*, 2000, ABE *et al.*, 2001). De maneira similar, inibidores de cicloxigenase administrados na área pré-óptica do hipotálamo anterior (PO/HA), uma área do hipotálamo extensivamente relacionada ao controle da resposta febril, inibiram esta resposta de hiperalgesia sugerindo a participação central de prostaglandinas nesta resposta de maneira similar ao que ocorre na resposta febril. É interessante observar ainda que a área pré-óptica medial do hipotálamo, também relacionada ao controle da temperatura corporal, projeta-se para a substância cinzenta periaquedutal (PAG) que é conhecida por mediar respostas antinociceptivas (USCHAKOV *et al.*, 2007, RIZVI *et al.*, 1996). Duncan *et al.*, (2013) demonstraram também que o LPS administrado por via intraperitoneal poderia induzir concomitantemente hiperalgesia térmica (pata) e febre (DUNCAN *et al.*, 2013).

Existem também evidências da participação de receptores de prostaglandinas EP₃ nesta hiperalgesia induzida por administração sistêmica de LPS, embora não esteja definido que os receptores envolvidos estejam no sistema nervoso central. Animais nocaute para receptores EP₃ apresentaram uma hiperalgesia reduzida após a administração de LPS sistêmico e ácido acético (UENO *et al.*, 2001). Adicionalmente, a injeção i.c.v. de PGE₂ reduziu a latência de retirada da pata e aumentou a taxa de disparo de neurônios trigeminais espinais para o *pinching* nocivo. Este efeito de hiperalgesia é replicado pela injeção i.c.v. de um agonista de EP₃ (HORI *et al.*, 2000).

Embora se tenha um conhecimento relativamente amplo dos segundos mensageiros envolvidos na sensibilização por prostaglandinas na periferia,

particularmente AMPc, PKA e Epac, há poucos estudos que exploram se os mesmos sistemas são ativados no SNC por estes prostanoides.

Além dos conhecimentos sobre os mecanismos que envolvem a hiperalgesia na síndrome de doença serem escassos, a maior parte dos estudos foram desenvolvidos em machos. Estudos recentes (BRITO *et al*, 2016) demonstraram que ratas OVX têm uma resposta febril, quando expostas ao LPS, maior que ratas falso-operadas, que é semelhante à resposta febril encontrada em machos. Porém, os mediadores endógenos envolvidos na febre induzida por LPS em machos e fêmeas OVX são diferentes. Sabe-se também, que as fêmeas OVX possuem maior concentração de PGE₂ no líquido cefalorraquidiano e expressão de COX-2 no hipotálamo comparativamente às fêmeas falso-operadas, o que explica a resposta febril mais pronunciada desses animais. Essa diferença na resposta febril das fêmeas OVX é abolida pela reposição de estrógeno (BRITO *et al.*, 2016). Estes dados sugerem que a produção de prostaglandinas no sistema nervoso central em fêmeas está sujeita ao controle dos hormônios sexuais, particularmente o estrógeno.

O ciclo menstrual humano é caracterizado por mudanças cíclicas no estado hormonal, que duram em média 28 dias, reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise, e estudos epidemiológicos apontam para o ciclo menstrual como fator importante na exacerbação de algumas condições dolorosas, sugerindo que os hormônios gonadais podem influenciar na percepção de dor. Além disso, as várias fases da vida da mulher, da puberdade até a fase pós-menopausa, marcadas por grandes variações no estado hormonal, estão também associadas à variações nessa percepção (IACOVIDES *et al*, 2015). Por outro lado, a rata é um animal do tipo poliestro, o que implica também em flutuações hormonais

cíclicas, que duram de 4 a 5 dias, mimetizando, num curto período de tempo, o ciclo menstrual observado em humanos. O ciclo estral é dividido em 4 fases pela maioria dos autores, sendo elas proestro, estro, diestro e metaestro. O proestro (PE) é a fase onde se tem um pico de estrogênio circulante, e o diestro (DE) onde esses níveis estão mais baixos, em comparação com as outras fases. Essas flutuações são uma razão pela qual fêmeas são excluídas dos estudos pré-clínicos, porém constituem um modelo para estudos da influência das flutuações hormonais em respostas adaptativas, como a síndrome de doença. Ainda, variações hormonais influenciam respostas centrais e periféricas, justificando as diferentes respostas à tratamentos medicamentosos em ambos os sexos, diferentes respostas em testes para comportamento tipo depressivo e ansioso, memória e aprendizado, resposta ao estresse, diferenças em níveis de neurotransmissores, neurogênese e neuroplasticidade (SIMPSON, KELLY, 2012). Além disso, um estudo recente demonstrou ainda que há diferenças na resposta febril, produzida pela injeção de LPS, quanto a participação do ligante do receptor ativador do NF- κ B (RANKL) de animais falso-operados em diferentes fases do ciclo estral, especificamente em PE e DE, fases nas quais sabe-se que a concentração de estrogênios na corrente sanguínea é maior e menor, respectivamente (RADULSKI, 2018). O RANKL participa da febre induzida pelo LPS na fase DE mas não no PE. Estes dados sugerem que as diferenças relacionadas a hormônios sexuais na resposta febril podem aparecer não somente entre ratas que apresentam o ciclo normal e ratas OVX, mas também entre animais entre diferentes fases do ciclo estral.

Neste sentido, nossa hipótese para a execução deste estudo foi a de que, uma vez que prostaglandinas participam da hiperalgesia na síndrome de doença

e que a síntese destes prostanóides está aumentada em animais OVX, estes animais poderiam apresentar também uma hiperalgesia aumentada. Assim, os hormônios sexuais, e particularmente o estrógeno, poderiam influenciar na intensidade da hiperalgesia que se manifestaria em diferentes fases do ciclo, comparativamente à redução ou ausência destes hormônios (ovariectomia). Tanto a confirmação desta hipótese quanto a sua negativa, poderiam indicar que mecanismos intracelulares diferentes estariam atuando, mecanismos estes ainda desconhecidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a hiperalgesia mecânica e térmica observada durante a síndrome de doença em ratas falso-operadas e ovariectomizadas, bem como possíveis influências do ciclo estral nessa condição. Também foi avaliado o papel de PKA e de Epac na mediação da hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela PGE₂ e LPS em ratas ovariectomizadas e falso-operadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a hiperalgesia térmica e mecânica induzida por administração periférica de LPS em ratas em 2 diferentes fases do ciclo estral (PE e DE) e ratas OVX;
- Avaliar se a injeção i.c.v. de PGE₂ induz hiperalgesia térmica e mecânica em ratas falso-operadas e OVX;
- Avaliar se a injeção i.c.v. do inibidor da PKA H-89 reduz a hiperalgesia mecânica e térmica induzida por PGE₂ em fêmeas falso-operadas e fêmeas OVX;

- Avaliar se a injeção i.c.v. do inibidor de Epac, ESI-09, reduz a hiperalgesia mecânica e térmica induzida por PGE₂ em fêmeas falso-operadas e fêmeas OVX;

- Avaliar se a injeção i.c.v. do inibidor da PKA, H-89, reduz a hiperalgesia mecânica e térmica induzida por LPS em fêmeas falso-operadas e fêmeas OVX;

- Avaliar se a injeção i.c.v. do inibidor de Epac, ESI-09 reduz a hiperalgesia mecânica e térmica induzida por LPS em fêmeas falso-operadas e fêmeas OVX.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram conduzidos em ratas Wistar, pesando entre 180 e 220g, obtidas nas instalações da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram alojados em caixas com, no máximo, 5 animais e a temperatura ambiente controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com um ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 7:00 h e apagadas às 19 h), ração e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados entre as 7:00 h e as 19:00 h. O Comitê de Ética da Instituição para Uso de Animais aprovou todos os experimentos, sob os protocolos CEUA/BIO (Comissão de Ética para Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná) nº 1075 e nº 1155, estando estes protocolos de acordo com as Diretrizes Brasileiras para o Uso de Animais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais, incluindo fatores como a duração e intensidade do estímulo doloroso expondo os animais o mínimo necessário (ZIMMERMANN, 1983).

3.2.Drogas

Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (0111: B4), prostaglandina E₂, ESI-09 e H-89 foram adquiridos da Sigma Chemical & Co. (St. Louis, MO, EUA). A cetamina foi adquirida da Vetnil Veterinary Products (Louveira, Brasil) e xilazina do Laboratório Syntec (Cotia, Brasil). A oxitetraciclina foi adquirida nos Laboratórios Pfizer (São Paulo, Brasil). O cetoprofeno foi adquirido da Sanofi-Aventis (Gentilly, França) e a lidocaína, da Eurofarma (São Paulo, Brasil).

3.3. Esterilização

O material utilizado nos experimentos, incluindo material cirúrgico, tubos eppendorf, cânulas e parafusos, foi autoclavado a 127°C por 30 min, esterilizado em calor seco a 200°C por 2 h, ou adquirido estéril. As soluções e diluições das drogas foram preparadas em condições assépticas e com a utilização de capela de fluxo laminar.

3.4. Ovariectomia

A ovariectomia foi realizada conforme descrito por BRITO *et al.*, 2016. Brevemente, as ratas foram anestesiadas com cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) por via intraperitoneal (i.p.) e, sob condições assépticas, uma laparotomia de 2 cm foi realizada na linha mediana ventral. Os ovários e as tubas uterinas foram isoladas, as trompas foram ligadas com fio de sutura e os ovários removidos. A cavidade abdominal foi suturada, os animais acompanhados durante os dias subsequentes à cirurgia para avaliação da celularidade do lavado vaginal e o anestro (ausência de ciclo estral) foi confirmado após 21 dias, quando os experimentos foram realizados. Os animais sham ou falso-operados foram submetidos ao mesmo procedimento, porém os ovários e as tubas uterinas foram mantidos intactos. Os animais receberam cloridrato de oxitetraciclina (400 mg / Kg, intramuscular) após a cirurgia e 5 mg/Kg de cetoprofeno por via subcutânea imediatamente e 24 h após a cirurgia. O peso corporal dos animais OVX e sham foi monitorado durante as três semanas subsequentes, e a diferença entre o peso antes e 21 dias após a cirurgia foi usada como um parâmetro adicional para confirmar a efetividade da ovariectomia. Todos os experimentos foram realizados entre a 3^a e a 4^a semana após a cirurgia.

3.5 Avaliação do ciclo estral

Esfregaços vaginais foram realizados em animais OVX e falso-operados de acordo com o método descrito por NELSON *et al.*, 1982. Brevemente, 10 µL de solução salina estéril 0,9% foi cuidadosamente inserido na vagina de animais OVX e falso-operados, usando um pipeta automática, evitando a estimulação do colo do útero, a fim de evitar efeitos indesejáveis. A solução salina foi aspirada de volta e o esfregaço fresco analisado sob microscópio. O anestro (ausência de ciclo estral) de ratas OVX foi confirmado pela presença persistente de somente um tipo celular (células cornificadas, leucócitos, epiteliais cornificadas) nos esfregaços vaginais (KERMATH E GORE, 2012) considerando três análises em três dias seguidos. Os animais falso-operados tiveram a fase do ciclo estral verificada todos os dias durante três dias antes de qualquer experimento e, para o primeiro conjunto de experimentos, os animais em PE e DE foram selecionados. PE foi caracterizado pela prevalência de células epiteliais nucleadas nos esfregaços, enquanto na fase DE o esfregaço rico em leucócitos foi utilizado como marcador. Adicionalmente, animais OVX apresentam ausência de ciclicidade, geralmente apresentando diestro ou estro persistentes.

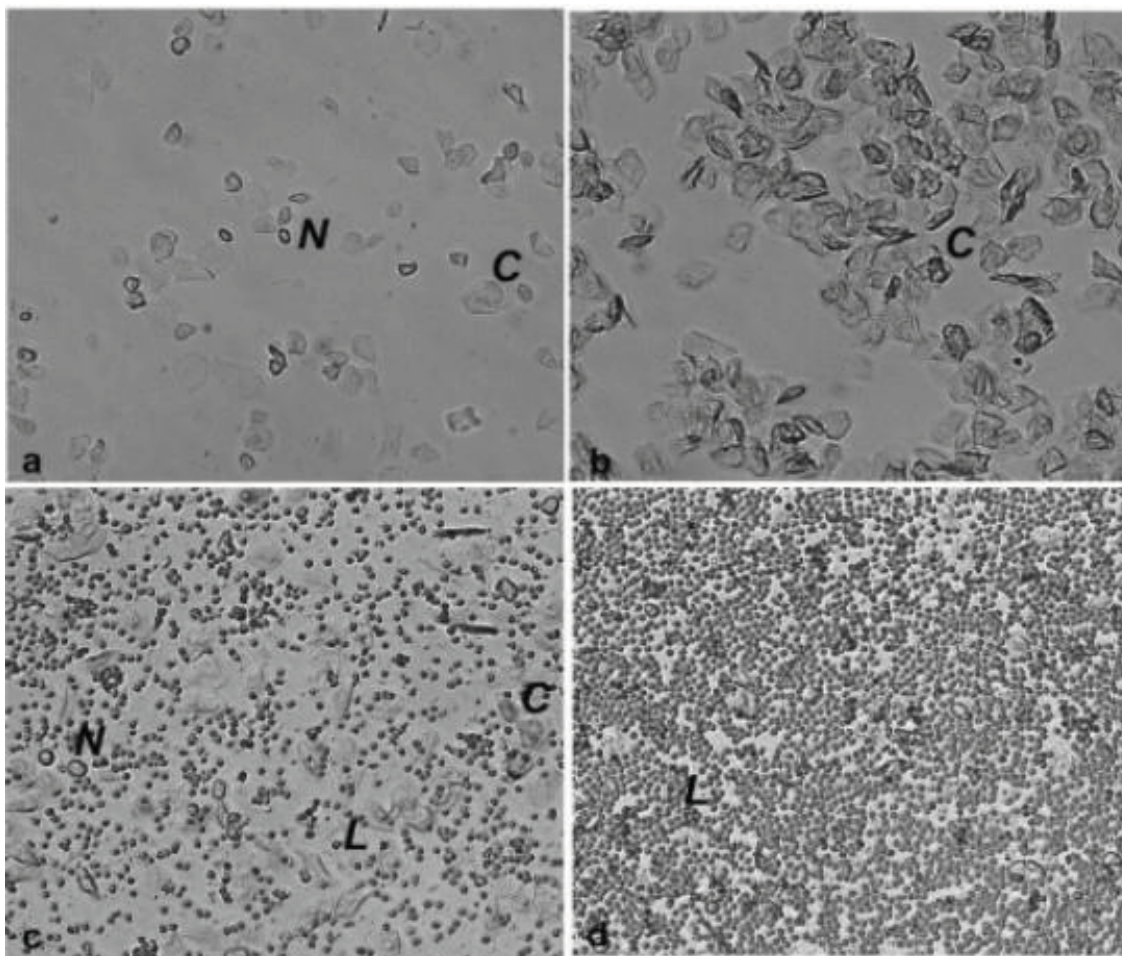


Figura 1: Aspecto microscópico das fases do ciclo estral de roedores. A: pró-estro. B: estro. C: Metaestro. D: Diestro. N: células epiteliais nucleadas, C: células cornificadas, L: leucócitos. (Caligioni, 2009).

3.6 Implante da cânula no ventrículo lateral

As cânulas foram preparadas utilizando-se agulhas descartáveis 30 x 8 mm que foram polidas até atingirem um comprimento de 13 mm. Antes do implante, as mesmas foram esterilizadas em estufa a 200 °C, por um período de 2 h. Os animais do 2º, 3º e 4º bloco de experimentos foram anestesiados com cetamina/xilazina (90/10 mg / Kg, i.p.) e após tricotomia e antissepsia da pele, tiveram a cabeça imobilizada em um aparelho estereotático (David-Kopf, modelo 900-USA). Foi administrado por via subcutânea 0,2 mL de lidocaína com 2% de noradrenalina na parte superior da cabeça, seguida de uma incisão de

aproximadamente 1 cm de diâmetro na pele, para exposição da calota craniana. Este procedimento facilita a remoção do periósteo, contribuindo para a redução do estímulo doloroso e diminuindo o sangramento. Após a localização do bregma, tomado como ponto de referência, os parâmetros estereotáticos utilizados para a perfuração do crânio e implantação da cânula no ventrículo lateral foram de -0,8 mm anteroposterior e -1,5 mm lateralmente, sendo a inclinação da barra incisal de -3,3 mm. As cânulas esterilizadas foram conectadas ao estereotático e introduzidas no tecido cerebral com coordenada ventral a 2,5 mm abaixo da superfície craniana. As coordenadas foram determinadas com base no atlas de Paxinos and Watson (1998). Após sua introdução no tecido cerebral, as cânulas foram fixadas utilizando-se uma prótese de acrílico autopolimerizável, com o auxílio de dois parafusos rosqueados à calota craniana (esterilizados previamente). Imediatamente após a cirurgia e após 24 h, os animais receberam cetoprofeno 3 mg/Kg, por via subcutânea para alívio da dor. Os experimentos foram conduzidos entre 5 e 7 dias após o procedimento cirúrgico, para permitir a recuperação dos animais. Após os experimentos os animais foram submetidos à eutanásia e checagem do correto posicionamento da cânula. Foi realizada injeção de azul de Evans no ventrículo lateral e posterior retirada do cérebro para verificação da marcação pelo corante no local correto.

3.7 Hiperalgisia mecânica

A hiperalgisia mecânica foi avaliada utilizando-se o analgesímetro digital (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil), conforme descrito anteriormente (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Os animais foram colocados individualmente em uma

caixa de acrílico (20 cm de comprimento x 25 cm de largura por 15 cm de altura) sobre uma plataforma com assoalho feito de tela de arame por 60 min para a habituação. O assoalho da malha permite que a ponta do analgesímetro estimule a região plantar média da pata posterior direita, utilizando uma ponta descartável de polipropileno (0,5 mm de diâmetro), ligada a um transdutor de força e *display* digital que permite a determinação da massa (em g) aplicada. Uma massa crescente foi aplicada à pata, até a ocorrência de resposta de retirada. O limiar mecânico foi calculado como o valor médio de três respostas de retirada semelhantes, com um máximo de seis estímulos intervalados por 30s. A hiperalgesia mecânica foi determinada como a diferença entre os limiares mecânicos médios observados antes de qualquer tratamento (basal) e em diferentes momentos após a administração de LPS, PGE₂ ou veículo.

3.8 Hiperalgesia térmica

A hiperalgesia térmica foi avaliada utilizando-se equipamento de placa aquecida (Bonther, Ribeirão Preto, SP, Brasil) no mesmo animal, em momento subsequente à avaliação da hiperalgesia mecânica. Os animais foram habituados ao aparelho um dia antes do experimento, durante 15 min (placa à temperatura ambiente). Antes de qualquer injeção, a latência basal na placa aquecida (a 48°C) foi avaliada e os animais ali permaneceram por no máximo 50 s para evitar danos aos tecidos. A latência para resposta foi calculada como a diferença entre a latência basal e a latência após a injeção de LPS, PGE₂ ou veículo em momentos específicos, conforme descrito nos protocolos.

3.9 Delineamento experimental

No primeiro conjunto de experimentos, os limiares térmicos e mecânicos de ratas falso-operadas em PE ou DE e em ratas OVX foram avaliados como

descrito acima. Em seguida, os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) ou o mesmo volume de veículo (salina estéril) e posteriormente avaliados para hiperalgesia mecânica e térmica 2, 4 e 6 h, nos mesmos animais, após o tratamento com LPS ou salina. Neste experimento, o grupo falso-operado foi dividido em grupos PE e DE para avaliar possíveis diferenças na hiperalgesia devido às diferentes fases do ciclo estral. A dose de LPS foi escolhida com base em estudos anteriores e é suficiente para induzir a febre (Telles *et al.*, 2017, Brito *et al.*, 2016).



Figura 2: Linha do tempo para o primeiro conjunto de experimentos

O segundo conjunto de experimentos foi realizado apenas com animais OVX e falso-operados (nenhuma diferenciação da fase do ciclo estral foi feita em experimentos subsequentes). Após avaliação da limiar basal mecânico e térmico, as ratas OVX e sham-operadas receberam PGE₂ (125 ng/2 μL , i.c.v.) ou veículo (salina, 2 μL , i.c.v.). A hiperalgesia térmica e mecânica foi avaliada aos 30, 60, 90 e 120 min após a injeção de PGE₂. A dose de PGE₂ foi escolhida com base em estudos anteriores e é suficiente para induzir febre (Fraga *et al.*, 2008).



Figura 3: Linha do tempo para o segundo conjunto de experimentos

No terceiro conjunto de experimentos teve como objetivo investigar as vias de sinalização intracelular envolvidas na ação da PGE₂ central, especificamente relacionadas à ativação de PKA e Epac. Avaliou-se o limiar mecânico e térmico de ratas fêmeas, falso-operadas e OVX. Os animais receberam intracerebroventricularmente H-89 (1 µg/2 µl), ESI-09 (350 ng/2 µl) ou o veículo (solução salina ou DMSO 1%, 2 µl, respectivamente) seguidos por PGE₂ (125 ng/2 µl) ou veículo (salina, 2 µl) 15 min após a injeção de H-89, ESI-09 ou os respectivos veículos. A hiperalgesia térmica e mecânica foi avaliada aos 30, 60, 90 e 120 min após a administração de PGE₂. As doses de H-89 e ESI-09 foram baseadas em estudos anteriores (Takasu *et al.*, 2009, Brod *et al.*, 2016)



Figura 4: Linha do tempo para o terceiro conjunto de experimentos.

No quarto conjunto de experimentos, foi explorada a resposta de animais falso-operados e OVX à injeção i.p. de LPS (50 µg/Kg), juntamente com os inibidores de PKA (H-89, 1 µg/2 µL) e Epac (350 ng/2 µL), ambos intracerebroventricularmente. Este bloco de experimentos foi desenhado de

modo a demonstrar o efeito do bloqueio da via de PKA e de Epac sobre a hiperalgesia produzida por LPS. Os animais receberam H-89, ESI-09 ou veículo (solução salina ou DMSO 1%, 2 µl, respectivamente, por via i.c.v.) seguidos, 15 min após, pela mesma dose de LPS. Novamente foi avaliado o limiar mecânico e a latência na placa aquecida de animais falso-operados e OVX, nos tempos de 2 h, 4 h e 6 h após a administração sistêmica de LPS.

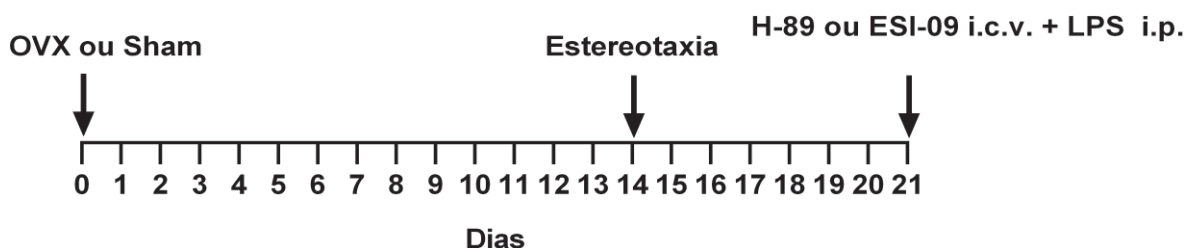


Figura 5: Linha do tempo para o quarto conjunto de experimentos.

3.10 Análise estatística

A hiperalgesia mecânica e térmica é apresentada como a intensidade de hiperalgesia, que foi calculada como a mudança no limiar mecânico ou a mudança na latência na placa aquecida antes e depois da injeção do estímulo. Estes dados foram analisados por análise de variância de medidas repetidas de duas vias (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. A área sob curva (AUC, em unidades arbitrárias [AU]) foi calculada utilizando a intensidade de hiperalgesia para revelar a alteração total na resposta. As diferenças na AUC e no limiar basal e latência basal foram analisadas pelo ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni. O ganho de peso foi analisado pelo teste t de Student não pareado. Todos os dados apresentam a média \pm erro padrão da média e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados utilizando o software Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1. Ganho de peso, limiar mecânico basal e latência basal na placa aquecida de animais falso-operados em DE e PE e animais OVX

A cirurgia de ovariectomia induziu um maior ganho de peso nas ratas OVX, quando da avaliação após 3 semanas da cirurgia de ovariectomia ou sham. Os animais submetidos à cirurgia de ovariectomia ganharam $30,2 \pm 2,7$ g, enquanto os animais falso-operados ganharam $6,2 \pm 1,9$ g ao longo de três semanas após a cirurgia (Fig. 1A). O limiar mecânico (Fig. 1B) e a latência na placa aquecida (Fig. 1C) dos grupos PE, DE e OVX foram avaliados antes de qualquer injeção ou desafio imunológico. Não houve diferença estatística entre os grupos.

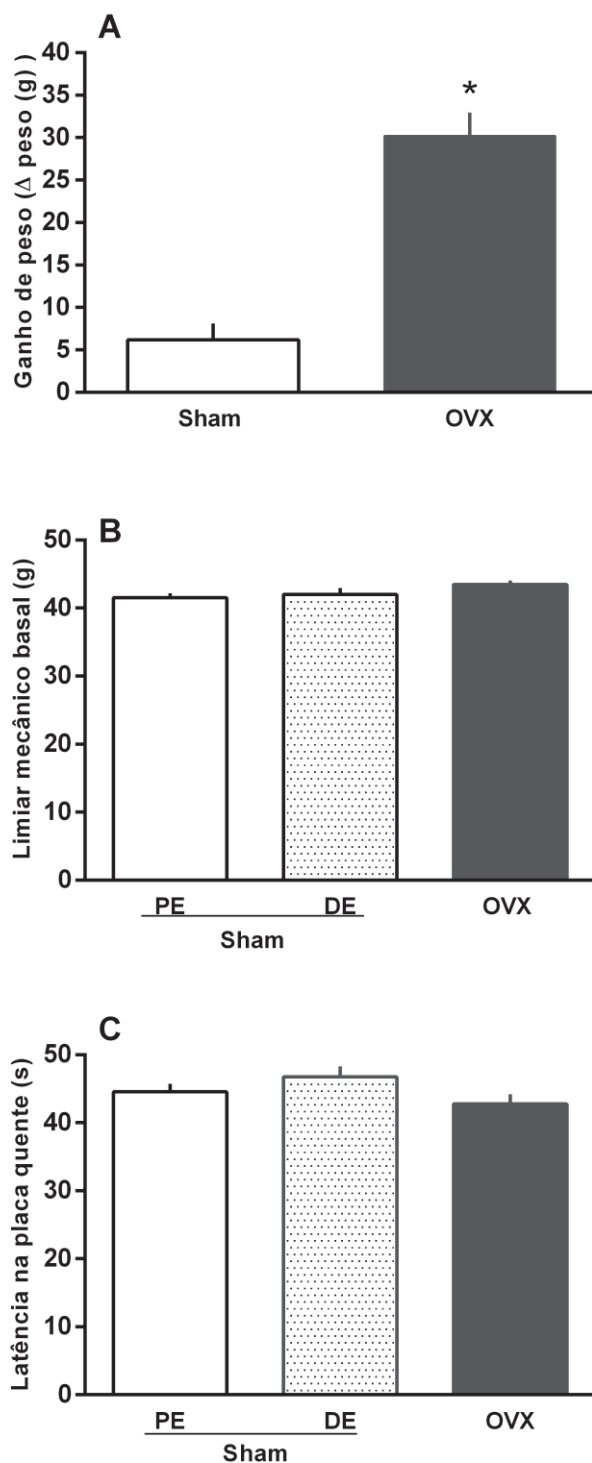


Figura 6: Mudança no peso corporal, limiar mecânico basal e latência basal na placa aquecida de ratas falso-operadas em PE e DE e ratas OVX. O peso (g) dos animais naive foi obtido antes de qualquer procedimento cirúrgico. Posteriormente, os animais foram separados em dois grupos (OVX e Sham), e o peso foi registrado após três semanas da cirurgia (A), quando os experimentos foram realizados (n = 14-15). O limiar mecânico (B) e a latência na placa aquecida (C) foram avaliados antes de qualquer tratamento. Os dados estão expressos como a média ± e.p. média do ganho de peso (g), do limiar mecânico basal (g) ou latência na placa aquecida (s) (n = 9-16). * denota diferença em relação ao grupo sham-operado, p < 0,05.

4.2.Efeito da injeção intraperitoneal de LPS na hiperalgesia mecânica de ratas falso-operadas e OVX

A injeção de solução salina por via i.p. não induziu quaisquer alterações no limiar mecânico de ratas falso-operadas PE, DE ou animais OVX. A injeção i.p. de LPS, em uma dose indutora de febre, também induziu uma hiperalgesia que começou na quarta hora e durou até a sexta hora para ratas falso-operadas em PE (Fig. 2A), ratas falso-operadas em DE (Fig. 2B) e ratas OVX (Fig. 2C). Não foram observadas diferenças na hiperalgesia mecânica induzida pelo LPS entre os diferentes grupos. Esta similaridade foi confirmada pela análise da AUC (Fig. 2D).

4.3.Efeito da injeção intraperitoneal de LPS na hiperalgesia térmica em ratas falso-operadas e OVX

A injeção de solução salina por via i.p. não induziu alterações significativas na latência na placa aquecida em animais falso-operados e OVX. A injeção i.p. de LPS, em uma dose indutora de febre, também induziu uma hiperalgesia térmica significativa que começou na 2ª hora e durou até a 6ª hora para ratas falso-operadas em DE (Fig. 2F) e OVX (Fig. 2G). Ratas falso-operadas em PE apresentaram apenas hiperalgesia térmica significativa 6 h após a injeção de LPS (Fig. 2E). No entanto, não foram observadas diferenças significativas na hiperalgesia térmica induzida pelo LPS entre os diferentes grupos. Esta semelhança foi confirmada pela análise da AUC (Fig. 2H).

Uma vez não encontrada diferença importante entre os animais falso-operados nas fases PE e DE do ciclo estral, tanto na hiperalgesia mecânica

quanto na térmica, estas foram agrupadas, nos experimentos subsequentes, no grupo falso-operado.

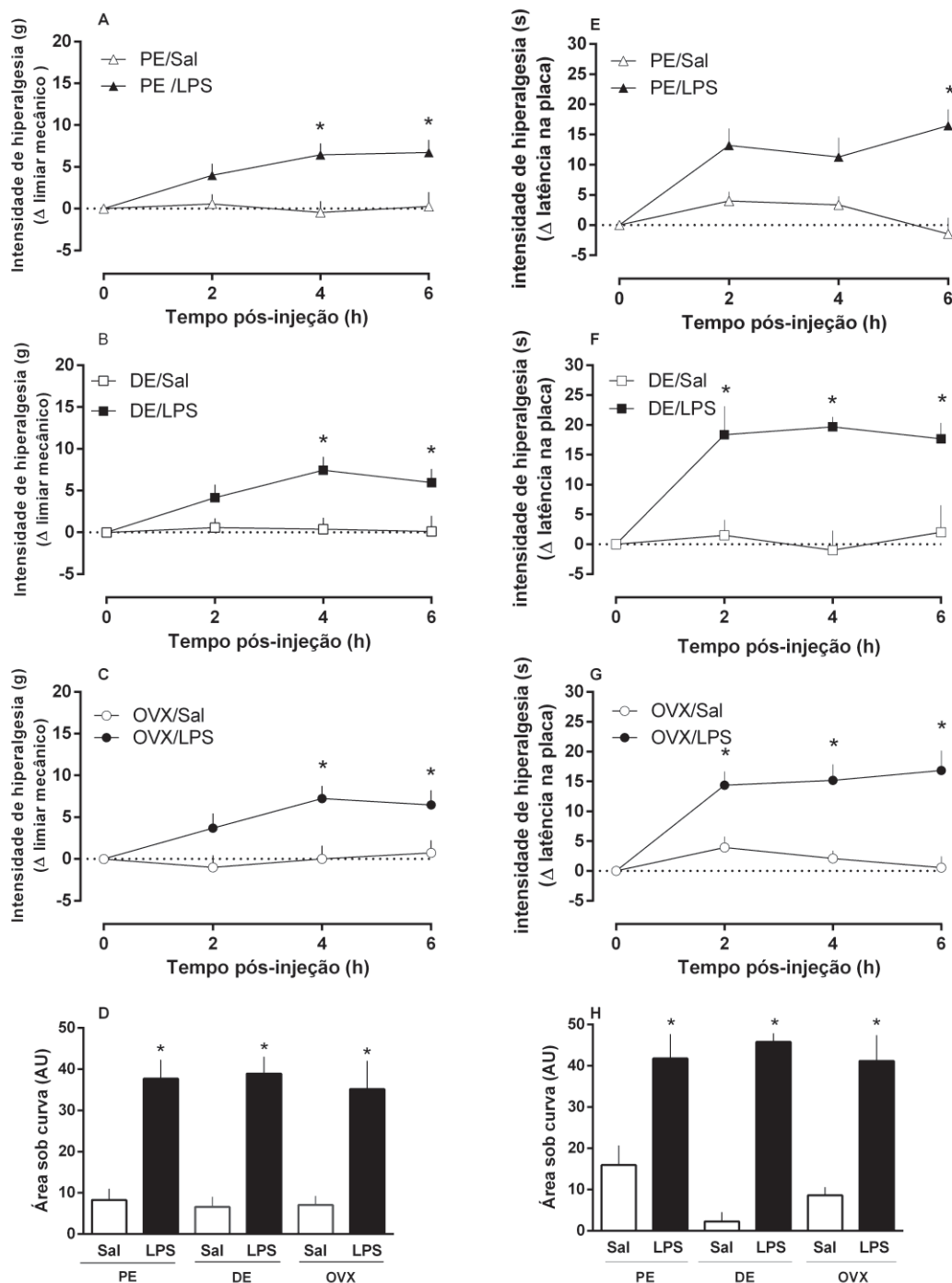


Figura 7: Hiperálgia mecânica e térmica induzida por injeção i.p. de LPS em ratas falso-operadas e OVX. LPS (50 µg/Kg) ou veiculo (salina, Sal) foi injetado i.p. em ratas falso-operadas em DE (A, E) ou PE (B, F) e em fêmeas OVX (C, G). A hiperálgia mecânica ou térmica foi avaliada nos tempos indicados. Os painéis D e H mostram a área sob as curvas em A-C e E-G. Os dados estão expressos como a média ± e.p.média da intensidade da hiperálgia (mudança no limiar mecânico em g ou mudança na latência na placa aquecida, em relação ao basal, antes de qualquer tratamento) ou a área sob as curvas (unidades arbitrárias, AU) (n = 10-14). * Denota diferença entre os grupos tratados com LPS e seu respectivo grupo tratado com Sal, p < 0,05.

4.4. Efeito da injeção intracerebroventricular de prostaglandina E₂ na hiperalgesia mecânica e térmica em ratas falso-operadas e OVX

Os animais falso-operados desenvolveram hiperalgesia de maneira rápida e intensa que começou aos 30 minutos após a injeção de PGE₂, diminuiu aos 60 min e voltou ao basal próximo dos 90 min. De maneira oposta, o grupo OVX mostrou uma hiperalgesia mecânica muito mais persistente que começou aos 30 min e durou até os 90 min. Observou-se uma diferença significativa entre os animais falso-operados e OVX aos 90 min (Fig. 3A). No entanto, a área sob a curva não mostrou diferença significativa entre os animais falso-operados e os OVX tratados com PGE₂ (Fig. 3B). Um padrão de resposta muito semelhante foi observado para a hiperalgesia térmica. Enquanto os animais falso-operados tiveram uma resposta muito rápida, que atingiu um pico aos 30 min, os animais OVX mostraram uma hiperalgesia significativa apenas aos 60 min após a injeção de PGE₂ (Fig. 3C). Neste caso, houve diferença significativa na área sob a curva entre os animais falso-operados e OVX tratados com PGE₂ (Fig. 3D).

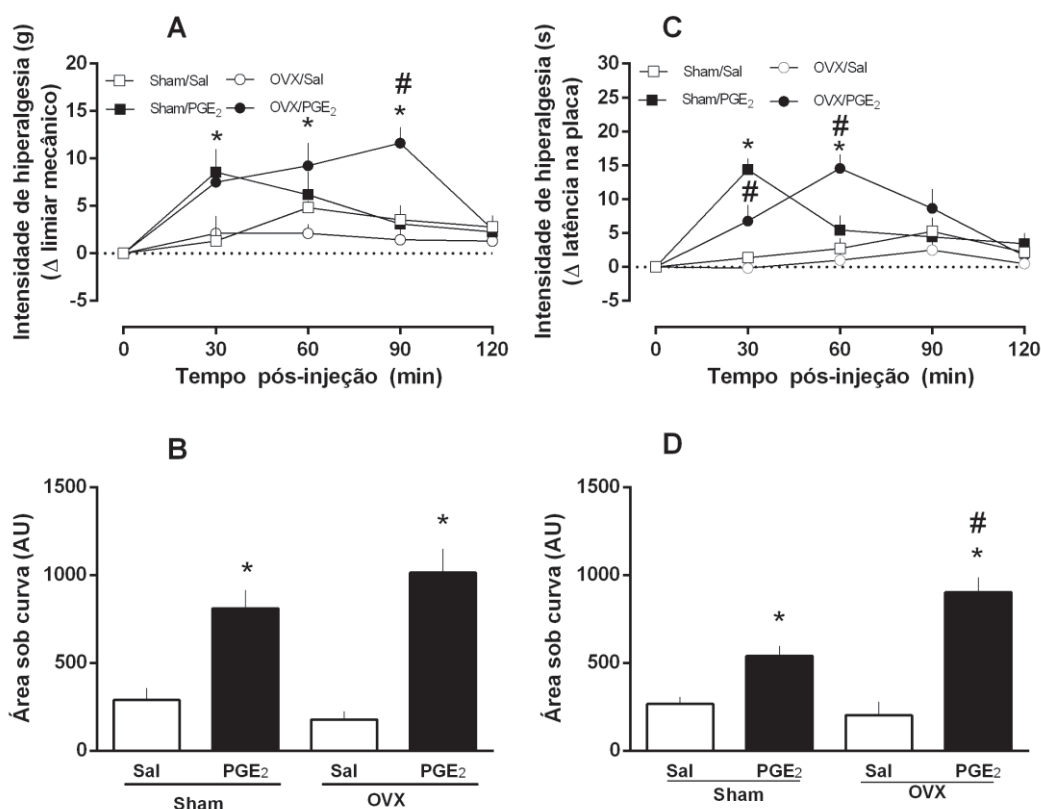


Figura 8: Hiperálgia mecânica e térmica induzida por injeção i.c.v. de PGE₂ em ratas falso-operadas e OVX. As fêmeas falso-operadas e OVX receberam PGE₂ 125 ng i.c.v. A hiperálgia mecânica (A) e térmica (C) foi avaliada nos tempos indicados. O painel B mostra a área sob a curva em A, o painel D mostra a área sob a curva em C. Os dados mostram a média \pm e.p.média da intensidade da hiperálgia (alteração no limiar mecânico em g e latência na placa aquecida em s) ou a área sob curva (unidades arbitrárias, UA) (n = 8-11). * denota diferença quando comparado ao respectivo grupo Sal, p <0,05. # denota diferença quando comparado ao grupo Sham / PGE₂, p <0,05.

4.5. Efeito do H-89, inibidor da PKA, na hiperálgia induzida por PGE₂

A injeção do inibidor de PKA, H-89, não induziu quaisquer alterações significativas no limiar mecânico ou térmico. Além disso, H-89, na dose utilizada, não foi capaz de reduzir a hiperálgia mecânica induzida por PGE₂ (Fig. 4A) e a hiperálgia térmica (Fig. 4C) no grupo falso-operado. No entanto, esta dose de H-89 aboliu a hiperálgia mecânica (Fig. 4E) e térmica (Fig. 4G) induzida por PGE₂ em animais OVX. Curiosamente, a hiperálgia térmica induzida por PGE₂ em animais falso-operados tratados com H-89 teve um desvio para a direita, o

que significa que a resposta atingiu o pico aos 60 min, enquanto no grupo falso-operado tratado com veículo, a resposta à PGE₂ atingiu o pico 30 min (Fig. 4C). Esses dados se confirmam pela análise da área sob curva na figura 4B, 4D, 4F e 4H.

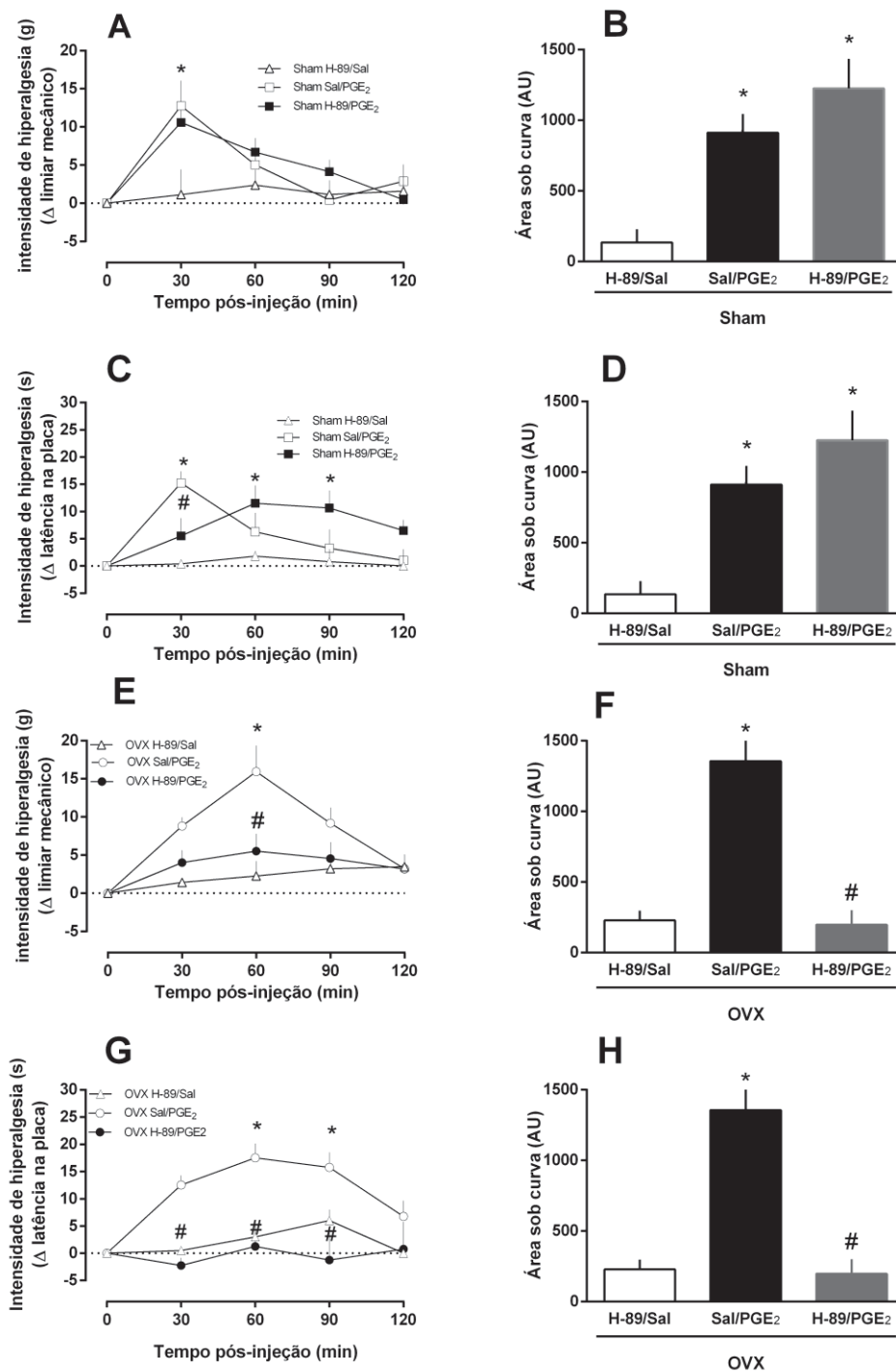


Figura 9: Efeito do inibidor de PKA, H-89, na hiperalgesia mecânica e térmica induzida por PGE₂ em ratas falso-operadas e OVX. Ratas falso-operadas (A, C) e OVX (E, G) foram tratadas com H-89 (1 µg / 2 µl, i.c.v) ou veículo (solução salina) e após 15 min receberam PGE₂ (125 ng / 2 µl, icv) ou salina (Sal). A hiperalgesia mecânica (A, E) e a hiperalgesia térmica (C, G) foram avaliadas nos momentos indicados. Os gráficos B, D, F, H mostram a área sob curva, baseado nos dados dos gráficos A, C, E e G, respectivamente. Os dados mostram a média ± e.p.média da intensidade da hiperalgesia (alteração no limiar mecânico em g ou a alteração na latência na placa aquecida em s) ou a área sob curva (unidades arbitrárias, UA) (n = 6-10). * denota diferença quando comparado ao respectivo grupo Sal/H-89, p <0,05. # denota diferença quando comparado ao grupo Sal/ PGE₂, p <0,05.

4.6. Efeito do inibidor Epac ESI-09 na hiperalgesia induzida pela PGE₂

Para investigar de maneira mais detalhada a influência da sinalização intracelular na resposta hiperalgésica a PGE₂, foi utilizado um inibidor específico da Epac. A injeção do inibidor Epac, ESI-09, não induziu alterações significativas no limiar mecânico ou térmico. Os animais falso-operados tiveram tanto a hiperalgesia mecânica (Fig. 5A) como a térmica (Fig. 5C) reduzida em 65% após o tratamento com o inibidor de Epac. Por outro lado, o ESI-09 não alterou a hiperalgesia mecânica (Fig. 5E) e térmica (Fig. 5G) induzida por PGE₂ no grupo OVX. Esses dados se confirmam pela análise da área sob curva na Figuras 5B, 5D, 5F e 5H.

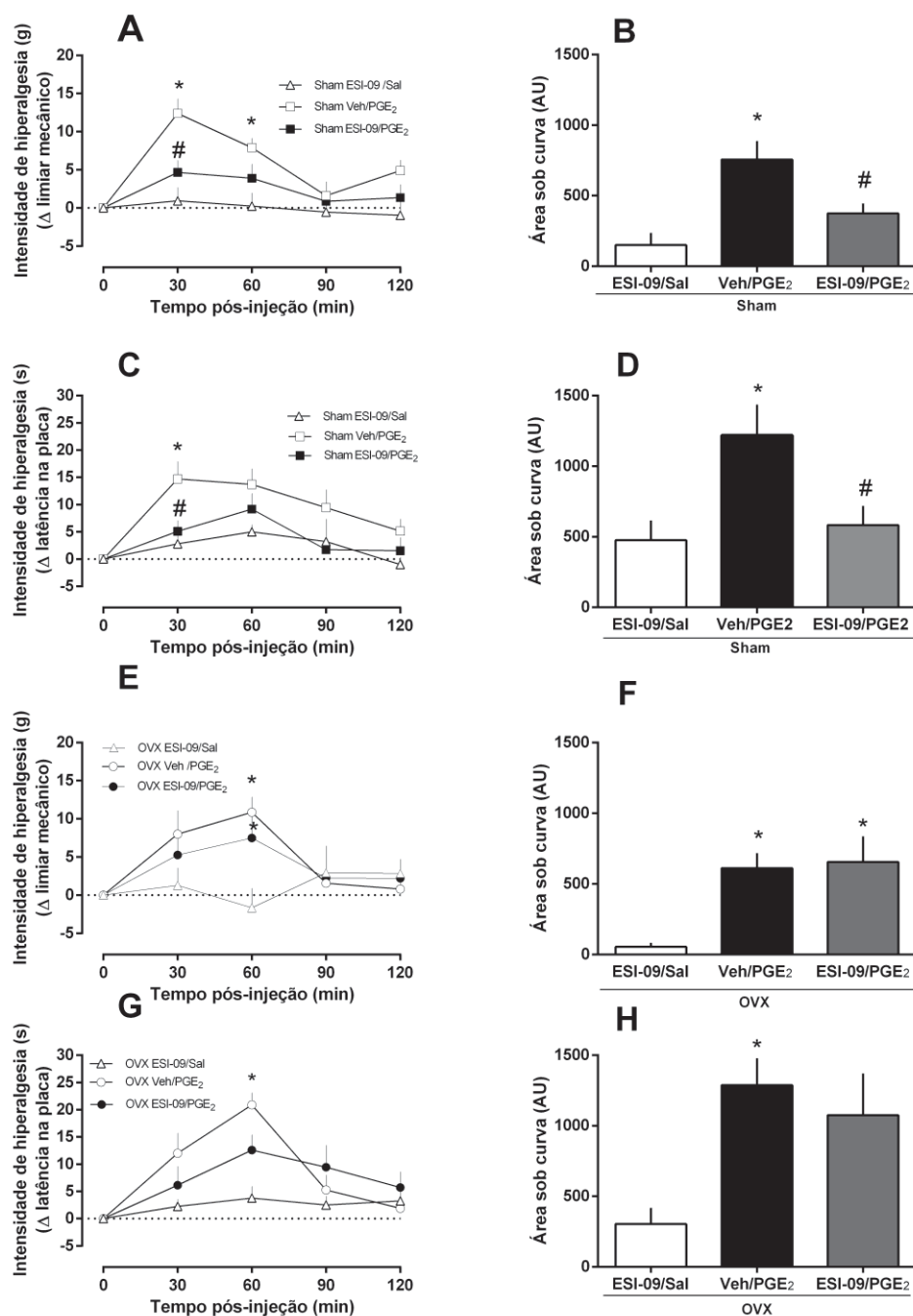


Figura 10: Efeito do inibidor de EPAC, ESI-09, na hiperalgesia mecânica e térmica induzida por PGE₂ em ratas falso-operadas e OVX. As ratas falso-operadas (A, C) e OVX (E, G) foram tratadas com ESI-09 (350 ng / 2 μ l, i.c.v) ou veículo (Veh, DMSO 1%) e após 15 min receberam PGE₂ (125 ng / 2 μ l, i.c.v) ou salina (Sal). A hiperalgesia mecânica (A, B) e a hiperalgesia térmica (C, D) foram avaliadas nos tempos indicados. Os gráficos B, D, F, H mostram a área sob curva, baseado nos dados dos gráficos A, C, E e G, respectivamente. Os dados mostram a média \pm e.p.média da intensidade da hiperalgesia (alteração no limiar mecânico em g ou a alteração na latência na placa aquecida em s) ou a área sob curva (unidades arbitrárias, AU) (n = 6-10). * denota diferença quando comparado ao respectivo grupo Sal/ESI-09, p <0,05. # denota diferença quando comparado ao grupo Veh/ PGE₂, p <0,05.

4.7. Efeito do H-89, um inibidor da PKA, na hiperalgesia induzida por LPS

O inibidor de PKA, na hiperalgesia produzida por LPS, teve efeito similar ao encontrado na hiperalgesia por PGE₂. Em animais falso-operados, não houve diferença entre o grupo tratado somente com LPS e o grupo tratado com H-89 (Fig.6A, B). De maneira oposta, a hiperalgesia mecânica e térmica em animais OVX foi revertida pelo mesmo inibidor (Fig. 6C,D). Estes resultados se confirmam na análise sob curva em E (hiperalgesia mecânica em A e C) e F (hiperalgesia térmica em B e D).

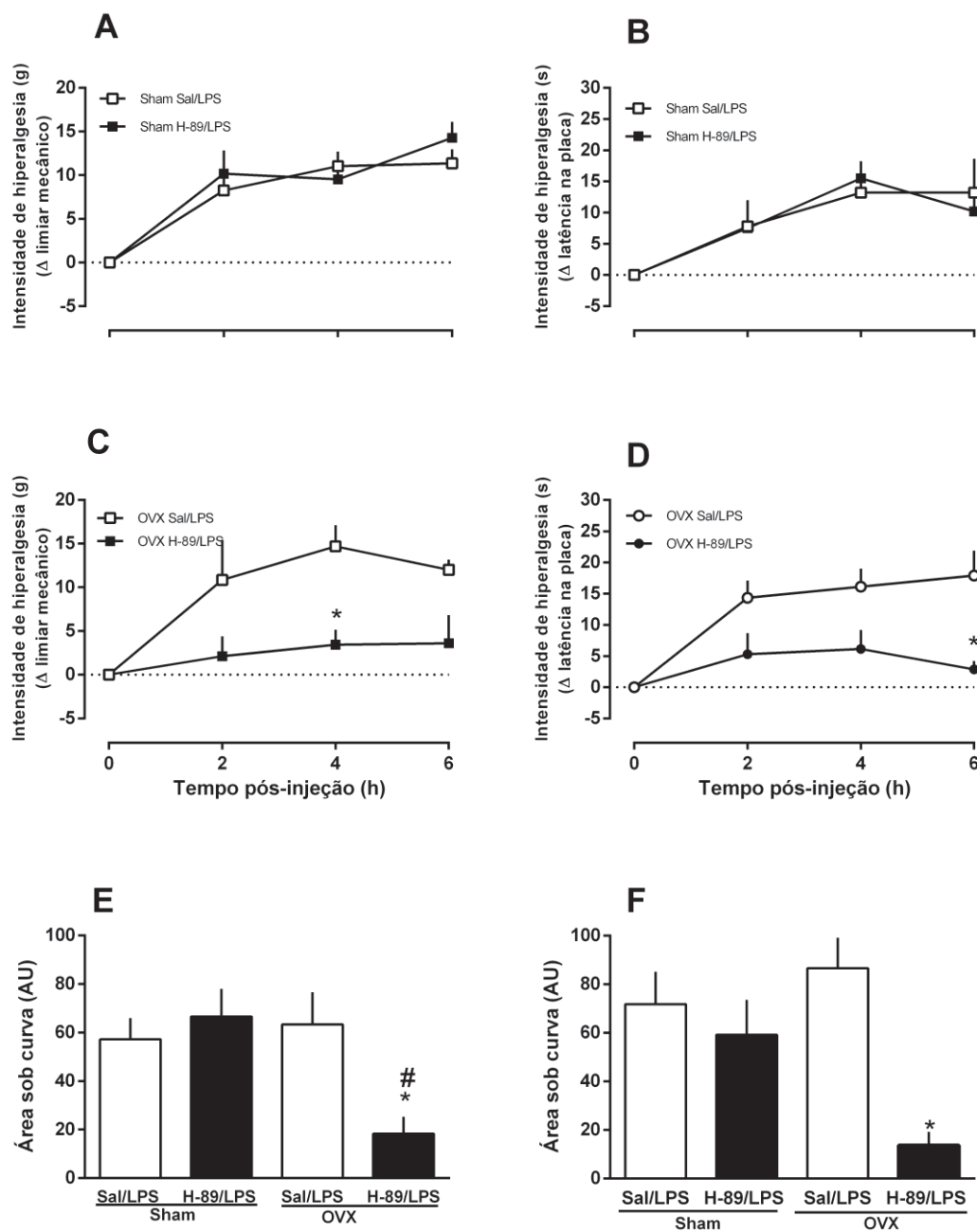


Figura 11: Efeito do inibidor de PKA H-89 na hiperalgesia mecânica e térmica induzida por LPS i.p. em ratas sham-operadas e OVX. Ratas sham-operadas foram tratadas com H-89 (1 μ g / 2 μ l, i.c.v) ou veículo (solução salina) e após 15 min receberam LPS (50 μ g/kg, i.p.). A hiperalgesia mecânica (A,C) e a hiperalgesia térmica (B, D) foram avaliadas nos momentos indicados. A área sob curva em E e F foi calculada com base nos dados em A e C e B e D, respectivamente. Os dados mostram a média \pm e.p.média da intensidade da hiperalgesia (alteração no limiar mecânico em g ou a alteração na latência na placa aquecida em s) ou área sob curva (AU, unidades arbitrárias) (n = 6-10). * denota diferença quando comparado ao respectivo grupo Sal/LPS, p <0,05. # denota diferença quando comparado ao grupo H-89/LPS, p <0,05.

4.8. Efeito do inibidor Epac ESI-09 na hiperalgesia induzida por LPS

O inibidor de Epac, ESI-09, foi capaz de inibir a hiperalgesia mecânica (Fig. 7A) e térmica (Fig. 7B), na 6ª hora, apenas em animais falso-operados, de maneira similar ao que ocorre na hiperalgesia por PGE₂. Esses achados se confirmam pela análise de área sob curva nas figuras 7E e 7F.

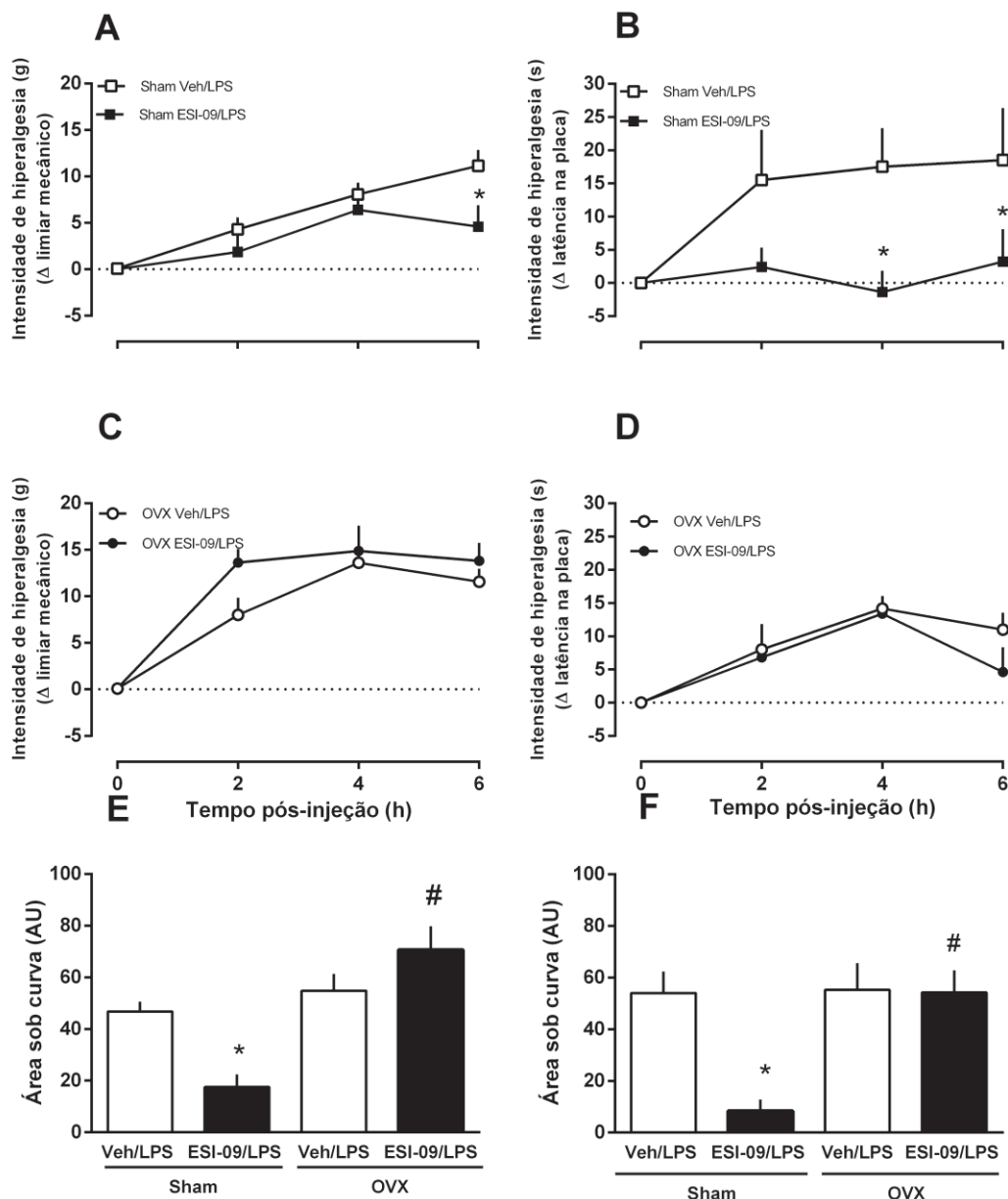


Figura 12: Efeito do inibidor de Epac, ESI-09, na hiperalgesia mecânica e térmica induzida por LPS i.p. em ratas falso-operadas e OVX. Ratas falso-operadas foram tratadas com ESI-09 (350 ng / 2 μ l, i.c.v) ou veículo (DMSO) e após 15 min receberam LPS (50 μ g/kg, i.p.). A hiperalgesia mecânica (A, C) e a hiperalgesia térmica (B, D) foram avaliadas nos momentos indicados, a área sob curva em E e F foram calculadas com base nos gráficos A, C, B e D, respectivamente. Os dados mostram a média \pm e.p.média da intensidade da hiperalgesia (alteração no limiar mecânico em g ou a alteração na latência na placa aquecida em s) ou a área sob curva (AU, unidades arbitrárias) (n = 6-10). * denota diferença quando comparado ao respectivo grupo Veh/LPS, p <0,05. # denota diferença quando comparado ao grupo Sham / H-89/LPS, p <0,05.

5.DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que não há diferença no limiar mecânico ou térmico em ratas em relação às diferentes fases do ciclo estral, especificamente animais PE e DE, e OVX. Também mostramos que tanto a hiperalgesia mecânica quanto a térmica induzida pelo LPS durante a síndrome da doença em ratas, são semelhantes em intensidade. No entanto, mostramos evidências de que os mecanismos, particularmente relacionados à sinalização da PGE₂, envolvidos nessa hiperalgesia podem ser diferentes entre ratas com ciclo estral preservado e ratas ovariectomizadas.

Neste estudo, as ratas OVX, PE e DE não apresentaram diferença entre o limiar basal de hiperalgesia mecânica e latência basal na placa aquecida. Nossos experimentos foram realizados na terceira semana após o procedimento cirúrgico (OVX ou falso-operado). Existe muita controvérsia presente na literatura, no que diz respeito aos efeitos da ovariectomia no limiar mecânico e resposta ao estímulo térmico. Por exemplo, SANOJA E CERVERO (2008) mostraram que camundongos OVX desenvolveram hiperalgesia mecânica abdominal, bem como na pata, após 3 a 4 semanas, com duração de 5 semanas, e diminuição da latência da resposta basal à placa aquecida até a 4ª semana. Ainda, não foram encontradas diferenças entre as diferentes fases do ciclo estral. No estudo de LI e colaboradores (2014), a hiperalgesia térmica desenvolveu-se primeiro, cerca de 2 semanas após a ovariectomia, enquanto a hiperalgesia mecânica se desenvolveu mais tardiamente, após 5 semanas. Diferentemente, MA *et al.* (2011) encontraram diferença significativa no limiar mecânico da pata entre ratas OVX e ratas com ciclo estral preservado, 2 semanas após a cirurgia, mas nenhuma diferença foi encontrada no limiar térmico avaliado após 4

semanas. De maneira oposta, HENANDEZ-LEON *et al.* (2018) não relataram diferenças no limiar mecânico entre ratas OVX e ratas com ciclo estral preservado, 2 semanas após a cirurgia, similarmente ao encontrado no presente estudo. Não foi possível encontrar uma explicação clara para esses diferentes resultados na literatura. No entanto, os resultados de outros autores aqui citados sugerem que a hiperalgesia térmica aparece mais cedo, em torno de duas semanas, enquanto a hiperalgesia mecânica aparece entre 4 a 5 semanas após a cirurgia. Neste estudo, os animais foram avaliados entre a terceira e a quarta semana e, portanto, isso pode sugerir que qualquer alteração nos limiares basais pode não ter sido detectada devido ao momento em que a hiperalgesia foi avaliada. Embora não tenhamos medido os níveis hormonais em nossos animais, a ausência de ciclo estral foi confirmada pelos lavados vaginais. Além disso, o aumento do padrão de ganho de peso também aponta para uma redução efetiva do estado hormonal após a ovariectomia. No entanto, para evitar possíveis interpretações errôneas de nossos dados, decidimos reportar nossos resultados em termos de alterações no limiar mecânico ou latência na placa aquecida em relação aos níveis basais. Além disso, nossos animais mostraram limiares mecânicos e térmicos semelhantes aos relatados anteriormente em ratos machos (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Os hormônios sexuais, e especialmente o estrogênio, parecem afetar diferentes tipos de dor, de maneira distinta. A saber, SANOJA E CERVERO (2005) estabeleceram um modelo de dor abdominal, em que camundongos fêmeas submetidas a ovariectomia desenvolvem hiperalgesia mecânica 5 semanas após a cirurgia, quando comparados com animais controle (intactos) e com animais sham-operados, como mencionado anteriormente. A hiperalgesia

foi revertida pelo tratamento com 17β -estradiol. Da mesma forma, MA *et al.* (2011) mostraram que ratas OVX desenvolveram hiperalgesia mecânica que foi revertida pela reposição de estrogênio, sugerindo que este hormônio pode modular negativamente a dor. Esses autores sugeriram que essa hiperalgesia se deve a uma expressão aumentada de receptores purinérgicos após ovariectomia. Portanto, a ausência de hormônios sexuais, e particularmente de estrogênio, aumenta a nocicepção aumentando a expressão de receptores purinérgicos.

Adicionalmente, LI *et al.* (2014) também mostraram que animais OVX desenvolveram hiperalgesia térmica na cauda proximal e distal 2 semanas após a cirurgia e hiperalgesia mecânica após 5 semanas, a qual foi abolida pela reposição de estrogênio. Além disso, esses autores também mostraram que, embora os animais OVX apresentassem uma resposta aumentada na segunda fase da nocicepção induzida por formalina, a hiperalgesia mecânica pela constrição crônica do nervo ciático foi a mesma em ratos falso-operados e OVX. MARTÍNEZ-GOMEZ *et al.* (1994), não mostraram influência da ovariectomia na hiperalgesia térmica avaliada pelo teste de retirada da cauda. Em conjunto, esses resultados sugerem que, enquanto a ausência de estrogênio pode aumentar a sensibilidade à estímulos nociceptivos em alguns casos, pode não afetar outros, e, portanto, a reposição com estrogênio traria benefícios no controle de alguns tipos de dor.

De maneira contrária, DINA *et al.* (2001) demonstraram que a ovariectomia em ratas impediu a indução de neuropatia periférica induzida por etanol e a reposição de estrogênio restabeleceu essa condição. Da mesma forma, VERMEER *et al.* (2015) mostraram que ratas OVX que receberam uma

mistura de mediadores inflamatórios, após uma exposição a um nível de estradiol equivalente aos níveis alcançados em animais em PE, alteraram o comportamento de *grooming* facial e outros comportamentos relacionados à enxaqueca, sugerindo que altos níveis desse hormônio podem estar implicados na prevalência de enxaqueca em mulheres. Mais recentemente, PAYRITS *et al.* (2017) demonstraram que o estrogênio modula os canais iônicos de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1), e como consequência, camundongos fêmeas com níveis mais altos de estrogênio na corrente sanguínea mostram uma sensibilidade aumentada tanto a estímulos térmicos como mecânicos, mesmo sem desafio imunológico. Essa sensibilidade aumentada é abolida quando o canal TRPV1 é silenciado em camundongos fêmeas, quando avaliadas na fase de estro e proestro. Ainda, quando os animais OVX são tratados com estradiol e resiniferotoxina (agonista de TRPV1), o comportamento nocifensivo associado é mais intenso. Portanto, esses resultados sugerem que, para outros tipos de dor, a presença de estrogênio pode ter um papel pronociceptivo. Ainda, um estudo de coorte, recente, com pacientes portadoras de câncer de mama, em terapia hormonal com inibidores da aromatase e/ou tamoxifeno, demonstrou que mulheres com câncer hormônio-dependente, em tratamento com inibidores endócrinos, têm maiores chances de desenvolver comorbidades como síndromes dolorosas e inflamatórias (NG *et al.*, 2018). Entretanto, não encontramos estudos que avaliassem a influência dos hormônios sexuais na resposta hiperalgésica observada durante a síndrome da doença.

Nossos resultados não mostraram diferença entre ratas fêmeas falso-operadas (PE ou DE) e OVX, no que diz respeito à resposta hiperalgésica produzida pela injeção sistêmica de LPS. Isso foi surpreendente porque, em um

estudo recente e usando a mesma dose de LPS, observamos que as ratas OVX têm uma resposta febril mais intensa, outro sinal de síndrome de doença, quando comparadas com ratas em fases diversas do ciclo estral. Essa resposta febril aumentada poderia ser atribuída, pelo menos em parte, ao fato de que as ratas OVX que receberam LPS têm expressão aumentada de COX-2 no hipotálamo, o que leva a uma produção mais pronunciada de PGE₂, observada no líquido cefalorraquidiano (BRITO *et al.*, 2016). Há evidências consistentes na literatura que o hipotálamo está envolvido na hiperalgesia observada durante a síndrome de doença (SAPER *et al.*, 2013). O hipotálamo está, também, implicado na modulação da percepção da dor, pois a ativação de neurônios na área pré-óptica medial leva a um aumento da expressão de *c-fos* na substância cinzenta periaquedutal, que é bem conhecida por seu papel na modulação da dor (RIZVI *et al.*, 1996). Além disso, ABE *et al.* (2001) demonstraram que a injeção intravenosa de LPS induziu a produção de prostanoídes na área pré-óptica do hipotálamo, o que leva à hiperalgesia antes do desenvolvimento da febre. Assim, esperava-se que os animais OVX apresentassem uma resposta hiperalgésica mais intensa ao LPS. Este fato levou-nos a investigar a hiperalgesia, tanto mecânica quanto térmica, de animais OVX e sham-operados, pela injeção i.c.v. de PGE₂.

De fato, a resposta induzida por PGE₂ administrada no ventrículo lateral direito em ratas OVX foi mais sustentada, em comparação com animais falso-operados, que mostraram uma resposta intensa e rápida que durou apenas 30 minutos. Em primeiro lugar, vale a pena notar que a hiperalgesia mecânica induzida por injeção i.c.v de PGE₂ em animais falso-operados está temporalmente relacionada à resposta febril induzida pela PGE₂ (FRAGA *et al.*,

2008; BRITO *et al.*, 2016), enquanto a hiperalgesia térmica pode ser detectada em medidas posteriores. Apesar dessas pequenas diferenças, não encontramos discrepância adicional entre os resultados globais obtidos na hiperalgesia mecânica e térmica. Essa semelhança pode estar relacionada ao fato de que muitos mecanismos centrais para o controle da dor são compartilhados por diferentes modalidades de dor. Por exemplo, em um modelo de inflamação por adjuvante completo de Freund, KANAI *et al.* (2007) mostraram que tanto a hiperalgesia mecânica quanto a térmica são reduzidas pela administração central de antagonistas do TRPV1, enquanto apenas a hiperalgesia térmica, mas não a mecânica, é reduzida pela administração periférica dos mesmos antagonistas. Estes resultados sugerem que os mecanismos centrais para hiperalgesia mecânica e térmica podem ser compartilhados, enquanto diferenças podem existir em neurônios periféricos. Além disso, a semelhança no curso temporal da hiperalgesia encontrada em ambas as modalidades, ou seja, térmica e mecânica, poderia ser explicada pelo fato de que 35% das fibras C são sensíveis a estímulos mecânicos e térmicos (calor) (DUBIN E PATAPOUTIAN, 2010).

De modo a investigar as diferenças entre a hiperalgesia (mecânica e térmica) evocada por PGE₂ i.c.v. em animais sham-operados e OVX, foram avaliadas possíveis diferenças na sinalização intracelular. Está bem estabelecido que a sinalização por PKA está ativa durante a hiperalgesia induzida pela PGE₂. OUSEPH *et al.*, (1995) mostraram que a injeção do inibidor da PKA, WIPTIDE, diretamente na pata produz uma redução da hiperalgesia induzida pela PGE₂ também administrada na pata, sugerindo o envolvimento da ativação da PKA na sensibilização de neurônios periféricos. Subsequentemente,

CUNHA *et al.*, (1999) mostraram que a hiperalgesia induzida pela injeção local de PGE₂ na pata poderia ser revertida pelo tratamento local com o outro inibidor de PKA, H-89. Usando um modelo de hiperalgesia induzida por remifentanil, ZENG *et al.*, (2018) demonstraram que a injeção de H-89 no córtex cingulado anterior bloqueava a hiperalgesia e a fosforilação do receptor de glutamato nessa região, sugerindo que a PKA, agora no sistema nervoso central, também está envolvida no desenvolvimento de hiperalgesia. No entanto, não foram encontrados estudos sobre o envolvimento deste sistema na hiperalgesia induzida pela injeção central de PGE₂.

Surpreendentemente, nossos resultados mostraram que tanto a hiperalgesia térmica quanto a mecânica produzida pela PGE₂, administrada no ventrículo lateral, não foram revertidas pelo H-89 em animais falso-operados, enquanto os animais OVX se mostraram sensíveis ao mesmo inibidor da PKA. A eficácia deste inibidor na hiperalgesia induzida por PGE₂ em animais OVX sugere que esta dose é suficiente para inibir a resposta. Estes resultados mostram que, enquanto em animais OVX a hiperalgesia induzida pela PGE₂ no sistema nervoso central é dependente da ativação da sinalização via PKA, a resposta em ratas falso-operadas deve ser dependente de outras vias de sinalização por segundos mensageiros.

ALEY *et al.*, (2000) e PARADA *et al.* (2005) demonstraram que a injeção de PGE₂ na pata traseira de rato induz hiperalgesia que pode ser bloqueada pelos inibidores de PKA. No entanto, o pré-tratamento com carragenina na pata, induziu uma hiperalgesia mais prolongada permanecendo por três dias. A aplicação subsequente de PGE₂ nas patas induziu uma hiperalgesia aumentada e prolongada que não foi bloqueada por inibidores de PKA mas por inibidores de

PKC ϵ (PARADA *et al.*, 2003). Este fenômeno ocorre apenas em ratos machos e fêmeas OVX, mas não em fêmeas falso-operadas (JOSEPH *et al.*, 2003).

Foi demonstrado que, em condições normais, a PGE₂ induz respostas nociceptivas mediadas por receptores purinérgicos, bem como aumenta as correntes ativadas por eles nos neurônios do gânglio da raiz dorsal, pela ativação de PKA (WANG *et al.*, 2007a; WANG *et al.*, 2007b). No entanto, em uma inflamação crônica, a sinalização purinérgica nos neurônios da raiz dorsal está aumentada e esse aumento é mediado tanto pela PKA quanto pela PKC ϵ . Esses autores também sugeriram que, sob essa condição, o AMPc, além de ativar a PKA, também ativa a Epac, que por sua vez ativa a PKC (WANG *et al.*, 2007b). Decidimos então avaliar o envolvimento de Epac na hiperalgisia induzida por PGE₂ tanto em ratas OVX quanto falso-operadas.

As fêmeas falso-operadas se mostraram sensíveis ao inibidor de Epac, ESI-09, uma vez que este foi capaz de abolir a hiperalgisia térmica e mecânica produzida pela injeção central de PGE₂. No entanto, os animais OVX não mostraram sensibilidade ao mesmo inibidor. Esses achados sugerem que, enquanto em ratas OVX a hiperalgisia induzida pela administração central de PGE₂ é dependente da ativação de PKA, em fêmeas falso-operadas essa resposta é dependente da ativação da Epac-PKC ϵ . Embora avaliando respostas hiperalgésicas bastante diferentes (hiperalgia da resposta inflamatória versus síndrome da doença), o estudo de JOSEPH *et al.* (2012) e o presente estudo mostram que os mecanismos de sinalização da PGE₂ podem mudar em ratas e que essas mudanças podem estar relacionadas ao estado hormonal, particularmente à diminuição da produção de estrogênio, como no caso de animais OVX que têm a maior fonte de estrogênio retirada, os ovários.

De maneira a confirmar esta participação diferenciada de PKA e Epac na hiperalgesia de síndrome de doença, um último bloco de experimentos foi desenvolvido. Os resultados relativos à hiperalgesia por LPS e bloqueio da sinalização de PKA e Epac em animais OVX e falso-operados confirmam que, apesar da percepção global de hiperalgesia ser semelhante em animais falso-operados e OVX, a sinalização intracelular que é subsequente à ligação de PGE₂ a seus receptores, é diferente. Quando os animais falso-operados foram tratados com H-89, administrado diretamente do ventrículo lateral, não houve diferença na resposta hiperalgésica induzida por LPS. De maneira oposta, esses animais foram sensíveis ao tratamento central com ESI-09, o que sugere que a resposta hiperalgésica ao LPS, pelo menos no que diz respeito aos seus efeitos no sistema nervoso central durante a síndrome de doença, é dependente da via Epac/PKC. Os animais OVX, por outro lado, foram sensíveis ao tratamento central com H-89, mas não a ESI-09, ou seja, a ovariectomia modifica a sinalização central das prostaglandinas. É importante ressaltar que esse padrão de resposta é observado no sistema nervoso central, e não avaliamos se o mesmo ocorre periféricamente. Ainda, não se pode descartar a participação de outros mediadores diferentes da PGE₂, que poderiam contribuir diferentemente na resposta de hiperalgesia observada na síndrome de doença.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostra que, apesar da resposta hiperalgésica global à injeção sistêmica de LPS não ser diferente em animais ovariectomizados e com ciclo estral preservado, pode-se sugerir que um dos principais mediadores envolvidos na síndrome de doença, PGE₂ pode atuar de maneira diferente nos dois grupos.

A injeção central de PGE₂ mostrou que animais falso-operados e animais OVX respondem de maneira diferente, desenvolvendo um padrão hiperalgésico mais sustentado em animais OVX e uma resposta mais rápida e curta à PGE₂ em animais falso-operados.

O uso de bloqueadores específicos de segundos mensageiros intracelulares envolvidos na sinalização da PGE₂ mostrou que esta depende de PKA em animais OVX, em contrariedade com o que é observado em animais falso-operados. Em animais falso-operados, há resposta à injeção do bloqueador de Epac, o que sugere que, nesses animais, a PGE₂ depende deste mensageiro para produzir hiperalgesia. Estes achados confirmam-se quando os animais são tratados com LPS, sendo observados os sinais de síndrome de doença, levando, provavelmente, à produção de PGE₂. A hiperalgesia produzida pelo LPS pôde ser modificada pela presença do inibidor de PKA, em animais OVX, e pelo inibidor de Epac, em animais falso-operados. Isso indica que, de maneira geral, a resposta de hiperalgesia na síndrome de doença, observada no modelo estudado, não é diferente em intensidade nos grupos estudados, porém o mecanismo pelo qual se desenvolve pode ser distinto.

Mesmo que o tratamento para o tipo de dor aqui explorada, ou seja, hiperalgesia relacionada à síndrome de doença, permaneça tendo como base o bloqueio da síntese de prostaglandinas por medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais, essas diferenças podem se estender a outras modalidades de dor, principalmente quando há correlação entre a síndrome dolorosa e sexo do paciente e/ou estado hormonal, como por exemplo na síndrome do túnel do carpo e a fibromialgia. A compreensão dessas diferenças certamente teria implicações importantes na escolha do tratamento da dor para mulheres em diferentes fases da vida.

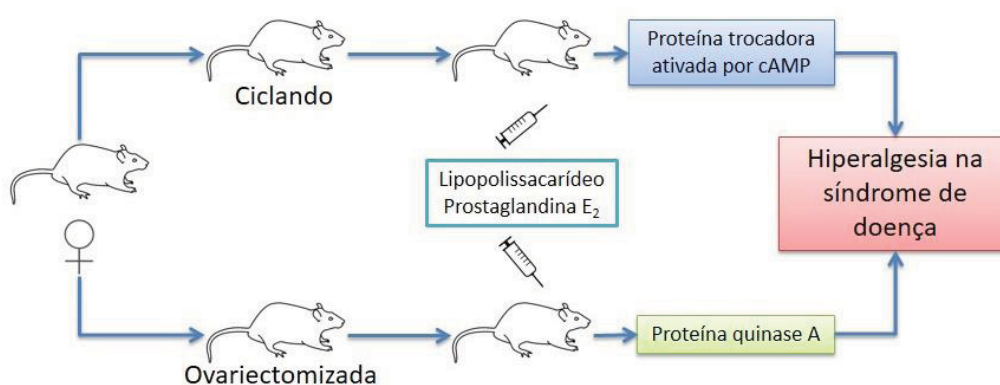


Figura 13: Resumo dos achados deste estudo.

7 REFERÊNCIAS

ABE, M. OKA, T., HORI, T., TAKAHASHI, S. Prostanoids in the preoptic hypothalamus mediate systemic lipopolysaccharide-induced hyperalgesia in rats. **Brain Research**. 2001; 916: 41–49.

ALEY, K.O., Levine, J.D., Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **The Journal of Neuroscience**, 1999; 19: 2181-6

ALEY, K.O., MESSING, R.O., MOCHLY-ROSEN, D. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. **The Journal of Neuroscience**. 2000; 20: 4680-4685.

BEAVO, J.A., BRUNTON, L.L., Cyclic nucleotide research still expanding after half a century. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 2002; 3: 710–718.

BERKELEY, K.J. Balancing nociception in cycling females. **Pain**. 2009, 146:1-2: 9-10.

BRITO, H.O., RADULSKI, D.R., WILHELMS, D.B., STOJAKOVIC, A., BRITO, L.M.O., ENGBLOM, D., FRANCO, C.R.C., ZAMPRONIO, A.R., Female Sex Hormones Influence the Febrile Response Induced by Lipopolysaccharide, Cytokines and Prostaglandins but not by Interleukin-1beta in Rats. **Journal of Neuroendocrinology**. 2016, 28:10.

BROD, L.M.P., FRONZA, M.G., VARGAS, J.P., LUDTKE, D.S., BRÜNING, C.A., SAVEGNAGO, L. Modulation of PKA, PKC, CAMKII, ERK ½

pathways is involved in the antidepressant-like effect of (octylseleno)-xylofuranoside (OSX) in mice. **Psychopharmacology**. 2017; 234:717–725.

CALIGIONI, C. Assessing reproductive status/stages in mice. *Current Protocols in Neuroscience*. 2009, APPENDIX 4I.

CANNON, J.G., Perspective on fever: the basic science and conventional medicine. **Complementary Therapies in Medicine**. 2013; 21: S54-60

CUNHA, F.Q., TEIXEIRA, M.M., FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems – cyclic AMP and cyclic GMP – on inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**. 1999; 127: 671–678

DE LUCA, L.A. Jr, ALMEIDA, R.L., DAVID, R.B., DE PAULA, P.M., ANDRADE, C.A., MENANI, J.V. Participation of α_2 -adrenoceptors in sodium appetite inhibition during sickness behavior following administration of lipopolysaccharide. **The Journal of Physiology**. 2016; 594:1607-16.

DINA, O.A., GEAR, R.W., MESSING, R.O., LEVINE, J.D. Severity of alcohol-induced painful peripheral neuropathy in female rats: role of estrogen and protein kinase (A and Cepsilon). **Neuroscience**. 2007; 145: 350-6.

DUBIN, A.E., PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**. 2010;120: 3760-3772.

DUNCAN, M., GALIC, M.A., WANG, A., CHAMBERS, A.P., MCCAFFERTY, D.M., MCKAY, D.M., SHARKEY, K.A., PITTMAN, Q.J. Cannabinoid 1 receptors are critical for the innate immune response to TLR4

stimulation. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**. 2013; 305: R224-31.

EARN, D.J.D., ANDREWS, P.W., BOLKER, B.M. Population-level effects of suppressing fever. **Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences**. 2014; 7; 281:778.

ELLIS, T.N., KUEHN, M.J.. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 2010; 74: 81–94.

ELMQUIST, J.K., SCAMMELL, T.E., SAPER, C.B. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. **Trends in Neuroscience**. 1997; 20: 565-70.

ENGSTRÖM, L., RUUD, J., ESKILLSON, A., LARSSON, A., MACKLERLOVA, L., KUGELBERG, U., QIAN, H., VASILACHE, A.M., LARSSON, P., ENGBLOM, D., SIGVARDSSON, M., JONSSON, J.I., BLOMQVIST, A. Lipopolysaccharide-Induced Fever Depends on Prostaglandin E2 Production Specifically in Brain Endothelial Cells. **Endocrin**. 2012; 153:4849–4861

FIELDS, H.L., BASBAUM, A.I., HEINRICHER, M.M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: **Textbook of Pain** . 5th ed. Burlington, Massachusetts, USA: Elsevier Health Sciences; 2005:125–142.

FRAGA, D., MACHADO, R.R., FERNANDES, L.C., SOUZA G.E.P., ZAMPRONIO, A.R. Endogenous opioids: role in prostaglandin-dependent and -

independent fever. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 2008; 294: R411–R420.

HANNESTAD, J., GALLETZOT, J.D., SCHAFBAUER, T., LIM, K., KLOCZYNSKI, T., CARSON, R.E., DING, Y.S., COSGROVE, K.P. Endotoxin-induced systemic inflammation activates microglia: [¹¹C]PBR28 positron emission tomography in nonhuman primates. **Neuroimage**. 2012; 63:232-9.

HERNANDEZ-LEON, A., DE LA LUZ-CUELLAR, Y.E., GRANADOS-SOTO, V., GONZÁLEZ-TRUJANO, M.E., FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Sex differences and estradiol involvement in hyperalgesia and allodynia in an experimental model of fibromyalgia. **Hormones and Behavior**. 2018; 97:39-46.

HORI, T., OKA, T., HOSOI, M., ABE, M., OKA, K.. Hypothalamic mechanisms of pain modulatory actions of cytokines and prostaglandin E2. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2000; 917: 106-20.

HUANG, M.L, GU, Y. Epac and nociceptor sensitization. **Molecular Pain**. 2017;13: 1–10.

IACOVIDES, S., AVIDON, I., BAKER, F.C. Does pain vary across the menstrual cycle? A review. **European Journal of pain**. 2015; 19: 1389-1405.

JOSEPH, E.K., PARADA, C.A., LEVINE, J.D. Hyperalgesic Priming in the rat demonstrates marked sexual dimorphism. **Pain**. 2003; 105: 143-150.

JOSEPH, E.K., LEVINE, J.D. Sexual Dimorphism in endothelin-1 induced mechanical hyperalgesia in the rat. **Experimental Neurology**. 2012; 223: 505-512.

KANAI, Y., HARA, T., IMAI, A., SAKAKIBARA, A. Differential involvement of TRPV1 receptors at the central and peripheral nerves in CFA-induced mechanical and thermal hyperalgesia. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 2007; 59: 733–738

KARSHIKOFF, B., JENSEN, K.B., KOSEK, E., KALPOUZOS, G., SOOP, A., INGVAR, M., OLGART HÖGLUND, C., LEKANDER, M., AXELSSON, J. Why sickness hurts: A central mechanism for pain induced by peripheral inflammation, **Brain, Behavior, and Immunity**. 2016; 57: 38-46.

KAVALIERS, M., INNES, D.G.L. Novelty-induced opioid analgesia in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): sex and population differences. **Behavioral and Neurobiology** 1988; 49: 54-60.

KAWABATA, A. Prostaglandin E₂ and Pain- an update. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 2011;34(8):1170-3.

KERMATH, B.A., GORE, A. C. Neuroendocrine control of the transition to the reproductive senescence: lessons learned from the female rodent model. **Neuroendocrinology**. 2012, 96: 1–12.

LAU, B.K., VAUGHAN, C.W. Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. **Current Opinion in Neurobiology**. 2014, 29: 159-164.

LI, L.H., WANG, Z.C., YU, J., ZHANG, Y.Q. Ovariectomy results in variable changes in nociception, mood and depression in adult female rats. **Plos one**. 2014; 4: 7-9.

LOYD, D.R., MURPHY, A.Z. The role of periaqueductal gray in modulation of pain in males and females: are the anatomy and physiology really that different? **Neural Plasticity**. 2009; 2009: 462879

MAIER, S.F., WIERTELAK, E.P., MARTIN, D., WATKINS, L.R. Interleukin-1 mediates the behavioral hyperalgesia produced by lithium chloride and endotoxin. **Brain Research**. 1993; 623: 321-4.

MA, B., YU, L.H., FRAN, J., CONG, B., HE, P., NI, X., BURNSTOCK, G. Estrogen Modulation of Peripheral Pain Signal: Involvement of P2X(3) Receptors **Purinergic Signalling**. 2011; 7: 73-83.

MARTÍNEZ-GOMEZ, M., CRUZ, Y., SALAS, M., HUDSON, R., PACHECO, P. Assessing pain threshold in the rat: changes with estrus and time of the day. **Physiology & Behavior**. 1994; 55:651-657.

MATULEF K., ZAGOTTA W.N. Cyclic nucleotide-gated ion channels. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. 2003; 19: 23–44.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**. 2001; 1: 135–145

MILLER, S.I., ERNST, R.K., BADER, M.W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nature Reviews Microbiology**. 2005; 3: 36-46.

NELSON, J.F., FELICIO, L.S., RANDALL, P.K., SIMS, C., FINCH, C.B. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I cycle frequency, length and vaginal cytology. **Biology of Reproduction**. 1982; 27: 327-339.

NG, H.S., BOGDA, K., RODER, D., NIYONSENGA, T., VITRY, A. Incidence of comorbidities in women with breast cancer treated with tamoxifen or an aromatase inhibitor: an Australian population-based cohort study **Journal of Comorbidity**. 2018, 8: 16-24.

OLIVEIRA, B.M.T., TELLES, T.M.B.B., LOMBA, L.A., CORREIA, D., ZAMPRONIO, A.R. Effects of binge-like ethanol exposure during adolescence on the hyperalgesia observed during sickness syndrome in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 2017; 160: 63-69.

OUSEPH AK, KHASAR SG, LEVINE JD. Multiple second messenger systems act sequentially to mediate rolipram-induced prolongation of prostaglandin E₂-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **Neuroscience**. 1995; 64:769–776.

PACE, S., ANTONIETTA, R., KRAUTH, V., DEHM, F., TROISI, F., BILANCIA, R., WEINIGEL, C., RUMMLER, S., WERZ, O., SAUTEBIN, L. Sex differences in prostaglandin biosynthesis in neutrophil during acute inflammation. **Scientific Reports**. 2017; 7: 3759

PARADA, C.A., YEH, J.J., JOSEPH, E.K., LEVINE, J.D. Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. **European Journal of Neuroscience**. 2003; 17: 1847-1852.

PARADA, C.A., REICHLING, D.B. AND LEVINE, J.D. Chronic hyperalgesia priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCepsilon second messenger pathways. **Pain**. 2005; 113: 185-190.

PAREKH, D.B., ZIEGLER, W., PARKER, P.J. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. **The Embo Journal**. 2000; 19:496 –503.

PAXINOS, G. AND C. WATSON, The rat brain in extereotaxic coordinates. 1998, **San Diego: Academic Press**.

PAYRITS, M., GHY, É., CSEKO, K., POHOCZKY, K., BOLCSKEI, K., ERNSZT, D., BARABÁS, K., SZOLCSÁNYI, J., ÁBRAHÁM, I.M., HELYES, Z., SZOKE, É. Estradiol Sensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in Pain Responses. **Endocrinology**. 2017; 158:3249–3258

RADULSKI, D. R. **Sistema RANK/RANKL/OPG na resposta febril induzida por endotoxina em ratos machos e fêmeas**. Dissertação de Mestrado. UFPR, 2018.

REN, K., DUBNER, R., Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature Medicine**. 2010; 16: 1267-1276.

RIZVI, T.A., MURPHY, A.Z., ENNIS, M., BEHBEHANI, M.M., SHIPLEY, M. Medial Preoptic Area Afferents to Periaqueductal Gray Medullo Output Neurons: A Combined Fos and Tract Tracing Study. **The Journal of Neuroscience**. 1996; 16:333-344

ROSEN, S., HAM, B., MOGIL, J.S. Sex differences in neuroimmunity and pain. **Journal of Neuroscience Research**. 2017; 95: 500-508.

SANDIEGO, C.M., GALLEZOT, J.D., PITTMAN, B., NABULSI, N., LIM, K., LIN, S.F., MATUSKEY, D., LEE, J.Y., O'CONNOR, K.C., HUANG, Y., CARSON, R.E., HANNESTAD, J., COSGROVE, K.P. Imaging robust microglial activation after lipopolysaccharide administration in humans with PET. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America. 2015; 112: 12468-73

SANOJA, R., CERVERO, F. Estrogen-dependent abdominal hyperalgesia induced by ovariectomy in adult mice: a model of functional abdominal pain. **Pain.** 2005;118: 243-56.

SANOJA, R., CERVERO, F. Estrogen modulation of ovariectomy-induced hyperalgesia in adult mice. **European Journal of Pain.** 2008; 573-581.

SAPER, C.B., ROMANOVSKY, A.A., SCAMMELL, T.E. Neural circuitry engaged by prostaglandins during the sickness syndrome. **Nature Neuroscience.** 2012; 15: 1088-95.

SIMPSON, J., KELLY, J.P. An investigation on whether there are differences in certain behavioural and neurochemical parameters in the rat. **Behavioural Brain Research.** 2012; 229:289–300

TAIWO, Y.O., LEVINE, J. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience.** 1991; 44: 131-5

TAKASU, K., KINOSHITA, Y., ONO, H., TANABE, M. Protein kinase A-dependence of the supraspinally mediated analgesic effects of gabapentin on thermal and mechanical hypersensitivity. **J Pharmacol Sci.** 2009; 110: 223 – 226

TELLES, T.M.M.B., OLIVEIRA, B.M.T., LOMBA, L.A., LEITE-AVALCA, M.C.G., CORREIA, D., ZAMPRONIO, A.R. Effects of binge-like ethanol exposure

during adolescence on the febrile response in rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. 2017; 41:507–515.

UCHASKOV, A., GONG, H., MCGINTY, D., SZYMUSIAK, R. Efferent projections from the median preoptic area nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. **Neuroscience**. 2007; 105:104-120.

UENO, A., MATSUMOTO, H., NARABA, H., IKEDA, Y., USHIKUBI, F., MATSUOKA, T., NARUMIYA, S., SUGIMOTO, Y., ICHIKAWA, A., OH-ISHI, S. Major roles of prostanoid receptors IP and EP(3) in endotoxin-induced enhancement of pain perception. **Biochemical Pharmacology**. 2001; 62: 157-60.

VERMEER, L.M., GREGORY, E., WINTER, M.K., MCCARSON, K.E., BERMAN, N.E. Behavioral effects and mechanism of migraine pathogenesis following estradiol exposure in a multibehavioral model of migraine in rat. **Experimental Neurology**, 2015; 263:8-16.

WALKER, K., DRAY, A., PERKINS, M. Hyperalgesia in rats following intracerebroventricular administration of endotoxin: effect of bradykinin B1 and B2 receptor antagonist treatment. **Pain**. 1996; 65: 211-9.

WALSH D.A., PERKINS, J.P., KREBS, E.G. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**. 1968; 243: 3763–3765.

WANG, C., LI, G.W., HUANG, L.Y. Prostaglandin E₂ potentiation of P2X₃ receptor mediated currents in dorsal root ganglion neurons. **Molecular pain**. 2007; 3:22.

WANG, C., GU, Y., LI, G.W., HUANG, L.Y. A critical role of the cAMP sensor Epac in switching protein kinase signalling in prostaglandin E₂-induced potentiation of P2X₃ receptor currents in inflamed rats. **Journal of Physiology**. 2007, 584:191-203.

WATKINS, L.R., GOEHLER, L.E. RELTON, J., BREWER, M.T., MAIER, S.F. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. **Brain Research**. 1995; 692: 244-50.

WEI, F., QIU, C.S., KIM, S.J., MUGLIA, L., MAAS, J.W., PINEDA, V.V., XU, H.M., CHEN, Z.F., STORM, D.R., MUGLIA, L.J., ZHUO, M. Genetic elimination of behavioral sensitization in mice lacking calmodulin-stimulated adenylyl cyclases. **Neuron**. 2002. 36: 713-26.

ZENG, J., LI, S., ZHANG, C., HUANG, G., YU, C. The Mechanism of Hyperalgesia and Anxiety Induced by Remifentanyl: Phosphorylation of GluR1 Receptors in the Anterior Cingulate Cortex. **Journal of Molecular Neuroscience**. 2018; 65: 93–101

ZHANG, G., MEREDITH, T.C., KAHNE, D. On the essentiality of lipopolysaccharide to gram-negative bacteria. **Current Opinion on Microbiology**. 2013: 16, 779–785.

ZIMMERMANN, M. Ethical Guidelines for investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. **Pain**. 1983: 16, 109-110.