

CAROLINE KIEL



**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA  
DOR INFLAMATÓRIA PERIFÉRICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Soares de Arruda

Co-orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

CURITIBA

2003

CAROLINE KIEL

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA  
DOR INFLAMATÓRIA PERIFÉRICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Soares de Arruda

Co-orientador: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

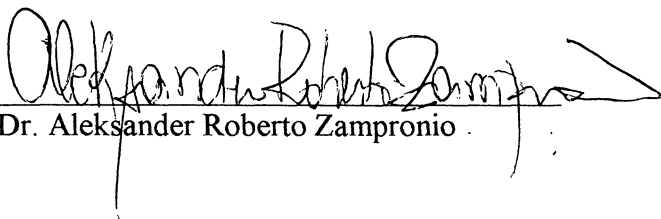
CURITIBA

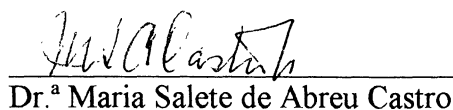
2003

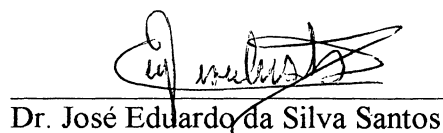


## PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA DOR INFLAMATÓRIA PERIFÉRICA**”, de autoria da Pós-Graduanda **CAROLINE KIEL**, e composta pelos Professores Dr.<sup>a</sup> Maria Consuelo Andrade Marques (Presidente); Dr. Aleksander Roberto Zampronio (UFPR), Dr.<sup>a</sup> Maria Salete de Abreu Castro (UFMG) e Dr. José Eduardo da Silva Santos. Atribui individualmente as seguintes notas: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio, nota A ( ); Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Salete de Abreu Castro, nota A ( ); e Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos, nota A ( ). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a Pós-Graduanda foi aprovada, com a nota A ( ). Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela coordenadora. Em Curitiba, 27 de junho de 2003.

  
Dr. Aleksander Roberto Zampronio

  
Dr.<sup>a</sup> Maria Salete de Abreu Castro

  
Dr. José Eduardo da Silva Santos

***Dedico esta dissertação à professora Ana Maria Soares de Arruda, pelo esforço e dedicação incondicional durante toda a realização deste trabalho.***



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Ana Maria Soares de Arruda pela colaboração ao meu desenvolvimento intelectual e pela importante lição de vida.

Ao professor Aleksander Roberto Zampronio pela contribuição fundamental durante toda a realização deste trabalho.

Aos professores Maria Salete de Abreu Castro e José Eduardo da Silva Santos pelas importantes considerações realizadas.

As minhas amigas Juliana Chichorro e Maria Fernanda Werner pelo apoio e colaboração no decorrer deste trabalho.

Aos meus amigos Daniel, Renata, Shirley, Melissa, Jaime e Kenia que contribuíram de alguma maneira para a realização desta dissertação.

Agradeço a todos os professores, técnicos e funcionários do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná que contribuíram de alguma forma com este trabalho.

Ao meu esposo Juliano pelo amor, amizade e companheirismo durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Wilson e Roseli, que sempre me incentivaram e me proporcionaram condições para a realização de mais esta etapa.

A todos os amigos e colegas que contribuíram de alguma forma para a conclusão desta dissertação.

Agradeço também à CAPES pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

|   |            |
|---|------------|
| <b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>  | <b>i</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>  | <b>iii</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>   | <b>iv</b>  |
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>vi</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>vii</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1. RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....   | 1          |
| 1.2. A RESPOSTA NOCICEPTIVA.....  | 1          |
| 1.3. ÓXIDO NÍTRICO COMO UMA MOLÉCULA SINALIZADORA.....  | 11         |
| <b>1.3.1. Óxido Nítrico: hiperalgésico ou analgésico.....</b>   | <b>15</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>  | <b>19</b>  |
| 2.1. OBJETIVO GERAL.....  | 19         |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 19         |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>20</b>  |
| 3.1. ANIMAIS.....   | 20         |
| 3.2. SUBSTÂNCIAS ALGOGÊNICAS, DROGAS E VEÍCULOS.....  | 20         |
| 3.3. TESTE DA FORMALINA (DUBUISSON & DENNIS, 1977).....   | 21         |
| 3.4. TRATAMENTO COM INIBIDORES DA NOS, SUBSTRATO PARA A<br>FORMAÇÃO DO NO E DOADORES DE NO SOBRE A<br>NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%..... | 24         |
| 3.5. CONTRA-PROVA DA ATUAÇÃO LOCAL DO NO NA NOCICEPÇÃO<br>INDUZIDA POR FORMALINA.....   | 24         |
| 3.6. SENSIBILIZAÇÃO DA PATA COM LPS PREVIAMENTE AO TESTE<br>DA FORMALINA.....   | 24         |
| 3.7. TRATAMENTO COM INIBIDORES DA NOS, SUBSTRATO PARA A<br>FORMAÇÃO DO NO E DOADORES DE NO PREVIAMENTE À<br>SENSIBILIZAÇÃO COM LPS.....           | 24         |
| 3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....   | 25         |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>   | <b>26</b>  |
| 4.1. CURVA DOSE RESPOSTA DA FORMALINA.....  | 26         |
| 4.2. EFEITO DOS INIBIDORES DA NO SINTASE NO TESTE DA<br>FORMALINA 0,3%.....   | 29         |
| 4.3. EFEITO DO SUBSTRATO E DO DOADOR PARA A FORMAÇÃO<br>DE NO NO TESTE DE FORMALINA 0,3%.....   | 34         |
| 4.4. EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM L-NMMA NA<br>NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5%.....  | 37         |
| 4.5. EFEITO DA SENSIBILIZAÇÃO DA PATA COM LPS NA<br>NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%.....   | 39         |
| 4.6. EFEITO DOS INIBIDORES DA NO SINTASE NO MODELO DE<br>SENSIBILIZAÇÃO DA PATA COM LPS.....  | 41         |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 4.7.      | EFEITO DO SUBSTRATO PARA A FORMAÇÃO DE NO E DO DOADOR DE NO NA POTENCIAÇÃO INDUZIDA POR LPS.....                 | 46        |
| 4.8.      | EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS NA PATA CONTRALATERAL SOBRE A RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR FORMALINA..... | 49        |
| 4.9.      | TABELA 1: RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS.....   | 51        |
| <b>5.</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>  | <b>52</b> |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>   | <b>62</b> |
| <b>7.</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>63</b> |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>FIGURA 01-</b> | EIXO SENSORIAL SOMÁTICO DO SISTEMA NERVOSO.....   | 03 |
| <b>FIGURA 02-</b> | EIXO ESPINOTALÂMICO DA TRANSMISSÃO<br>NOCICEPTIVA.....  | 06 |
| <b>FIGURA 03-</b> | SISTEMA DE ANALGESIA DO CÉREBRO E DA MEDULA<br>ESPINHAL.....  | 09 |
| <b>FIGURA 04-</b> | SÍNTESE DO NO.....  | 14 |
| <b>FIGURA 05-</b> | INJEÇÃO INTRAPLANTAR ( <i>ipl</i> ) NA PATA TRASEIRA<br>DIREITA DO ANIMAL.....  | 22 |
| <b>FIGURA 06-</b> | OBSERVAÇÃO DOS ANIMAIS DURANTE O TESTE DA<br>FORMALINA.....   | 22 |
| <b>FIGURA 07-</b> | RECOLHIMENTO DA PATA APÓS A INJEÇÃO<br>INTRAPLANTAR DE FORMALINA 0,3%.....  | 23 |
| <b>FIGURA 08-</b> | LAMBEDURA DA PATA APÓS A INJEÇÃO INTRAPLANTAR<br>DE FORMALINA 0,3%.....   | 23 |
| <b>FIGURA 09-</b> | EXEMPLO DA CURVA TEMPORAL NA RESPOSTA<br>INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DE<br>DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FORMALINA..... | 27 |
| <b>FIGURA 10-</b> | CURVA DOSE-RESPOSTA DA FORMALINA.....   | 28 |
| <b>FIGURA 11-</b> | EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM L-NAME NA<br>NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%.....                                     | 30 |
| <b>FIGURA 12-</b> | EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM L-NMMA NA<br>NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%.....                                     | 31 |
| <b>FIGURA 13-</b> | EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM AMT NA<br>NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%.....  | 32 |
| <b>FIGURA 14-</b> | EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM 7-NI NA<br>NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%.....                                       | 33 |
| <b>FIGURA 15</b>  | EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM L-ARGININA NA<br>NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%.....                                 | 35 |
| <b>FIGURA 16-</b> | EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM SNAP NA<br>NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%.....                                       | 36 |

|   |    |
|---|----|
| <b>FIGURA 17-</b> EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM L-NMMA NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA 2,5%.....                                  | 38 |
| <b>FIGURA 18-</b> EFEITO DA SENSIBILIZAÇÃO DA PATA COM LPS NO TESTE DA FORMALINA 0,3%.....  | 40 |
| <b>FIGURA 19-</b> EFEITO DO L-NAME SOBRE A POTENCIAÇÃO INDUZIDA POR LPS NA RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%.....        | 42 |
| <b>FIGURA 20-</b> EFEITO DO L-NMMA SOBRE A POTENCIAÇÃO INDUZIDA POR LPS NA RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%.....        | 43 |
| <b>FIGURA 21-</b> EFEITO DO AMT SOBRE A POTENCIAÇÃO INDUZIDA POR LPS NA RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%.....           | 44 |
| <b>FIGURA 22-</b> EFEITO DO 7-NI SOBRE A POTENCIAÇÃO INDUZIDA POR LPS NA RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%.....          | 45 |
| <b>FIGURA 23-</b> EFEITO DO 7-NI SOBRE A POTENCIAÇÃO INDUZIDA POR LPS NA RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%.....          | 47 |
| <b>FIGURA 24-</b> EFEITO DO SNAP SOBRE A POTENCIAÇÃO INDUZIDA POR LPS NA RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%.....          | 48 |
| <b>FIGURA 25-</b> EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS NA PATA CONTRALATERAL SOBRE A RESPOSTA NOCICEPTIVA INDUZIDA POR FORMALINA 0,3%..... | 50 |

## LISTA DE TABELAS

|                 |   |           |
|-----------------|---|-----------|
| <b>TABELA 1</b> | <b>RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS.....</b> | <b>51</b> |
|-----------------|---|-----------|

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ◆ ACPD – trans-1-amino-ciclopentil-1,3-dicarboxilato
- ◆ Ach – acetilcolina
- ◆ AE-ITU – S-2-aminoetil-isotiuréia
- ◆ AMPA – alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol
- ◆ AMPc – adenosina monofosfato cíclico
- ◆ AMT – 2 amino-5,6 dihidro-6 metil- 4H- 1,3-tiazina
- ◆ Asp – aspartato
- ◆ Ca<sup>2+</sup> – cálcio
- ◆ DAG – diacilglicerol
- ◆ D-NAME – D- N<sup>G</sup>-nitro arginina metil éster
- ◆ D-NMMA – N<sup>G</sup> -monometil – D arginina monoacetato
- ◆ eNOS – óxido nítrico endotelial
- ◆ EPM – erro padrão da média
- ◆ GABA – ácido  $\gamma$  - amino butírico
- ◆ GC – guanilato ciclase
- ◆ Glu – glutamato
- ◆ GMPc – guanosina monofosfato cíclico
- ◆ *ipI* – intraplantar
- ◆ IASP– Associação Internacional para o Estudo da Dor
- ◆ iNOS – óxido nítrico sintase induzida
- ◆ IP<sub>3</sub> – inositol 1,4,5-trifosfato
- ◆ i.t. – intratecal
- ◆ L-NAME – L -N<sup>G</sup>-nitro arginina metil éster
- ◆ L-NIO – L-N<sup>5</sup>-1-iminoetilornitina
- ◆ 7-Ni – 7 nitroindazol
- ◆ L-NMMA – N<sup>G</sup> -monometil – L arginina monoacetato
- ◆ LPS – lipopolissacarídeo
- ◆ LTB<sub>4</sub> – leucotrieno B<sub>4</sub>
- ◆ min – minuto

- ◆ n – número de animais
- ◆ NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
- ◆ NF- $\kappa$ B – fator nuclear  $\kappa$ B
- ◆ NMDA – N-metil-D-aspartato
- ◆ nNOS – óxido nítrico neuronal
- ◆ NO – óxido nítrico
- ◆ NOS – óxido nítrico sintase
- ◆ PBS – solução salina tamponada com fosfatos
- ◆ PGs – prostaglandinas
- ◆ PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>
- ◆ PIPS – potencial inibitório pós-sináptico
- ◆ pt – pata
- ◆ RMV – medula rostral ventromedial
- ◆ s – segundos
- ◆ SIN-1 – 3-morfolinosidnonimina
- ◆ SNAP – 5-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina
- ◆ SP – substância P
- ◆ v.o. – via oral
- ◆ 1400 W – N-3-aminometil-benzil-acetamidina



## RESUMO

Há duas décadas atrás, a descoberta do fator relaxante do endotélio, mais tarde identificado como NO, deu origem ao conceito de que uma molécula gasosa poderia ser uma substância sinalizadora no sistema biológico. Na dor, o NO gera conceitos contraditórios. Desta forma, o objetivo do nosso trabalho foi contribuir para a compreensão do papel do óxido nítrico na dor inflamatória, utilizando um único modelo, ou seja, a nocicepção induzida por formalina, para avaliar tanto a sensibilização do nociceptor quanto a nocicepção propriamente dita causada pela formalina. Os experimentos foram realizados utilizando ratos machos Wistar, pesando entre 180 e 250 g. O modelo experimental utilizado foi o teste da formalina. Neste teste, após a injeção da formalina (50  $\mu$ L), em diferentes concentrações, na pata traseira direita do animal, a intensidade da nocicepção pode ser medida através do tempo (s) de lambertura e recolhimento da pata. Esta resposta apresenta um perfil bifásico, onde a primeira fase reflete a ativação direta dos nociceptores pela formalina, enquanto que a segunda fase mostra o resultado da resposta inflamatória induzida pela formalina. A administração de formalina nas concentrações de 0,3; 0,6; 1,2 e 2,5% induziram uma resposta nociceptiva dose-dependente. A dose de 0,3% foi selecionada para que pudéssemos visualizar a participação do NO tanto na sensibilização quanto na nocicepção aguda. Os tratamentos foram administrados pela via *ipl* (20  $\mu$ L). Os resultados apresentados indicam a % máxima de redução ou potenciação da resposta nociceptiva. O pré-tratamento com os inibidores da NOS (L-NAME, 37-370nmol/pata; L-NMMA, 4-40 nmol/pata; AMT, 0,06-6 nmol/pata e 7-Ni, 6-60 nmol/pata) potenciaram a fase II (73, 116, 113 e 98 % respectivamente) da resposta nociceptiva a formalina 0,3%. O tratamento com o doador de NO (SNAP 13-130 nmol/pata) reduziu 69% a fase I da resposta a formalina 0,3%; e na fase II do teste, o SNAP (13-130 nmol/pata) e o substrato para a formação de NO (L-ARG 47-470 nmol/pata) reduziram 77 e 36%, respectivamente, o tempo de lambertura e recolhimento da pata do animal. O tratamento com L-NMMA (40nmol/pata) não modificou a resposta nociceptiva à formalina 2,5%. Para avaliarmos a participação do NO na sensibilização, os animais foram tratados com LPS (10 ou 100 ng/pata, *ipl*). O tratamento com LPS promoveu sensibilização da pata sobre a resposta nociceptiva à formalina 0,3%. O pré-tratamento dos animais, anteriormente à administração do LPS (10 ng/pata), com os inibidores da NOS (L-NAME, 370 nmol/pata; L-NMMA, 40nmol/pata; AMT, 6nmol/pata e 7-Ni, 60nmol/pata) potenciaram a fase II (44%, 46%, 52% e 79%, respectivamente) da resposta nociceptiva. O pré-tratamento dos animais, anteriormente à administração de LPS (100 ng/pata), com L-ARG (470 nmol/pata) ou SNAP (130 nmol/pata), reduziram a fase II (44 e 68% respectivamente) da resposta a formalina. Nenhum dos tratamentos modificou a resposta nociceptiva de animais que receberam salina previamente à formalina. Ainda, o tratamento com as diferentes drogas na pata contralateral não alterou a resposta nociceptiva a formalina em ambas as fases, mostrando que a atuação do NO nestes modelos é local. Estes dados nos permitem sugerir que o NO, nestes modelos está relacionado a um efeito antinociceptivo local, sendo possivelmente importante na sensibilização da fibra nociceptiva.

## ABSTRACT

Two decades ago, the discovery of nitric oxide (NO) gave the origin to a concept that a gaseous composition could be a signaling molecule in the biological system. During pain, NO generates contradictory concepts. So, the objective of our work was to make a contribution to the understanding of the role of nitric oxide in inflammatory pain, by using a unique model. In other words, the induced nociception by formalin was used in order to evaluate its role not even in the sensitization of the nociceptor but also in acute nociception caused by the formalin. The experiments were conducted using male Wistar rats, weighing 180-250 g. The experimental model used was the formalin test. In this test, after the injection of formalin (50  $\mu$ L) diluted in the right back paw of the animal, the intensity of pain can be measured through the time of licking and pulling back of the paw (s). This test presents a two-phase profile where the first phase reflects the direct activation of the nociceptors by the formalin, while the second phase shows the results of the induced inflammatory response by the formalin. The administration of formalin in the concentrations of 0,3; 0,6; 1,2 and 2,5 % induced a concentration related response. The 0,3% dose was selected so that we could visualize the participation of the NO in the sensitivity and also in acute nociception. The treatments were given by *ip*l (20  $\mu$ L) injection. The results presented indicate the maximum percentage of reduction or potentiation from the nociceptive response. The pre-treatment with the NOS (L-NAME, 37-370nmol/paw); (L-NMMA, 4-40 nmol/paw);(AMT, 0,06-6 nmol/paw); (7-Ni, 6-60 nmol / paw) inhibitors, potentiated phase II (73,116,113 and 98% respectively) of the nociceptive response to the 0,3 % formalin. The treatment with the NO donator (SNAP 13-130 nmol/paw) reduced 69 % phase I from the response to the 0,3 % formalin and in phase II of the test, the SNAP (13 – 130 nmol/paw) and the substratum for the formation of NO (L-ARG 47-470 nmol/paw) reduced 77 and 36 % respectively, the time of licking and pulling back of the of the animal paw. The treatment with L-NMMA (40 nmol/paw) didn't change the nociceptive response to the formalin 2,5%. In order to evaluate the participation of the NO in the sensitization, the animals were treated with LPS (10 or 100 ng/paw). LPS treatment promoted paw sensitization on the nociceptive response to formalin 0,3%. The animals pre-treatment, previously LPS (10 ng/paw) administration, with NOS inhibitors (L-NAME, 370nmol/paw); (L -NMMA, 40 nmol/paw); (AMT, 6 nmol/paw); (7-Ni, 60 nmol/paw), potentiated phase II (44%, 46%, 52% and 79% respectively) of the nociceptive response. The animals pre-treatment, previously LPS (100 ng/paw) administration, with L-ARG (470nmol/paw) and/or SNAP (130 nmol/paw), reduced phase II (44% and 68%) from nociceptive response to formalin. None of the treatments modified the nociceptive response of the animals that received saline previously formalin. Moreover, the treatment with different drugs in the contralateral paw does not modify the nociceptive response to formalin in both phases, showing that the performance of NO in these models is local. These data suggest that, in this model, NO participation is related to a local antinociceptive effect and it's possibly important to the sensitization of the nociceptive fiber.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A inflamação é uma resposta localizada de proteção ou um mecanismo de defesa do organismo a um estímulo agressor, visando a remoção deste e a restauração da integridade do tecido lesado. A inflamação é observada claramente em tecidos vascularizados, injuriados por agentes comumente de natureza microbiana. Existem ainda outros processos que podem desencadear a resposta inflamatória: agentes químicos (materiais corrosivos), físicos (radiação, trauma), necrose tecidual (infarto, isquemia) e reações de hipersensibilidade (alergia) são alguns exemplos. A inflamação aguda pode ser caracterizada por sinais cardinais clássicos, apontados por Cornelius Celsius (30 AC), “**rubor et tumor cum calore et dolore**” (“rubor e tumor com calor e dor”), podendo ainda apresentar um quinto sinal, acrescentado por Virchow (1821-1902), a “**functio lesae**” (perda da função). Esses sinais cardinais surgem como consequência das alterações do microambiente da área lesada, devido à liberação de uma série de mediadores químicos nesta área. O **rubor (eritema)** é causado pela vasodilatação acentuada e aumento do fluxo sanguíneo na área inflamada; o **tumor (edema)** ocorre devido ao acúmulo do exsudato rico em proteínas plasmáticas e leucócitos no espaço extravascular; o **calor** é consequência do aumento do fluxo sanguíneo (hiperemia) na região inflamada que leva ao aumento da temperatura local, e a **dor (nocicepção)** que é a sinalização da lesão do tecido, ocorre devido à sensibilização de nociceptores por mediadores químicos liberados no local. A **perda de função** ocorre quando o movimento de uma área inflamada é, consciente e reflexivamente, inibido pela dor e o edema severo, o que pode fisicamente levar à imobilização de parte do corpo ou quando ocorre morte tecidual em grande área (WEAVER, 1995).

### 1.2. A RESPOSTA NOCICEPTIVA

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita nestes termos”. Muitas, senão todas as enfermidades do corpo causam dor. Além disso, a capacidade de diagnosticar

diferentes doenças depende em grande parte do conhecimento sobre as várias formas da dor. A dor é um mecanismo de proteção do corpo; ocorre sempre que os tecidos estão sendo potencialmente lesados e faz com que a pessoa reaja no sentido de remover o estímulo doloroso ou proteger o local afetado (FLOREZ, 1993).

Segundo Price (1988), para que se possa compreender o processo doloroso é necessário diferenciar os componentes da experiência dolorosa:

- a) Componente sensodiscriminativo: está relacionado com as qualidades estritamente sensoriais da dor, ou seja, sua localização, sua intensidade, sua qualidade (dor pulsante, “agulhada”, “dor ardente” ).
- b) Componente cognitivo-avaliador: a dor é percebida não apenas como se está sentindo, mas também se considera o significado do que está ocorrendo, e o que pode ocorrer em relação a esta sensação. Esta capacidade de avaliar o porquê da sensação dolorosa, influencia muito na percepção da dor como sendo agradável ou desagradável.
- c) Componente afetivo-emocional: está intimamente relacionado com a questão anterior; a sensação dolorosa desperta um componente emocional onde se misturam desejos, esperanças, temores e angústias.

Muitas atividades do sistema nervoso são iniciadas por experiências sensoriais originárias de receptores sensoriais, seja receptores visuais, receptores auditivos, receptores para dor (terminações nervosas livres), receptores táteis (corpúsculo de Meissner) sobre a superfície do corpo ou outros tipos de receptores (Figura 1). Os receptores da dor, chamados de nociceptores, são terminações nervosas livres e se encontram na pele, no tecido celular subcutâneo, músculos, articulações e vísceras. Enquanto a dor representa uma percepção subjetiva com uma dimensão interpretativa, a nocicepção consiste na recepção dos estímulos pelos nociceptores que codificam sinais para fornecer informações ao Sistema nervoso central da existência da lesão tecidual. A nocicepção portanto, depende da geração, condução e transmissão de sinais elétricos ao longo de complexas vias nervosas. Estímulos capazes de produzir dor são denominados estímulos nociceptivos, e têm natureza física (calor, frio, pressão) ou química (substâncias irritantes) variada (MELZACK & WALL, 1965; FLOREZ, 1993).

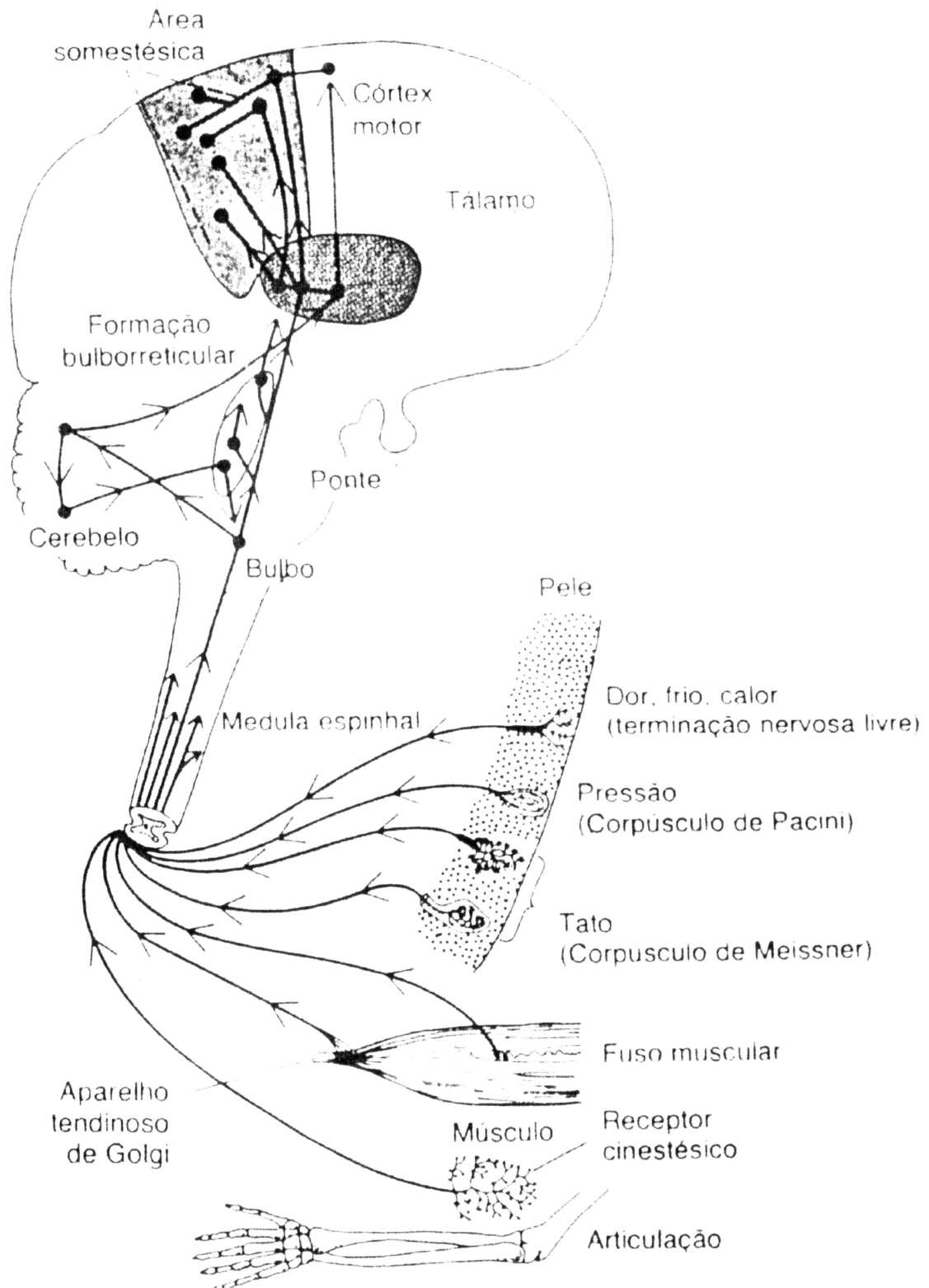


Figura 01: Eixo sensorial somático do sistema nervoso. As informações chegam ao sistema nervoso central por meio dos nervos espinhais e são conduzidas a múltiplas áreas sensoriais primárias na medula espinhal em todos os níveis, na substância reticular do bulbo, da ponte, do mesencéfalo, no cerebelo, tálamo e nas áreas somestésicas do cortex cerebral (GUYTON & cols, 1996).

A transdução da dor de origem química envolve interação com receptores de membrana acoplados a canais de íons e sistemas de segundo mensageiros, resultando em mudanças na excitabilidade da membrana celular. Neste ambiente, muitos estímulos químicos são capazes de iniciar uma cascata de sinais. Portanto, há um grande potencial para a amplificação e modulação do sinal, assim como oportunidade de sinergismo entre tecidos neuronais e não neuronais (DRAY e cols, 1994).

Os nociceptores são representados por terminais de fibras nervosas de neurônios cujos corpos celulares se encontram no gânglio da raiz dorsal dos nervos espinhais ou nos gânglios sensoriais dos nervos cranianos V, VII, IX e X. Estes neurônios, denominados neurônios aferentes primários, possuem um ramo periférico e um ramo central que adentra o corno dorsal da medula espinhal pela raiz dorsal. As fibras do neurônio aferente primário variam quanto ao grau de mielinização e à velocidade de condução dos estímulos. As fibras A $\delta$  possuem diâmetro pequeno e são finamente mielinizadas, fazem a condução de estímulos mecânicos e térmicos. A velocidade de condução do estímulo fica em torno de 5-30m/s. A ativação destes nociceptores está associada com sensações de dor aguda, como por exemplo uma picada de inseto. As terminações de outro tipo, as fibras C, são chamadas nociceptores polimodais, pois são ativados por vários tipos de estímulos de alta intensidade, como estímulos mecânicos, químicos e térmicos (mais de 45°C). São neurônios não-mielinizados, que conduzem o estímulo mais vagarosamente, em torno de 0,5 – 2m/s . Ambas as fibras, A $\delta$  e C, são amplamente distribuídas por toda a pele, assim como nos tecidos mais profundos (JESSEL & KELLY, 1991; BESSON & CHAOUCH, 1987).

No interior da substância cinzenta da medula espinhal, o ramo central do neurônio aferente primário faz sinapse com neurônios de segunda ordem. Usando critérios citoarquitetônicos, REXED (1952) dividiu a substância cinzenta espinhal em 10 lâminas ou camadas. Os corpos celulares dos neurônios de segunda ordem são encontrados principalmente na lâmina I (camada marginal), II (substância gelatinosa) III e IV (núcleo proprius) e a V e VI (camada profunda), e estes compõem o corno dorsal. A lâmina VII corresponde à substância cinzenta intermediária, lâminas VIII e IX compõem a porção medial e lateral ventral do corno, respectivamente, enquanto que a lâmina X fica na região circundante ao canal. As duas lâminas mais superficiais, I e II<sub>o</sub> (parte mais externa da lâmina II), junto com as lâminas V e VI e a

lâmina X, constituem as regiões predominantemente implicadas na recepção, processamento e transmissão rostral da informação nociceptiva. (REXED, 1952; MOLANDER & GRANT, 1986). Estes impulsos convergem para o tálamo, que ocupa a principal região responsável pela integração dos impulsos de dor. A partir do tálamo, neurônios de terceira ordem transmitem os impulsos para o córtex cerebral, onde ocorre o processamento das informações (FÜRST, 1998).

Os impulsos nociceptivos são retransmitidos para centros superiores no cérebro através de projeções dos neurônios de segunda ordem. As informações nociceptivas são transmitidas por cinco mecanismos ascendentes principais que se originam em diferentes lâminas do corno dorsal (JESSELL & KELLY, 1991).

1) O trato espinotalâmico é o mecanismo ascendente nociceptivo mais proeminente no cordão espinhal e se origina de neurônios da lâmina I e V-VII (figura 2).

2) Os axônios dos neurônios nociceptivos na lâmina VII e VIII fazem parte do trato espinoreticular, que ascende do quadrante anterolateral do cordão espinhal.

3) Os neurônios nociceptivos nas lâminas I e V são projetados através do trato espinomesencefálico para a formação mesencefálica reticular, a parte lateral da região cinzenta periaquedutal.

4) A maioria dos neurônios nas lâminas III e IV do corno dorsal respondem unicamente ao estímulo tátil, mas alguns também são ativados por estímulo nociceptivo. Os neurônios nestas duas lâminas são projetados através do trato espinocervical, o qual percorre o corno dorsal dorsolateral para o núcleo cervical lateral.

5) Alguns neurônios nociceptivos nas lâminas III e IV projetam seus axônios na coluna dorsal do cordão espinhal (JESSELL & KELLY, 1991).

A passagem de impulsos nociceptivos do aferente primário para o neurônio de segunda ordem depende da liberação local de neurotransmissores excitatórios. Dentre os neurotransmissores destacam-se a substância P, neurocininas, glutamato monoaminas (norepinefrina, serotonina), acetilcolina e o óxido nítrico, que será nosso objeto de estudo e por este motivo será discutido com mais detalhes adiante (FÜRST 1998).

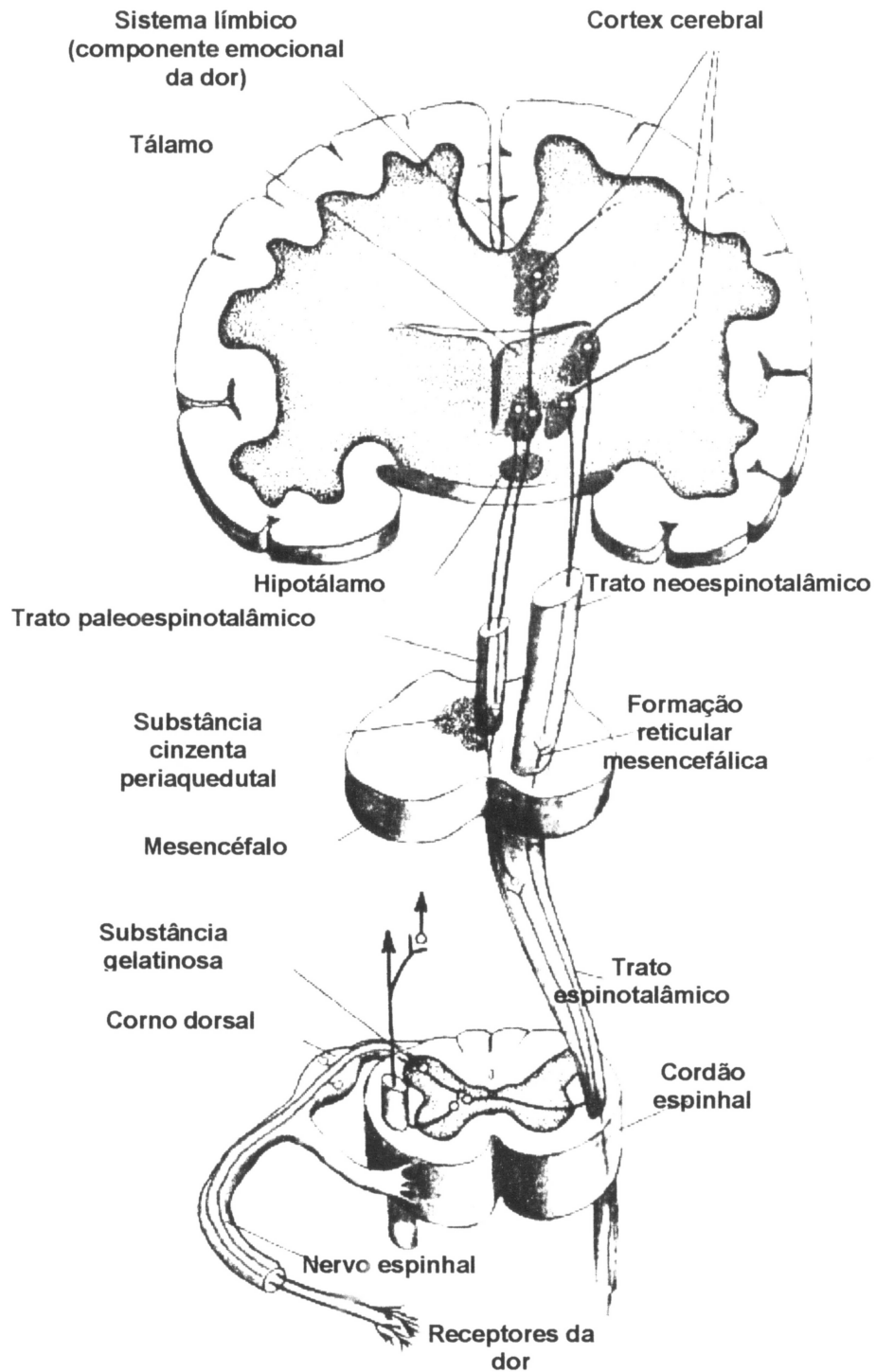


Figura 2: Eixo espinotalâmico da transição nociceptiva. Principal mecanismo ascendente de transmissão da informação nociceptiva do corno dorsal da coluna dorsal para os centros superiores (adaptado de WILLIS, 1985, em JESSEL e KELLY, 1991).



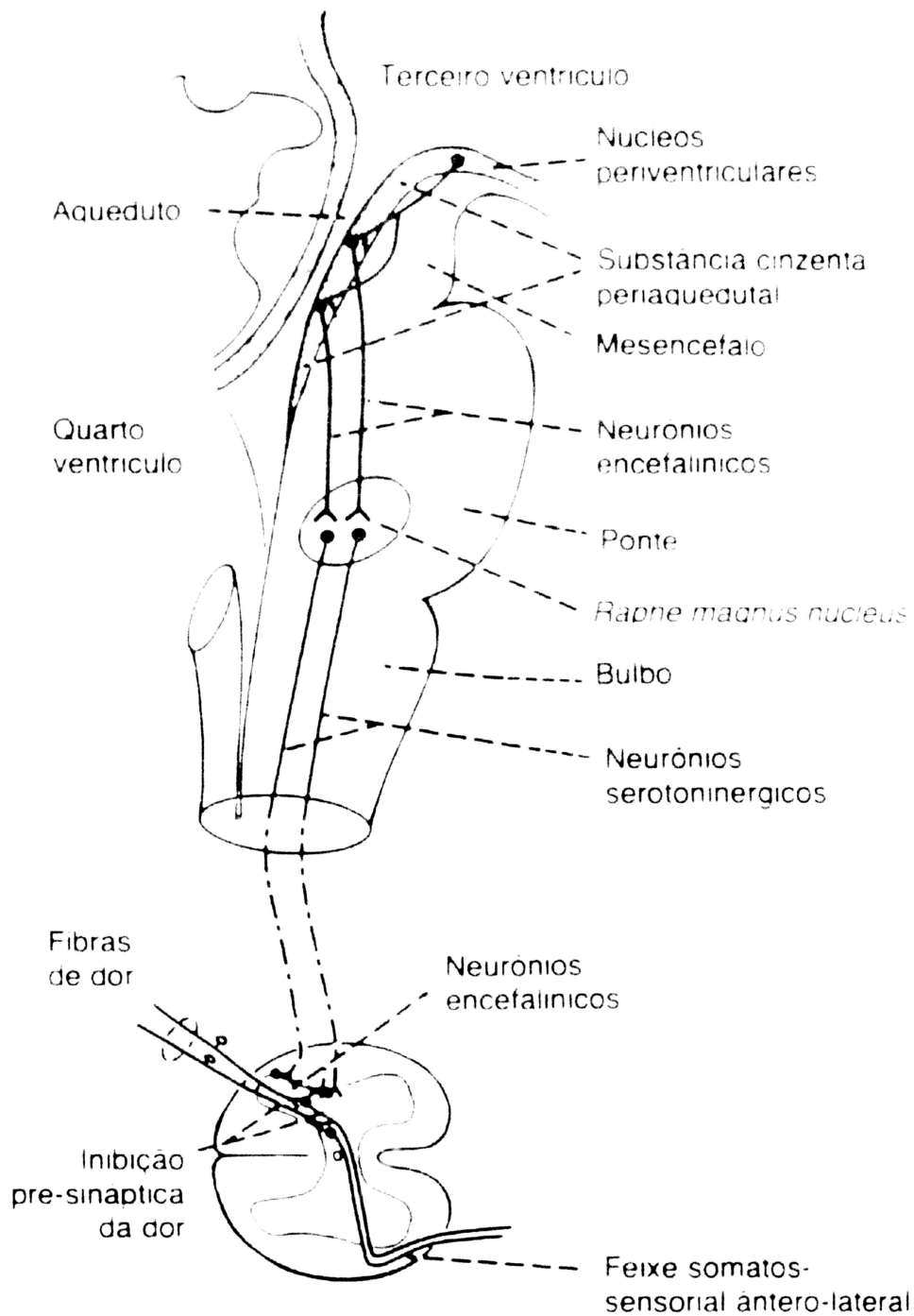
Os neuropeptídeos atraíram atenções como moléculas mensageiras intercelulares no início da década de 70, quando CHANG e cols (1971) identificaram a substância P como sendo um undecapeptídeo presente no hipotálamo. Historicamente, até os dias de hoje, as neurocininas têm mantido um papel proeminente na neurobiologia da nocicepção. As taquicininas incluem a SP (substância P), neurocinina A e neurocinina B e estes atuam preferencialmente nos três principais receptores para neurocininas: NK-1, NK-2 e NK-3, respectivamente (FÜRST, 1998). A liberação local da substância P promove um aumento nas correntes dependente de  $Ca^{2+}$ , e uma despolarização lenta ativa os nociceptores no corno dorsal. A substância P, ao se ligar no receptor NK-1, está implicada na dor neurogênica (FLEETWOOD-WALKER & cols, 1990). A substância P, juntamente com a neurocinina A, são liberadas ao longo do cordão espinhal *in vivo*, mediante estimulação nociceptiva periférica (MELLER & GEBHART, 1993).

Diversos outros neurotransmissores do neurônio aferente primário foram sendo gradualmente identificados. Aminoácidos também estão presentes em altas concentrações no sistema nervoso central e são potentes modificadores da excitabilidade neuronal em vários níveis. Os aminoácidos inibitórios – glicina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) – aumentam a permeabilidade a íons cloreto e dessa forma mimetizam o potencial inibitório pós-sináptico (PIPS) (FÜRST, 1998). Há dois principais tipos de receptores GABA: GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>. Uma classe especial de neurônios localizados no corno dorsal do cordão espinhal sintetiza GABA. Estes neurônios formam sinapses axo-axônicas com terminais nervosos sensoriais primários e são responsáveis pela inibição pré-sináptica. A concentração de GABA é maior no corno dorsal, onde ele é o principal transmissor inibitório. A inibição pré-sináptica pelo GABA dos terminais aferentes primários deve atenuar a propagação da informação nociceptiva das terminações nervosas sensoriais no ponto de entrada no cordão espinhal (FÜRST, 1998).

O glutamato (Glu) e o aspartato são os principais neurotransmissores aminoácido excitatórios presentes no sistema nervoso central. São responsáveis pela ativação de receptores que podem ser divididos em duas classes: ionotrópicos (diretamente acoplados à canais iônicos), que são: AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropionico), NMDA (N-metil-D-aspartato) e cainato; e os receptores metabotrópicos (ACPD – trans 1-amino-ciclopentil- 1,3 dicarboxilato) (acoplados à proteína G), os quais irão modular os níveis de segundos mensageiros,

principalmente inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ), diacilglicerol (DAG) e nucleotídeos cíclicos. O glutamato participa de uma grande diversidade de funções biológicas, como aprendizado e memória, doenças neurodegenerativas e morte neuronal. Além dessas ações, o glutamato é encontrado nas fibras C sensoriais onde acredita-se que desempenhe um papel relevante na transmissão de mecanismos nociceptivos no cordão espinhal (THOMAS, 1995). Os aminoácidos excitatórios também são importantes no processamento do comportamento nociceptivo causado por incisões, ou seja, a sensibilização causada por cirurgias. A nocicepção induzida pela incisão aumenta a liberação de glutamato e aspartato (ZAHN & cols, 2002). O glutamato liberado de neurônios aferentes primários e que atua em receptores AMPA, é responsável pela transmissão sináptica rápida na primeira sinapse no corno dorsal (DRAY, 1992; DRAY & cols, 1996).

Esta via nociceptiva ascendente está sujeita a um controle endógeno descendente. A existência de um sistema modulatório descendente endógeno da dor já é conhecido há pelo menos três décadas, e os mecanismos descendentes do cérebro constituem o principal mecanismo de controle da transmissão da dor (MILLAN, 2002). A base para um circuito modulatório descendente da dor envolve a substância cinzenta periaquedutal, a medula ventromedial rostral (que inclui o núcleo magno da rafe e a formação adjacente reticular ventral) e o cordão espinhal (FIELDS & cols, 1999) (figura 3). Em 1969, REYNOLDS constatou que a estimulação da substância cinzenta periaquedutal de ratos causava analgesia intensa o suficiente para permitir a realização de cirurgia abdominal sem anestesia e sem induzir qualquer resposta acentuada. A substância cinzenta periaquedutal projeta suas fibras de forma descendente até os núcleos bulbares, como o núcleo magno da rafe, e estes emitem projeções até a parte posterior da medula espinhal. As estruturas periaquedutares e periventriculares recebem diversas influências de numerosas áreas cerebrais envolvidas com funções sensoriais emocionais e de atenção. Desta forma, estímulos e situações diversas são capazes de ativar a substância cinzenta periaquedutal, e esta por sua vez estimular o núcleo magno da rafe (FLOREZ, 1993). A função dos núcleos bulbares situados na região rostral e ventromedial têm sido particularmente estudada nos últimos anos, pois se trata de uma via final comum, que canaliza as ações endógenas que irão modular tanto a inibição como a facilitação da transmissão nociceptiva no cordão espinhal. Na medula rostral ventromedial (RVM), três tipos de neurônios têm sido identificados como neurônios modulatórios da dor, que são



**Figura 3: Sistema de analgesia do cérebro e medula espinhal.** O sistema mostra a inibição dos sinais de entrada da dor ao nível da medula e a presença dos neurônios secretadores de encefalina, que suprimem os sinais da dor tanto na medula quanto no tronco cerebral (Guyton & cols., 1996).

chamados de células “on”, células “off” e células neutras (FIELDS & cols, 1988). Enquanto as células “off” são usualmente associadas com a inibição do comportamento nociceptivo, a atividade das células “on” está relacionada com a facilitação do comportamento nociceptivo. As células “on” são caracterizadas por um súbito aumento dos disparos nociceptivos e as células “off” exibem uma pausa na sua atividade no início da resposta nociceptiva. As células que não desempenham nenhuma alteração nos disparos relacionados com estímulo nociceptivo são chamadas de células neutras. O sistema de células “on” é inibido diretamente por células de natureza opióide presentes no tronco cerebral. Algumas destas células “on” são de natureza gabaérgica e se conectam reciprocamente com as células “off”; por este motivo a ativação das células “on” produz a inibição das células “off” (FIELDS & cols, 1991).

O descobrimento dos sistemas endógenos de inibição da dor e o crescente conhecimento de suas bases morfológicas e funcionais fizeram com que WALL e MELZACK (1965) introduzissem a “Teoria do Portão”. Esta teoria introduziu os seguintes princípios: A transmissão dos impulsos nervosos desde as fibras aferentes até as células transmissoras na medula espinhal estão moduladas por um sistema de barreira ou comporta que atua nestas células, chamadas de interneurônios inibitórios. Este mecanismo de barreira é influenciado pela atividade relativa das fibras de maior e menor diâmetro; as fibras mielinizadas, mais grossas (fibras A $\delta$ ) de baixo limiar de ativação tendem a inibir a transmissão (“fechar o portão”), através da ativação dos interneurônios inibitórios. Já as fibras C (mais finas), não mielinizadas tendem a facilitar a transmissão (“abrir o portão”). Este mecanismo é uma maneira de selecionar a atividade intrínseca do sistema de resposta ao estímulo nociceptivo.

É possível que o conjunto de descrições dos nociceptores, dos núcleos espinhais e supraespinhais, as vias ascendentes e descendentes e as áreas de proteção implicadas na transmissão e recepção da dor tenham dado a impressão de que estamos diante de um sistema de circuitos nervosos rígidos, e que cada fibra nervosa e cada célula cumpre uma função permanente e estável e de certo modo previsível. Mas a realidade não é esta. O sistema possui um elevado grau de plasticidade e adaptação, de onde se derivam fontes notáveis de sensibilidade, algumas vezes imediata e outras vezes pausada (WALL, 1989).

Esta plasticidade dinâmica está relacionada com a intensidade de estímulo e sensações. E um fenômeno de grande importância relacionado com estas ações é a

hiperalgesia. A hiperalgesia é definida como “um estado de intensificação da dor em resposta a estímulos que normalmente causam dor em tecidos periféricos” (HARDY e cols., 1967); por exemplo uma sensação de dor a um estímulo nociceptivo de calor antes e depois de uma queimadura. Após a queimadura o limiar para a passagem do estímulo nociceptivo é diminuído devido à exposição dos nociceptores a substâncias sensibilizantes. Esta sensibilização resulta na redução do limiar de despolarização fazendo com que o estímulo nociceptivo de calor desencadeie um potencial de ação. A hiperalgesia caracteriza a lesão tecidual (somática e visceral) e a inflamação. A hiperalgesia não ocorre apenas no local da injúria, mas também na área não afetada que está ao seu redor. A hiperalgesia no sítio da injúria é chamada de hiperalgesia primária, enquanto que a hiperalgesia no local não injuriado é chamado de hiperalgesia secundária (LEWIS, 1935).

Existe uma latência entre a injúria tecidual e o estabelecimento da hiperalgesia, o que sugere que o estímulo nocivo libera mediadores os quais podem ativar diretamente os referidos nociceptores, como a histamina e a bradicinina ou sensibilizar os mesmos, como as prostaglandinas (PGs) e as aminas biogênicas (noradrenalina, dopamina e serotonina). A sensibilização dos nociceptores envolve a ativação da enzima adenilato ciclase com conseqüente aumento nos níveis intracelulares de AMPc (LORENZETTI & FERREIRA, 1981).

### **1.3. O ÓXIDO NÍTRICO COMO UMA MOLÉCULA SINALIZADORA**

Há duas décadas atrás, a descoberta de um fator relaxante derivado do endotélio por Furchgott e Zawadzki, mais tarde identificado como óxido nítrico (NO), deu origem ao conceito de que um composto gasoso poderia ser uma molécula sinalizadora no sistema biológico (MONCADA & cols, 1988). O NO é um radical livre sintetizado a partir da L-arginina e do oxigênio molecular através de um processo enzimático que requer diversos cofatores, incluindo a calmodulina, cálcio, elétrons doados pelo NADPH, grupamento heme e flavinas (DAWSON & cols, 1994; PALMER & cols, 1988). A enzima NO sintase (NOS) converte a L-arginina em NO e L-citrulina. O NO por ser uma molécula gasosa, possui um tempo de meia vida na ordem de segundos a milisegundos e normalmente é produzido conforme a demanda (MELLER & GEBHART, 1993).

Com relação à NO sintase (NOS), existem três isoformas da enzima; duas isoformas são expressas constitutivamente e são dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ / calmodulina, enquanto que a terceira isoforma é expressa apenas em células ativadas, independentemente de  $\text{Ca}^{2+}$ / calmodulina (MONCADA & cols, 1991). A primeira forma constitutiva a ser identificada foi localizada originariamente no citosol de neurônios centrais e periféricos e ficou conhecida como NOS neuronal (nNOS ou NOS tipo I), enquanto que a outra, caracterizada originariamente em células endoteliais, ficou conhecida como NOS endotelial (eNOS ou NOS do tipo III). As isoformas constitutivas de NOS, ativadas através de fluxos transitórios de cálcio, geram pequenas quantidades de NO por curtos períodos de tempo. A terceira isoforma da NOS, normalmente não expressa no restante das células, pode ser induzida por uma variedade de estímulos, como citocinas e lipopolissacarídeos ( LPS ), esta isoforma é conhecida como NOS induzida ( iNOS ou NOS do tipo II). Uma vez expressa, esta enzima gera grandes quantidades de NO por um período mais prolongado. A regulação e a função da iNOS estão principalmente associadas com a resposta imune e inflamatória (COLEMAN, 2001; XU & cols; 1996; NATHAN, 1992).

A possibilidade de um mecanismo para a modulação do NO por ele mesmo surgiu em 1993, quando foi demonstrado a capacidade do NO em inibir a atividade da iNOS, através de um mecanismo que envolve o grupamento heme da enzima NOS (ASSREUY & cols, 1993; GRISCAVAGE & cols, 1993). Mais recentemente, foi demonstrado que o NO é capaz de inibir a transcrição do gene codificador da iNOS em uma variedade de tipo de células. Este efeito inibitório do NO na expressão do gene codificador da iNOS tem sido atribuído a inativação do fator nuclear transcricional  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ). Esta inativação está relacionada ao fato do NO manter o processo celular em um estado inibitório, gerando um ciclo autoregulatório (MARIOTTO & cols, 1995; KATSUYAMA & cols, 1998; COLASANTI & SUZUKI, 2000).

O NO é um radical livre, e desta maneira combina-se rapidamente com outros radicais e reage com uma variedade de espécies químicas (IGNARRO, & cols 1981; STAMLER & cols, 1992). Algumas espécies químicas estabilizam o NO ou atuam como moléculas carreadoras. Outras espécies (por exemplo, ânion superóxido  $\text{O}_2^-$ ) podem levar a uma rápida destruição do NO com a perda da atividade biológica ou a formação de outros radicais, incluindo o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (BECKMAN & cols, 1990).

A principal ação do NO é ativar a forma solúvel da enzima guanilil ciclase (GCs), a qual tem sido designada como um receptor fisiológico do NO (FURUYAMA & cols, 1993). A guanilil ciclase é uma proteína contendo um grupamento heme, encontrada na fração citosólica de todas as células dos mamíferos. Diversas formas de GCs têm sido clonadas e caracterizadas, consistindo de uma subunidade  $\alpha$  (82 kDa) e uma subunidade  $\beta$  (70 kDa) (HOBBS & IGNARRO, 1996). Três isoformas diferentes da subunidade  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ ) e da subunidade  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ) têm sido identificadas no tecido de ratos, bovinos e humanos (FURUYAMA & cols, 1993 e HOBBS & IGNARRO, 1996). Funcionalmente a GC converte a 5'- trifosfato de guanosina em 3',5'- monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O GMPc, como um segundo mensageiro intracelular, modifica diversos processos intracelulares incluindo ativação de proteínas quinases, canais iônicos e fosfodiesterases (KNOWLES & cols, 1989). Portanto, a função do NO é principalmente expressa através da produção de GMPc e a GCs desempenha um papel chave no mecanismo sinalizador do NO (DAWSON & cols, 1995; MONCADA & cols, 1989) (figura 4).

O NO é formado em muitos tipos de células e atua em diferentes sistemas do organismo, estimulando ou inibindo mecanismos regulatórios. Em mamíferos, ele atua como um agente de relaxamento vascular, como neurotransmissor e como inibidor da agregação plaquetária. Na neurotransmissão, o fato do NO ser uma molécula gasosa pequena (30 Da) e reativa permite que ele atravesse facilmente membranas neuronais. Como consequência destas propriedades, o NO está perfeitamente adaptado e pode atuar como mensageiro retrógrado. A ativação de um determinado receptor leva a produção de NO no neurônio pós-sináptico, de onde ele rapidamente se difunde para o neurônio pré-sináptico, onde irá modular a excitabilidade e as conexões sinápticas (BARINGA, 1991; MELLER & GEBHART, 1993).

Além do seu papel como mensageiro retrógrado, o NO pode atuar no neurônio onde é produzido, ou se difundir do seu sítio de produção para atuar em células da glia adjacentes e/ou outros neurônios ou ainda atuar como neurotransmissor "clássico" (BULT & cols, 1990; O'DELL & cols, 1991).

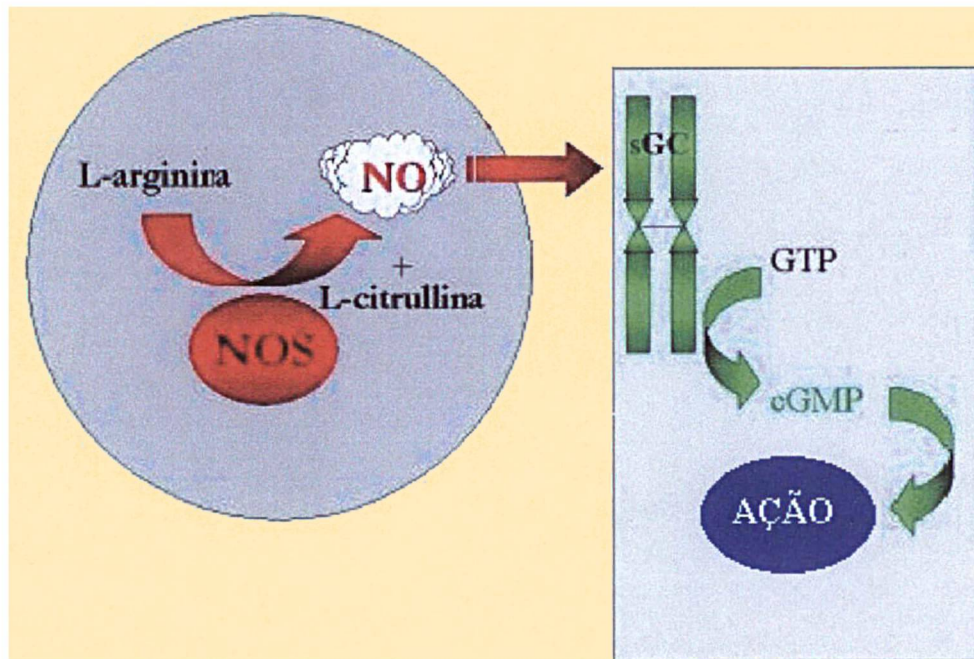


Figura 4: Síntese do NO. A enzima NO sintase (NOS) converte a L-arginina em NO e L-citrulina. A principal ação do NO é ativar a forma solúvel da enzima guanilil ciclase (sGC). Funcionalmente a GC solúvel converte a guanosina -5'-trifosfato (GTP) em guanosina - 3',5'- monofosfato cíclico (GMPc). O GMP cíclico, como um segundo mensageiro intracelular, modifica diversos processos intracelulares, por exemplo, através da ativação de proteínas quinases, canais iônicos e fosfodiesterases (TRIMER, B. et al. What is nitric oxide (NO). 2001. Disponível em: <http://www.ideaplace.org/Why/NOAndcGMP.html>)



No sistema nervoso central, o NO está envolvido na morte programada de células, degeneração neuronal, e modulação da percepção da dor (QUINN & cols, 1995; MELLER & GEBHART, 1993;).

Na vasodilatação o NO proveniente do endotélio promove uma importante redução do tônus basal de veias brônquicas e pulmonares e a perda deste tônus pode promover hipóxia (GREENBERG & cols, 1987). A síntese de NO no endotélio de pequenas artérias e arteríolas contribui como vasodilatador do tônus na circulação sistêmica (MONCADA & cols, 1988).

Em condições patológicas, altas concentrações de NO podem ser benéficas (por exemplo como agente bacteriano, anti-parasitário, anti-viral) ou prejudiciais, pois altas concentrações de NO podem reagir concomitantemente com ânions superóxidos, gerando compostos altamente tóxicos, como peroxinitritos e radicais hidroxil. Este mediador ainda está envolvido na patogenia de inúmeras doenças, como por exemplo o choque séptico. Alguns dos aspectos do choque séptico, incluindo hipotensão, hiporeatividade vascular, depressão miocárdial e danos no tecido, aparecem como resultado, pelo menos em partes, da produção excessiva de óxido nítrico (EVANS & cols, 1993).

O NO também é gerado durante a resposta imune e inflamatória. No entanto, dependendo da maneira como os resultados são avaliados obtemos respostas diferenciadas, que serão discutidas com mais detalhes adiante.

### **1.3.1. ÓXIDO NÍTRICO: NOCICEPTIVO OU ANTINOCICEPTIVO?**

Danos no tecido são geralmente acompanhados por um rápido desenvolvimento de hiperalgesia e alodinia. Mecanismos periféricos, no local da injúria, e processos centrais, particularmente no cordão espinhal, contribuem para o desenvolvimento deste fenômeno (GÜHRING & cols, 2000). No entanto, a participação do NO neste fenômeno ainda não está bem esclarecida, pois para alguns autores o óxido nítrico possui atividade pró-nociceptiva (MALMBERG & YAKSH, 1993; CHEN & LEVINE, 1999); enquanto que para outros autores o NO possui atividade antinociceptiva (DUARTE & cols, 1990 e GOETTL & LARSON, 1996).

Para se ter uma visão mais clara sobre o papel paradoxal do NO, é necessário avaliar este tópico sob diferentes aspectos, como a) diferentes tipos de enzimas da NOS, e conseqüente quantidade de NO gerado, b) diferença entre NO endógeno e exógeno, c) diferença na via de administração de doadores de NO e inibidores da NOS, d) local onde está acontecendo o processo de produção de NO.

Parte desta controvérsia pode ser analisada pela existência de três diferentes isoenzimas da NO sintase (nNOS, eNOS e iNOS) que podem sintetizar quantidades diferentes NO. Como já foi dito anteriormente, as isoformas constitutivas da NOS (nNOs e eNOS), geram pequenas quantidades de NO por curtos períodos de tempo; já a iNOS, normalmente induzida por uma variedade de estímulos, como citocinas e lipopolissacarídeos (LPS), gera grandes quantidades de NO por um período mais prolongado (COLEMAN, 2001; XU & cols; 1996; NATHAN, 1992). Portanto, dependendo do tipo de NOS que está sendo ativada, diferentes quantidades de NO estarão sendo geradas. E segundo alguns autores, o NO possui ações diferentes, dependendo da sua concentração no sítio inflamatório. KAWABATA & cols (1994), investigaram os efeitos da administração *ip/* de L-Arginina no comportamento de nocicepção induzido por formalina em camundongos. A L-Arginina, mas não a D-Arginina, nas concentrações de 0,1 - 1 $\mu$ g/pata co-administrada com formalina 0,5%, aumentaram a fase II da resposta nociceptiva à formalina, já a concentração de 3 $\mu$ g/pata não teve efeito significativo, e a concentração de 10 $\mu$ g/pata ao contrário, produziu antinocicepção, resultando em uma curva em sino. De acordo com os autores, o NO periférico desempenha um papel duplo na modulação nociceptiva dependendo da sua concentração no tecido, induzindo uma resposta nociceptiva ou anti-nociceptiva. SOUSA & PRADO, (2001) também demonstraram o efeito duplo de doadores do NO na nocicepção. Estes autores demonstraram que a administração intratecal de SIN-1 (substância doadora de óxido nítrico), produziu efeito dose-dependente duplo em um modelo de dor neuropática em ratos. Baixas doses de SIN-1 i.t. causaram antinocicepção, enquanto que altas doses causaram efeitos pró-nociceptivos ou não tiveram nenhum efeito na alodinia mecânica promovida pela ligadura crônica do nervo ciático. Este estudo também é um indicativo de que a quantidade de óxido nítrico influencia na resposta nociceptiva; talvez pela possibilidade reportada por GARTHWAITE & cols (1995) de que doadores de óxido nítrico atuam a partir da capacidade do mediador em interferir na condutância iônica de membrana de células no cordão espinhal. Ao contrário do trabalho de KAWABATA

e cols (1994), onde concentrações menores da substância doadora de NO causaram antinocicepção. Esta contradição pode estar relacionada ao fato de que a L-Arginina é o substrato para a formação de NO endógeno, já o SIN-1 é uma substância doadora de NO, no caso exógeno; ou ainda pode estar relacionada às diferentes metodologias de estudo (dor aguda ou crônica) e via de administração utilizada, pois KAWABATA e cols (1994) utilizaram a via intraplantar e SOUZA E PRADO (2001) utilizaram via intratecal.

Para alguns autores, como PAUL-CLARK & cols (2001), o NO possui efeitos opostos na inflamação aguda dependendo da sua rota de administração, sugerindo que durante a inflamação, a produção local é antiinflamatória, pela habilidade do NO em modular os níveis de mediadores pró-inflamatórios. Entretanto, estes mesmos autores observaram que a administração sistêmica de inibidores da NO sintase não reduzem a inflamação, demonstrando que a via de administração está envolvida no seu efeito. Para testar esta hipótese, PAUL-CLARK & cols (2001) utilizaram a metodologia de pleurisia induzida por carragenina. Os autores utilizaram o AE-ITU (S-2aminoetil-isotriuréia) e 1400W (N-3-aminometil-benzil-acetamidina) como inibidores mais seletivos da iNOS e o L-NIO (L-N<sup>5</sup>-1-iminoetilornitina) como inibidor mais seletivo para a eNOS. Estas drogas foram administradas na cavidade pleural imediatamente antes da pleurisia induzida pela carragenina. As variáveis analisadas foram formação de edema, número de células inflamatórias infiltradas, e níveis de nitrito no exsudato. Ficou demonstrado que inibidores da NOS administrados localmente exacerbaram a inflamação como resultado de um aumento de mediadores pró-inflamatórios como histamina, leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e O<sub>2</sub><sup>-</sup>, sugerindo que a produção local de NO é antiinflamatória. Entretanto a administração sistêmica de inibidores da NOS reduziram a inflamação, mostrando as propriedades pró e antiinflamatória do NO dependendo da rota de administração do inibidor (PAUL-CLARK & cols, 2001). Para verificar o possível papel do NO espinal, MALMBERG & YAKSH (1993) examinaram o efeito da injeção intratecal (i.t.) dos inibidores da NOS (L-NAME e L-NMMA) no teste da Formalina. Ambos os tratamentos, L-NAME (135 nmol) e o L-NMMA (246 nmol) produziram uma inibição dose-dependente da fase II do teste (10-60 minutos), com efeito mínimo na fase I. A administração espinal de L-NAME (370 nmol), mas não D-NAME (370 μmol), também bloqueou a hiperalgisia térmica induzida pela injeção *i.t.* de N-metil-D-aspartato (NMDA) 6,8 nmol. Este componente hiperalgésico parece ser iniciado pela ativação do receptor NMDA

espinhal que leva à formação de NO (MALMBERG & YAKSH, 1993), mostrando a ação pró-nociceptiva do NO quando o tratamento é sistêmico.

DUARTE & cols (1990), investigaram o envolvimento do mecanismo NO/GMPc na anti-nocicepção, através do tratamento local com Ach e nitroprussiato de sódio (doador de NO) no teste de Randal Selito modificado. Os autores demonstraram que a Ach (50, 100 e 200 µg/pata) e o nitroprussiato de sódio (50, 200 e 500 µg/pata), causaram uma analgesia dose-dependente, indicada pela redução da intensidade da hiperalgisia induzida por PGE<sub>2</sub>. Além disso, os autores demonstraram que o precursor do NO, a L-Arginina (100, 300 e 500 µg/pata), mas não a D-Arginina, causou analgesia quando testada na hiperalgisia induzida pela carragenina (100 µg/pata) na pata do rato. Este estudo sustenta novamente a evidência de que o NO tem um papel importante na analgesia periférica (DUARTE & cols, 1990). Autores como FERREIRA & LORENZETTI (1994), também demonstraram que o tratamento local com doadores do óxido nítrico, como SNAP (S-nitroso-N-acetil-D, L-penicilamina), foi capaz de bloquear a hiperalgisia (antinocicepção) no modelo de pressão na pata do rato (Randal Selete modificado).

Através destes estudos, podemos dizer que, talvez a explicação para esta aparente contradição, possa estar relacionada ao fato de que o mecanismo Arginina/NO/GMPc possua diferentes ações dependendo dos diferentes grupos de neurônios sensoriais primários envolvidos (GRANADOS-SOTO & cols, 1997) ou ainda estar relacionada ao local onde está sendo sintetizado.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Considerando diferenças discutidas anteriormente, objetivamos nossos estudos no sentido de compreender melhor a participação do NO na nocicepção utilizando um único modelo, ou seja, a nocicepção induzida por formalina, para avaliar tanto a sensibilização do nociceptor quanto a nocicepção causada pela formalina. Neste modelo que combina estes dois fenômenos, avaliamos a participação do NO utilizando inibidores enzimáticos seletivos e doadores de NO exógeno. No entanto, restringiremos nosso estudo avaliando somente a ação local de NO.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ◆ Investigar o papel local do NO na nocicepção no teste da formalina na pata;
- ◆ Estabelecer uma metodologia para avaliação da sensibilização do nociceptor na dor inflamatória a partir do teste da formalina;
- ◆ Investigar o papel do NO nesta sensibilização;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, machos, pesando entre 180-250 g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com água e comida à vontade até o início dos experimentos. Os animais foram mantidos na sala de ambientação uma semana antes do início do experimento e agrupados em 5 animais por caixa. Todos os procedimentos experimentais adotados foram previamente aprovados pelo comitê de ética da instituição para pesquisa em animais de laboratório desta universidade e estão de acordo com os padrões internacionais.

#### 3.2. SUBSTÂNCIAS ALGOGÊNICAS, DROGAS E VEÍCULOS

##### Substâncias algogênicas

- ◆ Formalina - formaldeído 37%, (0,3, 0,6, 1,2, e 2,5%, *ipl*).
- ◆ LPS (Lipopolissacarídeo de *Salmonella typhimurium* – 1, 10 e 100 ng/pata, *ipl*).

##### Drogas e doses

- ◆ L-NMMA ( $N^G$ -monometil - L -arginina monoacetato) → inibidor não seletivo de NOS: 4, 12 e 40 nmol/pata, *ipl*.
- ◆ D-NMMA → isômero inativo do L-NMMA: 40 nmol/pata, *ipl*.
- ◆ L-NAME (L- $N^G$ -nitro arginina metil éster) → inibidor não seletivo de NOS: 37, 110 e 370 nmol/pata, *ipl*.
- ◆ L-Arginina → substrato para formação de óxido nítrico: 47, 140 e 470 nmol/pata, *ipl*.
- ◆ D-Arginina → isômero inativo da L-ARGININA: 470 nmol/pata, *ipl*.
- ◆ SNAP (5-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina) → doador de NO: 13, 45 e 130 nmol/pata *ipl*.

◆ AMT (2 amino-5,6 dihidro-6 metil- 4H- 1,3-tiazina ) → inibidor seletivo da NOS induzida: 0,06, 0,6 e 6 nmol/pata *ipl*.

◆ 7-Ni (7 nitroindazol ) → inibidor seletivo da NOS neuronal: 6, 18, 60 nmol/pata *ipl*.

Todas as drogas utilizadas, com exceção da formalina, foram adquiridas da Sigma Chemical Co, EUA. A formalina foi obtida da Merck.

◆ Solução de PBS (solução salina tamponada com fosfatos) foi utilizada para a dissolução das diferentes drogas e das substâncias algogênicas.

Os materiais utilizados nos experimentos foram autoclavados à temperatura de 120°C durante 30 minutos ou adquiridos estéreis e as soluções preparadas em condições assépticas.

As drogas, os estímulos nociceptivos e o veículo foram administrados por via intraplantar (*ipl*) na pata traseira do animal através de seringa de insulina 0,5 mL. O volume administrado para cada tratamento com as drogas, veículo ou com LPS foi de 20 µL em cada injeção; e o volume administrado para a formalina foi de 50 µL.

### 3.3. Teste da formalina (DUBUISSON & DENNIS, 1977)

O teste consiste na injeção *ipl* de formalina (50 µL) na pata traseira direita do animal (figura 5). Imediatamente após a injeção de formalina, o animal é colocado sob um funil de vidro invertido com espelho no fundo (figura 6), e observado durante 40 minutos. O tempo de lambedura e recolhimento da pata injetada (figuras 7 e 8), é cronometrado de 5 em 5 minutos até que se complete os 40 minutos de observação. O tempo cronometrado a cada 5 minutos é registrado em segundos. O teste da formalina é bifásico (fase I e fase II), sendo que a fase I compreende os 5 primeiros minutos de observação e caracteriza o estímulo direto da formalina no nociceptor, e a fase II que compreende a somatória dos tempos de lambedura e recolhimento da pata dos 20 aos 40 minutos. A fase II caracteriza a resposta inflamatória ao estímulo nociceptivo.

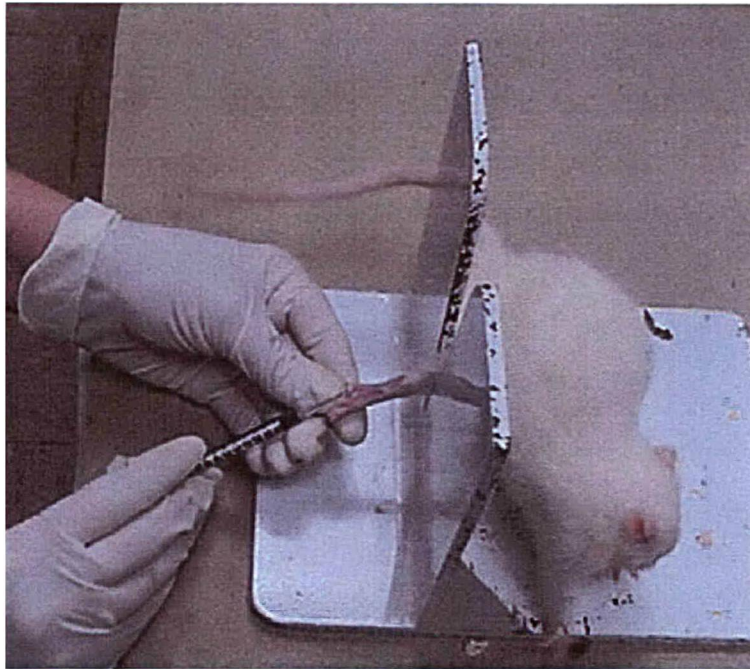


Figura 5: Injeção intraplantar (*ipl*) na pata traseira direita do animal.

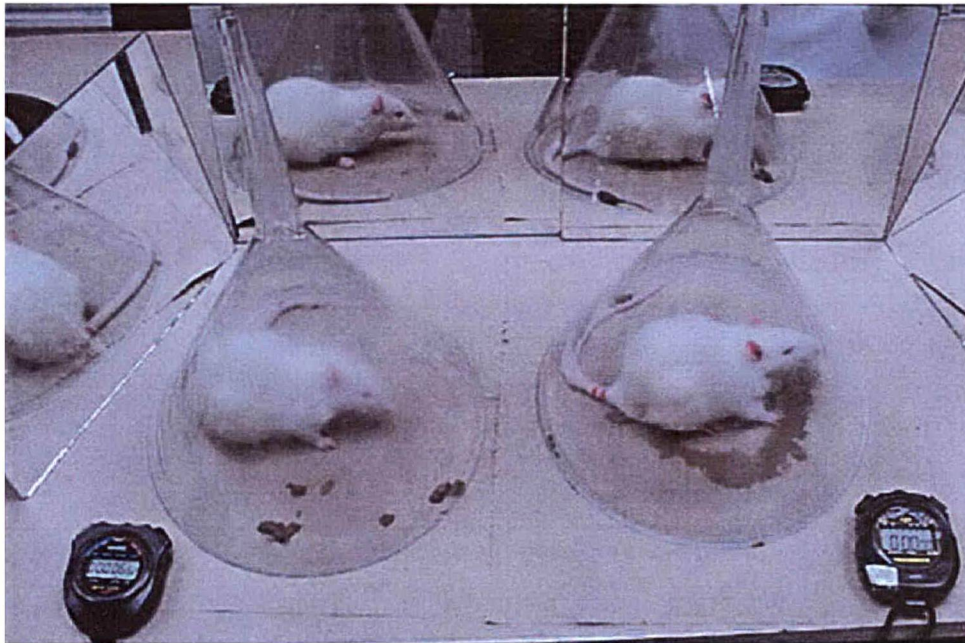


Figura 6: Observação dos animais durante o teste da formalina. Imediatamente após a injeção *ipl* de formalina 0,3%, os animais são colocados sob funis invertidos e observados durante 40 min.



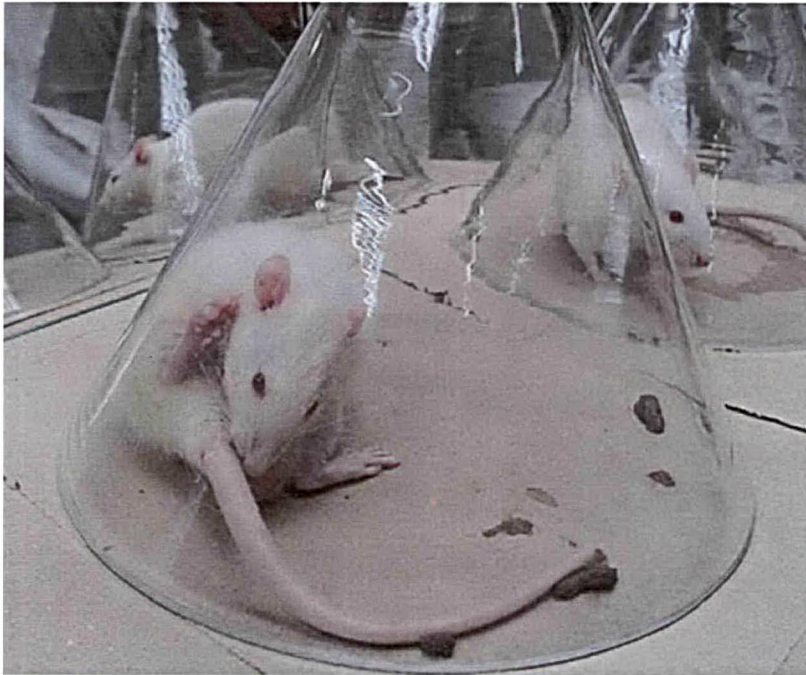


Figura 7: Recolhimento da pata após a injeção *ipl* de formalina 0,3%.



Figura 8: Lambedura da pata após a injeção *ipl* de formalina 0,3%.

### **3.4. Tratamento com inibidores da NOS, substrato para formação de NO e doadores de NO sobre a nocicepção induzida por formalina.**

Nos experimentos onde avaliou-se a participação do NO na nocicepção induzida por formalina, os animais foram pré-tratados com diferentes inibidores da NOS, doadores e substrato para formação de NO. Os animais receberam na pata direita traseira, uma injeção *ipl* com os diferentes tratamentos (L-NAME, L-NMMA, AMT, 7-Ni, L-ARGININA e SNAP, 20  $\mu$ L) ou o mesmo volume de PBS. Após 15 minutos, os animais receberam, na mesma pata, uma injeção *ipl* de formalina 0,3 ou 2,5% (50  $\mu$ L) e o comportamento nociceptivo foi avaliado conforme descrito no item 3.3.

### **3.5. Contra-prova da atuação local do NO na nocicepção induzida por formalina**

A fim de verificar se as doses utilizadas de inibidores e doadores de NO estariam atuando somente no local e não estariam atingindo a circulação sistêmica, os animais receberam na pata esquerda traseira, uma injeção *ipl* das maiores doses dos diferentes tratamentos (L-NAME, L-NMMA, AMT, 7-Ni, L-ARGININA e SNAP, 20 $\mu$ L), ou o mesmo volume de PBS. Após 15 minutos, os animais receberam uma injeção *ipl* de formalina 0.3% (50 $\mu$ L) na pata contralateral (pata direita traseira). O comportamento nociceptivo foi avaliado conforme descrito no item 3.3..

### **3.6. Sensibilização da pata com LPS previamente ao Teste da Formalina**

Nos experimentos onde avaliou-se a sensibilização prévia com LPS, os animais receberam na pata traseira direita, uma injeção *ipl* de LPS (1, 10 e 100 ng/pata, 20  $\mu$ L), ou o mesmo volume de PBS. Após 3 horas, os animais receberam uma dose sub-limiar de formalina (0,3% v/v, 50  $\mu$ L) para que pudéssemos observar a sensibilização promovida pelo LPS. O comportamento nociceptivo foi avaliado conforme descrito no item 3.3..

### **3.7. Tratamento com inibidores da NOS, substrato para formação de NO e doadores de NO previamente à sensibilização com LPS.**

Nos experimentos onde avaliou-se a atuação do NO na sensibilização, os animais foram pré-tratados com diferentes inibidores da NOS, doador de NO e substrato para formação de NO. Os animais receberam na pata direita traseira, uma injeção *ipl* com os diferentes tratamentos (L-NAME, L-NMMA, AMT, 7-Ni, L-ARGININA e SNAP, 20 $\mu$ L) ou o mesmo volume de PBS. Após 15 minutos, os animais receberam, na mesma pata, uma injeção *ipl* de LPS (10 ou 100 ng/pata, 20  $\mu$ L). Para que pudessemos visualizar a sensibilização promovida pelo LPS, após 3 horas os animais receberam mais uma injeção *ipl* de formalina 0,3% (50 $\mu$ L), e o comportamento nociceptivo foi avaliado conforme descrito no item 3.3..

### **3.8. Análise estatística**

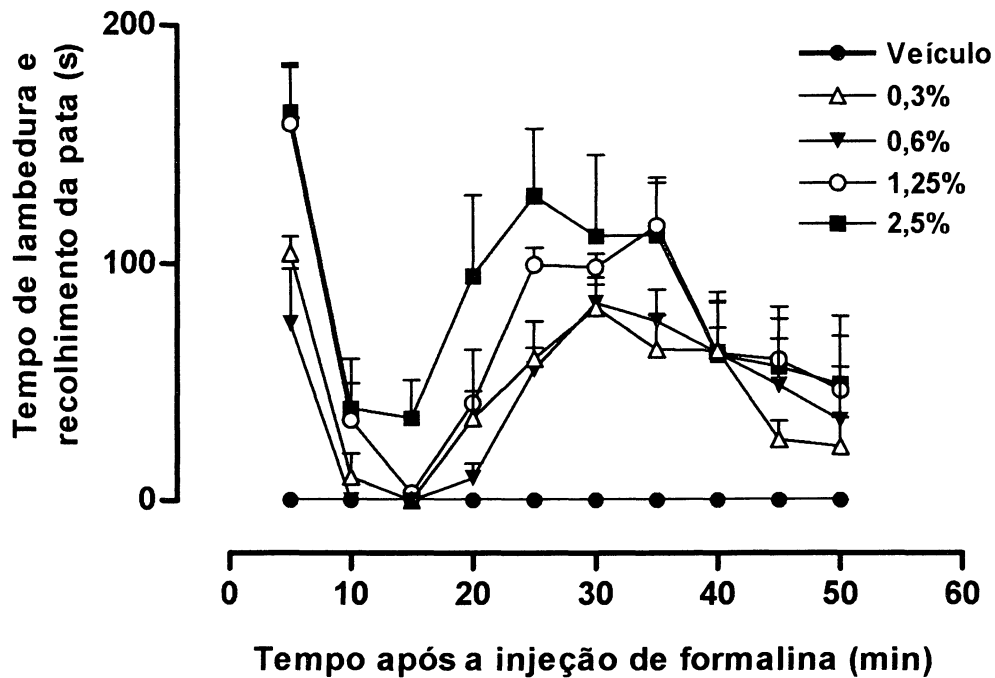
Todos os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média para grupos de seis (6) animais. Comparações estatísticas foram feitas para a fase I do teste da Formalina (5 primeiros minutos de observação) e para a fase II do teste (somatória do tempo de observação dos 20 aos 40 minutos). Para as comparações estatísticas utilizou-se análise de variância (ANOVA One-Way), seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## 4. RESULTADOS

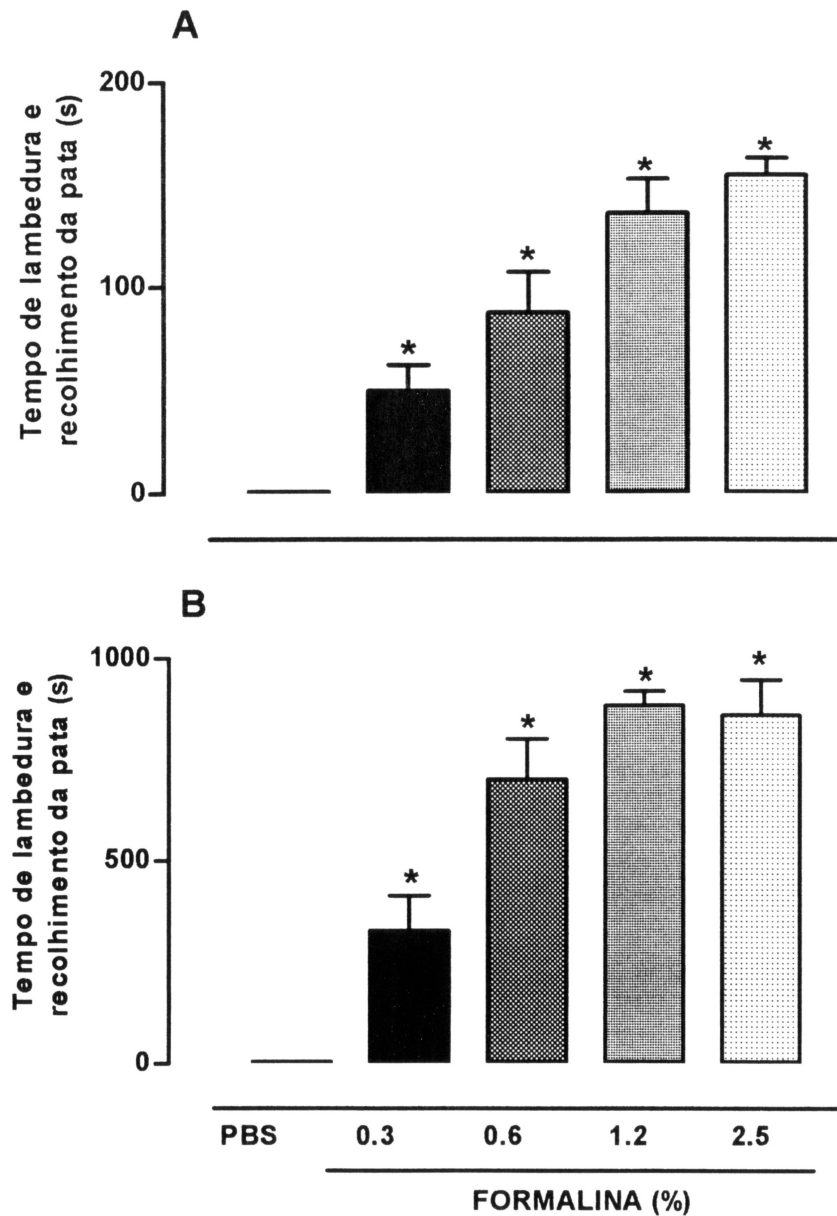
### 4.1. Curva dose resposta da formalina

A administração *ipl* de formalina nas concentrações de 0,3, 0,6, 1,2 e 2,5% induziu a uma resposta nociceptiva bifásica. A figura 9 mostra um exemplo do desenvolvimento temporal da resposta nociceptiva após a administração de diferentes concentrações de formalina. A partir da análise deste experimento, os 5 primeiros minutos da resposta nociceptiva foram considerados a fase I do teste, enquanto que o período compreendido entre os 20 e 40 min de observação foi considerado como fase II do teste. A figura 10 mostra o tempo total de lambedura e recolhimento da pata em fases distintas: fase I (0-5 min) e fase II (20-40 min). A administração de doses crescentes de formalina induziu uma resposta dose-dependente em ambas as fases. Na fase II, a resposta máxima foi observada na concentração de 1,2 %.

Após a realização deste experimento ficaram determinadas duas concentrações de formalina, 0,3 e 2,5 %. A razão para a escolha de duas doses distintas de formalina foi otimizar a visualização da dor por tratamento potencialmente pró-nociceptivo ou antinociceptivo, empregando uma dose sub-máxima (0,3%). Para efeitos comparativos, uma dose máxima (2,5%), comumente descrita na literatura, também foi utilizada.



**Figura 9: Exemplo de uma curva temporal da resposta nociceptiva induzida pela administração local de diferentes concentrações de formalina.** A resposta nociceptiva foi avaliada após a injeção ipl de 50  $\mu$ L de formalina (0,3; 0,6; 1,25 e 2,5%), ou o mesmo volume de PBS. Os pontos representam a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata (s), avaliado a cada 5 min durante 40 min (n=6).



**Figura 10: Curva dose-resposta da formalina.** A resposta nociceptiva foi avaliada após a administração local de formalina (50  $\mu$ L, *ipf*) nas concentrações de 0,3, 0,6, 1,2, 2,5% ou o mesmo volume de PBS. As barras representam a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata injetada (s), na fase I (painel A: 0-5 min) e na fase II (painel B: 20-40 min) (n=6). \* Significância estatística para as diferentes concentrações de formalina em relação ao veículo (PBS)  $p < 0,05$ .

#### 4.2. Efeito dos inibidores da NO sintase no teste da formalina 0,3%

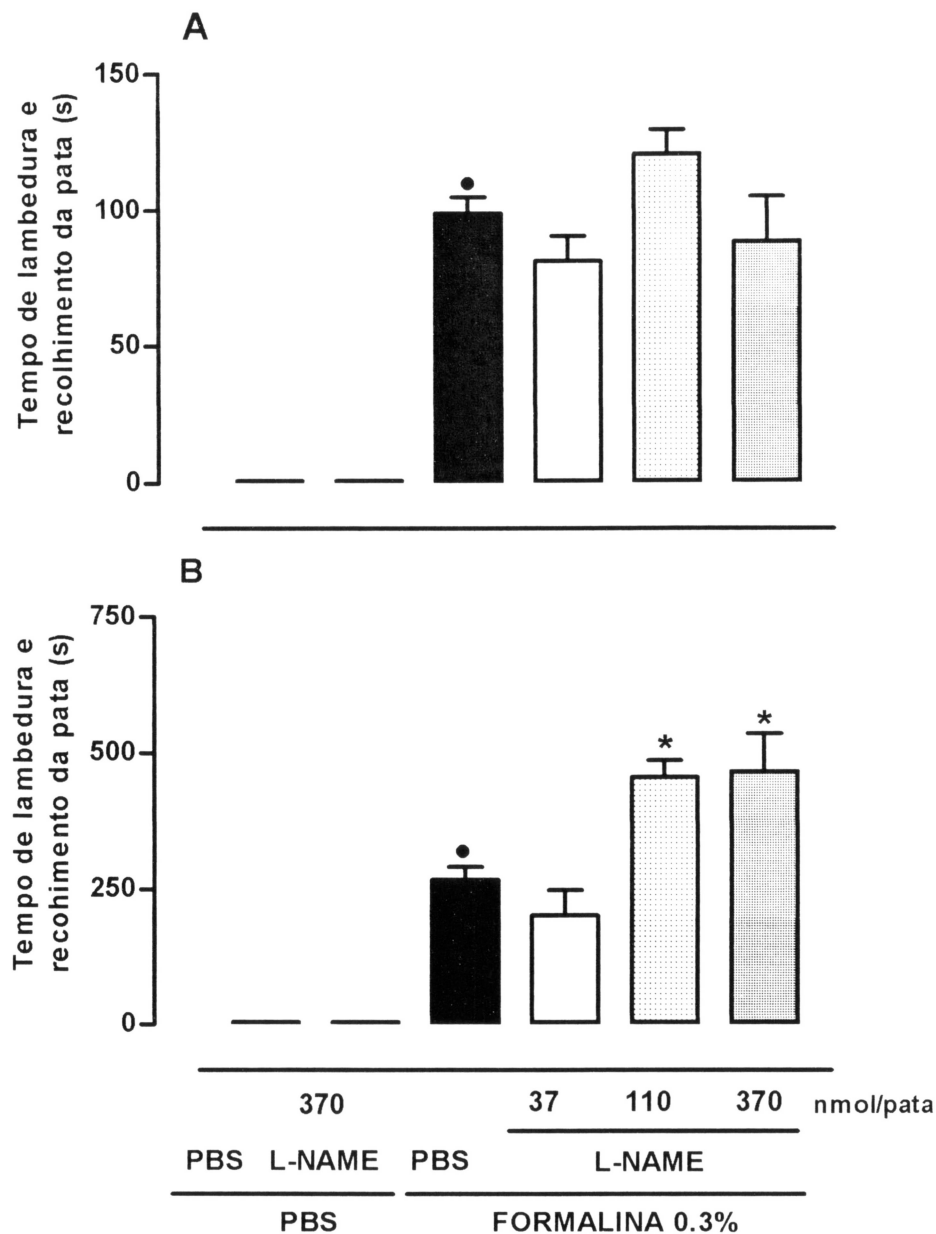
O tratamento com L-NAME, L-NMMA, AMT ou 7-Ni, nas doses utilizadas, não modificou a resposta nociceptiva à formalina na fase I do teste (painel A, figuras 11, 12, 13 e 14).

A administração *ipl* de L-NAME 37 nmol/pata não modificou o comportamento nociceptivo na fase II do teste; já as concentrações de 110 e 370 nmol/pata, aumentaram 69% e 73% respectivamente o comportamento nociceptivo na fase II da resposta à formalina em relação ao grupo controle (PBS+Formalina) (painel B, figura 11).

A administração *ipl* de L-NMMA 4 nmol/pata não modificou a resposta nociceptiva na fase II do teste; já as concentrações de 12 e 40 nmol/pata aumentaram 98% e 116% respectivamente, a fase II da resposta à formalina 0,3% (painel B, figura 12). O pré-tratamento com o isômero D-NMMA, na maior concentração utilizada (40 nmol/pata), não foi diferente do grupo controle (PBS + formalina) em ambas as fases do teste da formalina 0,3%, mostrando a especificidade da resposta (figura 12).

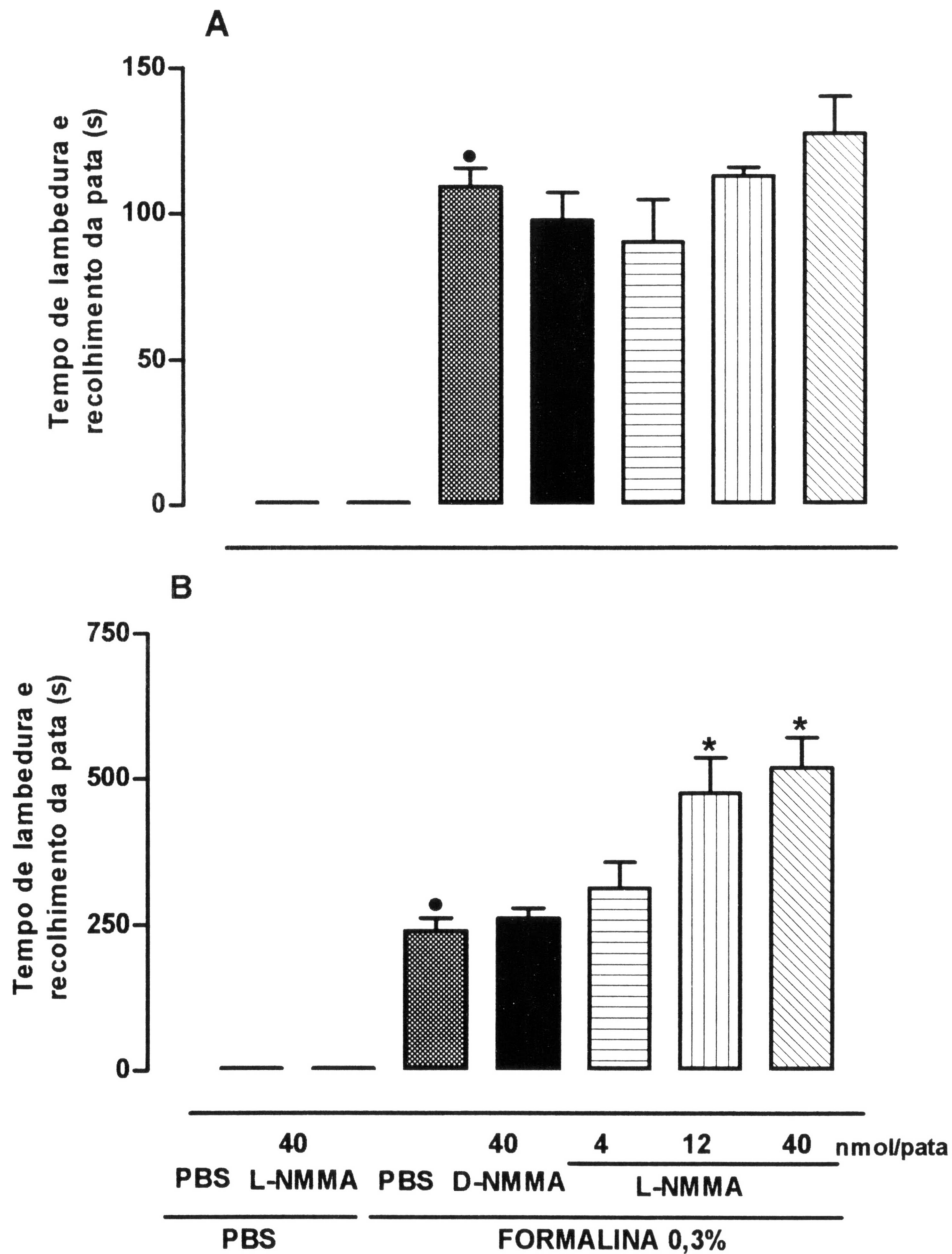
Com relação ao AMT (inibidor seletivo da iNOS) foi possível observar um aumento dose-dependente da resposta nociceptiva à injeção *ipl* de formalina na fase II. O aumento da resposta nociceptiva observado após o tratamento com AMT 0,06 nmol/pata não foi estatisticamente significativo (painel B, figura 13). Já as concentrações de 0,6 e 6 nmol/pata de AMT potenciaram 72 e 113%, respectivamente, a fase II da resposta nociceptiva à formalina 0,3% (painel B, figura 13).

O tratamento dos animais com 7-Ni (inibidor específico da nNOS) nas concentrações de 6 e 18 nmol/pata não alteraram a fase II da resposta nociceptiva à formalina quando comparadas ao grupo controle (PBS+formalina) (painel B, figura 14). Já a concentração de 61 nmol/pata aumentou 98% o tempo de lambertura e recolhimento da pata na fase II do teste da formalina 0,3% (painel B, figura 14).

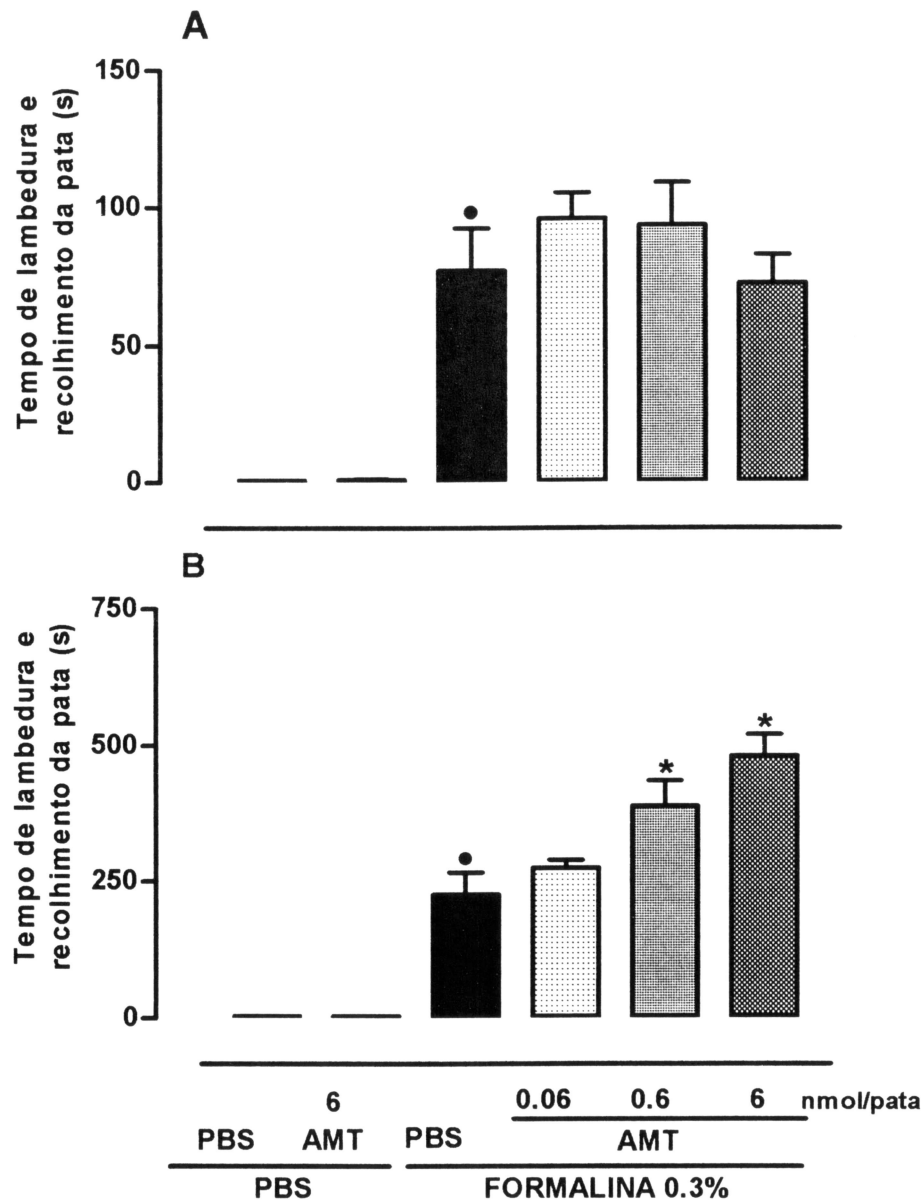


**Figura 11: Efeito do tratamento local com L-NAME na nocicepção induzida por formalina 0,3%.** Os animais foram tratados com L-NAME (37, 110 ou 370 nmol/pata, 20 $\mu$ L) ou o mesmo volume de PBS, 15 minutos antes da injeção *ipl* de formalina 0,3% ou PBS (50 $\mu$ L). As barras representam a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata (s) nas fases I (painel A: 0-5 min) e II (painel B: 20-40 min) (n=6). •Significância estatística em relação ao grupo que recebeu PBS+PBS ou L-NAME+PBS,  $p < 0,05$ . \* Significância estatística em relação ao grupo que recebeu PBS+formalina;  $p < 0,05$ .

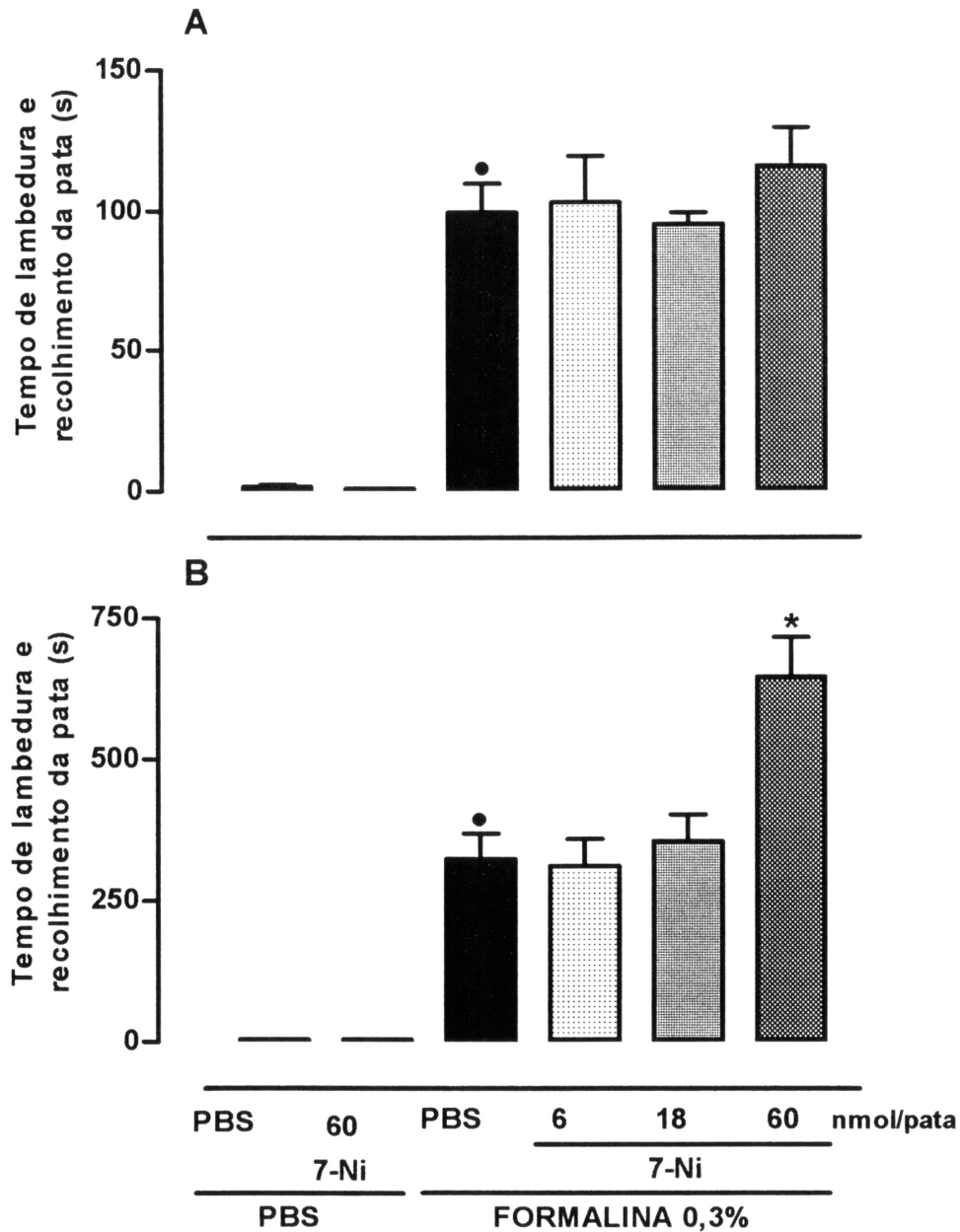




**Figura 12: Efeito do tratamento local com L-NMMA na nocicepção induzida por formalina 0,3%.** Os animais foram tratados com L-NMMA (4, 12 ou 40 nmol/pata, 20  $\mu$ L) ou o mesmo volume de PBS ou D-NMMA (isômero inativo, 40 nmol/pata), 15 min antes da injeção *ipl* de formalina 0,3% ou PBS (50  $\mu$ L). As barras representam a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata (s) nas fases I (painel A: 0-5 min) e II (painel B: 20-40 min) (n=6). • Significância estatística nas fases I e II em relação ao grupo que recebeu PBS+PBS ou PBS+L-NMMA,  $p < 0,05$ . \* Significância estatística na fase II em relação ao grupo que recebeu PBS+formalina,  $p < 0,05$ .



**Figura 13: Efeito do tratamento local com AMT na resposta nociceptiva induzida por formalina 0,3%.** Os animais foram tratados com AMT (0,06, 0,6 ou 6 nmol/pata, 20  $\mu$ L) ou o mesmo volume de PBS, 15 minutos antes da injeção *ipl* de formalina 0,3% ou PBS (50  $\mu$ L). As barras representam a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata (s) nas fases I (painel A: 0-5 min) e II (painel B: 20-40 min). •Significância estatística nas fases I e II em relação ao grupo que recebeu PBS+PBS ou AMT+PBS,  $p < 0,05$ . \* Significância estatística na fase II em relação ao grupo que recebeu PBS+formalina,  $p < 0,05$ .

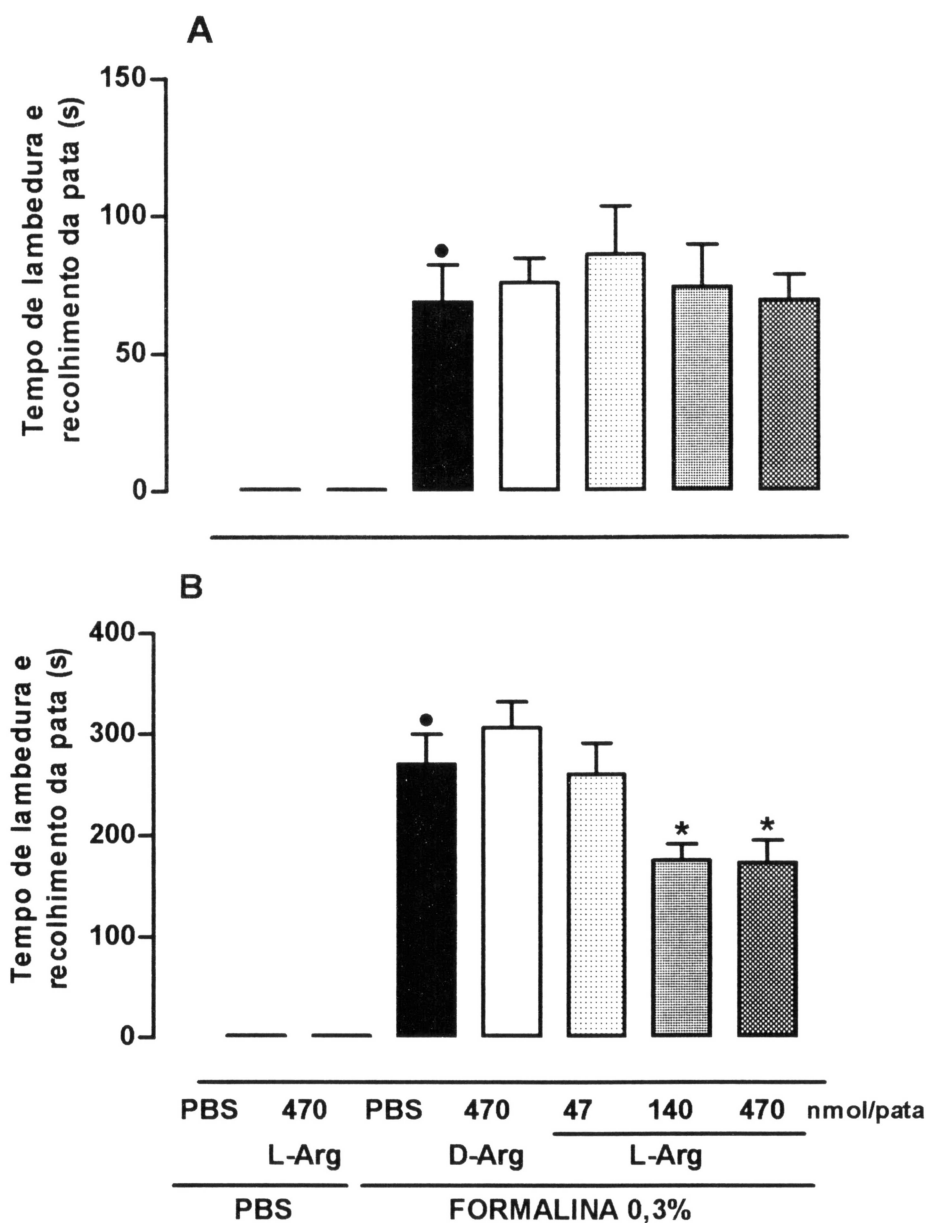


**Figura 14: Efeito do tratamento local com 7-Ni na nocicepção induzida por formalina 0,3%.** Os animais foram tratados com 7-Ni (6, 18 e 60 nmol/pata, 20  $\mu$ L) ou PBS, 15 minutos antes da injeção *ipl* de formalina 0,3% ( 50  $\mu$ L). As barras mostram a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata nas fases I (painel A: 0-5 min) e II (painel B: 20-40 min) (n=6). • Significância estatística nas fases I e II em relação ao grupo que recebeu PBS+PBS ou 7-Ni+PBS,  $p < 0,05$ . \* Significância estatística na fase II em relação ao grupo que recebeu PBS+formalina,  $p < 0,05$ .

### 4.3. Efeito do substrato e do doador para formação de NO na nocicepção induzida por formalina 0,3%.

O tratamento com L-Arginina (L-ARG) nas diferentes concentrações testadas, não alterou a resposta na fase I do teste da formalina (painel A, figura 15). A injeção *ip* de L-ARG 47 nmol/pata também não modificou a fase II da resposta nociceptiva à formalina (painel B, figura 15). Já o pré-tratamento com L-ARG 140 e 470 nmol/pata reduziram 35 e 36%, respectivamente, o tempo de lambertura e recolhimento da pata da fase II do teste da formalina 0,3%. O pré-tratamento com o isômero D-ARGININA, na maior concentração utilizada (470 nmol/pata), não foi diferente do grupo controle (PBS + formalina) em ambas as fases (figura 15).

O pré-tratamento com doador de NO, SNAP 130 nmol/pata, reduziu em 69% a fase I da resposta a formalina 0,3% (painel A, figura 16). Já na fase II da resposta, o pré-tratamento com diferentes concentrações de SNAP (13, 45 e 130 nmol/pata), reduziu de maneira dose-dependente (22, 40 e 77% respectivamente) o tempo de lambertura recolhimento da pata no teste da formalina 0,3% (painel B, figura 16).

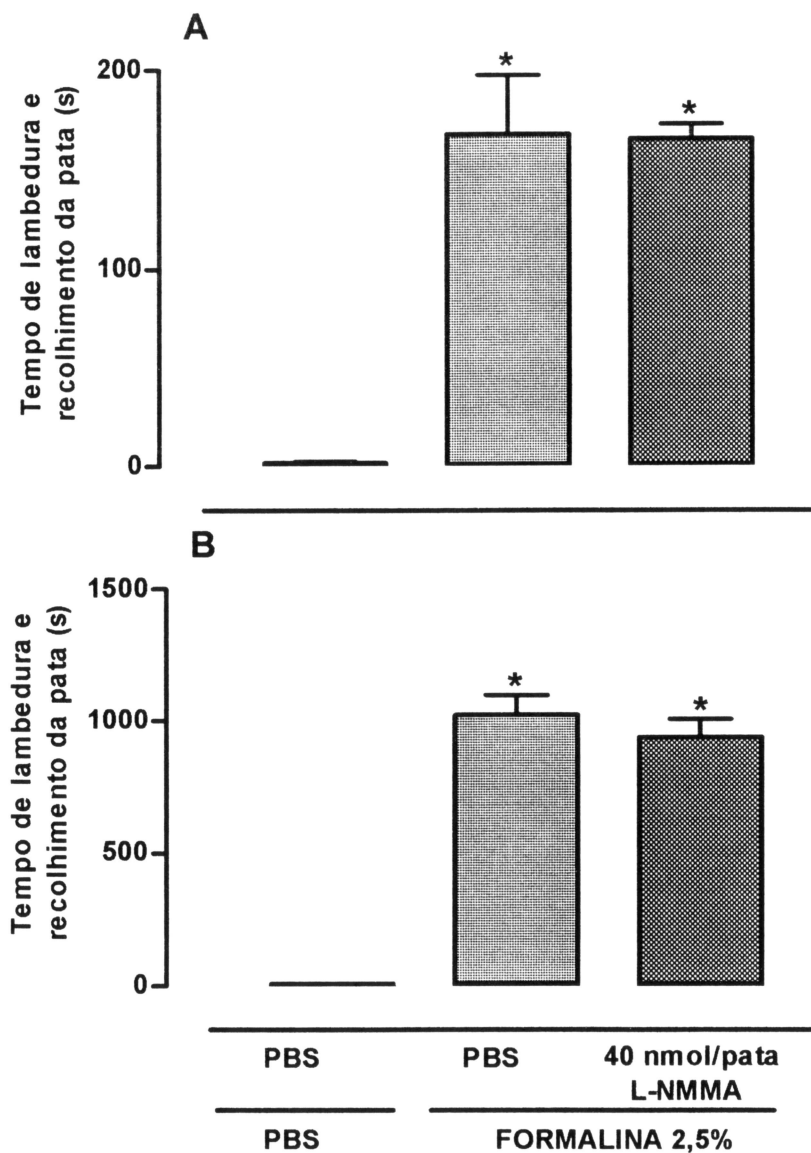


**Figura 15: Efeito do tratamento local com L-ARGININA (L-ARG) na nocicepção induzida por formalina 0,3%.** Os animais foram tratados com L-ARGININA (47, 140 ou 470 nmol/pata, 20  $\mu$ L) ou mesmo volume de PBS ou D-ARG (isômero inativo, 470 nmol/pata), 15 minutos antes da injeção *ipl* de formalina 0,3% (50  $\mu$ L). As barras representam a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata nas fases I (painel A: 0-5 min) e II (painel B: 20-40 min) (n=6). • Significância estatística nas fases I e II em relação ao grupo PBS+PBS e L-Arg+PBS,  $p < 0,05$ . \*Significância estatística na fase II em relação ao grupo PBS+Formalina,  $p < 0,05$ .



#### **4.4. Efeito do tratamento local com L-NMMA na fase II da nocicepção induzida por formalina 2,5%.**

O pré-tratamento com L-NMMA na concentração de 40nmol/pata não modificou a resposta nociceptiva à formalina na fase I do teste (painel A, figura 17). Assim como a administração *ipl* de L-NMMA 40 nmol/pata não modificou a fase II da resposta à formalina 2,5% em relação ao grupo controle (PBS+Formalina) (painel B, figura 17).

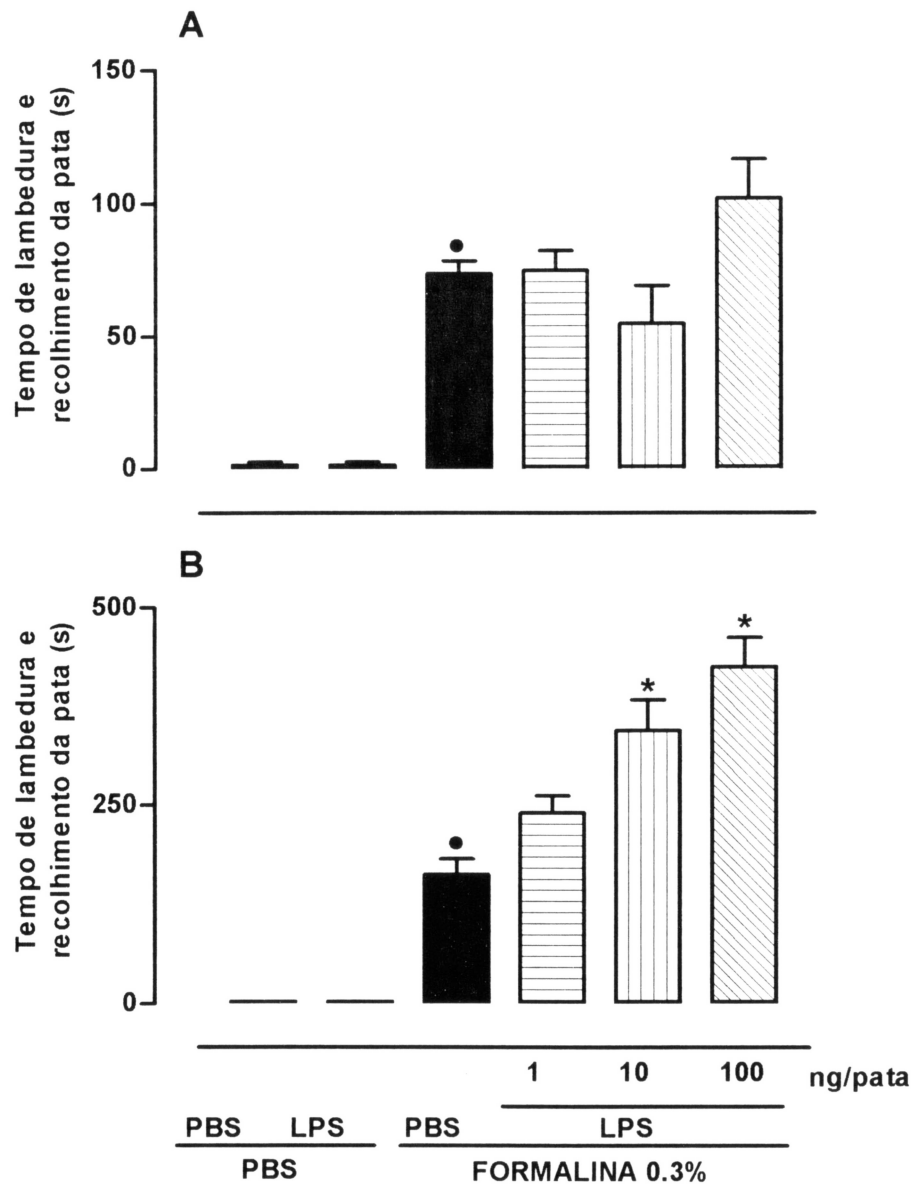


**Figura 17: Efeito do tratamento local com L-NMMA na nocicepção induzida por formalina 2,5%.** Os animais foram tratados L-NMMA (40 nmol/pata, 20  $\mu$ L) ou o mesmo volume de PBS, 15 min antes da injeção *ip*l de formalina 0,3% ou PBS (50 $\mu$ L). As barras representam a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata (s) nas fases I (painel A: 0-5 min) e II (painel B: 20-40 min) (n=6). \* Significância estatística em relação ao grupo PBS+PBS,  $p < 0,05$ .



#### **4.5. Efeito da sensibilização da pata com LPS na nocicepção induzida por formalina 0,3%.**

Para avaliar o efeito do LPS na sensibilização da pata, os animais foram pré-tratados com injeção *ipl* de diferentes concentrações de LPS (1, 10 e 100 ng/pata). O pré-tratamento com diferentes concentrações de LPS não alteraram a fase I da resposta nociceptiva à formalina (painel A, figura 18). Já na fase II da resposta foi possível observar um aumento dose-dependente do tempo de lambadura e recolhimento da pata; embora a concentração de 1 ng/pata não tenha sido significativa. A concentração de 10 ng/pata potenciou 110% e a de 100 ng/pata potenciou 160% a fase II da resposta nociceptiva à formalina, quando comparada ao controle (PBS+formalina) (painel B, figura 18).



**FIGURA 18: Efeito da sensibilização da pata com LPS na nocicepção induzida por formalina 0,3%.** Os animais receberam LPS (1, 10 ou 100 ng/pata, 20  $\mu$ L) ou o mesmo volume de PBS, 3 horas antes da injeção *ipl* de formalina 0,3% ou PBS (50  $\mu$ L). As barras representam a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata (s) na fase I (painel A: 0-5 min) e na fase II (painel B: 20-40 min) (n=6). • Significância estatística em relação aos grupos PBS+PBS e LPS+PBS,  $p < 0,05$  e na fase II, \* significância estatística em relação ao grupo PBS+formalina,  $p < 0,05$ .

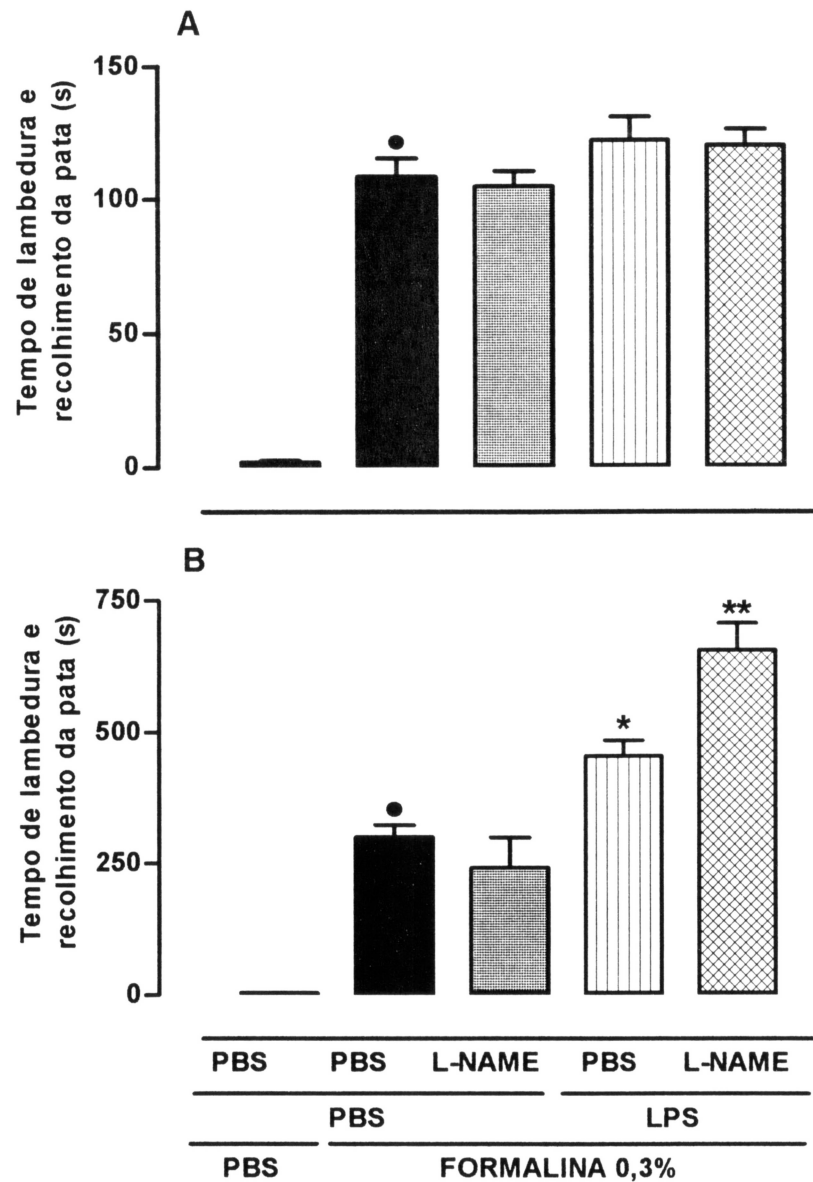
#### 4.6. Efeito dos inibidores da NO sintase no modelo de sensibilização da pata com LPS

Para que pudéssemos avaliar uma possível potenciação pelos inibidores da NOS, os animais receberam injeção *ip/* de LPS 10 ng/pata. O tratamento com LPS 10ng/pata (PBS+LPS+formalina) não alterou a resposta na fase I do teste em nenhum dos tratamentos (L-NAME, L-NMMA, AMT e 7-Ni) (painel A das figuras 19, 20, 21 e 22).

O tratamento dos animais com LPS 10 ng/pata, mas não com PBS, 3 h antes da injeção de formalina 0,3%, aumentou entre 52 e 73% a resposta nociceptiva induzida pela formalina (painel B das figuras 19 a 22).

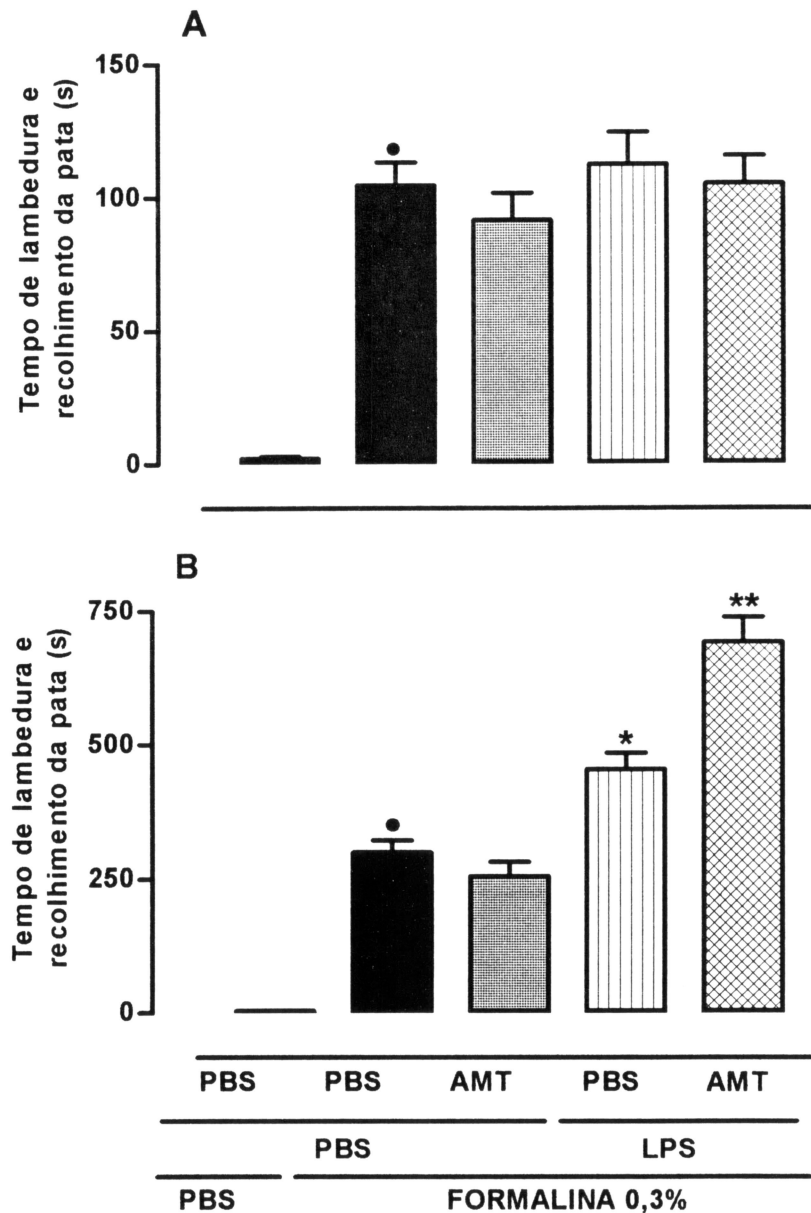
O pré-tratamento dos animais com L-NAME, anteriormente à injeção de LPS, promoveu um aumento adicional de 52% desta resposta. Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com L-NAME, anteriormente à injeção de PBS, não promoveu qualquer modificação na resposta (painel B da figura 19). Da mesma forma, pré-tratamento dos animais com L-NMMA, anteriormente à injeção de LPS, promoveu um aumento adicional de 46% desta resposta. Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com L-NMMA, anteriormente à injeção de PBS, não promoveu qualquer modificação na resposta (painel B da figura 20).

Resultados semelhantes foram obtidos com os inibidores específicos. O pré-tratamento dos animais com AMT e 7-NI, anteriormente à injeção de LPS, promoveu um aumento adicional de 52% e de 79%, respectivamente, desta resposta. Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com estes inibidores, anteriormente à injeção de PBS, não promoveu qualquer modificação na resposta (painel B das figuras 21 e 22).

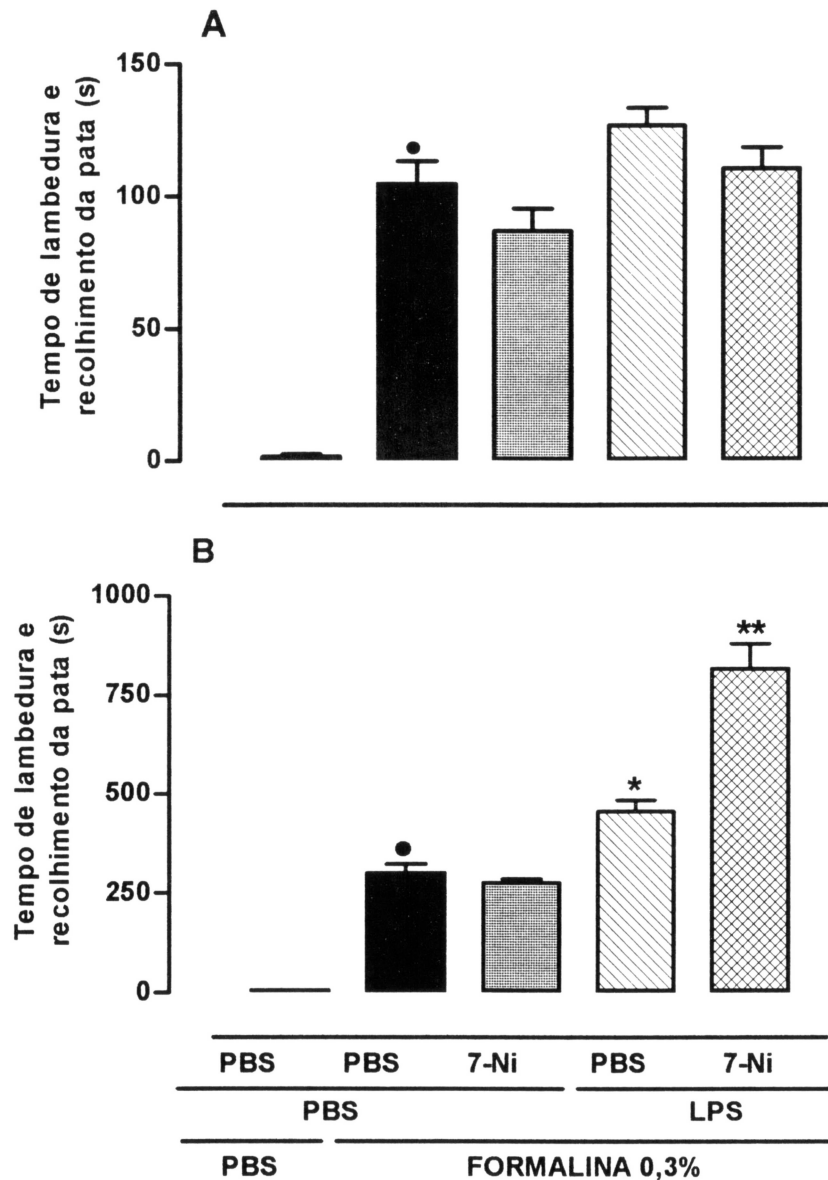


**Figura 19: Efeito do L-NAME sobre a potenciação induzida por LPS na resposta nociceptiva induzida por formalina 0,3%.** Os animais foram tratados com L-NAME (370 nmol/pata, 20 $\mu$ L) ou o mesmo volume de PBS, 15min antes da injeção de 20  $\mu$ L de PBS ou LPS 0,01 $\mu$ g/pata. Após 3 horas os animais receberam formalina 0,3% *ipl* ou PBS (50  $\mu$ L). As barras representam a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata (s) nas fases I (painel A: 0-5 min) e II (painel B: 20-40 min) (n=6). • Significância estatística nas fases I e II em relação ao grupo que recebeu PBS+PBS+PBS. \* Significância estatística na fase II em relação ao grupo que recebeu PBS+PBS+formalina. \*\* Significância estatística na fase II em relação ao grupo PBS+LPS+formalina,  $p < 0,05$ .





**Figura 21: Efeito do AMT sobre a potenciação induzida por LPS na resposta nociceptiva induzida por formalina 0,3%.** Os animais foram tratados com AMT (6 nmol/pata, 20 $\mu$ L) ou o mesmo volume de PBS, 15min antes da injeção de LPS 0,01 $\mu$ g/pata ou PBS. Após 3 horas os animais receberam formalina 0,3% *ipl* (50 $\mu$ L) ou PBS. As barras representam a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata (s) na fase I (painel A: 0-5 min) e fase II (painel B: 20-40 min) (n=6). • Significância estatística nas fases I e II em relação ao grupo PBS+PBS+PBS. \* Significância estatística na fase II em relação ao grupo PBS+PBS+formalina. \*\* Significância estatística na fase II em relação ao grupo PBS+LPS+formalina,  $p < 0,05$ .



**Figura 22: Efeito do 7-Ni sobre a potenciação induzida por LPS na resposta nociceptiva induzida por formalina 0,3%.** Os animais foram tratados com 7-Ni (60 nmol/pata, 20 $\mu$ L) ou o mesmo volume de PBS, 15min antes da injeção de LPS 0,01 $\mu$ g/pata ou PBS. Após 3 horas os animais receberam formalina 0,3% *ipi* (50 $\mu$ L) ou PBS. As barras representam a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata (s) nas fases I (painel A: 0-5 min) e fase II (painel B: 20-40 min) (n=6). • Significância estatística nas fases I e II em relação ao grupo PBS+PBS+PBS. \* Significância estatística na fase II em relação ao grupo PBS+PBS+formalina. \*\* Significância estatística na fase II em relação ao grupo PBS+LPS+formalina,  $p < 0,05$ .

#### **4.7. Efeito do substrato para a formação de NO e do doador de NO na potenciação induzida por LPS.**

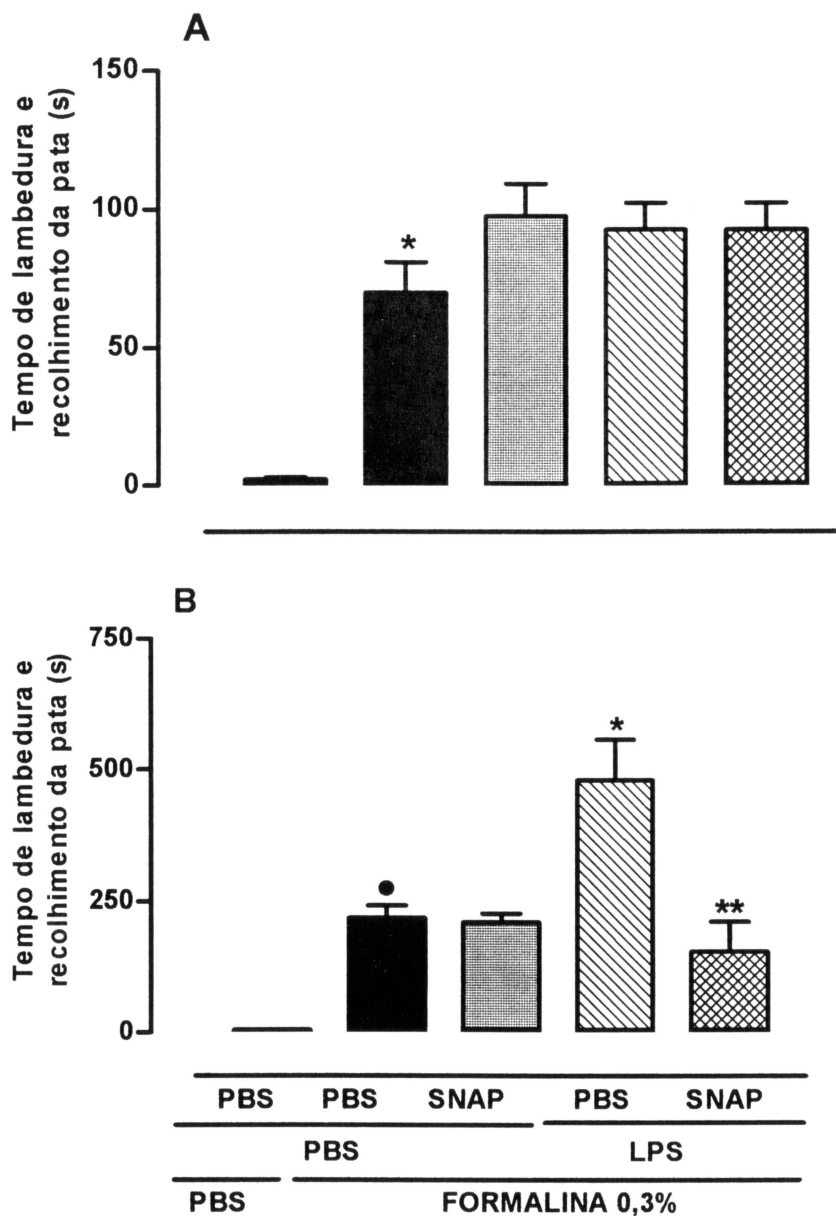
Para que pudéssemos avaliar uma possível redução da hiperalgesia pela administração do substrato para a NOS ou doador de NO, os animais receberam injeção *ipl* de LPS 100 ng/pata. O tratamento com LPS 100 ng/pata (grupo PBS+LPS+formalina) não alterou a resposta na fase I do teste em nenhum dos tratamentos (L-ARG ou SNAP) (painel A das figuras 23 e 24).

O tratamento dos animais com LPS 100ng/pata, mas não com PBS, 3 h antes da injeção de formalina 0,3%, aumentou em torno de 100% a resposta nociceptiva induzida pela formalina (painel B das figuras 23 e 24).

O pré-tratamento dos animais com L-ARG, anteriormente à injeção de LPS, promoveu uma redução de 44% desta resposta levando-a a níveis similares àqueles observados em animais não sensibilizados com LPS (painel B da figura 23). Da mesma forma o pré-tratamento dos animais com SNAP, anteriormente à injeção de LPS, promoveu uma redução de 68% desta resposta (painel B, figura 24). Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com L-ARG ou SNAP, anteriormente à injeção de PBS, não promoveu qualquer modificação na resposta (painel B, figuras 23 e 24).



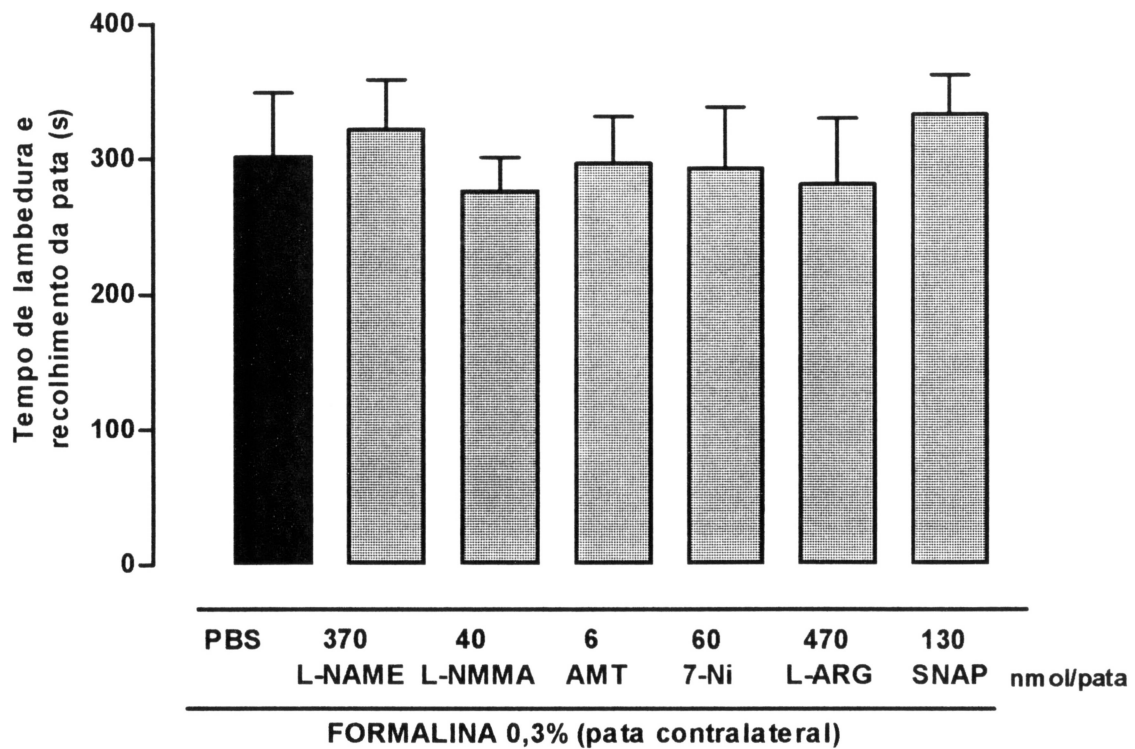




**Figura 24: Efeito do SNAP sobre a potenciação induzida por LPS na resposta nociceptiva induzida por formalina 0,3%.** Os animais foram tratados com SNAP (136 nmol/pata, 20 $\mu$ L) ou o mesmo volume de PBS, 15min antes da injeção de LPS 100ng/pata ou PBS. Após 3 horas os animais receberam formalina 0,3% *ipl* (50 $\mu$ L) ou PBS. As barras representam a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata (s) nas fases I (painel A: 0-5 min) e fase II (painel B: 20-40 min) (n=6). • Significância estatística nas fases I e II em relação ao grupo PBS+PBS+PBS. \* Significância estatística na fase II em relação ao grupo PBS+PBS+formalina. \*\* Significância estatística na fase II em relação ao grupo PBS+LPS+formalina,  $p < 0,05$ .

#### **4.8. Efeito dos diferentes tratamentos na pata contralateral sobre a resposta nociceptiva induzida por formalina.**

O pré-tratamento com os diferentes inibidores da NOS, doador e substrato para formação de NO, não alteraram a resposta induzida por formalina 0,3% na pata contra-lateral, em ambas as fases do teste da formalina (figura 25).



**Figura 25: Efeito dos diferentes tratamentos na pata contralateral sobre a resposta nociceptiva induzida por formalina 0,3%.** Os animais foram tratados com diferentes inibidores da NOS, L-ARG e SNAP nas doses descritas na figura (20 $\mu$ L/pata), 15min antes da injeção *ip*l de formalina 0,3%(50  $\mu$ L) na pata contralateral. As barras representam a média  $\pm$  e.p.média do tempo de lambedura e recolhimento da pata (s) na fase II (20-40min) (n=6).

## 4.9. Tabela 1: Resumo dos resultados obtidos.

| TRATAMENTO | FASE I         | FASE II |
|------------|----------------|---------|
|            | Formalina 0,3% |         |
| L-NAME     | ↔              | ↑       |
| L-NMMA     | ↔              | ↑       |
| AMT        | ↔              | ↑       |
| 7-Ni       | ↔              | ↑       |
| SNAP       | ↓              | ↓       |
| L-ARGININA | ↔              | ↓       |

| TRATAMENTO | FASE I               | FASE II |
|------------|----------------------|---------|
|            | LPS + Formalina 0,3% |         |
| L-NAME     | ↔                    | ↑       |
| L-NMMA     | ↔                    | ↑       |
| AMT        | ↔                    | ↑       |
| 7-Ni       | ↔                    | ↑       |
| SNAP       | ↔                    | ↓       |
| L-ARGININA | ↔                    | ↓       |

↔ (sem efeito); ↓ (redução da resposta nociceptiva); ↑ (aumento da resposta nociceptiva)

## 5. DISCUSSÃO

A dor é um fenômeno complexo e bastante subjetivo. Esta complexidade tem levado os pesquisadores a propor diferentes modelos para o estudo da dor, bem como para a avaliação da eficácia de drogas que atenuem ou bloqueiem esta resposta. Dentre estes modelos está a injeção intraplantar (*ipl*) de formalina (DUBUISSON & DENNIS, 1977). Este modelo constitui um teste bastante interessante, pois a injeção de formalina na pata do animal induz uma resposta nociceptiva bifásica. A fase I desta resposta caracteriza-se pelo estímulo químico direto dos nociceptores ou o que chamamos de dor neurogênica, enquanto que a fase II, por uma dor do tipo inflamatória (SHIBATA, M. & cols., 1989; HUNSKAAR & HOLE, 1987). Assim a administração desta substância química irritante ativa diretamente os nervos periféricos levando a ativação de neurônios no corno dorsal da medula espinhal (WATKINS & cols, 1997; PORRO & CAVAZZUTI, 1993). Por outro lado, a reação inflamatória local que se desenvolve nos minutos subsequentes à injeção de formalina, envolve a liberação de diversos mediadores, entre eles a bradicinina, substância P, histamina, serotonina e prostaglandinas que interagem com seus respectivos receptores, manifestando assim as diferentes características deste processo (revisado por DAMAS & LIÉGEOIS, 1999).

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam claramente uma resposta dose-dependente promovida pela injeção de diferentes concentrações de formalina, resposta esta bem caracterizada por estas duas fases distintas. A primeira fase foi observada nos primeiros 5 min após a injeção da substância algogênica. A esta fase seguiu-se um período de relativa inatividade, entre os 10 e 15 minutos, e em seguida observou-se um novo aumento no comportamento de lambida e elevação da pata que só começou a diminuir novamente a partir dos 40 minutos. Esta avaliação nos levou a finalizar a avaliação desta fase, a fim de evitar sofrimento desnecessário aos animais.

Esta resposta característica da formalina, inclusive sua evolução temporal, vem sendo observada por diversos autores com doses similares do estímulo (TJÖLSEN e cols, 1992; FRANKLIN & ABBOTT, 1989).

A concentração selecionada neste estudo para os experimentos posteriores foi a de 0,3%. A escolha desta concentração deveu-se principalmente ao fato de

podermos observar tanto um incremento quanto uma diminuição da resposta. Isto tornou-se necessário uma vez que objetivamos o trabalho no sentido de avaliar a resposta à participação do NO como agente nociceptivo ou antinociceptivo. A concentração de formalina superior a esta (0,6%) promove uma resposta bastante similar à resposta máxima na segunda fase e portanto, seria bastante provável que não pudéssemos observar incremento na resposta. Ainda, em 1993, WHEELER-ACETO e COWAN observaram uma diminuição no tempo de lambda da pata na fase I em concentrações superiores a 1,5% e diminuição ou ausência do comportamento nociceptivo em ambas as fases, em concentrações superiores a 10 ou 15%. Os autores sugerem que, a utilização de altas concentrações de formalina sejam capazes de induzir outros comportamentos, como por exemplo longos períodos de imobilidade, que se sobreporiam ao comportamento inicialmente visto. Neste sentido, a possibilidade de que alguns tratamentos a serem realizados neste estudo pudessem potencializar a resposta, levando esta resposta aos níveis em que se observa a imobilidade, poderiam ser interpretados como diminuição da dor quando na verdade isto não estaria ocorrendo.

Outro argumento contra o uso de altas concentrações de formalina é o fato de que, em camundongos, em concentrações superiores a 2,5% a cicatrização do tecido ainda não está completa 10 dias após a injeção, indicando que um dano persistente poderia estar ocorrendo (ROSLAND & cols, 1990).

Uma vez selecionada a concentração de formalina a ser utilizada, o passo seguinte foi avaliar o efeito dos diversos tratamentos sobre esta resposta. Inicialmente selecionamos o L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS. A administração *ip* de L-NAME potencializou a segunda fase da resposta nociceptiva à formalina sugerindo portanto, que a geração endógena de NO durante a fase II da resposta estaria atuando no sentido de diminuir a intensidade da dor no local. No entanto, há estudos que demonstram que o L-NAME poderia atuar também como antagonista de receptores muscarínicos (BUXTON et al., 1993). Já é conhecido também que agonistas de receptores muscarínicos possuem atividade antinociceptiva (GHELARDINI e cols., 2000). Assim o efeito deste inibidor poderia estar associado a efeitos outros que não a inibição da NOS.

A fim de esclarecer um pouco mais este ponto, utilizamos outro inibidor não seletivo da NOS, o L-NMMA. Este inibidor, nas doses de 12 e 40 nmol/pata, também

potenciou resposta nociceptiva induzida por formalina 0,3%, corroborando os resultados obtidos anteriormente. Este efeito parece ser específico para o isômero L, uma vez que o D-NMMA na maior dose não modificou a resposta. Estes resultados em conjunto sugerem que na nocicepção induzida por baixas doses de formalina o NO gerado endogenamente durante a segunda fase atua no sentido de diminuir a dor, ou seja, tem papel antinociceptivo endógeno.

Estes resultados contradizem alguns estudos anteriores. SAKURADA e cols. (2001), demonstraram que a injeção *ipl* de L-NAME reduziu de maneira dose-dependente a fase II da resposta à formalina 2% e não interferiu na fase I do teste. Em adição, ROCHE e cols. (1996) observaram que a injeção *i.t.* de L-NAME também reduziu a resposta à formalina 2,5%. Nestes dois trabalhos, portanto, o NO endógeno apresenta uma ação nociceptiva. Esta contradição pode estar relacionada a dois fatores principais. Em ambos os estudos (SAKURADA e cols, 2001 e ROCHE e cols, 1996) a intensidade do estímulo nociceptivo é superior a que utilizamos. Esta variação na concentração de formalina utilizada pode estar atuando em grupos de neurônios sensoriais primários diferentes, promovendo respostas nociceptivas também diferentes. Ainda, como dito anteriormente e observado por vários autores (WHEELER-ACETO & COWAN, 1993), a concentração entre 2 e 2,5% de formalina produz uma resposta máxima ou bastante próxima à máxima, sendo pouco provável que se possa evidenciar um aumento no comportamento de lambar e levantar a pata. Utilizando doses similares de formalina, ou seja, 2,5% o efeito nociceptivo do L-NMMA observado por nós anteriormente não foi mais evidenciado. É possível ainda, que os efeitos observados por estes autores se devam a outros comportamentos observados com altas doses de formalina como a imobilidade e não um efeito antinociceptivo propriamente dito.

Este efeito duplo do NO também pode estar relacionado à via de administração utilizada e conseqüentemente ao local onde o NO é gerado. No estudo de ROCHE e cols. (1996) a administração de L-NAME foi através da via *i.t.* enquanto que neste estudo os tratamentos, foram locais (*ipl*). Deste modo, é possível que o NO possua ações diferentes dependendo do local onde é gerado. Um estudo interessante foi realizado por PAUL-CLARK e cols (2001). De acordo com estes autores a atuação do NO muda conforme a via de administração utilizada. Para testar esta hipótese, os autores utilizaram um modelo de inflamação aguda, que é a pleurisia induzida pela



carragenina. Este estudo foi desenvolvido para investigar os efeitos de inibidores da NOS, administrados localmente no sítio inflamatório e comparar os seus efeitos com inibidores da NOS administrados sistemicamente. Para este propósito, os autores utilizaram S-(2-aminoetil) isotioreia (AE-ITU) e N-(3-aminometil-benzil) acetamidina (1400 W), os quais são inibidores mais seletivos para a iNOS e estruturalmente diferentes; assim como o L-N<sup>5</sup> (1-iminoetil)-ornitina (L-NIO), um inibidor mais seletivo para a eNOS. A formação do exsudato inflamatório, o número de células inflamatórias infiltradas, e os níveis de nitrito e nitrato no exsudato foram avaliados em vários tempos ao longo do processo inflamatório. Observou-se que os inibidores da NOS administrados localmente exacerbaram a inflamação como resultado de um aumento de mediadores pró-inflamatórios como a histamina, LTB<sub>4</sub> e o O<sub>2</sub><sup>-</sup>, sugerindo que o NO produzido no local atua como antiinflamatório. Este resultado, de certa maneira, corrobora nossos achados, uma vez que observamos que o NO gerado no local possui uma ação analgésica. Por outro lado, a administração sistêmica de inibidores da NOS amenizaram a inflamação, mostrando que as propriedades antiinflamatórias diferenciais dos inibidores da NOS dependem do local onde o NO está sendo produzido (PAUL-CLARK & cols, 2001).

Considerando todos estes pontos, é possível sugerir que o NO gerado no sítio inflamatório possui uma atividade antinociceptiva, pelo menos no que diz respeito a formalina.

Uma vez que a ação do NO endógeno foi evidenciada durante a fase inflamatória da nocicepção induzida por formalina, procuramos avaliar se haviam diferenças entre as enzimas envolvidas na geração deste NO utilizando inibidores mais seletivos para a NOS induzida (AMT) e NOS neuronal (7-Ni). Ambos os inibidores potenciaram a resposta induzida por formalina 0,3%. Estes resultados confirmam os resultados obtidos com L-NAME e o L-NMMA e sugerem ainda que tanto a NOS induzida quanto a NOS neuronal estão envolvidas na geração de NO após a injeção de formalina. No entanto, é importante ressaltar que foi necessária uma dose 100 vezes maior de 7-Ni do que AMT para induzir um aumento significativamente diferente na nocicepção induzida por formalina. Este dado, sugere uma maior importância da NOS induzida para a geração de NO durante a resposta induzida por formalina.

Como a NOS induzida parece ter um papel importante na geração de NO endógeno durante a resposta nociceptiva induzida por formalina, propusemos uma outra abordagem, ou seja, avaliar se um aumento na quantidade de NO gerado no local, através do fornecimento de mais substrato (L-Arg) à enzima, poderia influir no papel do NO como analgésico. Esta questão baseou-se em observações feitas por outros autores. KAWABATA & cols. (1994) demonstraram que a administração local de L-ARGININA possui ações pró e antiinflamatórias na nocicepção induzida por formalina, dependendo da concentração utilizada.

A administração de L-Arg na dose de 140 nmol/pata reduziu 35% a resposta nociceptiva induzida por formalina 0,3% na fase II do teste. No entanto, este parece ser o efeito máximo, pois uma dose 3 vezes maior do substrato não resultou em aumento do efeito. É provável que a concentração do substrato fornecida seja suficiente para que a enzima esteja trabalhando em velocidade máxima e na verdade, o fornecimento de mais substrato não aumentou a quantidade de NO gerado.

A possibilidade de suplantar esta limitação na geração de NO endógeno pela NOS seria o fornecimento de NO exógeno. O tratamento dos animais com SNAP induziu uma resposta dose-dependente da fase II da nocicepção induzida por formalina 0,3%.

A administração de L-Arg nas diferentes concentrações utilizadas não alterou a resposta nociceptiva na fase I do teste da formalina, no entanto, a maior dose de SNAP (130 nmol/pata) reduziu em 69% a fase I da resposta nociceptiva, mostrando pela primeira vez que o óxido nítrico participa da fase neurogênica no Teste da Formalina. Este resultado confirma a ação local do NO como antinociceptivo no Teste da Formalina.

O SNAP é um doador não enzimático de NO e uma vez liberado no sítio de atuação já se torna efetivo. A L-Arg, por se tratar do substrato para a formação do NO, depende da ação de enzimas para sintetizá-lo e posteriormente exercer a sua ação. Por este motivo o pré-tratamento com L-Arg não permitiu a visualização da ação do NO na fase I do teste; uma vez que esta fase é extremamente curta (5 primeiros minutos de observação) não sendo suficiente para liberar o NO e conseqüentemente visualizar a sua ação antinociceptiva local.

Em um modelo de dor persistente pós-operatória (incisão da pata em ratos), a aplicação local de drogas que geram baixa concentração de NO, inclusive baixas concentrações de SNAP, reduziram a dor na incisão, enquanto que altas concentrações de NO intensificaram a dor (PRADO & cols., 2002). Em nossos estudos não avaliamos doses maiores de SNAP. É importante ressaltar que PRADO & cols. (2002) observaram que os efeitos antinociceptivos de baixas doses de NO se dão através de um mecanismo dependente da ativação da guanilil ciclase e geração de GMPc. Por outro lado, em altas concentrações de NO se dá através de mecanismos independentes da guanilil ciclase. Alguns autores chamam a atenção para o fato de que diversos fatores devem ser considerados durante estudos de análise com doadores de NO; incluindo a diversidade de ferramentas farmacológicas utilizadas como doadores de NO, a alta taxa de variabilidade de NO liberado por estes compostos e a possibilidade de, além de NO, estes doadores estejam liberando outros radicais. O uso de doadores seletivos de NO, como por exemplo DETA-NO, o qual libera pequenas quantidades de NO de uma maneira estável, foi considerado o doador mais preciso para mimetizar o comportamento do NO sintetizado endogenamente (LAMAS & cols, 1998).

No teste da formalina, como já foi dito anteriormente, podemos observar a dor declarada em dois momentos, ou seja, por estímulo direto dos nociceptores (fase I) e através da inflamação e sensibilização no corno dorsal (fase II) (PUIG & SORKIN, 1996). A percepção da dor em muitos casos está relacionada com a elevada sensibilidade a uma informação sensorial de uma região do corpo que está recebendo o estímulo nociceptivo (BARANAUSKAS & NISTRÍ, 1998). A sensibilização periférica refere-se ao aumento da excitabilidade dos neurônios que caracteriza-se pelo aumento na resposta e na atividade espontânea, e estão relacionadas com fibras aferentes primárias de grande e pequeno calibre. A sensibilização de neurônios geralmente ocorre em virtude de uma injúria tecidual e/ou inflamação (LI & cols., 1999). O LPS, um lipopolissacarídeo irritante, é capaz de promover uma reação de alarme, onde há a ativação de uma cascata de mediadores inflamatórios assim como uma diminuição no limiar de excitabilidade do neurônio (hiperalgesia) (UENO & cols, 2001). Em modelos de hiperalgesia inflamatória (mecânica), a resposta à carragenina e ao LPS são iniciados pela bradicinina, atuando em receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, os quais estimulam a liberação de TNF $\alpha$ . O TNF $\alpha$

por sua vez induz a produção de IL-1 $\beta$  e IL-6, os quais estimulam a produção de prostaglandinas ou ainda IL-8, o qual estimula a produção de aminas simpatomiméticas (CUNHA & cols., 1992; FERREIRA & cols., 1993). Estes mediadores seriam os responsáveis pela sensibilização do aferente nociceptivo primário. Como o estado hiperalgésico é característico da resposta inflamatória e os efeitos observados até o momento apontavam para um papel importante do NO nesta fase da resposta, procuramos desenvolver um modelo nociceptivo que nos permitisse avaliar a participação do NO na hiperalgesia, sem modificarmos muito o parâmetro avaliado (comportamento característico da formalina).

Baseados nos estudos citados acima administramos diferentes doses de LPS na pata do animal e após 3 horas administramos uma baixa dose de formalina. Observamos que o LPS, nas doses de 10 e 100 ng/pata foi capaz de potencializar a fase II da formalina, provavelmente decorrente da geração de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas geradas pelo LPS. É possível que em doses maiores de LPS ou em um período maior entre a administração de LPS e formalina também observássemos uma potenciação na fase I da resposta à formalina. Em estudos desenvolvidos em nossos laboratórios observamos que a administração prévia de prostaglandinas (1 hora) nas doses de 50 e 100 ng/pata potencializou somente a fase II do comportamento nociceptivo induzido por formalina administrada na região orofacial. No entanto, quando administrada 3 horas antes da formalina, a dose de 100 ng/pata potencializou ambas as fases, enquanto que a dose de 50 ng/pata somente a segunda fase (CHICHORRO & cols, 2003).

Neste estudo, optamos por utilizar estas doses de LPS pelas mesmas razões que utilizamos uma baixa dose de formalina, ou seja, poderíamos observar tanto um incremento quanto uma redução decorrente do tratamento.

Uma vez estabelecido o modelo, passamos a avaliação dos diferentes tratamentos na sensibilização dos nociceptores, nesta fase do estudo portanto, administramos anteriormente ao LPS somente doses efetivas dos tratamentos.

A fim de avaliar se os inibidores da NOS estariam aumentando a sensibilização do neurônio aferente primário optamos pela utilização da menor dose de LPS.

Como esperado, nenhum dos tratamentos promoveu qualquer alteração na fase I da resposta à formalina.

Na fase II, os inibidores da NOS, L-NAME, L-NMMA, AMT e 7-Ni, potenciaram a sensibilização promovida pelo LPS 10 ng/pata, sugerindo que o NO gerado endogenamente, tanto pela NOS induzida quanto pela NOS neuronal, reduz a resposta nociceptiva inflamatória por reduzir a sensibilização no nociceptor. Este efeito parece ser específico na sensibilização, uma vez que nenhum dos tratamentos, que eram efetivos quando administrados imediatamente antes da formalina, modificaram a resposta induzida por formalina quando administrados 3 horas antes deste agente.

Para avaliarmos o efeito inibitório do doador de NO (SNAP) e do substrato para a sua formação (L-Arg) na sensibilização, optamos pela maior concentração de LPS testada (100 ng/pata). O pré-tratamento com SNAP e L-ARG revertem a sensibilização promovida pelo LPS, corroborando mais uma vez a ação anti-hiperalgésica do NO periférico.

Foi demonstrado o envolvimento do NO na analgesia periférica, através do nitroprussiato de sódio, um gerador não enzimático de NO, o qual promoveu uma resposta antinociceptiva no modelo de pressão na pata do rato. Da mesma maneira, foi demonstrado que a L-Arginina *ipl*, mas não a D-Arginina, causou analgesia na hiperalgesia induzida por carragenina na pata, e esta antinocicepção, induzida pela L-Arginina foi bloqueada pelo L-NMMA, um inibidor não seletivo da NOS (DUARTE & cols, 1990). No modelo de hiperalgesia mecânica o SNAP também reverteu a hiperalgesia promovida pelo glutamato, sugerindo novamente, que a ativação do mecanismo arginina/NO/GMPc é capaz de antagonizar a hiperalgesia periférica (FERREIRA & LORENZETTI, 1994).

A analgesia promovida por drogas antiinflamatórias não esteroidais são explicadas pelo bloqueio da síntese de prostaglandinas, prevenindo desta maneira, a sensibilização dos receptores da dor (VANE, 1971). No entanto, diversos antiinflamatórios não-esteroidais, entre eles a dipirona e o meloxicam, bem como opióides, possuem um efeito direto nos estados hiperalgésicos inflamatórios, promovendo uma "down-regulation" nos receptores da dor através da ativação da via L-Arginina/NO/GMPc nos neurônios sensoriais da dor (LORENZETTI & FERREIRA, 1985; DUARTE & cols, 1990 e 1992; FERREIRA & cols, 1991; AGUIRRE-BANUELOS & GRANADOS-SOTO, 2000). Mais recentemente, tem sido demonstrado que a dessensibilização do nociceptor pelo NO é decorrente da

ativação de canais de potássio sensíveis a ATP uma vez que a glibenclamida, um antagonista seletivo destes canais bloqueou o efeito analgésico do nitroprussiato de sódio (um doador de NO) e da morfina (SOARES e cols., 2000; RODRIGUES & DUARTE, 2000; SOARES & DUARTE, 2001)

Por fim, para confirmarmos que as repostas observadas se deviam única e exclusivamente a um efeito local das drogas utilizadas (e não estariam atingindo a circulação sangüínea e atuando em outros locais), avaliamos o comportamento nociceptivo do animal administrando os diferentes tratamentos em uma pata, e a formalina na pata contralateral. O tratamento com L-NAME, L-NMMA, AMT, 7-Ni, SNAP e L-ARGININA não alteraram a resposta nociceptiva a formalina após 3 horas e 15 minutos, em ambas as fases. Isto se deve provavelmente ao fato de que o NO é uma molécula gasosa que atravessa facilmente as membranas neuronais e tem um tempo de meia-vida na ordem de milissegundos a segundos e uma esfera de ação limitada devido ao seu curto tempo de meia-vida (MELLER & GEBHART, 1993).

Nossa abordagem neste estudo demonstrou claramente que o NO endógeno gerado periféricamente possui um efeito antinociceptivo, possivelmente por reduzir a sensibilização do nociceptor através da abertura de canais de potássio. Este efeito antinociceptivo pode ser obtido também através da administração de baixas doses de NO exógeno. É possível, no entanto, que maiores concentrações teciduais de NO possam gerar efeitos contrários.

Esta abordagem, também não nos permite avaliar o papel do NO em outros sítios, particularmente na medula espinhal. No modelo da placa quente a hiperalgesia térmica induzida pelo glutamato também é mediada pelo mecanismo arginina/NO/GMPc nos sítios espinhais e supraespinhais, mas de uma maneira contrária, ou seja, o pré-tratamento *i.p.*, *i.t.* ou *i.c.v.* com os inibidores da NOS (L-NAME, L-NOARG e L-NIO) antagonizaram, de maneira dose-dependente, a hiperalgesia térmica induzida pelo glutamato. E a hiperalgesia promovida por baixas concentrações de glutamato foi significativamente potenciada pela co-administração *i.t.* de L-arginina, pelo doador de NO, SNAP e pelo análogo estável do GMPc, 8-Br-GMPc (FERREIRA & cols, 1999). Outro estudo que avaliou a geração central de NO foi feito por SHIBUTA e cols (1996). Estes autores demonstraram que a administração *i.c.v.* do doador de NO (NOC-18) exibe um efeito nociceptivo no teste

da formalina. O NOC-18 é um composto liberador de NO, que não necessita da presença de um cofator. Os animais receberam NOC-18 *i.c.v.* nas doses de 15 e 150 µg por rato. A resposta nociceptiva foi avaliada através da injeção *i.pl.* de 50 µL de formalina 5%. Neste estudo o NO exógeno, derivado da administração *i.c.v.* do NOC-18, um doador de NO, facilitou a fase II da nocicepção induzida pela formalina de uma maneira dose-dependente. Este aumento da resposta foi completamente abolido pelo inibidor da guanilil ciclase, metileno blue. Segundo os autores, estes resultados demonstram que o NO facilita a nocicepção no sistema nervoso central via mecanismo NO-GMPcíclico (SHIBUTA & cols, 1996). Neste estudo, no entanto, vale chamar a atenção para a alta dose de formalina utilizada.

Estudos recentes indicam que a hiperalgesia em modelos animais de dor inflamatória e neuropática estão estreitamente ligados com a ativação de um circuito modulatório descendente que envolve tanto a inibição quanto a facilitação espinhal e supra-espinhal do impulso nociceptivo (REN & DUBNER, 2002). Na medula rostral ventromedial (RVM), dois tipos de neurônios, as células on e células off, têm sido identificados como neurônios modulatórios da dor. As células off estão relacionadas com a inibição do comportamento nociceptivo, enquanto que as células on estão relacionadas com a facilitação deste comportamento (FIELDS & cols., 1991). Outra hipótese para a ação controversa do NO na hiperalgesia pode estar relacionada ao fato de que a presença de NO a nível espinhal e supraespinhal estejam atuando no mecanismo descendente modulatório da dor, ativando primeiramente células on na medula rostral ventromedial (RVM) e conseqüentemente promovendo facilitação do impulso nociceptivo como uma forma de proteção inicial ao tecido que está sendo lesionado. Esta facilitação inicial deve funcionar como um aumento do comportamento nociceptivo de escape, ao passo que a inibição mais tardia e dominante do sítio lesionado seja para suprimir ou reduzir o movimento, para ajudar na cura e recuperação do tecido lesionado. Já está bem estabelecido que o influxo de cálcio através do receptor NMDA ativado promove, entre outros eventos, a produção de NO e uma subseqüente cascata de eventos que contribuem para plasticidade e sensibilização central (MELLER & GEBHART, 1993). A hiperalgesia visceral induzida pelo zimosan é influenciada pelo sistema facilitatório descendente mediado pela ativação de receptores NMDA na RVM e implicando na produção de NO supraespinhal (COUTINHO & cols., 1998, 2001).

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos sugerir que:

- ✓ O NO participa da nocicepção induzida pela injeção *ipl* de formalina;
- ✓ A potenciação da dor inflamatória pelos inibidores da NOS e a redução da dor pelo doador e pelo substrato para a formação de NO, mostram a ação antinociceptiva local do NO no Teste da Formalina;
- ✓ O pré-tratamento com inibidor específicos da iNOS (AMT) e nNOS (7-Ni), potenciaram a dor inflamatória induzida por formalina, mostrando a presença periférica da NOS do tipo II (iNOS) e do tipo I (nNOS) neste modelo. No entanto, a presença da NOS do tipo II pode ser mais importante.
- ✓ O efeito antinociceptivo do NO parece estar relacionado a um efeito anti-hiperalgésico local.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE-BAÑUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. *European Journal of Pharmacology*, v.395, p.9-13, 2000.

ASSREURY, J.; CUNHA, F.Q.; LIEW, F.Y.; MONCADA, S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. ***British Journal of Pharmacology***, v.108, n. 3, p. 833-837, 1993.

BARANAUSKAS, G.; NISTRÌ, A. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. ***Progress in Neurobiology***, v. 54, p. 349-365, 1998.

BARINGA, M. Is nitric oxide the "retrograde messenger"? ***Science***, v. 254, p. 1296-1297, 1991.

BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.; FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA***, v.87, p.1620-1624, 1990.

BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. ***Physiology Review***, v.67, p.67-186, 1987.

BULT, H.; BOECKXSTAENS, G.E.; PELCKMANS, P.A.; JORDAENS, F.H.; VAN MAERCKE, Y.M.; HERMAN, A.G. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic, non cholinergic neurotransmitter. ***Nature***, v. 345, p. 346-347, 1990.

BUXTON, I.L.; CHEEK, D.J.; ECKMAN, D.; WESTFALL, D.P.; SANDERS, K.M.; KEEF, K.D. NG-nitro L-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. ***Circ Research***, v.72, n.2, p.387-395, 1993.

CHANG, M.M.; LEEMAN, S.E.; NIALL, H.D. Amino acid sequence of substance P. **Nature**, v.232, p. 86-87, 1971.

CHEN, X.; LEVINE, J. D. NOS inhibitor antagonism of PGE2-induced mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors in the rat. **Journal of Neurophysiology**, v. 81, n.3, p. 963-966, 1999.

CHICHORRO, J.; Dor orofacial: mediadores envolvidos e controle farmacológico. Curitiba, **Tese de Mestrado em Farmacologia**, Universidade Federal do Paraná, 2002.

COLASANTI, M.; SUZUKI, H. The dual personality of NO. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.21, p. 249-252, 2000.

COLLEMAN, J.W. Nitric Oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, v.1, p. 1397-1406, 2001.

COUTINHO, S.V.; URBAN, M.O.; GEBHART, G.H. Role of glutamate receptors and nitric oxide in the rostral ventromedial medulla in visceral hyperalgesia. **Pain**, v.78, p.59-69, 1998.

COUTINHO, S.V.; URBAN, M.O.; GEBHART, G.H. The role of CNS NMDA receptors and nitric oxide in visceral hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, p. 319-325, 2001.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, p. 660-664, 1992.

DAMAS, J.; LIÉGEOIS, J.F.. The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology**, v. 359, p. 220-227, 1999.

DAWSON, T.M.; SYNDER, S.H.. Gases as biological messenger: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 5202-5222, 1994.

DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L.. Nitric oxide: actions and pathological roles. **Neuroscientist**, v.1, p. 7-18, 1995.

DRAY, A. Mechanism of action of capsaicin-like molecules on sensory neurons. **Life Sciences**, v.51, p. 1759-1765, 1992.

DRAY, A; URBAN, L.; DICKENSON A. Pharmacology of chronic pain. **Trends in Pharmacological sciences**, v. 15, p.190-197, 1994.

DRAY, A; URBAN, L. New pharmacological strategies for pain relief. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**, v.36, p.253-280, 1996.

DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, v.186, p.289-293, 1990.

DUARTE, I.D.G.; SANTOS, I.R.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide- cGMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 217, p.225-227, 1992.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v.4, p. 164-174, 1977.

EVANS, T.E.; CARPENTER, A.; KINDERMAN, H.; COHEN, J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. **Circulatory shock**, v.41, p. 77-81, 1993.

FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **European Journal of Pharmacology**, v. 201, p.121-122, 1991.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S.. Bradykinin initiates cytokine mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, Ribeirão Preto, SP, BR, n. 110, p. 1227-1231, 1993.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. **Neuropharmacology**, v.33, n.11, p.1479-1485, 1994.

FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**, v.38, p.835-842, 1999.

FIEDS, H.L.; BARBARO, N.M.; HEINRICHER, M.M. Brain stem neuronal circuitry underlying the antinociceptive action of opiates. **Program Brain Research**, v.77, p245-257, 1988.

FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annual Reviews of Neuroscience**, v.14, p.219-245, 1991.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: WALL, P.D.; MELZACK, R., editors. **Textbook of Pain**, London: Churchill Livingstone, p.309-329, 1999.

FLEETWOOD-WALKER, S.M.; MITCHELL, R.; HOPE, P.J.; EL YASSIR, N.; MOLONY, V.; BLADON, C.M. The involvement of neurokinin receptor subtypes in somatosensory processing in the superficial dorsal horn of the cat. **Brain Research**, v.519, p.169-182, 1990.

FLÓREZ, J. Dolor: mecanismos de transmisión y control. In: **Terapéutica Farmacológica del dolor**, p.19-39, 1993.

FRANKLIN, K.B.J.; ABBOTT, F.V. Techniques for assessing the effects of drugs on nociceptive responses. In: **Neuromethods**, v.13, p.145, 1989.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v.48, n.2, p. 129-141, 1998.

FURUYAMA, T., INAGAKI, S., TAKAGI, H. Localizations of  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  subunits of soluble guanylate cyclase in the rat brain. **Molecular Brain Research**, v.20, p. 335-344, 1993.

GARTHWAITE, J.; BOULTON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annual Review in Physiology**, Hungary, v.57, p. 683-706, 1995.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; BARTOLINI, A. Loss of muscarinic antinociception by antisense inhibition of M (1) receptors. **British Journal of Pharmacology**, v.129, n.8, p.1633-40, 2000.

GOETTL, V. & LARSON, A. A.; Nitric oxide mediates long-term hyperalgesic and antinociceptive effects of the N-terminus of substance P in the formalin assay in mice. **Pain**, v.67, p. 435-441, 1996.

GRANADOS-SOTO, V.; RUFINO, M.; LOPES, L.D.G.; FERREIRA, S.H.; Evidence for the involvement of nitric oxide – cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v.340, p. 177-180, 1997.

GREENBERG, B.; RHODEN, K.; BARNES, R.J.. Endothelium-dependent relaxitior of human pulmonary arteries. **American Journal of Physiology**, v.252, p.H434-H438, 1987.

GRISCAVAGE, J.M.; ROGERS, N.E.; SHERMAN, M.P.; IGNARRO, L. J. Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. **Journal of Immunology**, v.151, p. 6329-6337, 1993.

GÜHRING, H.; GÖRIG, M.; ATES, M.; COSTE, O.; ZEILHOFER, H.U.; PAHL, A.; REHSE, K.; BRUNE, K. Suppressed injury-induced rise in spinal prostaglandin E<sub>2</sub> production and reduced early thermal hyperalgesia in iNOS deficient mice. **The Journal of Neuroscience**, v.20, n.18, p.6714-6720, 2000.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Sensações Somáticas: II. Dor, Cefaléia e Sensações Térmicas; In:\_\_\_\_\_. **Tratado de Fisiologia Médica**, 9ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.551-561, 1996.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Organização do Sistema Nervoso: Funções Básicas das Sinapses e das Substâncias Transmissoras; In:\_\_\_\_\_. **Tratado de Fisiologia Médica**, 9ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.510-526, 1996.

HARDY, J.D.; WOLFF, H.G. & GOODELL, H. Pain sensations and reactions. **Willams & Wilkins**, New York, 1967.

HOOBS, A.J.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system. **Methods of Enzymology**, v.269, p.134-148, 1996.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

IGNARRO, L.J.; LIPPTON, H.; EDWARDS, J.; BARICOS, W.H.; HYMAN, A.L.; KADOWITZ, P.J.; GRUETTER, C.A.. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.218, p.739-749, 1981.

JESSEL, T.M.; KELLY, D.D. Pain and analgesia. In: KANDEL, E.R.; SCHARWITZ, J.H.; JESSEL, T.M. **Principles of Neural Science**. Prentice Hall do Brasil, p.385-399, 1991.

KATSUYAMA, K.; SHICHIRI, M.; MARUMO, F.; HIRATA, Y.. NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF- $\kappa$ B activation by interfering with phosphorylation and degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ . **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v.18, p.1796-1802, 1998.

KAWABATA, A.; MANABE, S.; MANABE, Y.; TAKAGI, H. Effect of topical administration of L-arginine on formalin induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. **British Journal of Pharmacology**, Japan, v. 112, n. 2, p. 547-550, 1994.

KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMAR, R.M.J.; MONCADA, S. Formation of Nitric Oxide from L-Arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 86, p. 5159-5162, 1989.

LAMAS, S.; SALA, D.P.; MONCADA, S. Nitric oxide: from discovery to the clinic. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.19, p. 436-438, 1998.

LEWIS, T. Experiments relating to cutaneous hyperalgesia and its spread through somatic fibres. **Clinical Science**, v.2, p. 373-423, 1935.

LI, J.; SIMONE, D.A.; LARSON, A.A.; Windup leads to characteristics of central sensitization. **Pain**, v. 79, p. 75-82, 1999.

LORENZETTI, B.B. & FERREIRA, S.H. Prostaglandins hyperalgesia: a AMPc/Ca<sup>++</sup> dependent process. **Prostaglandins**, v.18, p.179-190, 1981.

LORENZETTI, B.B. & FERREIRA, S.H. Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 114, p.375, 1985.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. **Pain**, v. 54, p. 291-300, 1993.

MARIOTTO, S.; CUZZOLIN, L.; ADAMI, A.; DEL SOLDATO, P.; SUZUKI, H.; BENONI, G.. Inhibition by sodium nitroprusside of the expression of inducible nitric oxide syntase in rat neutrophils. **British Journal of Pharmacology**, v.114, p. 1105-1106, 1995.

MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, v. 52, p.127-136, 1993.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain Mechanisms: a new theory. **Science**, v.150, p.971-979, 1965.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.

MOLANDER, C.; GRANT, G. Laminar distribution and somatotopic organization of primary afferent fibres from hind-limb nerves in the dorsal horn: a study by transganglionic transport of horseradish peroxidase in the rat. **Neuroscience**, v. 19, p. 297-312, 1986.

MONCADA, S.; RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.J. Endothelium-derived relaxing factor; identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochemical Pharmacology**, n. 37, p. 2495-2501, 1988.



MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Biosynthesis of Nitric Oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1709-1715, 1989.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacology**, v.43, p. 109-142, 1991.

NATHAN, C.; Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **Faseb Journal**, v. 6, p. 3051-3064, 1992.

O'DELL, T.J.; HAWKINS, R.D.; KANDEL, E.R.; ARANCIO, O. Tests of the role of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.88, p. 11285-11289, 1991.

PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v.333, p. 664-666, 1988.

PAUL-CLARK, M.J.; GILROY, D.W.; WILLIS, D.; WILLOUGHBY, D.A.; TOMLINSON, A. Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. **The Journal of Immunology**, v.166, p.1169-1177, 2001.

PORRO, C.A.; CAVAZZUTI, M. Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. **Progress in Neurobiology**, v. 41, p. 565-607, 1993.

PRADO, W.A.; SCHIAVON, V.F.; CUNHA, F.Q.. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 441, n.19, p. 57-65, 2002.

PRICE, D.D. Psychological and Neural Mechanisms of Pain. **Raven Press**, p. 242, 1988.

PUIG, S. & SORKIN, L.S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. **Pain**, v.64, p.345-355, 1996.

QUINN, A.C.; PETROS, A.J.; VALLANCE, P. Nitric oxide: an endogenous gas. **British Journal of Anaesthesia**, London, v.74, p. 443-451, 1995.

REN, K.; DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. **Pain**, v.100, p.1-6, 2002.

REXED, B. The cytoarchitectonic organization of spinal cord in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v.96, 415-466, 1952.

REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, p.444-445, 1969.

ROCHE, A.K.; COOK, M.; WILCOX, G.L.; KAJANDER, K.C. A nitric oxide synthesis inhibitor (L-NAME) reduces licking behavior and fos-labeling in the spinal cord of rats during formalin-induced inflammation. **Pain**, USA, v. 66, p. 331-341, 1996.

RODRIGUES AR, DUARTE ID. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. **British Journal of Pharmacology**, v.129, p.110-114, 2000.

ROSLAND, J.H.; TJÖLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: Effect of formalin concentration. **Pain**, v.42, p.235-242, 1990.

SAKURADA, C.; SUGIYAMA, A.; NAKAYAMA, M.; YONEZAWA, A.; SAKURADA, S.; TAN-NO, K.; KISARA, K. SAKURADA, T. Antinociceptive effect of spinally injected L-NAME on the acute nociceptive response induced by low concentrations of formalin. **Neurochemistry International**, v. 38, p. 417-423, 2001.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.

SHIBUTA, S.; MASHIMO, T.; ZHANG, P.; OHARA A.; YOSHIYA, I. A new nitric oxide donor, NOC-18, exhibits a nociceptive effect in the rat formalin model. **Journal of the Neurological Sciences**, v.141, p.1-5, 1996.

SOARES AC, LEITE R, TATSUO MA, DUARTE ID. Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. **European Journal Pharmacology**. v. 400, n.14, p.67-71, 2000.

SOARES AC, DUARTE ID. Dibutyryl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K(+) channels in the rat PGE2-induced hyperalgesic paw. **British Journal of Pharmacology**. v.134, p.127-131, 2001

SOUSA, A.M. & PRADO, W.A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Research**, v.897, p. 9-19, 2001.

STAMLER, J.S.; JAKARI, O.; OSBORNE, J.; SIMON, D.I.; KEANEY, J.; VITA, J.; VALERI, C.R.; LOSCALZO, J.. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, v. 89, p.7674-7677, 1992.

THOMAS, R.J. Excitatory amino acids in health and disease. **Journal American Geriatric Society**, v.43, p.1279-1289, 1995.

TJÖLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, p.5, 1992.

TRIMMER, B. et al. **What is nitric oxide (NO)?**. 2001. Disponível em: <http://www.ideaplace.org/Why/NOAndcGMP.html>.

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 EP3 in endotoxin-induced enhancement of pain perception. **Biochemical Pharmacology**, v.62, p.157-160, 2001.

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**, v.213, p.232-235, 1971.

XU, W.; CHARLES, I.G.; LIU, L.; MONCADA, S.; EMSON, P. Molecular cloning and structural organization of the human inducible nitric oxide synthase gene (NOS2). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 219, p.784-788, 1996.

WALL, P.D. The dorsal horn. In WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of Pain**, 2<sup>a</sup> ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, p.102-111, 1989.

WATKINS, L.R.; MARTIN, D.; ULRICH, P.; TRACEY, K.J.; MAIER, S.F. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. **Pain**, New York, USA, n. 71, p. 225-235, 1997.

WEAVER, D.L. Normal inflammatory response to injury. In: *Inflammation I*, Singapore, ed. Thornborough, 1995. P.13-68.

WHEELER-ACETO, H. COWAN, A.; Naloxone causes apparent antinociception and pronociception simultaneously in the rat paw formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v.236, p.193-199, 1993.

ZAHN, P.K.; SLUKA, K.A.; BRENNAN, T.J. Excitatory amino acid release in the spinal cord caused by plantar incision in the rat. **Pain**, n.100, p.65-76, 2002.