

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MANI INDIANA FUNEZ

Investigação dos mecanismos moleculares associados à
indução da hipernocicepção persistente pela administração
intraplantar de PGE₂

RIBEIRÃO PRETO

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MANI INDIANA FUNEZ

Investigação dos mecanismos moleculares associados à
indução da hipernocicepção persistente pela administração
intraplantar de PGE₂

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Departamento de Farmacologia
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia.
Orientador: Prof Dr Sérgio Henrique Ferreira.

RIBEIRÃO PRETO

2008

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Funez, Mani Indiana
Investigação dos mecanismos moleculares associados à indução da hipernocicepção persistente pela administração intraplantar de PGE₂. Ribeirão Preto, 2008.
82f.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Ferreira, Sérgio Henrique.

1. Dores crônicas. 2. Inflamação. 3. Plasticidade neuronal. 4. Analgesia. 5. Sinalização intracelular.

MANI INDIANA FUNEZ

Investigação dos mecanismos moleculares associados à indução da hipernocicepção persistente pela administração intraplantar de PGE₂

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Farmacologia.

Aprovado em 17 de junho de 2008.

Banca Examinadora:

Dr^a Gisele Picolo

Instituto Butantan. Assinatura:.....

Prof^a Dr^a Claudia Herrera Tambeli

FOP – UNICAMP. Assinatura:.....

Prof Dr Guilherme de Araújo Lucas

FMRP – USP. Assinatura:.....

Prof Dr José Geraldo Speciali

FMRP – USP. Assinatura:.....

Prof Dr Sérgio Henrique Ferreira

FMRP – USP. Assinatura:.....

Dedico esta tese

À minha família: meus pais, **Pedro** e **Walquiria**, e minha irmã **Bartira**. Aprendo as lições mais importantes com vocês!

Ao amor da minha vida, meu querido **Paulo Gustavo**, um anjo em meu caminho...

A todos aqueles que sofrem de dor.

Capa: páginas do diário de Frida Kahlo.

Frente: Pés torturados - em 1953, como parte do tratamento para as fortes dores que a artista sentia, foi-lhe amputado o pé.

Verso: última página do diário da artista antes de sua morte.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr Sérgio Henrique Ferreira, pelo aprendizado que a convivência com sua personalidade me proporcionou.

Ao Prof Dr Carlos Amílcar Parada, pelas discussões sobre o projeto e os resultados que geraram esta tese.

À Prof^a Dr^a Cristiane Flora Villarreal, pela colaboração neste trabalho.

Ao Prof Dr Fernando de Queiroz Cunha, pelo empréstimo de materiais e reagentes de seu laboratório que permitiram a realização de alguns experimentos deste trabalho.

À Dr^a Gisele Picolo, por aceitar participar da banca examinadora desta tese e pelas sugestões.

À Prof^a Dr^a Claudia Herrera Tambeli, por aceitar participar da banca examinadora desta tese.

Ao Prof Dr Guilherme de Araújo Lucas, por aceitar participar da banca examinadora desta tese.

Ao Prof Dr José Geraldo Speciali, por aceitar participar da banca examinadora desta tese.

À Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Às secretárias e secretários da Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, pelo apoio técnico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa que permitiu minha estadia em Ribeirão Preto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo, pelo apoio financeiro.

À Mara Rubia Nunes Celes pela análise histopatológica de parte do material concernente a esta tese, pelo profissionalismo e pela boa vontade.

Ao Prof Dr Gustavo Ballejo Olivera pelo empréstimo de equipamentos.

Ao Prof Dr Wiliam Alves do Prado pelo empréstimo do equipamento de “rotarod”.

Ao Prof Dr Norberto Cysne Coimbra pela análise histopatológica de parte do material concernente a esta tese.

Aos secretários Sônia Maria Stefanelli de Andrade, José Waldik Ramon e Fátima Helena Petean, agradeço pelo apoio constante.

À Ieda R. dos Santos Schivo pela importante ajuda nos experimentos comportamentais, em especial pela realização das injeções intratecais.

Ao Sérgio Roberto Rosa pelo importante e constante apoio técnico no laboratório.

À Fabíola L. A. C. Mestriner pelo relevante apoio técnico durante a realização dos experimentos de biologia molecular.

À Eleni L. Tamburus Gomes pelo apoio técnico processando cortes histológicos de medula espinal.

Ao Tadeu Franco Vieira pelo apoio técnico reativando nossa sala escura para revelação de filmes e por realizar as colorações de lâminas de cortes histológicos.

À Eliana Beatriz Castrechini de Barros e Maria Inês Castrechini Nemoto pelo manejo cuidadoso do biotério e dos animais experimentais.

À Giuliana Bertozzi Francisco pelo apoio técnico e pela amizade.

À Diva Amábile Montanha de Souza pelo apoio técnico que presta ao laboratório e ao departamento.

À Ana Kátia dos Santos pelo apoio técnico.

Ao Acácio, pelo trabalho que presta ao laboratório de inflamação e dor.

Às secretárias do Prof Sérgio, Valéria e Vanessa pela disposição e apoio despedidos.

Ao Prof Dr Francisco Guimarães pela doação de diazepam, pelo empréstimo de materiais e reagentes de seu laboratório e principalmente pela amizade.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia pela contribuição em minha formação.

Aos amigos e colegas que trabalharam, trabalham ou ainda possuem ligação com o laboratório de Inflamação e Dor.

Aos amigos e colegas que pertenceram ou ainda pertencem aos laboratórios do Prof Francisco Guimarães, da Prof^a Cristina Salgado, do Prof Hélio Zangrossi, do Prof Fernando Morgan e do Prof Willian Alves do Prado.

Aos colegas do DOL, pela oportunidade de discussões e engrandecimento científico.

Ao pessoal da portaria e/ou segurança do prédio da FMRP e do campus, pela importância de seu trabalho.

Ao pessoal da limpeza, pela importância de seu trabalho.

A familiares que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho: Nono Narcizo Funez (in memoriam), Nona Vitória Dalabetta Funez; Vô Roberto Schreiner (in memoriam), Vó Frieda Giesel Schreiner (in memoriam); e às tias: Elsi Bertoncello, Renite e Leonilda Funez. Muito obrigada!

À minha sogra, Regina, pelo apoio e carinho.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho e que por ventura não foram mencionados.

Por último, mas não menos importante, gostaria de deixar esta mensagem aos meus amigos, independente de seus nomes terem sido citados anteriormente neste item: “Caros amigos, com vocês aprendi muita coisa, e a vocês devo parte do que sou. Certamente sem vocês meus amigos, tudo seria diferente! Nomeá-los aqui e agradecer individualmente seria incoerente neste momento... Por isso meus queridos amigos, em sua coletividade, recebam meu agradecimento: Muito Obrigada! De coração!”

**“Das águas dos rios que tudo arrastam diz-se que são violentas,
Mas não dizem que violentas são as margens que as comprimem.”**

Bertold Brecht

**"Sabemos da verdade somente quando sabemos pouco; quanto mais
sabemos, tanto mais duvidamos."**

Goethe

"O melhor dos mestres é o estudo. E a melhor das disciplinas o trabalho."

Machado de Assis

RESUMO

Funez, MI. **Investigação dos mecanismos moleculares associados à indução da hipernocicepção persistente pela administração intraplantar de PGE₂**. 2008. 82f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O objetivo do presente estudo foi investigar os mecanismos responsáveis pela persistência da hipernocicepção mecânica induzida pelo principal mediador inibido por drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINEs), PGE₂ (prostaglandina E₂). Observamos que a antinocicepção diária induzida por dipirona ou oligodeoxinucleotídeos (ODNs) para canais de sódio Na_v1.8 não é suficiente para prevenir a instalação do quadro persistente. Numa segunda etapa de nossos experimentos investigamos se a ativação da via de sinalização da PGE₂ poderia conter elementos importantes para o processo de cronificação. Como ferramenta foram utilizadas drogas inibidoras das duas principais quinases ativadas pela PGE₂, PKA e PKC ϵ , além de uma droga inibidora de adenilil ciclase. Neste caso foi observada prevenção total do quadro de hipernocicepção persistente para todos os tratamentos propostos. Tanto PKA quanto PKC ϵ parecem ser igualmente importantes visto que sua inibição isolada ou concomitante preveniu o quadro persistente. Da mesma forma, a ativação diária de PKA ou PKC ϵ , utilizando agonistas seletivos, é capaz de induzir um quadro de hipernocicepção persistente similar ao induzido pela PGE₂. Também investigamos a participação do fator de transcrição relacionado à via de sinalização AMPc-PKA, o CREB, e do fator de transcrição κ B (NF- κ B). Observamos que CREB parece ser importante para a expressão do fenótipo de hipernocicepção persistente, enquanto que NF- κ B parece não ser importante para a instalação do quadro. O conjunto de nossos resultados sugere fortemente que analgesia sem inibição do processo inflamatório pode ser um tratamento não eficaz quando a prevenção de mudanças no nociceptor que levam à cronificação é desejada. Adicionalmente, PKA e PKC ϵ parecem ter um papel chave na sensibilização aguda do nociceptor bem como na sensibilização crônica.

Palavras Chave: Dores crônicas. Inflamação. Plasticidade neuronal. Analgesia. Sinalização intracelular.

ABSTRACT

Funez, MI. **Investigation of mechanisms underlying the installation of a PGE₂-induced state of persistent hypersensitivity.** 2008. 82f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

We have investigated the mechanisms underlying the persistence of mechanical hypernociception induced by the major inflammatory mediator PGE₂ inhibited by NSAIDs. It was observed that peripheral antinociception brought about dipyrone or ODNs antisense for the Na_v1.8 during the whole period of persistent hypernociception induction is not sufficient to prevent the chronification process. Our second hypothesis is that there must be something in the signaling pathway of PGE₂ that triggers daily the chronification process and reinforcing this, we observed that the persistent condition is dependent on the EP receptors-activation. Next, we pharmacologically inhibited on a daily basis the adenylyl cyclase and two major kinases activated by PGE₂, PKA and PKCε, and a prevention of the process was observed. Both kinases are important because the concomitant or the isolated inhibition is sufficiently effective. Accordingly, the 14-day administration of the PKA or PKCε-activators in the hind paws of rats can induce a very similar picture of persistent hypernociception. Our third hypothesis is that the inhibition of the transcription factors described as being activated by PKC or PKA and involved in inflammatory and pain processes - NF-κB or CREB - could prevent the persistent hypernociception installation. It was observed that CREB seems be important to the persistent phenotype expression, but the inhibition of the two transcription factors did not prevent the persistent condition installation. Until now, own whole results have strongly suggested that causing analgesia without inhibiting the inflammatory process is an ineffective treatment when prevention of nociceptor changes as to pain chronification is desired. In addition, the PKA and PKCε seem to have a key role during the induction of acute and persistent nociceptor sensitization.

Keywords: Chronic pain. Inflammation. Neuronal plasticity. Analgesia. Intracelular signalling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diagrama do aparelho usado para avaliação do limiar nociceptivo em patas de em ratos.....	14
Figura 2. Evolução temporal da intensidade de hipernocicepção durante e após 14 injeções diárias de PGE ₂	23
Figura 3. A antinocicepção induzida pelo pré-tratamento diário com dipirona durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente.....	25
Figura 4. A instalação da hipernocicepção persistente induzida por injeções de PGE ₂ é dependente da ativação de receptores EP.....	27
Figura 5. A ativação da adenilil ciclase durante o período de indução é importante para a instalação da hipernocicepção persistente.....	29
Figura 6. A ativação das proteinoquinasas A e C durante o período de indução faz parte do mecanismo de instalação da hipernocicepção persistente.....	31
Figura 7. A inibição farmacológica da PKA previne a instalação da hipernocicepção persistente.....	33
Figura 8. A administração aguda da subunidade catalítica da PKA induz hipernocicepção mecânica.....	35
Figura 9. A administração crônica da subunidade catalítica da PKA induz hipernocicepção persistente.....	37
Figura 10. A inibição farmacológica da PKC previne a instalação da hipernocicepção persistente.....	39
Figura 11. A administração aguda do agonista de PKCε induz hipernocicepção mecânica.....	41

Figura 12. A administração crônica da agonista de PKC ϵ induz hipernocicepção persistente.....	43
Figura 13. Antinocicepção induzida pelo tratamento com ODN antisense para canais Na $_v$ 1.8 não previne a HP.....	47
Figura 14. Injeções intratecais de ODNs para Na $_v$ 1.8 durante 18 dias não interferem com a capacidade locomotora dos animais.....	49
Figura 15. A administração de anticorpos anti-NGF durante o período de indução não previne a hipernocicepção persistente.....	53
Figura 16. Tratamento com ODN, seqüência antisense, para CREB durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente.....	55
Figura 17. Injeções intratecais de ODNs para CREB durante 18 dias não interferem com a capacidade locomotora dos animais.....	57
Figura 18. A administração de dexametasona durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente.....	61
Figura 19. A administração do inibidor de NF- κ B, PDTC, durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Agentes que induzem sensibilização dos nociceptores.....	15
Tabela 2- Drogas com propriedades antiinflamatórias ou analgésicas.....	15
Tabela 3 - Drogas antagonistas ou que interferem com a via de sinalização da PGE ₂	16
Tabela 4 – Oligodeoxinucleotídeos.....	17
Tabela 5 - Drogas anestésicas e outros.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\psi\epsilon$ RACK - agonista de PKC ϵ

α -NGF - anticorpos para NGF

μ g - microgramas

μ L - microlitros

AC - adenilil ciclase

AH 23848 - ácido [1 α (Z),2 β ,5 α]-(\pm)-7-[5-[[1,1-bifenil)-4-il]metóxi]-2-(4- orfolinil)-3-oxociclopentil]-4-heptenóico

AH 6809 - ácido 6-isopropóxi-9-oxoxantene-2-carboxílico

AKAP- In CELLect™ AKAP St-Ht31 Inhibitor Peptide

AKAPs - proteínas de ancoragem para PKA (A-kinase Anchoring Proteins)

AMPc - 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA - análise de variância

C - Celsius

Ca⁺⁺ - íons cálcio

cm - centímetro

COX (PGHS) - ciclooxigenase (prostaglandina H sintase)

CREB - elemento de resposta ao AMPc (cAMP Responsive Element Binding Protein)

DAG - diacil glicerol

DMSO - dimetilsulfóxido

EP - receptor para prostaglandina do tipo E

epm - erro padrão da média

g - grama

GMPc - 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina

GRD ou GRDs - gânglio da raiz dorsal ou gânglios das raízes dorsais

h - hora

H-89 - hidrato de diidroclorídeo

HP - hipernocicepção persistente

ip - intraperitoneal

IP₃ - inositol trifosfato

ipl - intraplantar

it - intratecal

K⁺_{ATP} - canais de potássio sensíveis ao ATP

L4 - vértebra lombar 4

L5 - vértebra lombar 5

mg - miligrama

min - minuto

mL – mililitro

mm - milímetro

Na_v1.8 - canais de sódio dependentes de voltagem e resistentes à tetrodotoxina do subtipo 1.8

NF-κB - fator de transcrição nuclear-κB

ng - nanograma

NGF - fator de crescimento do nervo

nm - nanômetro

NO - óxido nítrico

° - graus

ODN ou ODNs – oligodeoxinucleotídeo ou oligodeoxinucleotídeos

PDBU - dibutirato forbol

PDTC - ácido pirrolidinaditiocarbato amônio

PG - prostaglandina

PGE₂ - prostaglandina do tipo E₂

PGES - PGE sintases

PGH₂ - prostaglandina do tipo H₂

PGI₂ - prostaciclina do tipo I₂

PIP₂ - 4,5-bifosfato de fosfatidil inositol

PKA - proteinoquinase dependente de AMPc ou proteinoquinase A

PKAsc - Subunidade catalítica de PKA

PKC - proteinoquinase C

PKC ϵ - proteinoquinase C ϵ

PKG - proteinoquinase dependente de GMPc

PLC - fosfolipase C

RACKs - proteínas de ancoragem para PKC ou receptores para PKC ativada
(Receptor for Activated Protein Kinase C)

RNA_m - ácido desoxirribonucléico mensageiro

s - segundo

SQ 22536 - 9-(tetrahydro-2'-furyl) adenina

TNF- α - fator de necrose tumoral- α

TRPV1 - receptores vanilóides do tipo 1 (transient receptor potential vanilloid 1)

TXA₂ - tromboxano A₂

α - alfa

β - beta

δ , Δ - delta

ϵ - epsilon

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 DESENVOLVIMENTO.....	12
2.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.2 RESULTADOS.....	21
2.3 DISCUSSÃO.....	64
3 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS	
ANEXO	

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios para a terapêutica analgésica é o alívio de dores crônicas. Em geral, as dores crônicas de origem inflamatória são precedidas de episódio inflamatório agudo e acredita-se que a inflamação aguda de longa duração pode induzir mudanças plásticas nos nociceptores contribuindo para a persistência do quadro doloroso, independentemente da resolução do processo inflamatório. Uma das causas pode ser porque durante a inflamação há síntese e liberação de um leque de mediadores inflamatórios que são importantes para um fenômeno que a acompanha, a sensibilização dos nociceptores.

No intuito de estudar componentes fisiopatológicos e como interferir farmacologicamente com a dor crônica de origem inflamatória, nosso grupo desenvolveu um protocolo experimental no qual 14 injeções diárias, em patas de ratos, de mediadores inflamatórios como a prostaglandina E_2 (PGE_2) e dopamina assim como fator de necrose tumoral- α , $TNF-\alpha$; interleucina- 1β , $IL-1\beta$ e interleucina-8, $IL-8$ podem induzir um quadro de sensibilização crônica a estímulos mecânicos designado “hipernocicepção mecânica persistente” ou “hipernocicepção persistente – HP” (Ferreira e cols., 1990; Sachs e cols., 2002). Durante o período de injeções ocorre hipernocicepção aguda e, de alguma maneira, a PGE_2 , por exemplo, induz mudanças nos nociceptores que garantem subsequente à fase de hipernocicepção aguda o desenvolvimento da hipernocicepção persistente. Então há uma série de eventos agudos, uma fase intermediária e a persistência ou cronificação do quadro.

Nos animais com hipernocicepção persistente uma única injeção local de drogas analgésicas clássicas como dipirona ou morfina surpreendentemente induz

antinocicepção de longa duração permitindo a visualização de uma fase quiescente (quiescere, do latim: tornar-se quieto; não causar problemas ou sintomas) que pode permanecer por período de até 30 dias (Ferreira e cols., 1990; Sachs e cols., 2004). Este efeito parece estar relacionado com a ativação local da via de sinalização L-arginina – óxido nítrico (NO) - guanosina monofosfato cíclico (GMPc) - proteinoquinase dependente de GMPc (PKG) - canais de potássio sensíveis ao ATP (K^+_{ATP}) (Ferreira e cols., 1990; Sachs e cols., 2004).

De fato, tem sido sugerido que o limiar nociceptivo é resultado, dentre outros fatores, do balanço entre os níveis dos segundos mensageiros adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e GMPc (Cunha e cols., 1999). Sendo os níveis de AMPc aumentados por agentes pró-inflamatórios e os níveis de GMPc aumentados por drogas analgésicas de ação local como dipirona e morfina dentre outras (Ferreira e Nakamura, 1979a; Cunha e cols., 1999). Durante a fase quiescente, o “desafio” das patas dos animais por meio da administração de mediadores inflamatórios em baixas doses (e portanto induzem hipernocicepção de baixa intensidade) restaura totalmente a hipernocicepção persistente, sugerindo que neste modelo ocorrem mudanças nos nociceptores favorecendo uma espécie de “memória nociceptiva” – quadro que caracteriza dores crônicas.

Desta forma, nosso grupo trabalha com a hipótese de que mediadores inflamatórios como a PGE_2 , ao mesmo tempo em que são importantes para sensibilização aguda dos nociceptores, também podem desencadear mecanismos intracelulares que contribuem para a sensibilização persistente.

Prostaglandinas da série E_2 são um dos cinco produtos gerados pela ação inicial das enzimas ciclooxigenases (COX) sobre o ácido araquidônico. Os outros quatro produtos gerados podem ser prostaglandina $F_{2\alpha}$, prostaglandina D_2 ,

prostaciclina (PGI₂) e tromboxano A₂ (TXA₂). PGH₂ é o metabólito inicial produzido pelas enzimas COX que depois será convertido nos produtos finais através da ação de enzimas específicas variando de acordo com o tipo celular. As PGE₂ são geradas pelas enzimas PGE sintases (PGES).

Os receptores para PGE₂ foram inicialmente caracterizados farmacologicamente e após foram clonados. Dentre eles, são descritos 4 subtipos nomeados EP1 - EP4. Os receptores do subtipo EP3 apresentam-se em múltiplas isoformas resultantes de "splicing" pós-transcricional de RNAm na cauda C-terminal (Coleman e cols., 1994). Os receptores EP1 são descritos como ligados a fosfolipase C e sua ativação causa aumento na hidrólise de fosfato de inositol (Watabe e cols., 1993). EP2, EP3 e EP4 são descritos como acoplados a adenilil ciclase (AC) (Regan e cols., 1994; Sugimoto e cols., 1992; Honda e cols., 1993; para revisão Coleman e cols., 1994), sendo que a ativação de EP2 e EP4 induz aumento dos níveis de AMPc. A ativação de EP3 pode aumentar ou diminuir a atividade da AC dependendo da isoforma (Coleman, e cols., 1994), por exemplo a ativação da isoforma EP3C, presente em gânglios das raízes dorsais (GRDs), induz aumento de AMPc (Southall e Vasko, 2001). O neurônios sensoriais de GRDs expressam tanto RNAm para sua síntese quanto as proteínas EP1, EP2, EP3 e EP4 (Southall e Vasko, 2001). Durante quadros de inflamação crônica há aumento na expressão de EP4 em GRDs e a administração de um antagonista seletivo reverte a sensibilização dos nociceptores que os acompanha, sugerindo a importância deste receptor na manutenção da sensibilização inflamatória (Lin e cols., 2006).

O papel das prostaglandinas na dor e inflamação tem sido extensivamente estudado desde a década de 70. Sua importância nestes processos é bem estabelecida e a principal ação de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (NSAIDs)

é atribuída à inibição de sua síntese (Vane, 1971). Acredita-se que parte de seus efeitos pró-inflamatórios ocorre através da ação direta nas terminações nervosas livres dos nociceptores levando à sensibilização destas células. Seu efeito foi demonstrado no homem (Ferreira, 1972) e em animais experimentais (Chahl & Iggo, 1977; Moncada e cols., 1975; Willis & Cornelsen, 1973; Collier & Schneider, 1972) e em estudos *in situ* onde PGE₂ aumenta o disparo de neurônios sensoriais em resposta a estímulos nocivos (Martin e cols., 1987; Kumazawa e cols., 1996). Além disso, a exposição de células de GRDs em cultura à PGE₂ aumenta os níveis do segundo mensageiro AMPc (Hingtgen e cols., 1995), aumenta hidrólise de fosfatos de inositol (Smith e cols., 1998), aumenta número de potenciais de ação causados por estímulo despolarizante (Nicol e Cui, 1994) e aumenta a liberação evocada de neuropeptídeos facilitatórios como a substância P e CGRP (Hingtgen e cols., 1995; Vasko e cols., 1994).

O papel do AMPc na sensibilização induzida por mediadores inflamatórios como a PGE₂ tem sido demonstrado em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Embora os receptores do subtipo EP2 sejam descritos também nos neurônios sensoriais de GRDs, parece ser a ativação de EP3C e EP4 responsável pela geração de AMPc e aumento na liberação de neuropeptídeos (Southall & Vasko, 2001). A administração intraplantar de uma droga ativadora de AC, a forskolina, ou de dibutilil-AMPc, um análogo estável do AMPc, causa hipernocicepção mecânica (Ferreira e Nakamura, 1979a; Taiwo & Levine, 1991). Os níveis citosólicos de AMPc são controlados pelo balanço entre sua produção, via AC, e sua degradação, via fosfodiesterases. Reforçando o papel do AMPc na sensibilização dos nociceptores, drogas ativadoras de AC ou inibidoras de fosfodiesterases aumentam a hipernocicepção induzida por PGE₂ ou AMPc (Taiwo e cols., 1989).

Um dos passos subseqüentes na transmissão de sinais intracelulares que decorrem na sensibilização dos nociceptores por mediadores inflamatórios é a ativação da proteinoquinase A (PKA) pelo AMPc. A sensibilização dos nociceptores induzida por agentes inflamatórios ou por substâncias que promovem o aumento nos níveis de AMPc como PGE₂ ou a forskolina (ativa AC) é bloqueada pelo tratamento com inibidores da ativação da PKA (Taiwo & Levine, 1991; Aley & Levine, 1999; Cunha e cols., 1999; Aley e cols., 2000). Por outro lado, a administração intraplantar da subunidade catalítica desta enzima (PKAsc) também induz hiperalgisia mecânica (Aley & Levine, 1999; Parada e cols., 2005). Uma vez que o AMPc ativa PKA, sua subunidade catalítica pode fosforilar diversas proteínas relacionadas ao processo de dor por exemplo, canais de sódio dependentes de voltagem e resistentes à tetrodotoxina do subtipo 1.8 (Na_v1.8). Sua fosforilação pela PKA parece ser processo fundamental durante a sensibilização dos nociceptores que acompanha a inflamação (England e cols., 1996; Gold e cols., 1998; para revisão Cantrell & Catterall, 2001). Também há descrições da ativação de outras quinases como será discutido adiante. A PKA pode ainda translocar-se até o núcleo e ativar fatores de transcrição como o elemento de resposta ao AMPc (cAMP Responsive Element Binding Protein - CREB), que tem sido associado a processos de dor crônica onde parece ter papel precoce, ou seja, durante a fase de instalação (Hoeger-Bement & Sluka, 2003). Além disso, uma vez ativada, a PKA parece ter um papel importante na manutenção da sensibilização de origem inflamatória independente da ativação da AC (Aley & Levine, 1999).

Como já mencionado, a adição de PGE₂ em cultura de GRDs com conseqüente ativação de seus receptores pode gerar tanto AMPc (Hingtgen e cols., 1995), como resultado da ativação da AC, quanto fosfatos de inositol que acredita-se

seja resultado da ativação da enzima fosfolipase C (PLC) (Smith e cols., 1998). Os receptores do subtipo EP1 são descritos como ligados à via de sinalização da fosfolipase C, com conseqüente hidrólise de fosfatidilinositol-bifosfato, o que resulta na liberação de inositol trifosfato (IP_3) e diacil-glicerol (DAG) (Watabe e cols., 1993). O DAG, altamente lipossolúvel, encontra-se associado à membrana plasmática onde pode ativar uma proteinoquinase C (PKC). Em animais experimentais, a administração local de ativadores de PKC causa tanto sensibilização quanto nocicepção (Taniguchi e cols., 1997; Souza e cols., 2002; Ferreira e cols., 2005). Além disso, a sensibilização induzida por mediadores como epinefrina e bradicinina é dependente de sua ativação (Khasar e cols., 1999; Souza e cols., 2002). Em modelo de dor inflamatória crônica, PKC ϵ pode ser ativada por AMPc e exerce papel fundamental visto que sua inibição previne o surgimento da sensibilização em longo prazo (Aley e cols., 2000; Parada e cols., 2003). Ainda, dados não publicados do nosso laboratório sugerem que a PKC ϵ é ativada pela PKA, e esta por sua vez pelo AMPc, durante a sensibilização mecânica aguda induzida por PGE $_2$ (Sachs, D comunicação pessoal, dados em fase de publicação). Por fim, PKC ϵ tem emergido como sendo uma isoforma relevante para a sensibilização nociceptiva (Khasar e cols., 1999; revisado em Van Kolen e cols., 2008)

Como substratos para PKC relacionados ao sistema sensorial nociceptivo são descritos, assim como para PKA, canais Na $_v$ 1.8. Estes canais possuem em sua estrutura sítios para fosforilação por PKA e PKC o que resulta em aumento na corrente de entrada de sódio e contribui para o processo de sensibilização dos nociceptores, portanto, são moduláveis por PKA e PKC (Gold e cols., 1998; para revisão Cantrell & Catterall, 2001). Adicionalmente, há dados sugerindo que PKC pode modular a atividade de AC visto que um agonista de PKC (dibutirato forbol -

PDBU) induz aumento nos níveis de AMPc em células de GRDs em cultura (Smith e cols., 1998; Houslay, 1991).

Como um dos mecanismos importantes para a manutenção de quadros dolorosos crônicos que acompanham as neuropatias ou a inflamação tem sido relatada a redistribuição ou aumento na expressão de canais $\text{Na}_v1.8$ (Novakovic e cols., 1998; Porreca e cols., 1999; Coward e cols., 2000; Bucknill e cols., 2002; Lai e cols., 2002; Gold e cols., 2003; Sah e cols., 2003; Renton e cols., 2005; Warren e cols., 2008). Durante a fase de manutenção da hipernocicepção persistente induzida por PGE_2 há aumento na expressão de RNAm para canais $\text{Na}_v1.8$ (Villarreal e cols., 2005). Este aumento é fundamental para a expressão do fenótipo de hipernocicepção persistente visto que a inibição da expressão da proteína utilizando-se oligodeoxinucleotídeo (ODN) faz com que o limiar mecânico nociceptivo dos animais retorne aos valores basais (Villarreal e cols., 2005). Os canais $\text{Na}_v1.8$ também têm sido amplamente implicados na manutenção da sensibilização presente em quadros de neuropatias (Lai e cols., 2002; Gold e cols., 2003; para revisão Lai e cols., 2004). E durante o processo inflamatório há aumento significativo na expressão dos subtipos $\text{Na}_v1.8$ e $\text{Na}_v1.9$ no período de 48 horas após o estímulo (Coggeshall e cols., 2004). Também existem evidências de que o efeito hipernociceptivo agudo da PGE_2 é dependente da ativação de correntes de sódio via canais $\text{Na}_v1.8$. Utilizando a tecnologia de ODN antisense Khasar e cols. (1998) observaram que aproximadamente 50% dos animais mostraram diminuição significativa na hiperalgesia mecânica induzida por PGE_2 . Esta habilidade da PGE_2 de modular a atividade dos canais $\text{Na}_v1.8$, por exemplo, pode explicar seus efeitos de sensibilizar os neurônios nociceptivos (para revisão Lai e cols., 2004). Como já mencionado, a atividade das proteinoquinases A e C induzida por agentes pró-

inflamatórios como a PGE_2 parece ser importante para modular, por meio de fosforilação, aumentando a amplitude da corrente de entrada através dos canais $Na_v1.8$ (Gold e cols., 1996; Gold e cols., 1998; Cantrell & Catterall, 2001). Então é possível que a PGE_2 , através de sua via de sinalização intracelular culminando com a ativação de PKA e PKC, possa induzir sensibilização aguda dos nociceptores por fosforilação de canais $Na_v1.8$ e sensibilização persistente também por interferir com os canais $Na_v1.8$, porém induzindo sua redistribuição (aumento) nos neurônios nociceptivos. Esta última condição poderia se dar por ativação de PKA e PKC e conseqüente ativação de mecanismos celulares que favoreçam mudanças no fenótipo dos nociceptores.

A neurotrofina fator de crescimento do nervo (NGF) tem sido implicada na regulação de vários genes relacionados ao processo de dor como substância P, os receptores TRPV1 e canais de sódio (Lindsay e Harmar, 1989; Gilchrist e cols., 1991; Winston e cols., 2001; Friedel e cols., 1997; Fang e cols., 2005). Além disso, o NGF pode induzir mudanças morfológicas como crescimento do sistema nervoso simpático e formação dos “sympathetic baskets” ao redor dos corpos celulares de neurônios sensoriais de GRDs, relacionados à manutenção de alguns tipos de dores crônicas (Ramer e Bisby, 1999; Zhou e cols., 1999). A expressão de canais $Na_v1.8$ parece ser regulada por esta neurotrofina visto que sua inibição reduz tanto a expressão das proteínas quanto as correntes de sódio resistentes à tetrodotoxina (Fjell e cols., 1999). Complementando estas informações, em diferentes modelos de dor neuropática a administração tanto aguda quanto crônica de anticorpos para NGF reverte a alodinia tátil sem induzir tolerância (Wild e cols., 2007). Visto que o aumento na expressão de $Na_v1.8$ é parte do mecanismo de manutenção da

hipernocicepção persistente, pode-se presumir que esta neurotrofina possua papel na regulação deste processo persistente.

A via de sinalização AMPc-PKA também tem sido relacionada com a ativação do fator de transcrição “elemento de resposta ao AMPc” (cAMP Responsive Element Binding Protein - CREB) e com sua participação em quadros dolorosos (Richards e cols., 1996; Ji e Rupp, 1997; Woolf e Costigan, 1999; Ma e cols., 2003; Hoeger-Bement e Sluka, 2003). Além disso, a ativação de CREB também parece ser modulada por PKC que pode agir conjuntamente com PKA (Li e cols., 2004; Mao e cols., 2007). CREB localiza-se no núcleo das células e a fosforilação da serina 133 desta proteína permite que este seja ativado dando início ao processo de transcrição (Richards e cols., 1996; Niederberger e cols., 2007). Durante a inflamação periférica ocorre fosforilação de CREB (serina 133) presente no corno dorsal da medula espinal de ratos, fato que tem sido associado à plasticidade que envolve as respostas à inflamação (Ji e Rupp, 1997; Messersmith e cols., 1998; Woolf e Costigan, 1999; Anderson e Seybold., 2000). Desta forma, pode-se elaborar a hipótese de que o CREB possa ser ativado - por PKA e/ou PKC - durante o processo de instalação da hipernocicepção persistente.

Dentre os fatores de transcrição relacionados à inflamação mais estudados encontra-se o fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B). Este fator é constitutivo e normalmente encontrado inativo no citoplasma das células, porém, em resposta a estímulos variados como, por exemplo, os envolvidos em plasticidade neuronal - glutamato, despolarização e aumento no Ca^{++} intracelular - este pode translocar-se para o núcleo e regular a atividade de diferentes genes pró-inflamatórios (revisado em O'Neill & Kaltschmidt, 1997). Após inflamação aguda periférica a administração intratecal de inibidor de NF- κ B reduz significativamente a hiperalgesia térmica e

alodinia mecânica em patas de ratos, sugerindo sua ativação em nível espinal como fator importante na manutenção de estados de sensibilização (Lee e cols., 2004). Além disso, sua ativação pode ser desencadeada por uma via de sinalização envolvendo a PKC (Kang e cols., 2007). Desta forma, é plausível elaborar a hipótese de que o NF- κ B possa estar ligado ao processo de sensibilização persistente induzido pela PGE₂ em nosso modelo.

Visto que 1) todos os estudos realizados em dor são bem definidos temporalmente, agudos ou crônicos, e conseqüentemente os mesmos contemplam os mecanismos ou da dor aguda ou da dor crônica; e 2) toda dor crônica necessariamente foi aguda em seu início: pode-se inferir que as mudanças que ocorrem numa fase intermediária, que pode ser claramente visualizada no protocolo experimental por nós utilizado (ver figura 2, seção 2.2 RESULTADOS), sejam fundamentais para consolidação do quadro crônico. Portanto, entendemos que é importante a compreensão de tais mudanças, pois as mesmas podem indicar quais fatores são preponderantes para a cronificação e fornecer a base para se propor alternativas terapêuticas no sentido de prevenção da instalação de quadros crônicos.

O objetivo geral deste trabalho foi investigar os mecanismos moleculares envolvidos no processo de persistência (cronificação) da hipernocicepção induzida por injeções de PGE₂. Para tal, foram escolhidos - com base nos dados da literatura discutidos nesta INTRODUÇÃO - possíveis alvos, e estabeleceram-se ferramentas para estudá-los.

Os objetivos específicos incluíram o estudo de eventos e/ou fatores que possam influenciar o processo de instalação da persistência:

- 1) Investigação da dependência da ativação de receptores EP para a instalação da hipernocicepção persistente induzida pela administração diária de PGE₂;
- 2) Investigação da influência da antinocicepção para a instalação da hipernocicepção persistente, observando se ocorre prevenção da persistência após:
 - O tratamento diário com dipirona;
 - O tratamento com ODN antisense para os canais Na_v1.8 durante todo o período de instalação do quadro.
- 3) Investigação do papel da ativação da via de sinalização da PGE₂ proposta como importante para a sensibilização dos nociceptores: AC-AMPC-PKA e PKC, observando:
 - O efeito da inibição diária da AC ou de PKA e/ou PKC para o mecanismo de instalação da hipernocicepção persistente induzida por PGE₂;
 - O efeito da hipernocicepção induzida pela ativação de PKA ou PKC.
- 4) Investigação da influência da neurotrofina NGF para o mecanismo de instalação da hipernocicepção persistente induzida por PGE₂;
- 5) Investigação do papel de fatores de transcrição como CREB e NF-κB no processo de indução da hipernocicepção persistente, observando:
 - O efeito do tratamento com ODNs antisense para CREB durante todo o período de instalação da hipernocicepção persistente induzida por PGE₂;
 - O efeito do tratamento com o glicocorticóide dexametasona;
 - O efeito do tratamento com o inibidor de NF-κB para o mecanismo de instalação da hipernocicepção persistente induzida por PGE₂.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 100 - 450 gramas provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto (USP-RP). Os animais foram mantidos em sala com temperatura e luminosidade controladas e acesso à água e comida *ad libitum* durante todo o período experimental. Os experimentos foram realizados no período das 09 às 16h. Os protocolos para uso de animais em experimentação estão de acordo com as “Normas Éticas para Investigações Envolvendo Dor Experimental em Animais Acordados” (Zimmermann, 1983), com “Os Princípios Éticos na Experimentação Animal” adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (protocolo nº 139/2005).

Avaliação do limiar nociceptivo mecânico dos animais - método de pressão constante em patas de ratos

O termo hipernocicepção é utilizado neste trabalho para designar a sensibilização dos nociceptores e a conseqüente diminuição no limiar nociceptivo dos animais (Parada e cols., 2003). Para a medida do limiar nociceptivo mecânico foi utilizada a técnica descrita por Randall & Selitto (1957) e modificada por Ferreira e cols. (1978). Nessa metodologia, o animal é colocado em uma plataforma e mantido em decúbito ventral pelo experimentador. Em seguida, utilizando-se um aparato não pontiagudo, é exercida pressão constante de 20mmHg em área de

15mm² na superfície dorsal de qualquer uma das patas traseiras do animal. A pressão na pata é interrompida quando o animal exibe um quadro característico interpretado como reação de nocicepção.

O quadro de reação que compõe o comportamento interpretado como nociceptivo é variável de animal para animal, dependendo quase sempre de seu grau de agitação e das diferenças comportamentais entre os mesmos. De modo geral, os animais podem apresentar as seguintes reações: relaxamento da musculatura da cauda; o animal não procura fugir e nem retirar a pata do aparato; a cabeça se imobiliza e por fim ocorre uma espécie de "reação de congelamento". A "reação de congelamento" é caracterizada pelo término dos movimentos de fuga, aparecimento de uma breve apnéia concomitante com fasciculação do dorso do animal (sucessivas ondas de contração muscular) e retração da cabeça e patas dianteiras.

Para cada animal, o tempo de reação em segundos foi medido e registrado antes e após a administração de qualquer tratamento e/ou da substância que induz hipernocicepção (PGE₂). O tempo de reação para a medida do limiar nociceptivo em uma pata não tratada ou após injeção intraplantar de salina foi de, aproximadamente, 30 ± 2 segundos. Após a injeção da PGE₂ o tempo de reação dos animais é de, aproximadamente, 15 ± 1 segundo. As intensidades de hipernocicepção foram calculadas subtraindo-se o valor obtido na segunda medida (após os tratamentos) do valor da primeira medida (anterior aos tratamentos) para cada animal (Ferreira e cols., 1978). Deste modo, quanto menor o tempo em que o animal apresentar a reação de nocicepção após a injeção de PGE₂, por exemplo, maior a intensidade de hipernocicepção (tempo para reação antes do tratamento: 30 segundos – tempo para reação após o tratamento: 14 segundos = intensidade de

hipernocicepção de 15 segundos). Nossos dados foram expressos utilizando-se os termos **intensidade de hipernocicepção** ou **intensidade de hipernocicepção basal**, conforme o protocolo experimental discutido na seção 2.2 RESULTADOS. Todas as medidas foram feitas pelo mesmo experimentador e, na maioria das sessões experimentais, confirmadas por um segundo experimentador que ignorava o tipo de tratamento que determinado grupo de animais recebeu.

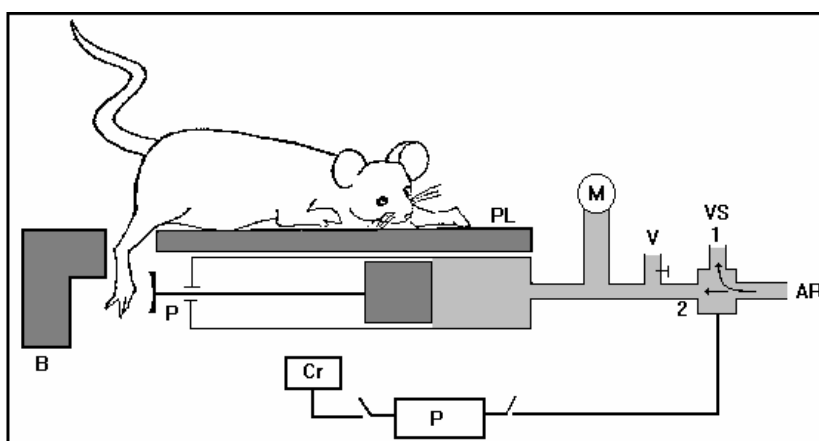


Figura 1. Diagrama do aparelho usado para avaliação do limiar nociceptivo em patas de em ratos. O animal é colocado sobre a plataforma (PL) e a sua pata traseira posicionada entre a plataforma e a barra (B). O ar é pressionado constantemente dentro do sistema, mas a válvula solenóide (VS) normalmente dirige-o na direção 1. Quando o pedal (P) é ativado pelo experimentador, ocorre simultaneamente o disparo do cronômetro (Cr) e o fechamento da válvula solenóide que faz com que o fluxo de ar seja dirigido para dentro da seringa de teflon - direção 2. A pressão no sistema pode ser monitorada por meio do manômetro (M) e permanece no valor desejado pelo experimentador através da válvula de escape (V).

Drogas e Tratamentos Farmacológicos

Tabela 1 - Agentes que induzem sensibilização dos nociceptores

Nome Procedência	Dose Via Volume	Diluentes	Tempo	Comentários
PGE ₂ Sigma, EUA	100 ng ipl 50 µL	Solução estoque [500 µg/mL] de etanol; Diluição em NaCl 0,9%	Pico de ação 3 horas após a injeção	Solução estoque mantida em alíquotas individuais (-20°C) que foram diluídas imediatamente antes do uso
Subunidade catalítica de PKA Calbiochem, EUA	3U ipl 50µL	Solução estoque [20mM] de tampão Tris- HCl/NaCl/EDTA; Diluição em NaCl 0,9%	3 horas após a injeção	
Agonista de PKCε (ψεRACK) SynPep, EUA	3U ipl 50µL	Solução estoque [1mg/mL] de água MiliQ; Diluição em NaCl 0,9%	3 horas após a injeção	
NGF (Fator de Crescimento do Nervo) (dado pelo Prof. S. Poole, National Institute for Biological Standards and Control, UK)	50µL ipl	Diluição em NaCl 0,9%	Pico de ação 3 horas após a injeção	Solução estoque mantida em alíquotas individuais (-70°C) que foram descongeladas imediatamente antes do uso

Tabela 2- Drogas com propriedades antiinflamatórias ou analgésicas

Nome Procedência	Dose Via Volume	Diluentes	Tempo	Comentários
Dipirona Sigma, EUA	160 µg ipl 50 µL	Diluição em NaCl 0,9%	Administrada 30 min antes da PGE ₂	Diluído imediatamente antes da administração
Dexametasona (fosfato de sódio) Sigma, EUA	25µg 50µL /ipl ou 10µL/it	Diluição em NaCl 0,9%	Administrada 60 min antes da PGE ₂	
PDTC (ácido Pirrolidinaditiocarbato Amônio) Aléxis Corporation, Suíça	20µM/50µL/ipl 200µM/10µL/it	Diluição em NaCl 0,9%	Administrado 60 min antes da PGE ₂	

Tabela 3 - Drogas antagonistas ou que interferem com a via de sinalização da PGE₂

Nome Procedência	Dose Via Volume	Diluentes	Tempo	Comentários
Antagonista EP2/1 – AH6809 (ácido 6-isopropóxi-9-oxoxantene-2-carboxílico) Sigma, EUA	7,5 ng ipl 50 µL	Solução estoque [2mg/mL] em DMSO; Diluição em NaCl 0,9%, solução final DMSO < 0,1%	Administrado 15 min antes da PGE ₂	Solução estoque mantida em alíquotas individuais (-20°C) que foram diluídas imediatamente antes do uso
Antagonista EP4 – AH23848 (ácido [1α(Z),2β,5α]-(±)-7-[5-[[[1,1-bifenil]-4-il]metóxi]-2-(4-morfolinil)-3-oxociclopentil]-4-heptenóico) Sigma, EUA	10 µg ipl 50 µL	Solução estoque [10mg/mL] em DMSO; Diluição em NaCl 0,9%, solução final DMSO 2%	Administrado 15 min antes da PGE ₂	
SQ 22536 (9-(tetrahidro-2'-fúril)adenina) Biomol, EUA	25 µg ipl 50 µL	Solução estoque [50µg/mL] em água MiliQ; Diluição em NaCl 0,9%	Administrado 30 min antes da PGE ₂	
AKAP (In CELlect™ AKAP St-Ht31 Inhibitor Peptide), Promega, EUA	0,3 µg ipl 50 µL	Solução estoque [10mM] Tris-HCl; Diluição em NaCl 0,9%	Administrado 5 min antes da PGE ₂	
Peptídeo inibidor de PKCε Calbiochem, EUA	3 µg ipl 50 µL	Solução estoque [5mg/mL] em água MiliQ; Diluição em NaCl 0,9%	Administrado 5 min antes da PGE ₂	
H-89 (hidrato de diidroclorídeo) Sigma, EUA	27 µg ipl 50 µL	Solução estoque [85.8mg/mL] em DMSO; Diluição em NaCl 0,9%, solução final DMSO 0,5%	Administrado 30 min antes da PGE ₂	
Staurosporina (<i>Streptomyces</i> sp) Sigma, EUA	1 µg ipl 50 µL	Solução estoque [4mg/mL] em DMSO; Diluição em NaCl 0,9%, solução final DMSO 0,5%	Administrado 30 min antes da PGE ₂	

Tabela 4 - Oligodeoxinucleotídeos

Nome Procedência	Dose Via Volume	Diluentes	Seqüência antisense	Seqüência controle
Na _v 1.8 Erviegas, Brasil	20µg it 10 µL	Diluição em NaCl 0,9% e mantida em alíquotas individuais (-20°C) que foram descongeladas imediatamente antes do uso	5' GGG GAG CTC CAT CTT CTC 3'	5' GGG GTC TTC CAA GCT CTC 3'
CREB Erviegas, Brasil			5' TGG TCA TCT AGT CAC CGG TG 3'	5' CAC CGG TGA CTA GAT GAC CA 3'

Tabela 5 - Drogas anestésicas e outros

Nome Procedência	Dose Via Volume	Diluentes	Tempo	Comentários
Tiopental sódico 2,5% Abbott, EUA	50mg/2mL/Kg/ip	Diluição em NaCl 0,9%	-	Solução estoque mantida a 4°C
Hidrato de cloral 4% Sigma, EUA	10mL/Kg/ip		-	Solução estoque mantida a 4°C
Diazepam	30mg/Kg/ip		Pico de ação 20 minutos	-
Anticorpo anti-NGF (carneiro anti-rato) (doado pelo Prof. S. Poole, National Institute for Biological Standards and Control, UK)	50µL/ipl ou 10µL/it		15 minutos antes de PGE ₂ ou NGF	Solução estoque mantida em alíquotas individuais (-70°C) que foram descongeladas imediatamente antes do uso
NaCl 0,9%Equiplex, Brasil	-	-	-	Utilizado como diluente
DMSO (dimetilsulfóxido) Sigma, EUA	-	-	-	
Etanol Merk, EUA	-	-	-	

Vias de administração

Para a realização deste estudo as drogas foram administradas por via local-intraplantar-subcutânea (ipl) ou local-intratecal (it). Também, as drogas anestésicas e o diazepam foram administrados por via intraperitoneal (ip).

Administração intratecal de drogas

A administração intratecal de drogas foi realizada utilizando-se a técnica de injeções diretas proposta por Mestre e cols. (1994). Brevemente, sob anestesia os animais foram instalados sobre um dispositivo cilíndrico onde permaneceram em decúbito ventral com a região lombar hiperfletida, expondo o interespaço L4-L5. Em seguida foi inserida, de forma perpendicular à coluna vertebral, a agulha para injeção utilizando-se seringa de insulina (30 unidades ou μL). Quando a agulha atinge o espaço subaracnóide pode ser observado movimento lateral da cauda do animal, este sinal foi utilizado como garantia do local correto da injeção. Após a injeção (10 μL) foram aguardados alguns segundos antes da remoção da seringa para evitar refluxo de líquidos.

Conforme dados do nosso laboratório e da literatura, a administração dos oligodeoxinucleotídeos (ODNs) estudados em regime de uma vez ao dia durante 4 dias consecutivos é suficiente para induzir redução significativa tanto da proteína $\text{Na}_v1.8$ quanto da proteína CREB (Parada e cols., 2003; Villarreal e cols., 2005; Ma e cols., 2003). Para garantir que ao início do tratamento a expressão das proteínas alvo estivesse diminuída, antes de se iniciar o protocolo para indução da hipernocicepção persistente induzida por PGE_2 foi realizado o tratamento de 4 dias com os ODNs; em seguida, os ODNs foram administrados em regime de dias alternados ou dias consecutivos, dependendo do protocolo experimental, durante os 14 dias de tratamento com PGE_2 . As demais drogas ou anticorpos foram

administrados diariamente e previamente ao tratamento com PGE₂, conforme indicado.

Teste Motor

Para a avaliação de um possível comprometimento motor dos animais devido às repetidas injeções intratecais associadas ao efeito das drogas ou ODNs, utilizamos o teste de “rota-rod”. O aparelho de “rota-rod” Ugo Basile foi regulado para o modo constante (18 rpm) e consiste basicamente de um cilindro (distante 7 cm da superfície onde o aparelho encontra-se) que gira movido por um motor à velocidade fixada pelo experimentador. Para manter-se no cilindro o animal necessita locomover-se e a capacidade locomotora é então quantificada registrando-se o tempo de permanência no aparelho. Os animais foram treinados 2 dias antes do teste, o que incluiu 3 sessões de treino em cada dia, e todos foram capazes de permanecer no cilindro por período superior à 200 segundos que foi o tempo de corte estabelecido. Drogas que, como os benzodiazepínicos (p.ex. diazepam, controle positivo utilizado neste estudo), diminuem significativamente o tempo de permanência dos animais no aparato em relação ao grupo salina e são consideradas drogas que interferem com a capacidade locomotora dos animais.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa "Graph Pad Prism 4.0, San Diego, EUA". Os resultados são representados como média \pm erro padrão da média (epm) de medidas realizadas em grupos 4 -15 animais e indicam a intensidade de hipernocicepção ou a intensidade de hipernocicepção *basal* dos animais, variando conforme o protocolo experimental.

Foram utilizadas as análises de variância de duas (two-way ANOVA) ou de uma via (one-way ANOVA), para a análise de dados repetidos ao longo do tempo ou não, respectivamente. Em seguida às análises de variância e para se obter comparações pareadas foram realizados testes de comparações múltiplas de Bonferroni. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

2.2 RESULTADOS

Evolução temporal da hipernocicepção durante 14 dias de tratamento com PGE₂ e período de pós-tratamento:

A administração de PGE₂ (100ng/50µL/pata) diariamente por 14 dias induz, ao término do tratamento, quadro de hipernocicepção mecânica persistente que permanece por até 30 dias após o término do regime de injeções (figura 2; Ferreira e cols., 1990). Existem duas etapas bem definidas neste modelo experimental: a **indução** ou **instalação** da hipernocicepção persistente, na qual foram realizados os tratamentos com PGE₂ além da avaliação diária dos limiares nociceptivos dos animais; e a **manutenção** onde o limiar nociceptivo dos animais foi avaliado constantemente (não foi realizado nenhum tratamento neste estudo). Durante o período de indução ou instalação da hipernocicepção persistente o teste nociceptivo foi realizado antes e após os tratamentos o que permite identificar uma fase inicial onde os eventos hipernociceptivos agudos - induzidos pelas injeções diárias de PGE₂ - bem como as alterações induzidas por este tratamento no limiar nociceptivo basal dos animais podem ser discriminados (indicado na figura 2). Por volta do 4º dia de administração de PGE₂ o limiar nociceptivo basal dos animais apresenta-se alterado, sendo estatisticamente diferente do limiar apresentado pelos animais que receberam salina. A partir daí há diminuição gradativa do mesmo sendo que aproximadamente no 7º dia de tratamento encontra-se indistinguível do limiar após a administração de PGE₂ e não retorna mais aos valores controle até a última injeção (14º dia – fase intermediária). O fato de ser possível visualizar experimentalmente a fase de indução da hipernocicepção persistente bem como

registrar e analisar as mudanças gradativas no limiar nociceptivo dos animais torna este modelo interessante para o estudo dos mecanismos envolvidos na cronificação.

Com base nestas observações os dados representados neste trabalho a partir da figura 3 podem ser de duas formas: 1) **intensidade de hipernocicepção** - para representar as medidas dos limiares nociceptivos dos animais durante estudos agudos ou ainda para representar o efeito dos tratamentos sobre a hipernocicepção induzida pela PGE₂ no momento de seu pico (3 horas após as injeções do eicosanóide) durante os estudos crônicos; ou 2) **intensidade de hipernocicepção basal** - para representar as medidas dos limiares nociceptivos basais dos animais durante os estudos crônicos.

Ainda, podem ocorrer pequenas variações quanto ao primeiro dia de alteração do limiar nociceptivo das patas dos animais ou à intensidade de hipernocicepção que poderão ser detectadas observando-se os resultados ao longo deste trabalho, entendemos que estas variações são experimentalmente aceitáveis e decorrentes principalmente de variações biológicas. Também, não se pode excluir o efeito de variações ambientais, embora todo o esforço tenha sido feito para evitá-las.

Por fim, durante o período de manutenção da hipernocicepção persistente o limiar nociceptivo dos animais foi avaliado por 7, 14, 21 ou 30 dias, conforme necessário e levando em consideração que a duração do experimento foi o mais curta quanto possível (Zimmermann, 1983).

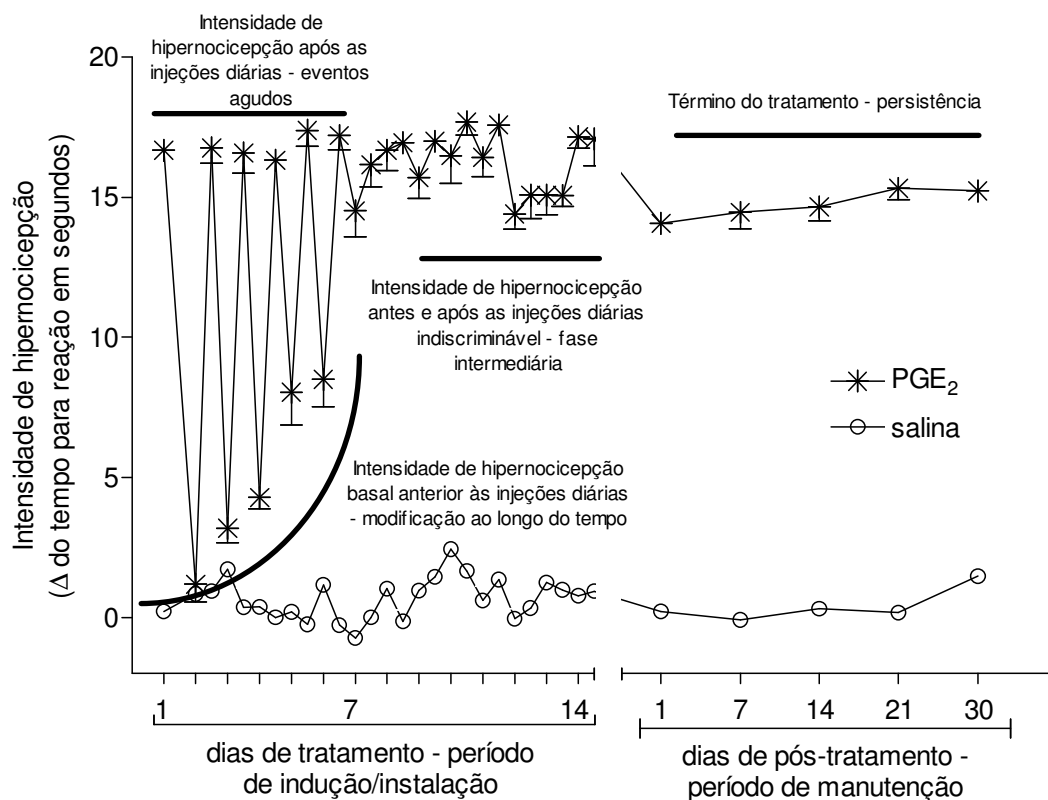


Figura 2. Evolução temporal da intensidade de hipernocicepção durante e após 14 injeções diárias de PGE₂. A administração de PGE₂ (100ng/50μL/pata) induz hipernocicepção aguda (avaliada 3h após sua administração durante todo o período de tratamento) que se resolve em 24 horas (dia 2). Por volta do 4º dia após o início do tratamento ocorre hipernocicepção que não retorna aos valores basais no dia seguinte (5º dia), evoluindo para valores indiscrimináveis dos valores apresentados após as injeções de PGE₂ durante uma fase intermediária até o 14º dia de tratamento. Após o término do tratamento verifica-se um período de persistência do quadro hipernociceptivo. O teste nociceptivo foi realizado diariamente antes (limiar nociceptivo basal dos animais) e após as injeções durante todo período de tratamento e durante 30 dias de pós-tratamento. Os dados representam médias ± epm de grupos de 4-6 animais, sendo a figura representativa do fenômeno estudado.

A antinocicepção induzida pelo pré-tratamento diário com dipirona durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente:

Com o intuito de investigar se a antinocicepção diária induzida por dipirona poderia prevenir o desenvolvimento da hipernocicepção persistente realizamos o seguinte protocolo: pré-tratamento diário com dipirona (160µg/50µL/pata), 30 minutos antes da administração de PGE₂ (100ng/50µL/pata); avaliação do limiar nociceptivo basal dos animais e 3h após a injeção de PGE₂. A dose de dipirona utilizada neste estudo induz antinocicepção local, não sendo detectado efeito na pata contralateral (Parada e cols., 2003). O pré-tratamento com dipirona inibiu a hipernocicepção induzida pela administração de PGE₂ durante todo o período de indução da hipernocicepção persistente (figura 3A). No entanto, o limiar nociceptivo basal dos animais apresentou-se hipernociceptivo a partir do 4^o dia de tratamento (figura 4B) não sendo diferente do grupo controle (salina + PGE₂). Além disso, após o término do regime de tratamento os animais apresentaram hipernocicepção persistente durante todo o período de avaliação (21 dias), sugerindo que o tratamento com dipirona não previne a instalação do quadro persistente. É importante salientar que os dados expressos na figura 3A ou 3B referem-se ao mesmo grupo experimental sendo expressos separadamente apenas para facilitar a visualização de dois momentos distintos durante a realização dos protocolos experimentais.

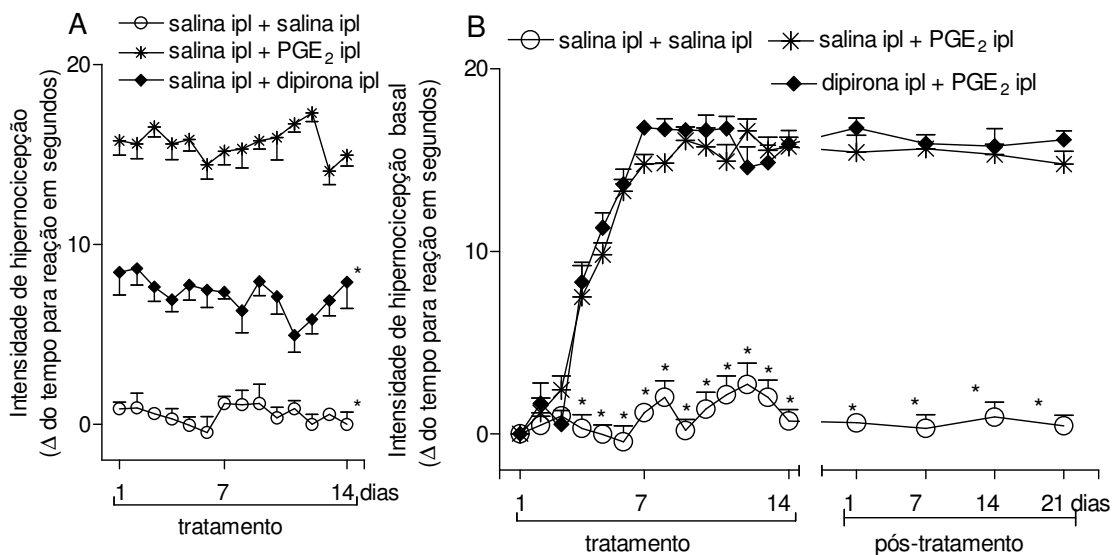


Figura 3. A antinocicepção induzida pelo pré-tratamento diário com dipirona durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente. O pré-tratamento diário com dipirona (160 μ g/50 μ L/pata) inibiu a hipernocicepção (painel A), mas não a alteração do limiar nociceptivo basal das patas dos animais nem a instalação da HP (painel B) induzidas por injeções diárias de PGE₂ (100ng/50 μ L/pata). O teste nociceptivo foi realizado diariamente antes (hipernocicepção basal, painel B) e após a administração do estímulo (painel A) durante todos os dias de tratamento e mais 21 dias do período de pós-tratamento (painel B). Os dados representam médias \pm epm de grupos de 5 - 6 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo PGE₂, para painel A todos os pontos das linhas; $p < 0,05$ (two-way ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni).

A instalação da hipernocicepção persistente induzida por injeções diárias de PGE₂ é dependente da ativação de receptores EP:

Para avaliar se a instalação da HP é dependente da ativação de receptores para PGE₂ – EPs, foram testados dois antagonistas previamente estudados em nosso laboratório: 1) antagonista preferencial para receptores EP2, porém apresenta certa seletividade para receptores EP1, AH6809 (EP2/1, 7,5ng/50µL/pata); e 2) antagonista de receptores EP4, AH23848 (10µg/50µL/pata). A escolha das doses e tempos de administração baseou-se em estudo prévio realizado em nosso laboratório (Rodrigues, MA. Dissertação, 2007). A administração aguda destes antagonistas, isoladamente ou em associação, 15 minutos antes, previne a hipernocicepção induzida por PGE₂ (100ng/50µL/pata) avaliada 3h após sua administração (figura 4A). O pré-tratamento (mesmas doses e tempos) com os antagonistas administrados isoladamente durante os 14 dias de tratamento com PGE₂ (100ng/50µL/pata) não preveniu a instalação da hipernocicepção persistente (figura 4B para o antagonista EP2/1 e 4C para antagonista EP4). Porém, a associação dos dois tratamentos preveniu que o limiar basal dos animais se alterasse para hipernociceptivo durante os 12 dias iniciais de tratamento. Ao término do regime de injeções (dias 13 e 14) o limiar evoluiu para hipernociceptivo, mantendo-se por menos de 7 dias de avaliação, no período de pós-tratamento, quando então regrediu gradativamente até valores próximos aos valores apresentados pelo grupo salina (painel D).

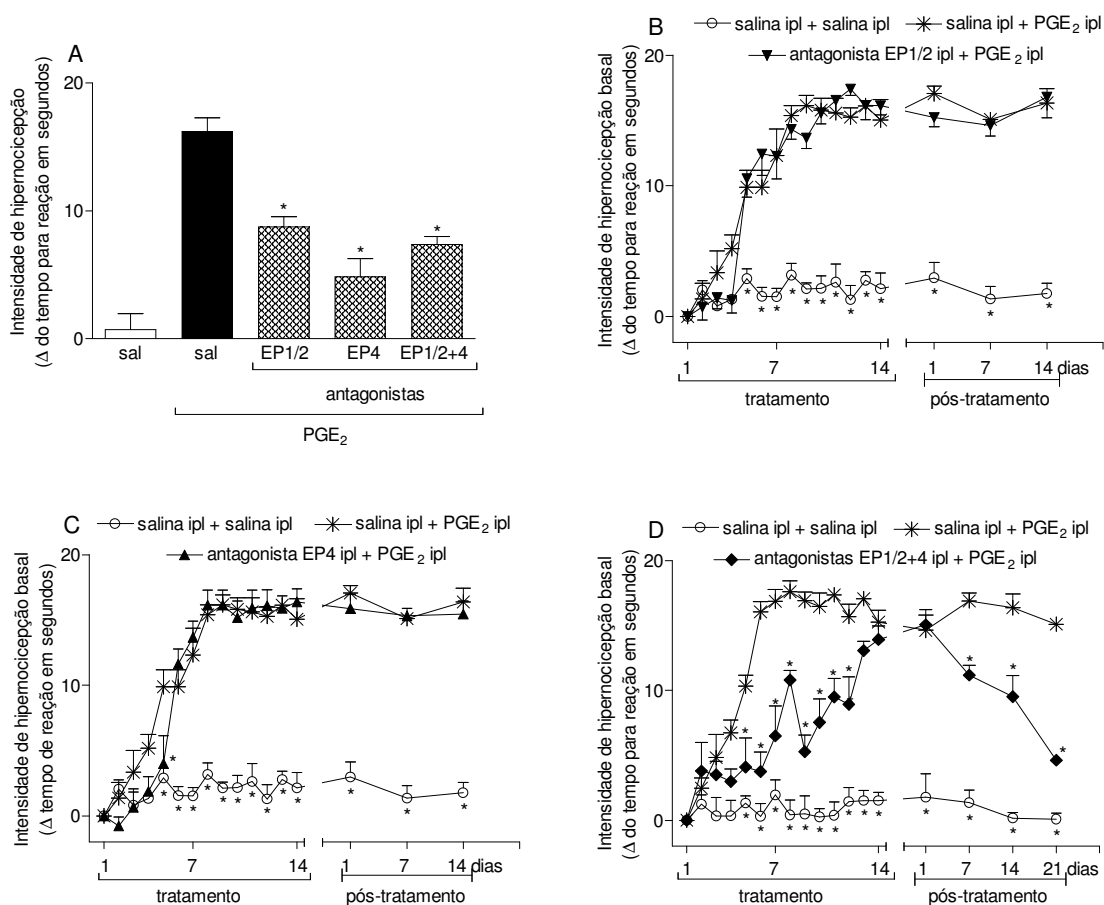


Figura 4. A instalação da hipernociceção persistente induzida por injeções de PGE₂ é dependente da ativação de receptores EP. O pré-tratamento agudo, 15 minutos antes, com AH6809 (EP2/1, 7,5ng/50μL/pata) ou com AH23848 (EP4, 10μg/50μL/pata) ou ainda sua associação previne a hipernociceção aguda induzida por PGE₂ (100ng/50μL/pata) (painel A). O mesmo protocolo quando aplicado cronicamente (14 dias) para o antagonista EP2/1 (painel B) ou EP4 (painel C), não inibe a alteração do limiar nociceptivo basal dos animais. A associação dos dois antagonistas seguindo-se o protocolo de administração crônica preveniu temporariamente a alteração do limiar nociceptivo basal dos animais durante o período de tratamento, este tendo se mantido hipernociceptivo no período inicial após o término dos tratamentos retornando a valores próximos aos valores do grupo salina no 21^o dia de pós-tratamento (painel D). O teste nociceptivo foi realizado antes e 3h após a administração de PGE₂ (painel A) ou diariamente antes da administração do estímulo durante todos os dias de tratamento e 21 dias durante o período de pós-tratamento (painéis B-D). Os dados representam médias ± epm de grupos de 4 - 6 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina + PGE₂. p<0,05 (one-way ANOVA para painel A e two-way ANOVA para painéis B-D, seguidos do pós-teste de Bonferroni).

A ativação da adenilil ciclase durante o período de indução é importante para a instalação da hipernocicepção persistente:

Visto que a antinocicepção parece não ser fundamental para que a instalação da hipernocicepção persistente ocorra e esta é um fenômeno dependente da ativação de receptores EP, investigamos a seguir o efeito da inibição da via de sinalização proposta para a PGE₂. Para investigar o papel da ativação da adenilil ciclase (AC) foi realizado o pré-tratamento diário, 30 minutos antes da administração de PGE₂, com um inibidor da AC, SQ 22536 (25µg/50µL/pata) (figura 5). O SQ 22536 inibiu a hipernocicepção aguda induzida por PGE₂ (100ng/50µL/pata) quando avaliada 3h após a administração da mesma (figura 5A). Além disso, preveniu a alteração no limiar nociceptivo basal dos animais e o aparecimento ou a instalação da HP durante todo o período de pós-tratamento em que foi avaliado o limiar nociceptivo dos animais (21 dias) (figura 5B).

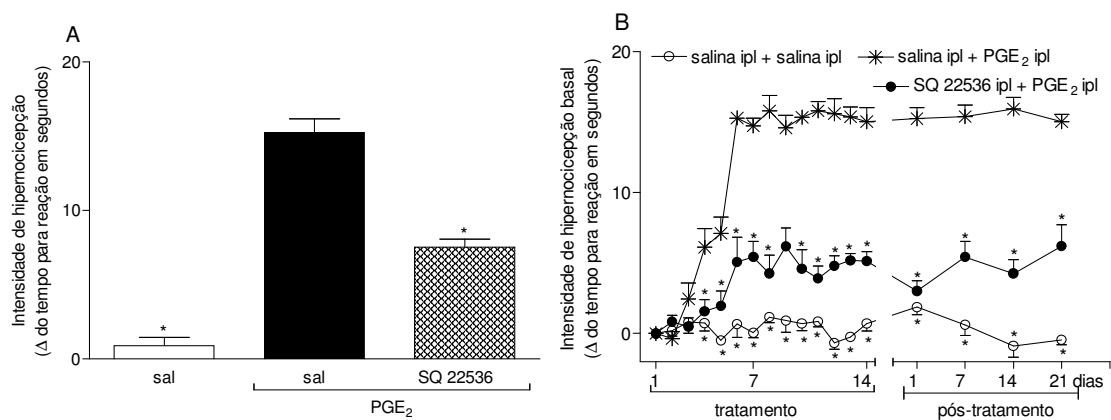


Figura 5. A ativação da adenilil ciclase durante o período de indução é importante para a instalação da hipernocicepção persistente. O pré-tratamento, 30 minutos antes, com o inibidor da AC SQ 22536 (25µg/50µL/pata) previne a hipernocicepção aguda (painel A), a alteração do limiar nociceptivo basal das patas dos animais e a HP induzida por injeções diárias de PGE₂ (100ng/50µL/pata) (painel B). O teste nociceptivo foi realizado antes e 3h após a administração de PGE₂ (painel A) ou diariamente antes da administração do estímulo durante todos os dias de tratamento e 21 dias durante o período de pós-tratamento (painel B). Os dados representam médias ± epm de grupos de 5 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina + PGE₂, p<0,05 (one-way ANOVA para painel A; two-way ANOVA para painel B, seguidos do pós-teste de Bonferroni).

A ativação das proteinoquinases A e C durante o período de indução faz parte do mecanismo de instalação da hipernocicepção persistente:

Dando seguimento ao estudo sobre a importância da ativação da via de sinalização da PGE₂ para a indução da HP, foi investigado o papel das proteinoquinases A e C (ϵ). Inicialmente foram realizados pré-tratamentos diários, 5 minutos antes da PGE₂, com inibidor de PKA, AKAP (0.3 μ g/50 μ L/pata) mais o peptídeo inibidor da PKC ϵ (PKC ϵ i, 3 μ g/50 μ L/pata) em associação. Este tratamento inibiu a hipernocicepção aguda induzida por PGE₂ (100ng/50 μ L/pata) quando avaliada 3h após sua administração (figura 6A). O tratamento crônico com a associação dos inibidores também preveniu a alteração no limiar nociceptivo basal e o aparecimento ou a instalação da HP durante todo o período de pós-tratamento em que foi conduzido o experimento (21 dias) (figura 6B). É importante mencionar que a associação dos inibidores de PKA + PKC ϵ induziu antinocicepção diária (dados não mostrados) seguindo o mesmo padrão da resposta exemplificada na figura 6A. Para avaliar se, apesar de não apresentarem HP, as patas dos animais poderiam reter algum tipo de sensibilidade, realizamos um “desafio” administrando no 7^o dia de pós-tratamento, baixa dose de PGE₂ (10ng/50 μ L/pata). Esta dose é caracterizada por ser suficiente para reinstalar o quadro de HP durante seu período de quiescência (Ferreira e cols., 1990). Observamos que este grupo de animais apresentou resposta estatisticamente diferente dos animais controle que receberam salina + PGE₂ em baixa dose ($p < 0,05$), porém também diferente dos animais que apresentavam HP ($p < 0,001$) (PGE₂ (14 dias) + salina desafio: $16 \pm 0,7$; inibidores (14 dias) + PGE₂ (14 dias) + PGE₂ (baixa dose - desafio): $9,7 \pm 1,5$; salina (14 dias) + PGE₂ (baixa dose - desafio): $5,5 \pm 0,5$; dados expressos em segundos, n=5, one-

way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni, dados não expressos graficamente). Embora o grupo tratado tenha apresentado uma sutil diferença ao desafio com a dose baixa de PGE₂ em relação aos animais controle (salina por 14 dias + desafio), estes dados sugerem importante papel para as proteinoquinases A e Cε durante a instalação da hipernocicepção persistente.

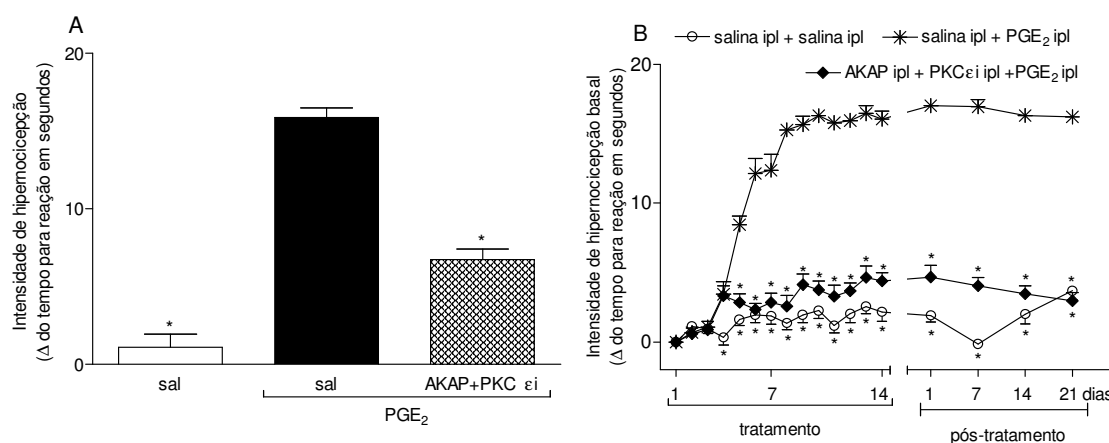


Figura 6. A ativação das proteinoquinases A e C durante o período de indução faz parte do mecanismo de instalação da hipernocicepção persistente. O pré-tratamento, 5 minutos antes, com inibidor de PKA (AKAP, 0.3μg/50μL/pata) mais o inibidor da PKCε (PKCεi, 3μg/50μL/pata) inibe a hipernocicepção aguda (painel A), a alteração do limiar nociceptivo basal das patas dos animais e a HP induzida por injeções diárias de PGE₂ (100ng/50μL/pata) (painel B). O teste nociceptivo foi realizado antes e 3h após a administração de PGE₂ (painel A) ou diariamente antes e após a administração do estímulo durante todos os dias de tratamento e 21 dias durante o período de pós-tratamento (painel B). Os dados representam médias ± epm de grupos de 5 - 15 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina + PGE₂, p<0,05 (one-way ANOVA para painel A; two-way ANOVA para painel B, seguidos do pós-teste de Bonferroni).

A ativação da proteínquinase A durante o período de indução faz parte do mecanismo de instalação da hipernocicepção persistente - I) Pré-tratamento com inibidores de PKA durante o período de indução:

Para analisar a contribuição da ativação da PKA, isoladamente de PKC, no processo de indução da HP foram utilizadas duas drogas inibidoras desta proteínquinase: AKAP (0,3µg/50µL/pata) ou H89 (27µg/50µL/pata), ambas administradas previamente ao tratamento diário com PGE₂ (100ng/50µL/pata), 5 ou 30 minutos respectivamente (figura 7). O limiar nociceptivo dos animais foi avaliado diariamente antes dos tratamentos (figura 7B e 7C); ou antes, e após 3h das injeções de PGE₂ (figura 7A). Os inibidores de PKA induziram antinocicepção aguda (painel A), além disso, tanto durante o período de tratamento quanto durante o período de pós-tratamento (21 dias) o limiar nociceptivo basal dos animais apresentou-se diferente do grupo controle que recebeu PGE₂ (figura 7B e 7C), sugerindo importante papel para esta proteínquinase durante a instalação da HP.

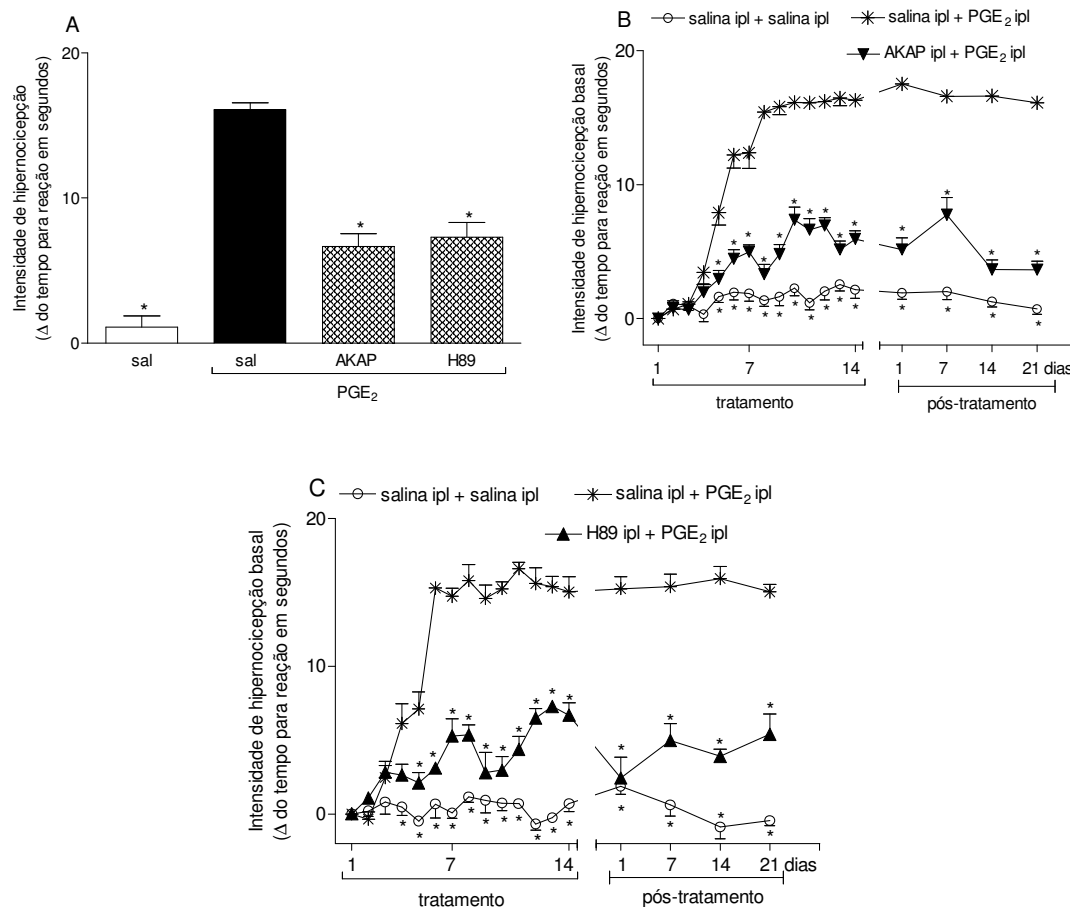


Figura 7. A inibição farmacológica da PKA previne a instalação da hipernociceção persistente. O pré-tratamento com os inibidores de PKA: AKAP (5 minutos antes, 0,3 μ g/50 μ L/pata) ou H89 (30 minutos antes, 27 μ g/50 μ L/pata) inibe a hipernociceção aguda (painel A), a alteração do limiar nociceptivo basal das patas dos animais e a HP induzida por injeções diárias de PGE₂ (100ng/50 μ L/pata) (painel B para AKAP e painel C para H89). O teste nociceptivo foi realizado antes da administração dos tratamentos e 3h após a administração de PGE₂ (painel A); diariamente antes da administração dos tratamentos e durante o período de 21 dias após o término do regime de tratamento (hipernociceção basal, painéis B e C). Os dados representam médias \pm epm de grupos de 5 - 15 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado aos respectivos grupos salina + PGE₂, $p < 0,05$ (one-way ANOVA para painel A; two-way ANOVA para painéis B e C, seguidos do pós-teste de Bonferroni).

A ativação da proteínquinase A durante o período de indução faz parte do mecanismo de instalação da hipernociceção persistente - II) Efeito hipernociceptivo induzido pela administração aguda da subunidade catalítica da PKA:

Para analisar a importância de PKA na indução de sensibilização mecânica em patas de ratos, administramos agudamente a subunidade catalítica da PKA (PKAsc) em diferentes doses: 0,3, 1, 3 e 9 U/pata/50 μ L. Observamos que todas as doses induziram hipernociceção de intensidade similar que manteve-se até 24 horas após, quando declinou lentamente até retornar aos valores controles no 18^o dia de avaliação do limiar nociceptivo dos animais (figura 8A). Três horas após sua administração, as doses de 0,3, 3 e 9U/pata da PKAsc induziram intensidade de hipernociceção similar à observada também 3h após a administração de PGE₂ (dose usualmente utilizada: 100ng/50 μ L/pata, figura 8B). A dose de 1U/pata apresentou intensidade de hipernociceção superior à induzida por PGE₂ (figura 8B). Para dar prosseguimento aos nossos estudos foi escolhida a dose de 3U/pata/50 μ L por ser intermediária dentre as três doses que se apresentaram estatisticamente iguais à dose de PGE₂.

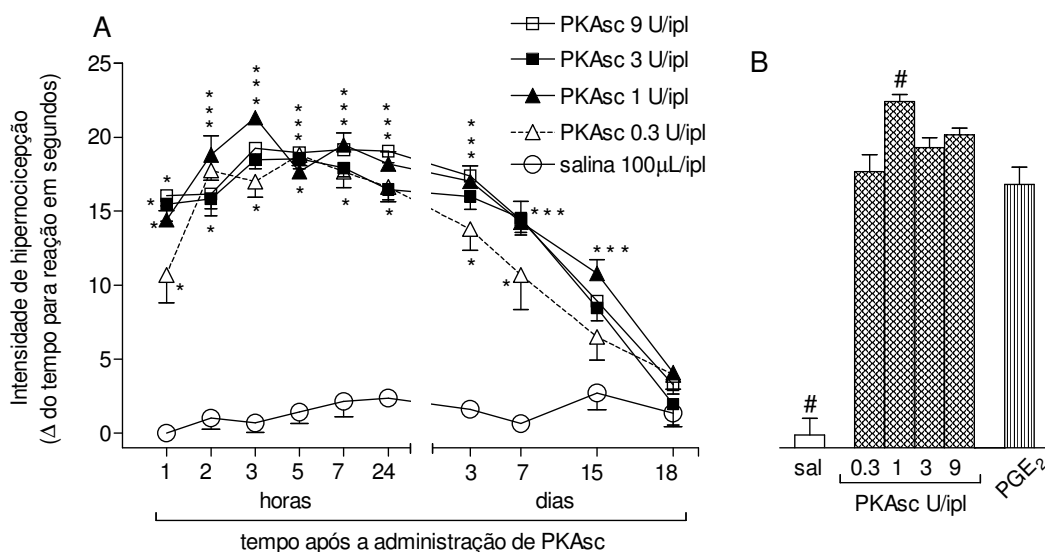


Figura 8. A administração aguda da subunidade catalítica da PKA induz hipernociceção mecânica. Uma única injeção intraplantar da subunidade catalítica da PKA (PKAsc, 0,3, 1, 3 e 9 U/pata/50µL) induziu hipernociceção que manteve-se até 24 horas após, quando declinou lentamente até retornar aos valores controles no 18º dia (painel A). A intensidade de hipernociceção induzida pelas diferentes doses da PKAsc 3h após sua administração foi similar ao efeito hipernociceptivo observado para PGE₂ avaliada também 3h após sua administração (100ng/50µL/pata, painel B). O limiar nociceptivo foi avaliado durante a 1ª, 2ª, 3ª, 5ª, 7ª e 24ª horas e nos dias 3, 7, 15 e 18 após a administração da PKAsc. Os dados representam médias ± epm de grupos de 4 - 6 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina e # diferença significativa quando comparado ao grupo PGE₂, p<0,05 (two-way ANOVA (painel A) e one-way ANOVA (painel B) seguidos do pós-teste de Bonferroni).

A ativação da proteínquinase A durante o período de indução faz parte do mecanismo de instalação da hipernocicepção persistente - III) Tratamento crônico com a subunidade catalítica da PKA:

Para confirmar a importância da ativação de PKA durante o processo de instalação da hipernocicepção persistente foi administrada então sua subunidade catalítica (3U/pata/50 μ L) em um regime inicial de administração em dias alternados. Este protocolo inicial foi desenhado devido ao fato de a PKAsc apresentar hipernocicepção prolongada (aproximadamente 7 dias após sua administração). Embora os animais tenham apresentado alteração no limiar nociceptivo já no segundo dia de experimento e este perfil foi mantido até o término do tratamento não sendo diferente do grupo PGE₂, por volta do 7º dia de pós-tratamento o limiar nociceptivo retornou a valores similares aos apresentados pelo grupo salina (figura 9A). Continuando o estudo, foi realizado um segundo protocolo onde a PKAsc (3U/pata/50 μ L) foi administrada em regime diário (figura 9B). Neste caso observamos também a alteração do limiar basal dos animais já no segundo dia de tratamento que se manteve por até 21 dias de pós-tratamento não sendo diferente do grupo PGE₂.

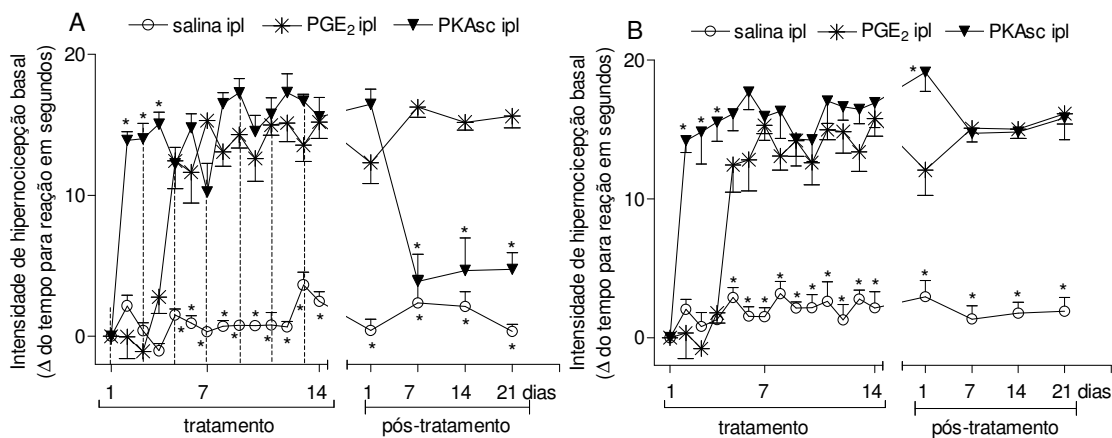


Figura 9. A administração crônica da subunidade catalítica da PKA induz hipernocicepção persistente. A administração intraplantar de PKAsc (3 U/pata/50 μ L) foi realizada em regime de dias alternados, os dias de tratamento são indicados pelas linhas pontilhadas verticais (painel A). O limiar nociceptivo basal dos animais apresentou-se alterado já no segundo dia de tratamento retornando aos valores controle (grupo salina) por volta do 7^o dia de pós-tratamento (painel A). Porém, quando a administração intraplantar de PKAsc (3 U/pata/50 μ L) foi realizada em regime diário, o limiar nociceptivo basal dos animais apresentou-se alterado também a partir do segundo dia de tratamento permanecendo similar ao apresentado pelo grupo PGE₂ durante todo o período de pós-tratamento avaliado (21 dias) (painel B). O teste nociceptivo foi realizado diariamente antes da administração do estímulo durante todos os dias de tratamento e 21 dias após o término do regime de tratamento. Os dados representam médias \pm epm de grupos de 4 - 6 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo PGE₂, $p < 0,05$ (two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

A ativação da proteínquinase C durante o período de indução faz parte do mecanismo de instalação da hipernocicepção persistente - I) Pré-tratamento com inibidores de PKC durante o período de indução:

Da mesma forma que para PKA, analisamos a contribuição da ativação individual da PKC para o processo de indução da hipernocicepção persistente induzida pela PGE₂. O primeiro protocolo experimental envolveu a inibição farmacológica desta proteínquinase, utilizamos: o peptídeo inibidor seletivo para PKC ϵ (PKC ϵ i, 3 μ g/50 μ L/pata) ou o inibidor não-seletivo staurosporina (1 μ g/50 μ L/pata), ambos administrados previamente ao tratamento diário com PGE₂ (100ng/50 μ L/pata), 5 ou 30 minutos respectivamente (figura 10). Os inibidores de PKC induziram antinocicepção aguda (figura 10A); preveniram alterações no limiar nociceptivo basal dos animais durante o período de indução e também o aparecimento da HP durante o período de pós-tratamento (21 dias) (figura 10B para o inibidor seletivo de PKC ϵ e figura 10C para Staurosporina). Durante todo o período de pós-tratamento o limiar nociceptivo basal dos animais tratados apresentou-se diferente do grupo controle que recebeu salina + PGE₂, sugerindo a importância desta proteínquinase, em especial da PKC ϵ , durante a instalação da HP induzida por PGE₂ (figura 10B e 10C).

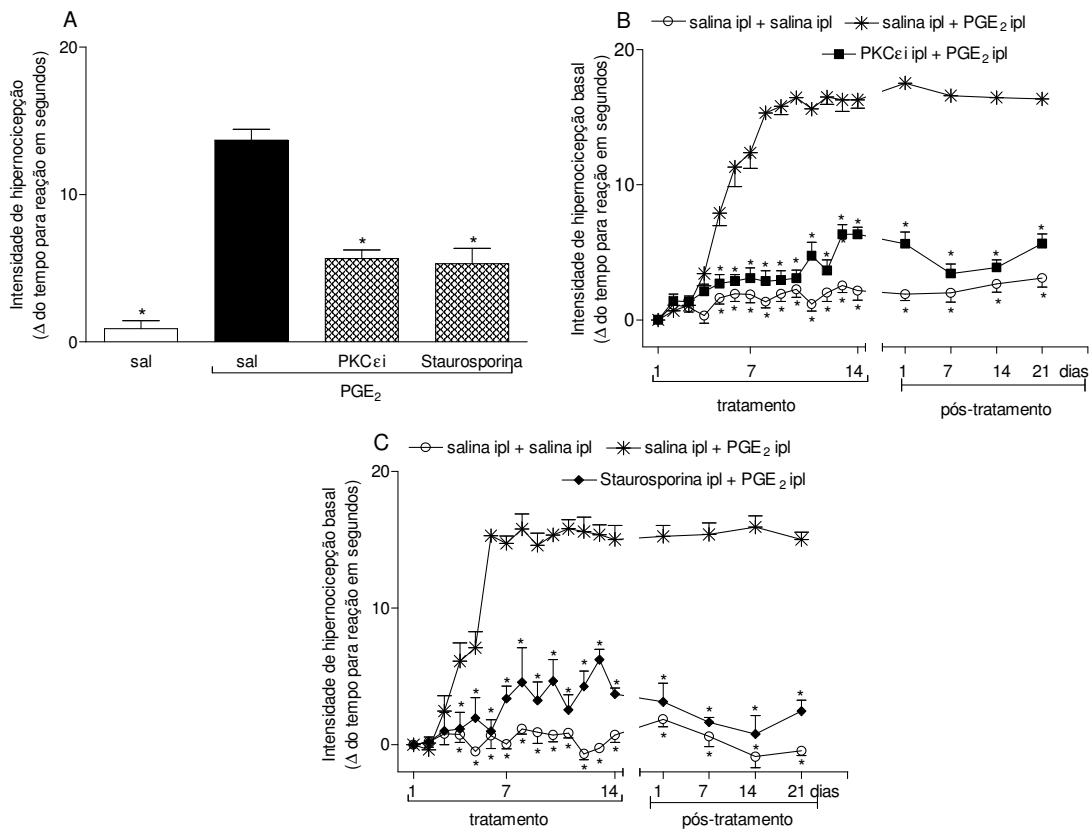


Figura 10. A inibição farmacológica da PKC previne a instalação da hipernocicepção persistente. O pré-tratamento com os inibidores de PKC: peptídeo seletivo para PKC ϵ (PKC ϵ i, 5 minutos antes, 3 μ g/50 μ L/pata) ou Staurosporina (30 minutos antes, 1 μ g/50 μ L/pata) inibe a hipernocicepção aguda (painel A), a alteração do limiar nociceptivo basal das patas dos animais e a HP induzida por injeções diárias de PGE₂ (100ng/50 μ L/pata) (painel B para PKC ϵ i e painel C para staurosporina). O teste nociceptivo foi realizado antes da administração dos tratamentos e 3h após a administração de PGE₂ (painel A); ou diariamente antes da administração dos tratamentos e durante o período de 21 dias após o término do regime de tratamento (hipernocicepção basal, painéis B e C). Os dados representam médias \pm epm de grupos de 5 - 15 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado aos respectivos grupos salina + PGE₂, $p < 0,05$ (one-way ANOVA para painel A; two-way ANOVA para painéis B e C, seguidos do pós-teste de Bonferroni).

A ativação da proteínquinase C durante o período de indução faz parte do mecanismo de instalação da hipernociceção persistente - II) Efeito hipernociceptivo induzido pela administração aguda do agonista de PKC ϵ ($\psi\epsilon$ RACK):

Para investigar a importância da ativação de PKC ϵ para a sensibilização mecânica dos nociceptores foi administrado agudamente o agonista de PKC ϵ $\psi\epsilon$ RACK em diferentes doses: 0,3, 1, 3 e 9 μ g/pata/50 μ L. Observamos que as doses utilizadas induziram hipernociceção de intensidade similar que manteve-se até a 7^a hora após sua administração quando declinou retornando aos valores controles na 24^a hora mantendo-se com alterações pouco significativas do ponto de vista comportamental até o 14^o dia de avaliação do limiar nociceptivo dos animais (figura 11A).

As doses de 1, 3 e 9U/pata, mas não 0,3U/pata induziram intensidade de hipernociceção similar à observada na 3^a hora após a administração de PGE₂ (dose usualmente utilizada: 100ng/50 μ L/pata, figura 11B). A dose de 0,3U/pata apresentou intensidade de hipernociceção inferior à induzida por PGE₂ (figura 11B). Para dar prosseguimento aos nossos estudos foi escolhida a dose de 3U/pata/50 μ L, pois, assim como para PKA α , dentre as três doses que se apresentaram estatisticamente iguais à dose de PGE₂, esta foi intermediária.

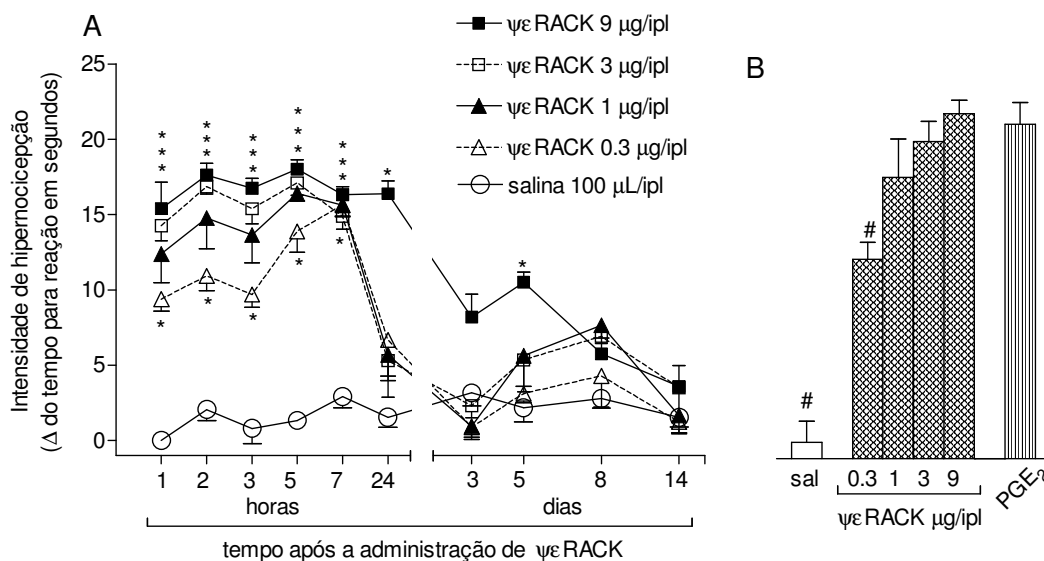


Figura 11. A administração aguda do agonista de PKC ϵ induz hipernociceção mecânica. Uma única injeção intraplantar do agonista de PKC ϵ ($\psi\epsilon$ RACK, 0,3, 1, 3 e 9 $\mu\text{g/pata}/50\mu\text{L}$) induziu hipernociceção que se manteve até a 7^a hora após, quando declinou até retornar aos valores controles na 24^a hora (painel A). A intensidade de hipernociceção induzida pelas diferentes doses de $\psi\epsilon$ RACK 3h após sua administração foi similar ao efeito hipernociceptivo observado para PGE₂ avaliada também 3h após sua administração (100ng/50 μL /pata, painel B). O limiar nociceptivo foi avaliado durante a 1^a, 2^a, 3^a, 5^a, 7^a e 24^a horas e nos dias 3, 5, 8 e 14 após a administração do agonista de PKC ϵ . Os dados representam médias \pm epm de grupos de 4 - 6 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina e # diferença significativa quando comparado ao grupo PGE₂, $p < 0,05$ (two-way ANOVA para painel A e one-way ANOVA para painel B, seguidos do pós-teste de Bonferroni).

A ativação da proteínquinase C durante o período de indução faz parte do mecanismo de instalação da hipernocicepção persistente - III) Tratamento crônico com o agonista de PKC ϵ ($\psi\epsilon$ RACK):

Para avaliar a importância da ativação de PKC ϵ durante o processo de instalação da hipernocicepção persistente inicialmente foi administrado seu agonista ($\psi\epsilon$ RACK, 3U/pata/50 μ L) em um regime de administração em dias alternados. A administração aguda do $\psi\epsilon$ RACK induz hipernocicepção que se resolve em 24 horas (figura 11A) apresentando um perfil temporal diferente da PKA α (figura 8A) - que induz hipernocicepção prolongada, aproximadamente por 7 dias após sua administração - no entanto, optamos por realizar os mesmos protocolos durante este estudo. O limiar nociceptivo basal dos animais apresentou-se alterado a partir do 3^o dia de experimento e este perfil foi mantido até o término do tratamento não sendo diferente do grupo PGE₂; aproximadamente no 7^o dia de pós-tratamento o limiar nociceptivo apresentou-se diferente do grupo PGE₂, retornando a valores similares aos apresentados pelo grupo salina até o 21^o dia de pós-tratamento (figura 12A). Em seguida foi realizado o protocolo onde o $\psi\epsilon$ RACK (3U/pata/50 μ L) foi administrado em regime diário (figura 12B). Neste caso observamos também a alteração do limiar basal dos animais já no segundo dia de tratamento que se manteve por até 21 dias de pós-tratamento não sendo diferente do grupo PGE₂.

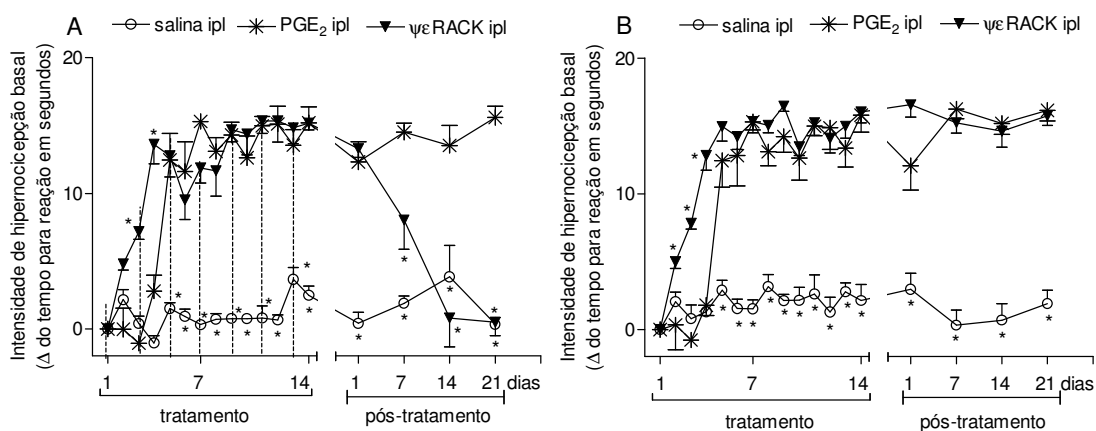


Figura 12. A administração crônica da agonista de PKC ϵ induz hipernociceção persistente. A administração intraplantar do agonista de PKC ϵ , $\psi\epsilon$ RACK, (3 U/pata/50 μ L) foi realizada em dias alternados indicados pelas linhas pontilhadas verticais (painel A). O limiar nociceptivo basal dos animais apresentou-se alterado no 3^o dia de tratamento retornando aos valores controle (grupo salina) por volta do 7^o dia de pós-tratamento (painel A). A administração intraplantar do agonista de PKC ϵ , $\psi\epsilon$ RACK, (3 U/pata/50 μ L) foi realizada em regime diário e o limiar nociceptivo basal dos animais apresentou-se alterado a partir do 2^o dia de tratamento permanecendo similar ao apresentado pelo grupo PGE₂ durante todo o período de pós-tratamento avaliado (21 dias) (painel B). O teste nociceptivo foi realizado diariamente antes da administração do estímulo durante todos os dias de tratamento e 21 dias após o término do regime de tratamento. Os dados representam médias \pm epm de grupos de 4 - 6 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo PGE₂, $p < 0,05$ (two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

Antinociceção induzida pelo tratamento com oligodeoxinucleotídeo (ODN), seqüência antisense, para canais Na_v1.8 durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente:

Nesta etapa de nossos estudos foi investigada a influência dos canais Na_v1.8 para a instalação da hipernocicepção persistente induzida por PGE₂. Como discutido na introdução, o aumento na expressão destas proteínas é importante para a manutenção da HP. Além disso, estes canais são alvo de fosforilação por PKA e PKC, duas enzimas que se mostraram fundamentais para o processo de indução da HP em nosso estudo. Por outro lado, a inibição destes canais também induz antinocicepção e por um mecanismo distinto do mecanismo da dipirona, podendo assim acrescentar informações sobre o efeito da antinocicepção para a instalação da HP.

O tratamento com ODN antisense ou a seqüência controle para canais Na_v1.8 (20µg/10µL/intratecal) foi realizado por 4 dias consecutivos antes do início do tratamento com PGE₂ (100ng/50µL/pata) para indução da HP, garantindo assim que ao seu início a síntese deste canal de Na⁺ estivesse significativamente reduzida (Khasar e cols., 1998; Parada e cols., 2003; Villarreal e cols., 2005). A administração de ODNs *per se* não interferiu com o limiar nociceptivo mecânico dos animais. Em seguida, durante o período de indução da HP, foram realizados dois protocolos distintos. Inicialmente o ODN foi administrado num regime dia sim / dia não, ou seja, por 7 dias alternados durante os 14 dias de indução da HP (figuras 13A e 13B). A escolha do tratamento em dias alternados foi para evitar possíveis lesões espinais devido às repetidas injeções intratecais. Durante todo o período de tratamento o limiar nociceptivo basal dos animais manteve-se diferente do grupo PGE₂, no

entanto, ao término do tratamento tornou-se hipernociceptivo e não diferente do grupo controle indicando que a hipernocicepção persistente foi instalada (figura 13A). Ainda, ocorreu antinocicepção durante o período de tratamento com ODN até o 12º dia, a partir daí (13º e 14º dias) os animais apresentaram hipernocicepção mecânica similar ao grupo PGE₂ (figura 13B), sugerindo que o tratamento com ODN em dias alternados não foi suficiente para inibir por todo o período a expressão dos canais Na_v1.8. Em seguida, procedeu-se um segundo regime de tratamento com ODN, em grupo experimental independente, o protocolo seguiu o mesmo tratamento de 4 dias antes do início das injeções de PGE₂, no entanto, os animais receberam mais 14 injeções intratecais de ODN (20µg/10µL/intratecal) (figura 13C e 13D). Os animais tratados apresentaram antinocicepção durante todo o período de indução da HP (figura 13D) indicando que o tratamento com ODN foi efetivo, porém, ao término do tratamento o limiar nociceptivo do grupo “antisense” tornou-se hipernociceptivo e não diferente do limiar nociceptivo dos grupos salina + PGE₂ ou seqüência controle + PGE₂ (figura 13C).

Para a realização destes protocolos experimentais o limiar nociceptivo dos animais foi avaliado diariamente antes (limiar basal, figuras 13A e 13C) e após as injeções de PGE₂ (figura 13B e 13D). É importante mencionar que o limiar nociceptivo dos animais foi medido antes e após o início do tratamento com os ODNs e não foi observada qualquer mudança no limiar nociceptivo dos animais que pudesse ser atribuída exclusivamente ao tratamento com os ODNs (dados não mostrados).

Os grupos que receberam tratamentos por via intratecal perfazendo um total de 18 dias (figura 13C) foram avaliados quanto à possibilidade de lesões espinais de três formas distintas: 1) análise visual: onde não foram detectadas alterações; 2)

coleta das medulas espinais para análise histopatológica: não sendo observados sinais de necrose tecidual ou inflamação (dados não mostrados); e por fim 3) análise da capacidade motora pelo teste de “rota rod” (figura 14): onde não houve diferença em relação ao grupo salina.

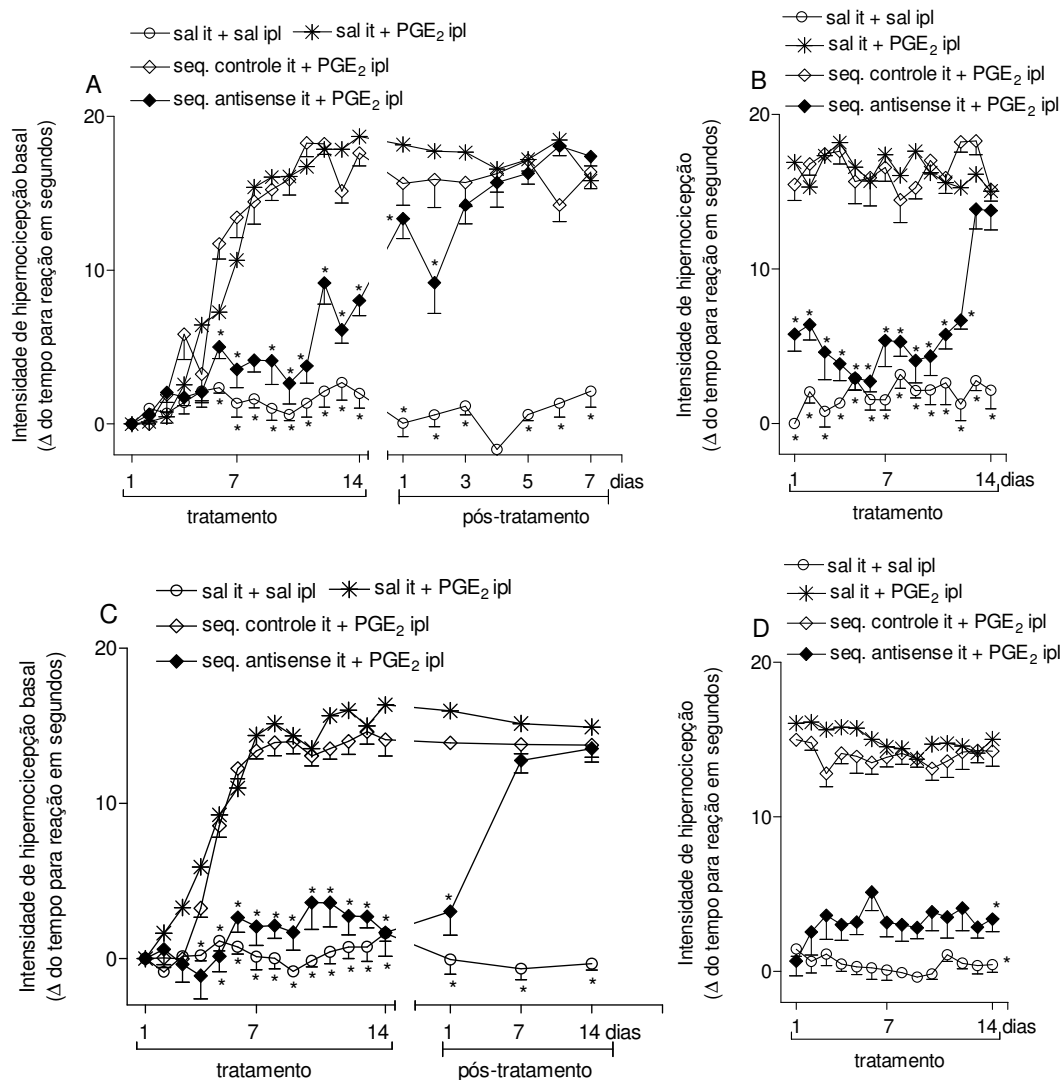


Figura 13. Antinociceção induzida pelo tratamento com ODN antisense para canais $Na_v1.8$ não previne a HP. A administração de ODN antisense para canais $Na_v1.8$ ($20\mu\text{g}/10\mu\text{L}/\text{intratecal}$), por 4 dias consecutivos antes do início do tratamento com PGE_2 ($100\text{ng}/50\mu\text{L}/\text{pata}$) e por mais 7 dias alternados (painel A) ou 14 dias consecutivos (painel C) durante todo o período de indução da HP, embora tenha inibido as alterações no limiar nociceptivo basal dos animais durante o período de indução da HP, não foi capaz de inibir a instalação da mesma (painéis A e C). O tratamento com ODN por 7 dias alternados foi eficaz em inibir a hipernocicepção da PGE_2 até o 12º dia de tratamento (painel B) e o tratamento por 14 dias consecutivos foi efetivo em prevenir a hipernocicepção diária induzida por PGE_2 (painel D). O teste nociceptivo foi realizado diariamente antes (limiar basal, painéis A e C) e após (painéis B e D) as injeções durante o período de tratamento e uma vez ao dia durante o período de pós-tratamento (7 dias para painel A e 14 dias para painel C). Os dados representam médias \pm epm de grupos de 4 - 6 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina + PGE_2 ou seqüência controle + PGE_2 , onde $p < 0,05$ (two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

Análise da capacidade motora dos animais que receberam tratamento por via intratecal durante 18 dias:

Para a análise da resposta dos animais foi utilizado como controle positivo o diazepam. A administração de diazepam (30 mg/Kg/100 μ L/intraperitoneal) diminuiu o tempo de permanência dos animais no aparelho de rota rod quando comparado ao grupo salina (100 μ L/intraperitoneal) (figura 14). Os tratamentos por via intratecal (salina 10 μ L, seqüência controle ou seqüência antisense de ODNs para Na_v1.8 20 μ g/10 μ L/animal) não interferiram significativamente com a capacidade locomotora dos animais quando comparada ao grupo que recebeu salina (figura 14). Todos os 3 grupos que receberam tratamento por via intratecal também receberam tratamento com PGE₂ nas patas (figura 13C-D). O teste foi realizado no primeiro dia de pós-tratamento.

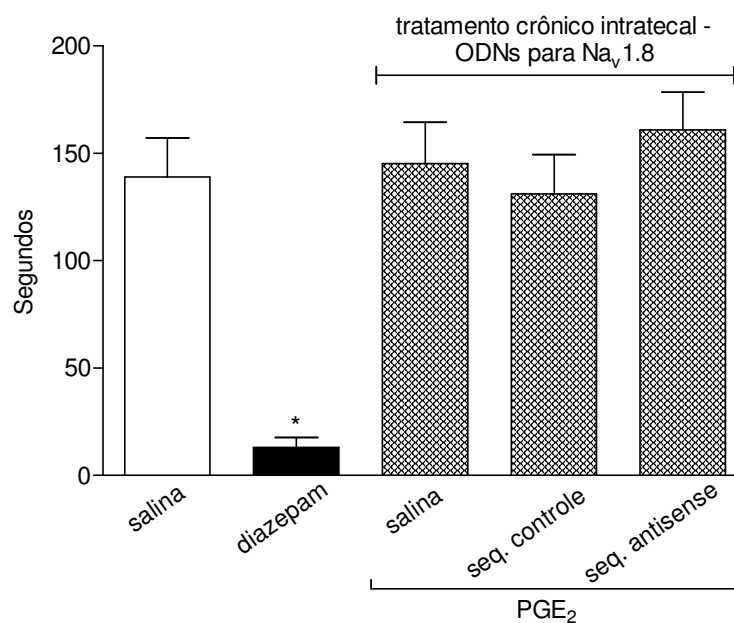


Figura 14. Injeções intratecais de ODNs para $Na_v1.8$ durante 18 dias não interferem com a capacidade locomotora dos animais. Os animais receberam os tratamentos por via intratecal com salina ($10\mu\text{L}$), e ODNs seqüência controle ($20\mu\text{g}/10\mu\text{L}$) ou seqüência antisense ($20\mu\text{g}/10\mu\text{L}$) para $Na_v1.8$ durante 18 dias. No primeiro dia após o término do tratamento foram submetidos a sessões para avaliação da capacidade motora. Para a realização do teste foram incorporados dois grupos: salina ($100\mu\text{L}/\text{ip}$) ou diazepam ($30\text{ mg}/\text{Kg}/100\mu\text{L}/\text{ip}$). O teste foi realizado 20 minutos após as injeções de salina ou diazepam. Os dados representam médias \pm epm de grupos de 5 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina, $p < 0,05$ (one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

A administração de anticorpos anti-NGF durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente:

Evidências da literatura sugerem que a neurotrofina NGF é responsável por regular a expressão dos canais $\text{Na}_v1.8$ presentes em neurônios sensoriais em condições basais e durante a inflamação. Por isso investigamos se o NGF possuiria alguma participação na instalação da HP utilizando como ferramenta a administração de anticorpos anti-NGF (αNGF). Os tratamentos foram realizados localmente, por via intraplantar (50 μL) ou por via intratecal (10 μL) na tentativa de inibir o efeito do NGF se este estivesse sendo liberado nos tecidos periférico ou central / gânglios das raízes dorsais. A dose de αNGF escolhida para a administração intraplantar baseou-se em curva dose-resposta realizada previamente no laboratório (dados não publicados) onde foi avaliada sua capacidade de inibir a hipernocicepção mecânica induzida pela própria neurotrofina administrada também i.pl. (figura 15A). Os pré-tratamentos 15 minutos antes com ambas as doses (50 μL /pata ou 10 μL /intratecal) não inibiram a hipernocicepção aguda induzida por PGE_2 (100ng/50 μL /pata) quando avaliada 3h após sua administração (figura 15A ou 15C). Os pré-tratamentos diários com os anticorpos anti-NGF iniciaram-se quando os primeiros sinais de alterações no limiar nociceptivo basal dos animais foram detectados, ou seja, no 4º dia de tratamento com PGE_2 (figuras 15B e 15D). Os tratamentos, mesmas doses e tempos, por via intraplantar (figura 15B) ou por via intratecal (figura 15D), embora tenham interferido com o limiar nociceptivo basal dos animais durante alguns dias do período de instalação, não preveniram a instalação do quadro de HP avaliado durante 14 dias no período de pós-tratamento.

Para os grupos experimentais que receberam tratamento crônico por via intratecal além da análise visual dos animais que se mostraram sem alterações, também foram colhidas as medulas espinais e realizada avaliação histopatológica onde não se observou sinais de inflamação ou necrose tecidual (dados não mostrados).

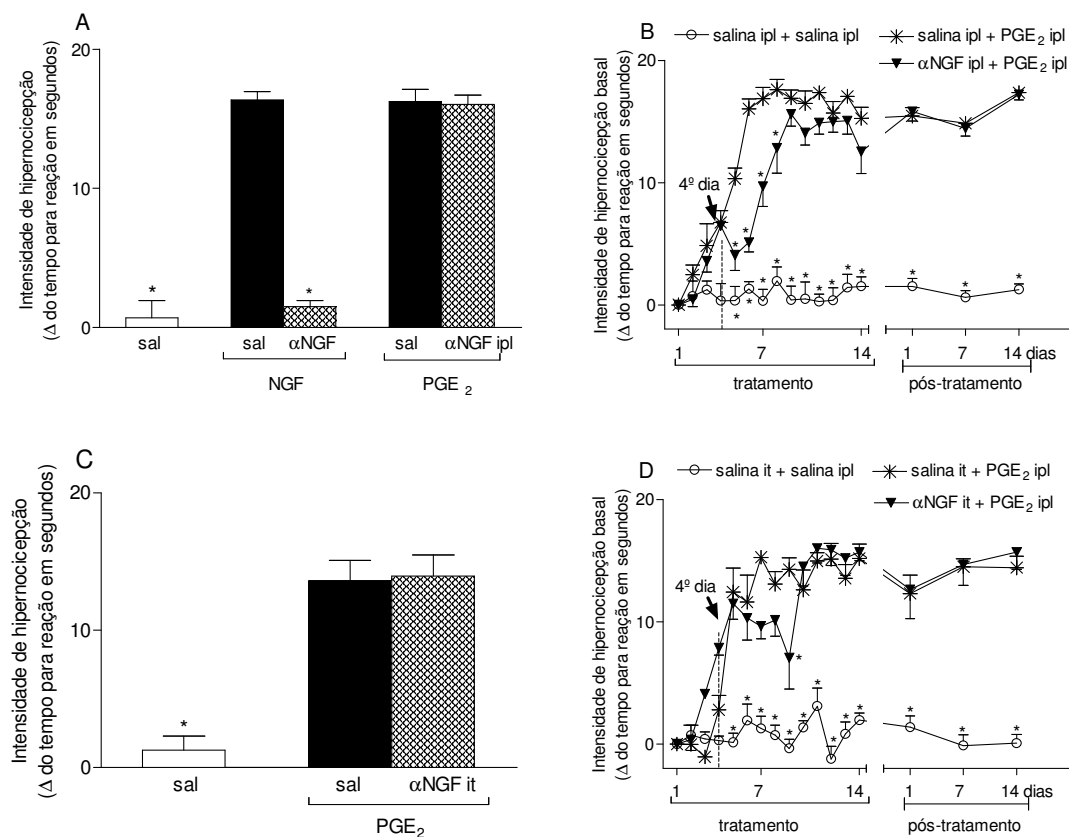


Figura 15. A administração de anticorpos anti-NGF durante o período de indução não previne a hipernocicepção persistente. O pré-tratamento 15 minutos antes com anticorpos anti-NGF (α NGF, 50 μ L/pata) inibe a hipernocicepção mecânica induzida por NGF mas não a induzida por PGE₂ (100ng/50 μ L/pata) (painel A). Também, o pré-tratamento 15 minutos antes com α NGF (10 μ L/intratecal) não inibe a hipernocicepção aguda induzida por PGE₂ (100ng/50 μ L/pata) (painel C). Os pré-tratamentos 15 minutos antes com α NGF (50 μ L/pata, painel B ou 10 μ L/intratecal, painel D) embora tenham alterado o limiar nociceptivo basal das patas dos animais durante alguns dias de tratamento, retardando as mudanças nos limiares nociceptivos, não preveniram a hipernocicepção persistente induzida por injeções diárias de PGE₂ (100ng/50 μ L/pata). O teste nociceptivo foi realizado antes e 3h após a administração do estímulo para os experimentos agudos (painéis A e C); e durante todos os dias de tratamento mais 14 dias após o término do regime de tratamento para os experimentos crônicos (painéis B e D). Os dados representam médias \pm epm de grupos de 4 - 6 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo PGE₂ (painéis B, C e D) ou quando comparado ao grupo NGF (painel A), $p < 0,05$ (one-way ANOVA para painéis A/C e two-way ANOVA para painéis B/D, seguidos do pós-teste de Bonferroni).

Tratamento com oligodeoxinucleotídeo (ODN), seqüência antisense, para CREB durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente:

Um dos substratos para PKA bem descrito na literatura e ligado ao processo de transcrição é o CREB. Também há descrições de que PKC ou ainda PKA e PKC em conjunto possam ativá-lo. Na tentativa de encontrar uma molécula chave que seja ativada por PKA ou PKC e seja importante para o processo de instalação da hipernocicepção persistente induzida por PGE₂, investigamos o possível papel fator de transcrição. Utilizamos como ferramenta o tratamento com ODNs (20µg/10µL/intratecal), seqüência antisense e seqüência controle, durante 4 dias iniciais dando início então ao protocolo de indução da HP (PGE₂,100ng/50µL/pata) e realizando a administração dos tratamentos durante 14 dias (figura 16). O protocolo de administração dos ODNs por 4 dias consecutivos, bem como da seqüência dos nucleotídeos foi previamente descrito por Ma e cols. (2003). O limiar nociceptivo dos animais foi avaliado diariamente antes (limiar basal, figura 16A) e após as injeções de PGE₂ (figura 16B).

A administração de ODNs *per si* não interferiu com o limiar nociceptivo mecânico dos animais. Durante o período de tratamento com a seqüência antisense para CREB o limiar nociceptivo basal dos animais manteve-se diferente do grupo PGE₂ (figura 16A), no entanto, por volta do 7º dia de pós-tratamento tornou-se hipernociceptivo e não diferente do grupo controle indicando que a hipernocicepção persistente foi instalada (figura 16A). Interessantemente, embora o limiar nociceptivo basal dos animais tenha se mantido igual ao limiar do grupo salina, a resposta dos

animais às injeções diárias de PGE₂ quando avaliada 3h após permaneceu idêntica ao grupo que recebeu a seqüência controle (figura 16B).

Os animais tratados por via intratecal (18 dias de tratamento, figura 17) foram avaliados quanto a possíveis lesões espinais de três maneiras: 1) análise visual: onde não foram detectadas alterações; 2) coleta das medulas espinais para análise histopatológica: não sendo observados sinais de necrose tecidual ou inflamação (dados não mostrados); e por fim 3) análise da capacidade motora pelo teste de “rota rod” (figura 17): onde não houve diferença em relação ao grupo salina.

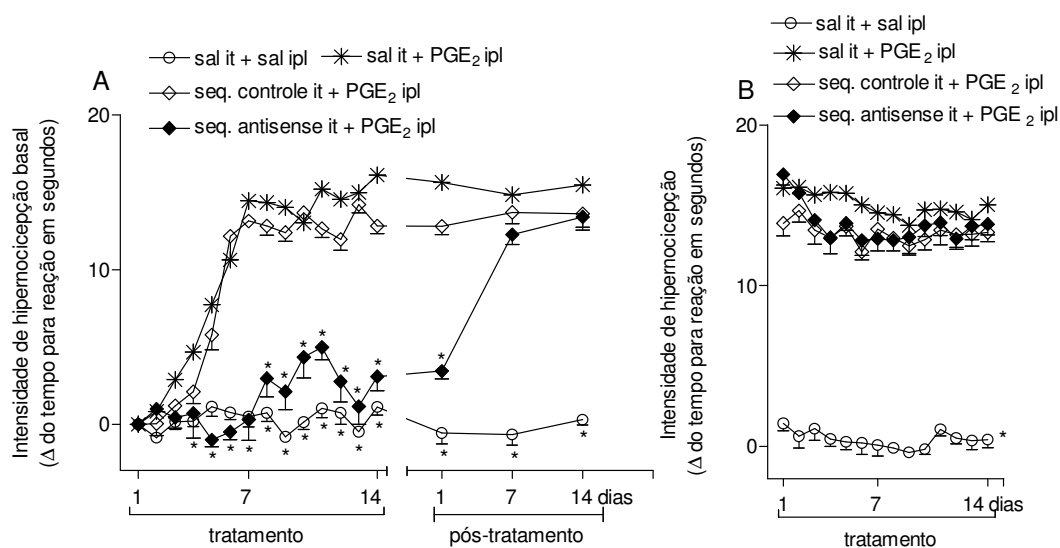


Figura 16. Tratamento com ODN, seqüência antisense, para CREB durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente. A administração de ODN antisense para CREB (20µg/10µL/intratecal), por 4 dias consecutivos antes do início do tratamento com PGE₂ (100ng/50µL/pata) e por mais 14 dias do período de indução da HP não induziu antinocicepção (painel B) nem preveniu a instalação da HP (painel A), mas foi capaz de inibir as alterações nos limiares nociceptivos basais dos animais durante o período de indução da HP (painel A). O teste nociceptivo foi realizado diariamente antes (limiar basal, painel A) e após (painel B) as injeções durante o período de tratamento e uma vez ao dia durante o período de pós-tratamento. Os dados representam médias ± epm de grupos de 4 - 6 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo PGE₂, onde p<0,05 (two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

Análise da capacidade motora dos animais que receberam tratamento por via intratecal durante 18 dias:

Para estes experimentos também foi utilizado como controle positivo o diazepam. A administração de diazepam (30 mg/Kg/100 μ L/intraperitoneal) diminuiu o tempo de permanência dos animais no aparelho de rota rod quando comparado ao grupo salina (100 μ L/intraperitoneal) (figura 17). Os tratamentos por via intratecal (salina 10 μ L, seqüência controle ou seqüência antisense de ODNs para CREB 20 μ g/10 μ L/animal) não interferiram significativamente com a capacidade locomotora dos animais quando comparada ao grupo que recebeu salina (figura 17). É importante reforçar que os três grupos que receberam tratamento por via intratecal também receberam tratamento com PGE₂ nas patas (figura 16). O teste foi realizado no primeiro dia de pós-tratamento.

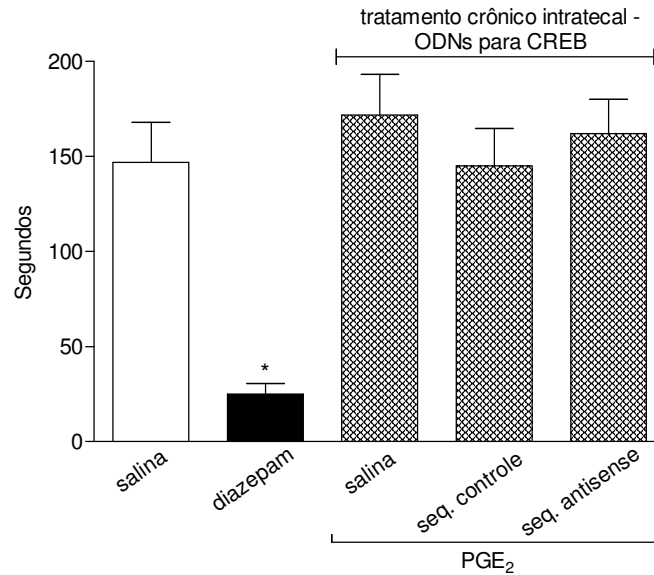


Figura 17. Injeções intratecais de ODNs para CREB durante 18 dias não interferem com a capacidade locomotora dos animais. Os animais receberam os tratamentos por via intratecal com salina (10 μ L), e ODNs seqüência controle (20 μ g/10 μ L) ou seqüência antisense (20 μ g/10 μ L) para CREB durante 18 dias. No primeiro dia após o término do tratamento foram submetidos a sessões para avaliação da capacidade motora. Para a realização do teste foram incorporados mais dois grupos: salina (100 μ L/ip) ou diazepam (30 mg/Kg/100 μ L/ip). O teste foi realizado 20 minutos após as injeções de salina ou diazepam. Os dados representam médias \pm epm de grupos de 5 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo salina, $p < 0,05$ (one-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni).

A administração de dexametasona durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente:

Para determinar se durante o processo de instalação da hipernocicepção persistente induzida por PGE₂ pode ocorrer liberação de citocinas ou ainda ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B utilizamos inicialmente como ferramenta o tratamento com o glicocorticóide dexametasona. O pré-tratamento 1 hora antes com dexametasona 25 μ g/50 μ L/pata ou 25 μ g/10 μ L/intratecal não previne a hipernocicepção aguda induzida por PGE₂ (100ng/50 μ L/pata) quando avaliada 3h após sua administração (figura 18A). As doses de dexametasona escolhidas para o estudo estão padronizadas para uso em nosso laboratório e são eficazes, por exemplo, em inibir a sensibilização dos nociceptores que é dependente da liberação de citocinas em patas de ratos, portanto são doses sabidamente com efeitos antiinflamatórios. Foram escolhidas as vias de administração locais intraplantar ou intratecal com o intuito de 1) abolir os efeitos indesejados que o tratamento sistêmico por 14 dias com glicocorticóides pode induzir; 2) estudar os mecanismos locais periféricos de indução da hipernocicepção persistente bem como 3) elucidar mudanças que ocorrem nos corpos celulares das aferências nociceptivas ou mesmo na medula espinal por meio da injeção intratecal de drogas. Os pré-tratamentos diários com a dexametasona, mesmas doses e tempos, por via intraplantar (figura 18B) ou por via intratecal (figura 18C) não preveniram as alterações no limiar nociceptivo basal dos animais durante o período de tratamento, nem a instalação da hipernocicepção persistente durante o período de pós-tratamento em que os animais foram avaliados (7 dias para o grupo que recebeu tratamento intraplantar – figura 18B e 14 dias para o grupo que recebeu tratamento intratecal – figura 18C). É

importante observar que não houve diferenças na hipernocicepção persistente avaliada por 7 ou 14 dias de pós-tratamento. O painel D ilustra uma pequena alteração de peso corporal dos animais que receberam tratamento com dexametasona por via intratecal comparado com os grupos PGE₂ e salina. Os animais tratados com dexametasona por via intraplantar apresentaram o mesmo perfil de resposta (dados não mostrados). Adicionalmente, foram colhidas as medulas espinais destes animais para avaliação histopatológica e não foi observada alteração tecidual (dados não mostrados).

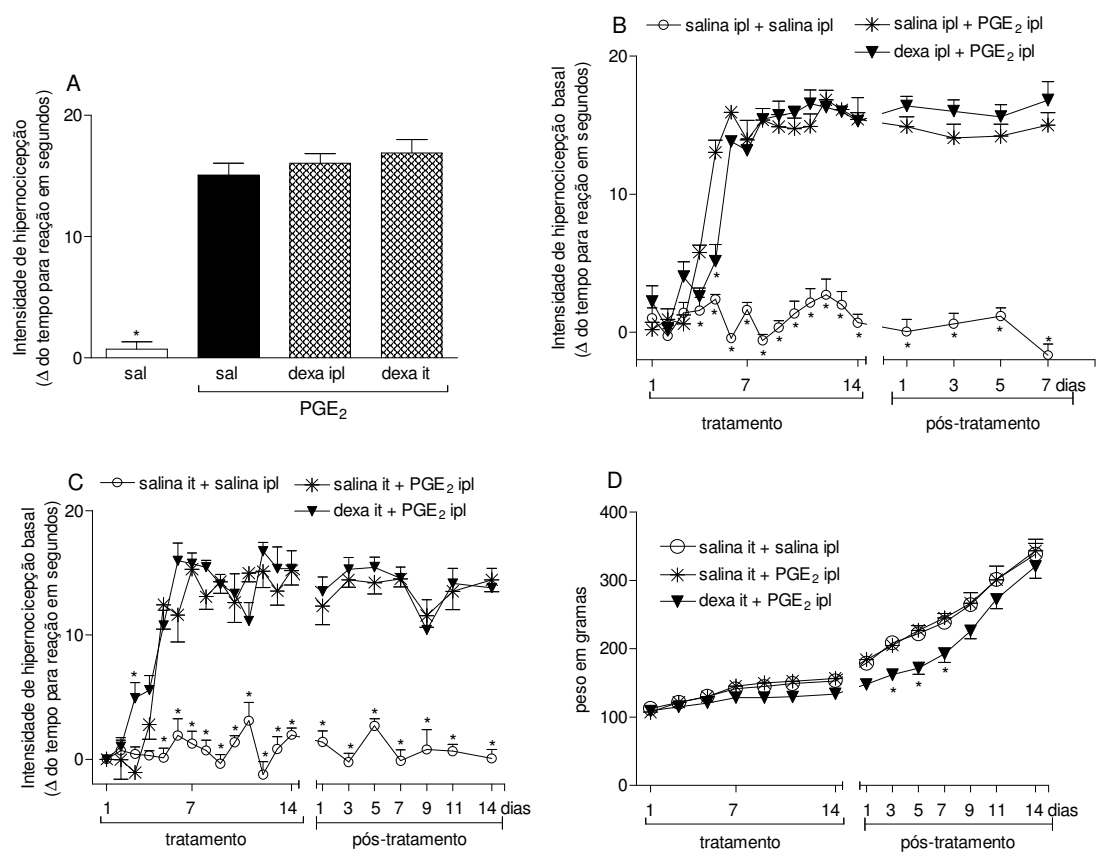


Figura 18. A administração de dexametasona durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente. O pré-tratamento 1 hora antes com dexametasona (25 μ g/50 μ L/pata ou 25 μ g/10 μ L/intratecal) não inibe a hipernocicepção aguda (painel A), a alteração do limiar nociceptivo basal das patas dos animais e a hipernocicepção persistente induzida por injeções diárias de PGE₂ (100ng/50 μ L/pata) (painel B – injeções por via intraplantar e painel C – injeções por via intratecal). O painel D ilustra o peso corporal dos animais que receberam dexametasona por via intratecal cronicamente comparado com o peso dos animais salina ou PGE₂. O teste nociceptivo foi realizado antes e 3h após a administração do estímulo (painel A); para os experimentos crônicos foi realizado diariamente antes da administração dos tratamentos durante todos os dias de tratamento e 7 dias (painel B) ou 14 dias (painéis C) após o término do regime de tratamento. O peso corporal dos animais foi registrado diariamente durante o período de tratamento e durante o período de pós-tratamento nos dias indicados. Os dados representam médias \pm epm de grupos de 4 - 6 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo PGE₂ (tratamento agudo para painel A e tratamento crônico para painéis B-D), $p < 0,05$ (one-way ANOVA para painel A e two-way ANOVA para painéis B-D, seguidos do pós-teste de Bonferroni).

A administração do inibidor de NF- κ B, PDTC, durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente:

Para determinar especificamente se o fator de transcrição NF- κ B é envolvido no processo de instalação da hipernocicepção persistente utilizamos o inibidor PDTC. O pré-tratamento 1 hora antes com PDTC 20 μ M/50 μ L/pata ou 200 μ M/10 μ L/intratecal não inibe a hipernocicepção aguda induzida por PGE₂ (100ng/50 μ L/pata) quando avaliada 3h após sua administração (figura 19A). As doses escolhidas para o estudo com PDTC são descritas como efetivas em inibir os efeitos de mediadores inflamatórios que por sua vez são dependentes da ativação de NF- κ B (Lee e cols., 2004; Duarte, DB - Tese, 2007). Os motivos pelos quais foram escolhidas as vias de administração locais intraplantar e intratecal foram os mesmos daqueles descritos para dexametasona. O pré-tratamento diário com PDTC não preveniu a alteração do limiar nociceptivo basal dos animais, com as mesmas doses e tempos, por via intraplantar (figura 19B) ou por via intratecal (figura 19C), durante o período de tratamento, nem a instalação da hipernocicepção persistente durante o período de pós-tratamento em que os animais foram avaliados (7 dias para o grupo que recebeu tratamento intraplantar – figura 19B e 14 dias para o grupo que recebeu tratamento intratecal – figura 19C). Não houve diferenças na hipernocicepção persistente avaliada por 7 ou 14 dias de pós-tratamento. Comparado com os grupos PGE₂ e salina o grupo tratado com PDTC por via intratecal não apresentou alteração de peso corporal (figura 19D). O tratamento por via intraplantar demonstrou o mesmo perfil de resposta (dados não mostrados). Assim como realizado para o grupo tratado com dexametasona, as medulas espinais

destes animais foram colhidas para avaliação histopatológica e não foi detectada alteração tecidual (dados não mostrados).

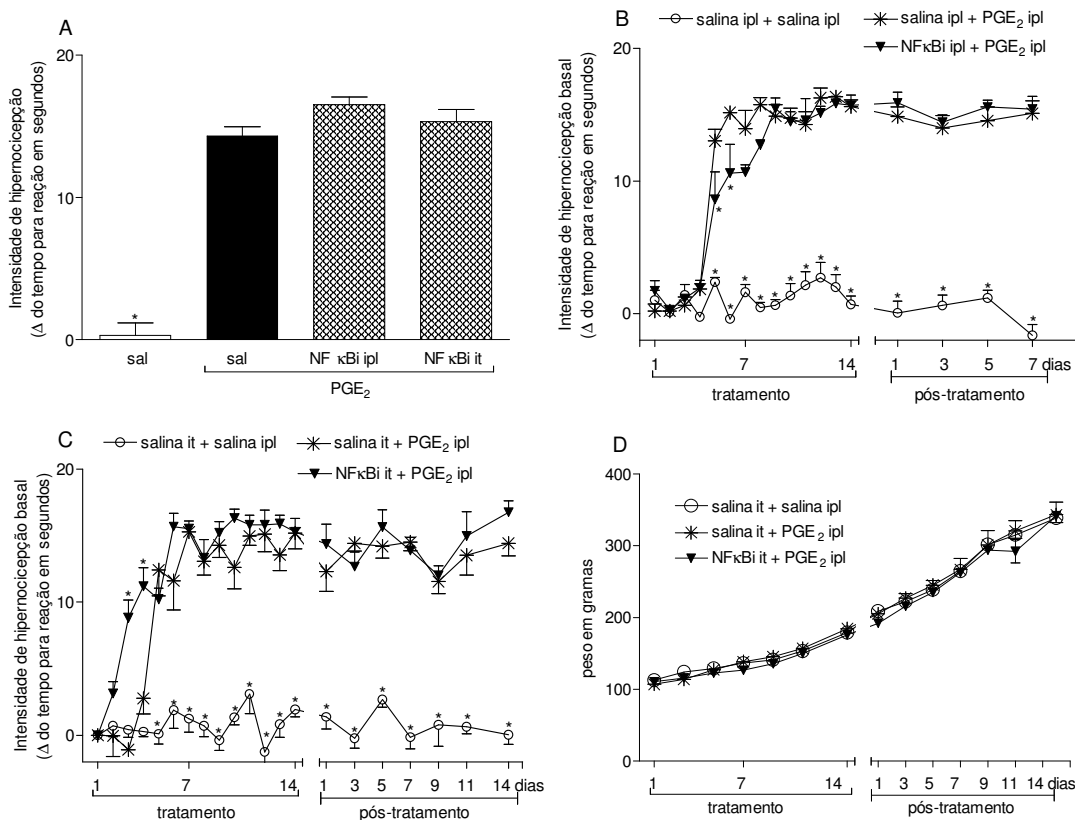


Figura 19. A administração do inibidor de NF- κ B, PDTC, durante o período de indução não previne a instalação da hipernocicepção persistente. O pré-tratamento 1 hora antes com PDTC (20 μ M/50 μ L/pata ou 200 μ M/10 μ L/intratecal) não inibe a hipernocicepção aguda (painel A), a alteração do limiar nociceptivo basal das patas dos animais e a hipernocicepção persistente induzida por injeções diárias de PGE₂ (100ng/50 μ L/pata) (painel B – injeções por via intraplantar e painel C – injeções por via intratecal). O painel D ilustra o peso corporal dos animais que receberam PDTC por via intratecal cronicamente comparado com o peso dos animais salina ou PGE₂. O teste nociceptivo foi realizado antes e 3h após a administração do estímulo (painel A); para os experimentos crônicos foi realizado diariamente antes da administração dos tratamentos durante todos os dias de tratamento e 7 dias (painel B) ou 14 dias (painéis C) após o término do regime de tratamento. O peso corporal dos animais foi registrado diariamente durante o período de tratamento e durante o período de pós-tratamento nos dias indicados. Os dados representam médias \pm epm de grupos de 4 - 6 animais, * indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo PGE₂, $p < 0,05$ (one-way ANOVA para painel A e two-way ANOVA para painéis B-D, seguidos do pós-teste de Bonferroni).

2.3 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram investigados os mecanismos envolvidos no processo de cronificação ou indução da persistência de uma condição de sensibilização mecânica dos nociceptores induzida por 14 injeções diárias e consecutivas do mediador inflamatório PGE₂.

Os experimentos iniciais deste trabalho foram para reproduzir o modelo de hipernocicepção persistente previamente descrito pelo grupo (Ferreira e cols., 1990). A administração diária de PGE₂ induz hipernocicepção mecânica também diariamente, medida na 3^a hora após sua administração. A hipernocicepção aguda induzida por PGE₂ é completamente resolvida 24 horas após sua administração, porém, estes eventos diários de hipernocicepção tornam-se indiscrimináveis ao longo do tempo, pois o limiar nociceptivo basal dos animais – avaliado aproximadamente 24 horas após cada injeção - torna-se alterado, tendendo a hipernociceptivo por volta do 4^o-6^o dias de tratamento. A partir das primeiras alterações no limiar nociceptivo basal dos animais progressivamente ocorre evolução para uma condição que ao término do regime de tratamento não difere, quantitativamente, da observada após 3h da administração de PGE₂. As alterações no limiar nociceptivo basal dos animais, representadas graficamente neste estudo como “intensidade de hipernocicepção basal” são interpretadas como indicativas de alterações plásticas nos neurônios sensitivos (os nociceptores) e fornecerão importante indicador, utilizado em todo o estudo, do efeito dos tratamentos aqui propostos. Para alguns tratamentos apenas está indicado o efeito agudo sobre a hipernocicepção também aguda da PGE₂ em gráficos de barras, seguidos pela representação gráfica dos limiares nociceptivos basais diários dos animais durante todo o período do protocolo de indução e avaliação da hipernocicepção persistente

(p. ex. figura 4). Quando se considerou relevante para o estudo a visualização do efeito do tratamento diário na 3ª hora após a PGE₂, este foi representado graficamente em linhas como “intensidade de hipernocicepção” (p. ex. figura 3). Para facilitar o entendimento do período de instalação da hipernocicepção persistente, a figura 2 que o caracteriza apresenta tanto a “intensidade de hipernocicepção basal” quanto a “intensidade de hipernocicepção” diárias.

Dando início à investigação dos mecanismos envolvidos na instalação da hipernocicepção persistente induzida por PGE₂, abordamos uma importante questão que envolve o tratamento da dor - seu alívio e controle. Esta abordagem é relevante não apenas quanto à qualidade de vida do indivíduo que sofre de dor no momento em que esta é presente, mas também no sentido de prevenção de sua cronificação. Baseados nestas informações investigamos se a hipernocicepção persistente pode ser instalada em casos onde não há nocicepção ou hipernocicepção, porém, o mediador que induz a sensibilização (PGE₂) continue atuando no tecido. Esta informação é importante porque responde a pergunta se a instalação do quadro persistente é dependente da presença de hipernocicepção ou nocicepção.

Para testar esta hipótese administramos dipirona durante todo o período de indução da hipernocicepção persistente. A dipirona é um derivado das pirazonas e classificada como uma droga antiinflamatória não-esteroidal (Brunton e cols., 2006), estas por sua vez, possuem como principal mecanismo de ação a inibição da síntese de prostaglandinas (Vane, 1971). No entanto, além da capacidade de inibir as enzimas COX (Chandrasekharan e cols., 2002; Hinz e cols., 2007) estudos envolvendo diferentes vias de administração e modelos experimentais sugerem que os efeitos antinociceptivos da dipirona podem ser independentes da ação antiinflamatória (Lorenzetti & Ferreira, 1985; Duarte e cols., 1992; Beirith e cols.,

1998; Alves & Duarte, 2002; Vanegas & Tortorici, 2002; Sachs e cols., 2004; Siebel e cols., 2004). Este analgésico não só é efetivo durante a sensibilização mecânica aguda induzida pela PGE_2 – o que sugere o efeito independente da inibição da COX – mas também em induzir antinocicepção quando a hipernocicepção persistente está instalada levando ao quadro quiescente mencionado na seção 1 INTRODUÇÃO (Lorenzetti & Ferreira, 1985; Ferreira e cols., 1990; Sachs e cols., 2004). Durante estes efeitos locais, seu mecanismo de ação molecular parece ser a ativação de uma via de sinalização que envolve a síntese de óxido nítrico, aumento nos níveis de GMPc culminando com a fosforilação, via PKG, de canais K^+_{ATP} (Lorenzetti & Ferreira, 1985; Duarte e cols., 1992; Alves & Duarte, 2002; Sachs e cols., 2004). Este mecanismo é proposto contrabalançar o mecanismo de indução da sensibilização nos nociceptores que envolve o aumento dos níveis de AMPc (Ferreira e Nakamura, 1979a; Cunha e cols., 1999) Em nosso estudo, a administração diária de dipirona não foi suficiente para prevenir que o limiar nociceptivo basal dos animais se alterasse para hipernociceptivo ao longo do tratamento e que a hipernocicepção persistente fosse instalada. O possível contrabalanço nos mecanismos moleculares de sensibilização dos nociceptores e a conseqüente antinocicepção diária induzidos por dipirona não foram, portanto, suficientes para prevenir a instalação da hipernocicepção persistente induzida por PGE_2 .

Nossos estudos subseqüentes investigaram possíveis alvos na via de sinalização da PGE_2 cuja ativação possa ser relevante para a instalação do quadro persistente.

Inicialmente avaliamos a importância da ativação de receptores EP para a instalação do processo. Nosso objetivo foi a realização de um controle para verificar

se a instalação da hipernocicepção persistente induzida pela PGE₂ é dependente da ativação de seus receptores. Utilizamos o recurso de drogas antagonistas de receptores EP cujas curvas dose-resposta e temporais sobre a hipernocicepção aguda da PGE₂ foram previamente estudadas (Rodrigues, MA, Dissertação, 2007). Observamos que uma única injeção dos antagonistas de receptores EP2/1 ou EP4 ou ainda sua associação previne significativamente a hipernocicepção aguda induzida por PGE₂. A administração diária, durante todo o período de indução, de um ou outro antagonista não previne a alteração do limiar nociceptivo basal dos animais nem a instalação da hipernocicepção persistente. Visto que o tratamento com um ou outro antagonista é capaz de prevenir a hipernocicepção aguda induzida pela administração de PGE₂, mas não a instalação da hipernocicepção persistente, estes dados reforçam que a antinocicepção não é suficiente para prevenir a instalação da hipernocicepção persistente. Ainda, embora a inibição de um ou dois receptores para a PGE₂ seja capaz de prevenir o comportamento hipernociceptivo o mesmo não ocorre para os efeitos de sensibilização em longo prazo. Procedemos então o tratamento concomitante com os dois antagonistas e observamos que houve retardo na alteração do limiar basal dos animais, sendo que este permaneceu hipernociceptivo por determinado período de pós-tratamento tendendo a decair a partir de 7 dias de pós-tratamento. Embora o tratamento não tenha prevenido totalmente algum tipo de alteração temporária no limiar nociceptivo dos animais, este dado nos permite sugerir que é necessária a ativação de pelo menos 3 dos receptores de PGE₂: EP1, EP2 e EP4 pela PGE₂ durante o período de instalação da hipernocicepção persistente. Corroborando nossos dados, Southall e Vasko (2001) observaram em estudos *in vitro* que a inibição da ativação de um único receptor para PGE₂ - EP1 ou EP2 ou EP3 ou EP4 - em GRDs não é suficiente para inibir o

aumento nos níveis de AMPc induzido pela PGE₂, neste caso foi necessária a inibição concomitante de receptores EP3C e EP4. Além disso, Lin e cols. (2006) encontraram que durante a inflamação crônica ocorre aumento na expressão apenas de EP4 e o tratamento com o correspondente antagonista seletivo AH 23848 atenua significativamente a sensibilização térmica e mecânica que acompanha o processo. Assim, é provável que durante a indução da hipernocicepção persistente mecanismos adicionais aos mecanismos que ocorrem agudamente sejam recrutados, p. ex. o aumento no número de receptores; isto poderia influenciar a ação da droga antagonista. Ainda, é necessário considerar que a PGE₂ possa atuar em receptores IP, estes são presentes nos nociceptores e parecem também estarem envolvidos nos efeitos de sensibilização da PGE₂ (Smith e cols., 1998; Moriyama e cols., 2005). De qualquer forma, a partir de nossos dados pode-se inferir que a instalação da hipernocicepção persistente induzida por PGE₂ é um fenômeno dependente da ativação de receptores EP e não o resultado de uma ação não específica deste eicosanóide.

Receptores EP2, EP3 e EP4 são acoplados a AC e sua ativação pode, portanto, aumentar os níveis neuronais de AMPc (Regan e cols., 1994; Sugimoto e cols., 1992; Honda e cols., 1993; para revisão Coleman e cols., 1994; Southall e Vasko, 2001). Este por sua vez é bem caracterizado como um importante segundo mensageiro envolvido no processo de sensibilização dos nociceptores (Ferreira & Nakamura, 1979a; Taiwo e cols., 1989; Taiwo e Levine, 1991; Cunha e cols., 1990; England e cols., 1996). A inibição da AC e do provável aumento nos níveis de AMPc bloqueou, em nosso estudo, a hipernocicepção aguda induzida por PGE₂, fato que já era esperado e que pode ser considerado um controle de que a droga inibidora apresentou o efeito esperado. Também preveniu as mudanças nos limiares

nociceptivos dos animais e a instalação da hipernocicepção persistente. Nossos dados acrescentam a idéia de que o AMPc possa ser um segundo mensageiro não apenas relacionado com a sensibilização aguda mas também ter um papel adicional como modulador da plasticidade dos nociceptores em longo prazo.

Como parte do mecanismo molecular proposto para a indução da sensibilização dos nociceptores pela PGE₂ é também descrita a ativação de PKA e PKC, estas por sua vez possuem a habilidade de fosforilar os canais Na_v1.8, aumentando a correntes de sódio (England e cols., 1996; Gold e cols., 1998; Fitzgerald e cols., 1999; Lai e cols., 2004, para revisão Cantrell & Catterall, 2001). Este mecanismo neuromodulatório é considerado como uma forma de plasticidade celular visto que modifica a relação entre entrada e saída da informação em todo o neurônio (Cantrell & Catterall, 2001). De fato há evidências de que PKA e PKC possuam papel importante na modulação da plasticidade neuronal bem como de processos envolvidos em dores crônicas e em alguns casos as duas enzimas parecem agir em conjunto para exercer estas ações (Aley & Levine, 1999; Aley e cols., 2000; Parada e cols., 2003; Parada e cols., 2005; Joseph e cols., 2007; Van Kolen e cols., 2008; Cantrell & Catterall, 2001; Hiruma e cols., 2000).

Em nosso estudo, a inibição concomitante ou não destas duas proteinoquinases previne a hipernocicepção aguda induzida por PGE₂. Estudos prévios realizados em nosso laboratório sugerem fortemente que tanto PKA quanto PKCε são ativadas por PGE₂ durante a sensibilização aguda dos nociceptores visto que a administração de seus inibidores previne totalmente este efeito da PGE₂ (Sachs e cols, comunicação pessoal; Rodrigues, MA, Dissertação, 2007). Portanto, seu efeito agudo por nós observado pode ser também considerado o controle de que as drogas utilizadas apresentaram a ação pretendida com sua administração. Sua

inibição, também concomitante ou não, durante todo o período de indução previne as alterações nos limiares nociceptivos basais e a instalação da hipernocicepção persistente. É relevante mencionar que os animais tratados com o inibidor de PKA AKAP mais o peptídeo inibidor de PKC ϵ apresentaram antinocicepção diária (dados não mostrados) reforçando que estes inibidores mantiveram seu efeito até o final do período de indução da hipernocicepção persistente.

Ao término do tratamento (7^o dia do período de pós-tratamento) as patas dos animais deste mesmo grupo foram “desafiadas” com uma dose 10 vezes mais baixa do que a dose convencionalmente utilizada de PGE₂ e observamos que, embora os animais não apresentassem hipernocicepção de intensidade igual aos animais com hipernocicepção persistente, também apresentaram limiar nociceptivo diferente dos animais naive (dados não mostrados). Então, apesar de os sucessivos tratamentos com os inibidores de PKA e/ou PKC ϵ prevenirem a instalação da hipernocicepção persistente, algum tipo de sensibilização leve e residual parece ter ocorrido. Seus mecanismos causais podem ser inúmeros, desde a ativação de outras moléculas também relevantes para o processo nos nociceptores até relativos aos inibidores utilizados. As doses dos inibidores utilizadas foram escolhidas com base em seu efeito inibitório sobre a hipernocicepção aguda induzida por PGE₂, no entanto, a instalação da hipernocicepção persistente parece ser um processo diverso onde mecanismos adicionais sejam recrutados. Neste caso aumentar a dose dos inibidores utilizados talvez fosse suficiente para se impedir a presença daquela sensibilização aparentemente residual. Também se pode elaborar a hipótese que o efeito alcançado com os inibidores seja o máximo possível para o sistema utilizado neste estudo e por isso aumentar a dose não impediria a presença de tal sensibilização.

Para dar suporte aos estudos com as proteinoquinases A e C foram utilizados quatro inibidores distintos e descritos como tendo mecanismos de ação diversos. Os peptídeos inibidores de PKA (AKAP) ou de PKC ϵ (PKC ϵ i) foram desenvolvidos a partir de fragmentos das próprias proteinoquinases (Vijayaraghavan e cols., 1997; Johnson e cols., 1996). O princípio baseia-se no fato de que estas enzimas são ancoradas de maneira compartimentalizada por proteínas específicas no espaço intracelular. PKA é ancorada por proteínas denominadas AKAPs (A-kinase Anchoring Proteins)(Vijayaraghavan e cols., 1997). Peptídeos contendo o domínio de ligação da PKA à AKAP competem com a enzima pelo sítio de ligação (em AKAP) inibindo-a (Vijayaraghavan e cols., 1997). Da mesma forma, as PKCs são ancoradas no meio intracelular por proteínas denominadas RACKs (Receptor for Activated Protein Kinase C)(Johnson e cols., 1996; para revisão Van Kolen e cols., 2008). Dependendo da isoforma, as proteinoquinases C possuem diferentes sítios de ligação às RACKs o que faz com que sua localização intracelular seja dependente do subtipo de PKC e permite então sua inibição seletiva (Johnson e cols., 1996). O peptídeo inibidor é uma seqüência da PKC ϵ que se liga à RACK inibindo assim a PKC ϵ endógena ativada de ligar-se, desta forma a PKC ϵ endógena não exerce seus efeitos (Johnson e cols., 1996). Estes peptídeos inibidores têm sido utilizados em estudos utilizando diferentes sistemas (Johnson e cols., 1996; Vijayaraghavan e cols., 1997; Dorn e cols., 1999; Khasar e cols., 1999; Mochly-Rosen e cols., 2000; Dina e cols., 2001; Aley e cols., 2001; Rathee e cols., 2002; Zhou e cols., 2002; Parada e cols., 2005; Joseph e cols., 2007; Sachs e cols., comunicação pessoal; Rodrigues, MA, Dissertação, 2007). H-89 é um inibidor de PKA que compete com a enzima pelo ATP e sua ação tem sido descrita por inibir os efeitos de substâncias pró-inflamatórias bem como os efeitos da PGE₂ *in vivo* e *in*

vitro (Chijiwa e cols., 1990; Hiruma e cols., 2000; Sachs, D, Tese, 2004; Li e cols., 2004; Chen e cols., 2007). A staurosporina é um alcalóide bacteriano (*Streptomyces* sp) inicialmente descrito como tendo atividade inibitória sobre as isoformas de PKC da subclasse “convencional” que por sua vez são dependentes de Ca^{++} intracelular e DAG (Tamaoki e cols., 1986; Van Kolen e cols., 2008). No entanto, a $PKC\epsilon$ é classificada como “nova” cuja principal característica é ser independente de Ca^{++} e em nossos estudos foi detectado efeito para a staurosporina o que pode sugerir a importância de outra PKC que não a ϵ . A seletividade da staurosporina para as PKCs da subclasse dependente de Ca^{++} é discutível, pois estudos utilizando neurônios sensoriais em cultura e sistemas de sinalização em que ocorre ativação de PKCs independentemente de aumento nos níveis de Ca^{++} intracelular têm detectado efeito para a staurosporina (Obreja e cols., 2002). Além disso, tem sido descrito que staurosporina apresenta um amplo espectro de ação, podendo inibir diferentes quinases, incluindo PKA (Merck Biosciences Home Page, 2008). De fato, em modelo de sensibilização dos nociceptores induzida por endotelina, a staurosporina apresenta melhores resultados do que um inibidor não seletivo de PKCs que compete pelo sítio de ligação de lipídios nas enzimas, o calfostin C, reforçando e sugerindo seu amplo espectro de ação (da Cunha e cols., 2004).

Confirmando o papel de PKA e $PKC\epsilon$ na hipernocicepção mecânica, administramos agudamente diferentes doses da subunidade catalítica da PKA e do agonista de PKC, $\psi\epsilon$ RACK. Para a escolha inicial das doses destes agonistas foi baseada em estudos prévios utilizando-os para caracterizar o papel de PKA e $PKC\epsilon$ na sensibilização que acompanha a inflamação em patas de ratos (Aley e Levine, 1999; Parada e cols., 2005; Joseph e cols., 2007). Observamos que ambas as drogas induzem hipernocicepção que não parece ser dose-dependente.

Surpreendentemente a administração da subunidade catalítica de PKA induz hipernocicepção que permanece por aproximadamente 15 dias enquanto que a maior dose do agonista de PKC ϵ induz hipernocicepção que permanece por cerca de 5 dias. Aley e Levine (1999) utilizando também a administração intraplantar da subunidade catalítica de PKA observaram que ocorre sensibilização das patas dos animais por mais de 24 horas se resolvendo 72 horas após. Além disso, a administração de um inibidor de PKA 24 horas após reduz significativamente a sensibilização induzida por PKA ϵ , sugerindo seu efeito prolongado (Aley e Levine, 1999). O passo seguinte foi proceder ao tratamento crônico com os ativadores destas proteoquinases como um recurso farmacológico para confirmar seu papel no processo de instalação da hipernocicepção persistente. A escolha das doses utilizadas para dar seguimento aos estudos foi discutida na seção 2.2 RESULTADOS e baseou-se na comparação com a intensidade de hipernocicepção induzida pela dose convencionalmente utilizada de PGE $_2$. Inicialmente optamos pela administração dia sim / dia não, pois seu efeito agudo é mais prolongado do que o efeito agudo da PGE $_2$. Observamos que embora tenha ocorrido algum tipo de sensibilização o processo se resolve ao longo do tempo. Portanto, este regime de tratamento não é suficiente para a instalação da hipernocicepção persistente. O segundo passo foi proceder à administração diária que se mostrou efetiva em induzir a instalação da hipernocicepção persistente, sugerindo a importância destas quinases para o processo de instalação da condição persistente. Ainda, adiciona mais uma informação que se complementa com os dados do estudo utilizando dipirona ou ODN para Na $_v$ 1.8 (discutido mais à frente): antinocicepção diária não é suficiente para prevenir enquanto a hipernocicepção diária também não é suficiente para induzir o quadro persistente. O que parece ser importante sim é a estimulação

por agentes pró-inflamatórios, consecutiva e bem delimitada no tempo de 14 dias, das aferências nociceptivas levando a alterações permanentes em seu fenótipo.

Estas drogas ativadoras de PKA ou PKC ϵ têm sido utilizadas por diferentes grupos de pesquisa (Sachs e cols., comunicação pessoal, dados em fase de publicação; Dorn e cols., 1999; Aley e Levine, 1999; Parada e cols., 2005; Joseph e cols., 2007). O peptídeo ativador de PKC ϵ foi desenvolvido com base na seqüência de ligação da PKC ϵ à sua RACK correspondente, RACK ϵ (Dorn e cols., 1999). A subunidade catalítica de PKA é essencialmente um excesso de PKA sem sua subunidade regulatória (Aley e Levine, 1999).

É importante mencionar ainda a observação de que uma única administração da subunidade catalítica de PKA induz sensibilização mecânica por um período mínimo de 7 dias após, resolvendo-se em 14 dias. E, a administração crônica no regime dia sim / dia não (7 dias de administração no total) induz sensibilização que se resolve completamente no 7^o dia após o término do tratamento (compare figuras 8A e 9A). Ou seja, 1 injeção foi mais eficaz do que 7 injeções. O importante é notar que, embora tenha ocorrido esta diferença de dias, ambas se resolvem. Ainda, Aley e Levine (1999) utilizando uma dose 5 vezes maior do que a utilizada em nosso estudo, observaram efeito duradouro para a droga, porém menor do que o observado neste estudo. Embora este cenário de dados seja complicado para análise e inferência, pode-se sugerir que houve diferença quanto à atividade da subunidade catalítica de PKA utilizada para cada experimento; para a realização de nossos estudos foram utilizados dois lotes diferentes, ambos provenientes de processos de importação distintos e os experimentos foram realizados com intervalos de dois anos aproximadamente.

Por fim, não parece haver diferença entre a ativação de PKA ou PKC ϵ para a instalação da hipernocicepção persistente, visto que sua inibição – concomitante ou não – e sua ativação não apresentaram diferenças em nossos estudos. Isto pode sugerir que as duas quinases estejam ligadas ao mesmo sistema de sinalização e, independente de como seja a arquitetura deste sistema, a inibição de uma das quinases é suficiente para colapsá-lo. A sensibilização mecânica aguda induzida por PGE₂ é dependente da ativação de PKA por AMPc e em seguida de PKC ϵ (Sachs e cols., comunicação pessoal, dados em fase de publicação). De acordo com nossos resultados seria plausível poder aplicar este modelo para a instalação da hipernocicepção persistente induzida por PGE₂. Por outro lado, Parada e cols. (2005) sugerem que o AMPc pode ativar tanto PKA quanto PKC ϵ em modelo de sensibilização inflamatória crônica. Neste mesmo modelo também foi observado que a fosfolipase C- β 3 pode ativar PKC ϵ e que tanto PKA quanto PKC ϵ são importantes para a manutenção da sensibilização dos nociceptores (Aley e Levine, 1999; Parada e cols., 2003). Como já mencionado, os receptores EP podem ser ligadas à AC mas também à fosfolipase C, que por sua vez leva à ativação de PKCs por gerar DAG. Sendo assim, ainda poderia ocorrer a ativação concomitante de PKA e de PKC induzida pela ativação de diferentes receptores EP (Moriyama e cols., 2005; Smith e cols., 1998; Kassuya e cols., 2007).

Um dos principais fatores que permitem que a hipernocicepção persistente mantenha-se após o término do tratamento diário com PGE₂ parece ser o aumento na expressão gênica de canais de sódio dependentes de voltagem resistentes à tetrodotoxina, Na_v1.8 (Villarreal e cols., 2005). De fato, a redistribuição ou aumento dos canais Na_v1.8 nos nociceptores tem sido associada à diferentes modelos experimentais de dor em roedores e humanos e sua inibição relacionada ao controle

das mesmas (Novakovic e cols., 1998; Porreca e cols., 1999; Coward e cols., 2000; Lai e cols., 2002; Bucknill e cols., 2002; Gold e cols., 2003; Sah e cols., 2003; Renton e cols., 2005; Warren e cols., 2008). Além disso, estes canais parecem ser presentes exclusivamente em neurônios sensoriais e são fundamentais para a expressão da sensibilização aguda induzida por diferentes mediadores ligados ao processamento doloroso incluindo-se PGE₂ (Akopian e cols., 1996; Gold e cols., 1996; England e cols., 1996; Gold e cols., 1998; Khasar e cols., 1998; Parada e cols., 2003; para revisão Cummins e cols., 2007). Uma das características destes canais é que eles possuem sítios para fosforilação pelas proteinoquinases A e C, que por sua vez podem ser ativadas por PGE₂, o que resulta em aumento da corrente de entrada de Na⁺ e, portanto aumento na excitabilidade celular (England e cols., 1996; Gold e cols., 1998; Lai e cols., 2004, Cantrell & Catterall, 2001). Nesta etapa de nosso estudo investigamos se um possível aumento na expressão gênica dos canais Na_v1.8 durante o período de instalação da hipernocicepção persistente poderia ser importante para a indução e manutenção da mesma após o término do regime de injeções com PGE₂. Seu papel na indução da hipernocicepção poderia se dar não só pelo aumento na quantidade desta proteína e o conseqüente aumento nas correntes de entrada de Na⁺, mas por ativar ou facilitar algum mecanismo intracelular importante para a persistência da sensibilização. Utilizamos a tecnologia de ODNs, seqüências antisense e controle, para inibir a síntese da proteína Na_v1.8, esta ferramenta foi descrita por Khasar e cols. (1998) e já utilizada em nosso laboratório para estudos sobre a manutenção da hipernocicepção persistente (Villarreal e cols., 2005). Os tratamentos com ODNs antisenses realizados em dois regimes diferentes – dias alternados ou dias consecutivos – durante o período de indução, inibiram significativamente as alterações nos limiares nociceptivos dos

animais, porém não preveniram a instalação da hipernocicepção persistente. Durante todo o período de tratamento também não foi possível detectar o efeito hipernociceptivo agudo da PGE₂, com exceção dos dois últimos dias durante o tratamento em dias alternados. Ainda, o tratamento com injeções repetidas não parece ter induzido comprometimento motor nos animais. Este dado pode servir como garantia de que os tratamentos com ODNs foram efetivos em inibir a expressão de Na_v1.8, visto que estão em congruência com dados da literatura (Khasar e cols., 1998). No entanto, para que os experimentos tenham maior credibilidade é necessário realizar controle analisando a expressão de RNAm ou da própria proteína Na_v1.8. Experimentos utilizando a técnica de *western blot* estão ainda em andamento na tentativa de padronizar os protocolos para a detecção de Na_v1.8. Até o momento não foi possível detectar quantidades significativas da proteína em amostras utilizando 50 µg de proteínas totais extraídas de GRDs (dados não mostrados). Warren e cols. (2008), também utilizando a técnica de *western blot*, detectaram a proteína e o aumento de sua expressão durante inflamação em polpa dental de humanos utilizando um protocolo que separa frações de membrana neuroniais exclusivamente. Mesmo assim, as quantidades de Na_v1.8 detectadas em tecido não inflamado foram muito discretas (Warren e cols., 2008). No momento as amostras de animais tratados com os ODNs encontram-se armazenadas para posterior continuação destes experimentos controles. Nossos dados desta última série de experimentos sugerem que o possível aumento da população de Na_v1.8 *per se* é apenas consequência da instalação da hipernocicepção persistente e não um fenômeno importante para sua instalação. O aumento nas quantidades de seu RNAm parece ser importante para a manutenção da hipernocicepção persistente como demonstrado por Villarreal e cols. (2005) provavelmente porque faz parte do

novo fenótipo induzido nos neurônios nociceptivos do qual é consequência e não causa.

Um importante regulador da expressão de canais $Na_v1.8$ descrito na literatura é o NGF (Dib-Hajj e cols., 1998; Gould e cols., 2000; Fjell e cols., 1999; Sah e cols., 2003). Esta neurotrofina também é responsável por manter a sobrevivência de neurônios sensoriais e simpáticos durante o desenvolvimento e *in vitro* (Sah e cols., 2003). A administração de NGF exógeno induz sensibilização dos nociceptores, além disso, durante o processo inflamatório e dores crônicas tem sido detectado aumento nos níveis desta neurotrofina e sua inibição melhora quadros de dor em roedores (para revisão Sah e cols., 2003 e Hefti e cols., 2006; Woolf e cols., 1997; Ro e cols., 1999; Gwak e cols., 2002; Banik e cols., 2005; Wild e cols., 2007). Tem sido proposto o desenvolvimento de drogas antagonistas de NGF como mais um recurso para o tratamento de dores crônicas (Hefti e cols., 2006). Ainda, a sensibilização dos nociceptores induzida pelo NGF exógeno parece não ser dependente da liberação de mediadores inflamatórios no tecido periférico, porém dependente de PKA e PKC sugerindo uma ação direta nos nociceptores (Funez e cols., dados não publicados). Neste caso, testamos a hipótese de que esta neurotrofina poderia modular a expressão do fenótipo de hipernocicepção persistente. Os tratamentos agudos com anticorpos para NGF, em doses que inibem o efeito do próprio NGF, por via intraplantar ou intratecal, não interferem com a hipernocicepção aguda induzida pela PGE_2 . Os tratamentos crônicos, por via intraplantar ou por via intratecal, iniciados no 4º dia de tratamento com PGE_2 - quando foram detectadas as primeiras alterações no limiar nociceptivo basal dos animais - apesar de induzirem pequenos retardos na progressão não preveniram a instalação da hipernocicepção persistente. Nossos dados indicam portanto que esta

neurotrofina parece não ser importante durante a instalação do quadro persistente. O fato de que em alguns dos 14 dias do protocolo de indução o limiar dos animais tratados apresentou-se significativamente diferente do controle (PGE_2) indica que é necessário ter cautela ao sugerir que o NGF não possua papel relevante neste modelo. Da mesma forma que para outras drogas utilizadas neste estudo, os efeitos dos anticorpos foram testados com base em estudos prévios conduzidos em nosso laboratório (Cunha e cols., 2003) e sobre o efeito do NGF exógeno em patas de ratos, por isso não se pode garantir que a dose dos anticorpos seja seguramente efetiva para causar efeito no modelo crônico por nós estudado.

A via de sinalização do AMPc-PKA pode também ativar fatores de transcrição como o CREB sendo importante para processos que envolvem plasticidade celular ou ainda em modelos de dor crônica (Richards e cols., 1996; Woolf e Costigan, 1999; Hoeger-Bement e Sluka, 2003; Ma e cols., 2003; Li e cols., 2004). Também tem sido descrito que PKC pode ativar este fator de transcrição e a atuação conjunta de PKA e PKC parece ser importante para os efeitos da PGE_2 em outros sistemas (Li e cols., 2004; Mao e cols., 2007). O tratamento com ODNs seqüência antisense para CREB durante 4 dias antes do início e durante todo o período de tratamento com PGE_2 preveniu as alterações nos limiares nociceptivos basais dos animais, mas não a instalação da hipernocicepção persistente. Este regime de tratamento não alterou a capacidade motora dos animais quando testada pelo método de “rota-rod”. Em coerência com nossos dados Hoeger-Bement e Sluka (2003) observaram que a ativação de CREB pela via de sinalização AC-AMPc-PKA correlaciona-se com a diminuição do limiar nociceptivo dos animais apenas nas primeiras 24 horas e não uma semana após injeções intramusculares de ácido (modelo experimental de dor crônica muscular). Sugerindo que a ativação de CREB ocorre no início dos

processos dolorosos crônicos de origem inflamatória. No entanto, em modelos de neuropatias a administração de ODNs antisense para CREB atenua a alodinia tátil que acompanha estes modelos experimentais. Não se pode portanto estabelecer um papel para o CREB em fases precoces ou como parte do mecanismo de manutenção de dores crônicas. Embora sua inibição durante todo o período de instalação não tenha prevenido a hipernocicepção persistente, podemos sugerir que este fator de transcrição pode modular as respostas dos nociceptores aos estímulos diários com PGE₂ visto que, durante todo o tratamento os limiares nociceptivos basais dos animais mantiveram-se iguais aos limiares apresentados pelo grupo salina. Também não podemos correlacionar diretamente a ativação da via AC-AMPC-PKA ou PKC com a ativação de CREB em nosso estudo. Para tal, mais experimentos são necessários. Por fim, da mesma forma que para os controles dos tratamentos com ODNs para Na_v1.8, nossos controles utilizando a técnica de *western blot* estão inacabados, já foi possível detectar as proteínas CREB em sua forma fosforilada ou não, e as amostras dos grupos tratados com ODNs estão armazenadas para posterior realização do ensaio.

NF- κ B é um fator de transcrição ativado por uma grande quantidade de estímulos, incluindo PGE₂, durante processos inflamatórios agudos ou crônicos (para revisão Siebenlist e cols., 1994; Kopp e Ghosh, 1994; Marok e cols., 1996; Neurath e cols., 1996; Chen e cols., 2000; Lavagno e cols., 2004). Uma vez que proteinoquinasas como PKA e PKC podem ativar fatores de transcrição relacionados com plasticidade celular e inflamação, testamos a hipótese de ocorrer liberação de citocinas pró-inflamatórias e/ou a ativação do NF- κ B durante o processo de instalação da hipernocicepção persistente. Para tal os animais foram pré-tratados agudamente e cronicamente com o glicocorticóide dexametasona ou um inibidor de

NF- κ B, PDTC, por via intraplantar ou intratecal. Nem a hipernocicepção aguda nem a persistente foram prevenidas por estes tratamentos. Os animais tratados com dexametasona ou PDTC por via intratecal não apresentaram alterações importantes no peso corporal quando comparados aos controles. Além disso, a avaliação histopatológica das medulas espiniais dos animais tratados com as duas drogas não mostrou diferença em relação aos grupos salina ou naive (dados não mostrados). Agudamente não é esperado que a hipernocicepção da PGE₂ seja sensível às duas drogas, as mesmas possuem mecanismos de inibir a ativação de fatores de transcrição e/ou liberação de citocinas, portanto sua analgesia é consequência do efeito antiinflamatório. Porém cronicamente talvez os tratamentos pudessem prevenir a alteração do limiar basal dos animais e a instalação da persistência visto que a ativação de NF- κ B tem sido associada a modelos de dor. A ativação do NF- κ B na medula espinal parece contribuir para a sensibilização que acompanha a inflamação e sua inibição contribui para reduzir a hiperalgesia em modelos de dor neuropática e inflamatória em ratos (Lee e cols., 2004; Tegeder e cols., 2004). Alguns dos efeitos de antiinflamatórios são associados à inibição do NF- κ B e é proposto que este efeito possa ser significativo para o tratamento de dores crônicas inflamatórias como a artrite reumatóide (Smoak e Cidlowski, 2004; Hayashi e cols., 2004; Lavagno e cols., 2004). Além disso, estudos prévios do nosso laboratório sugerem que a manutenção da hipernocicepção persistente é sensível ao tratamento com dexametasona e inibidor de NF- κ B (Souza, GR, Dissertação, 2007). Esta série final de experimentos nos permite sugerir que liberação de citocinas e a ativação de NF- κ B no tecido periférico, GRDs ou ainda medula espinal, não são importantes para a instalação do fenômeno estudado.

Consideramos importante mencionar que a ausência de efeito na prevenção da hipernocicepção persistente observada neste estudo não invalida os tratamentos propostos como ferramentas para o controle da dor. A dipirona tem poucos efeitos indesejados, é barata e tem sido utilizada em combinação com outros analgésicos durante a analgesia multimodal. O bloqueio seletivo de subtipos de canal de sódio oferece a vantagem de agir seletivamente em fibras nociceptivas (Akopian e cols., 1996; Ekberg e cols., 2006; Jarvis e cols., 2007; Priest e Kaczorowski, 2007; McGaraughty e cols., 2008). Também tem sido proposto o desenvolvimento de drogas para o tratamento da dor baseando-se no mecanismo de inibição que os anticorpos para NGF exercem sobre esta neurotrofina (Hefti e cols., 2006). Ainda é necessário considerar que nossa abordagem antinociceptiva tem um componente central pobre e nossos dados não podem excluir que a analgesia central ou sistêmica possa prevenir a instalação da hipernocicepção persistente.

A elucidação dos mecanismos envolvidos na cronificação pode ser de grande valia para se propor tratamentos durante a fase aguda no sentido de prevenir a cronificação. No presente trabalho foi demonstrado que a antinocicepção local não previne a cronificação. Da mesma forma e complementando esta hipótese, a hipernocicepção também não é suficiente para induzir a hipernocicepção persistente. Por outro lado, a interferência na via de sinalização descrita para a PGE₂ foi o único recurso que apresentou resultados em nosso modelo. Nossos resultados sugerem que analgesia sem uma abordagem antiinflamatória para o tratamento de condições inflamatórias duradouras pode facilitar a cronificação da sensibilização ou da dor. Além disso, PKA e PKC ϵ , duas quinases que participam do

processo de sensibilização e plasticidade do nociceptor parecem ter papel chave nos mecanismos que levam à persistência da hipernocicepção. Por último, a inibição do fator de transcrição CREB parece inibir a expressão do fenótipo de hipernocicepção persistente, fato que sugere seu papel nos processos crônicos e merece mais estudo.

Perspectiva

As duas quinases aqui estudadas, PKA e PKC ϵ parecem ter um papel chave nos mecanismos de plasticidade do nociceptor. Os efeitos induzidos por sua inibição em nosso modelo associados a dados prévios da literatura, podem ser promissores. A inibição destas enzimas hoje não se apresenta uma ferramenta adequada para o controle da dor em humanos, pois estas quinases estão presentes em outros tecidos onde tem igual importância. No coração, por exemplo, PKC ϵ parece ser fundamental para a viabilidade de cardiomiócitos e PKA parece ser importante para a regulação da excitabilidade do tecido. Entender o comportamento destas enzimas e suas relações com proteínas de ancoragem tem sido útil, por exemplo, no desenvolvimento de inibidores mais seletivos. Algumas proteínas de ancoragem parecem ser tecido-específicas e apenas para PKA já estão descritas mais de 50 AKAPs. Certamente mais estudos são necessários para o entendimento do comportamento destas proteínas nos nociceptores formando a base para o desenho racional de fármacos como uma das alternativas para o tratamento da dor.

3 CONCLUSÕES

- As mudanças progressivas no limiar nociceptivo basal de ratos tratados diariamente com PGE₂ são indicativas de alterações plásticas nos nociceptores em resposta à estimulação diária. O modelo de hipernocicepção mecânica persistente induzida por PGE₂ é um interessante instrumento para se estudar a cronificação de dores inflamatórias;
- Por ser prevenida por drogas antagonistas seletivas, pode-se sugerir que a hipernocicepção mecânica persistente induzida por PGE₂ é dependente da ativação de pelo menos 3 dos receptores para PGE₂, a saber: EP1, EP2 e EP4;
- A antinocicepção induzida por analgésicos ditos de ação direta nos nociceptores como a dipirona não previne a instalação do quadro persistente;
- Ainda, em relação ao efeito da dipirona, o contrabalanço a mecanismos intracelulares responsáveis pela sensibilização aguda induzida pela PGE₂ não é suficiente para prevenir as alterações fenotípicas induzidas pela administração crônica do mesmo mediador;
- A ativação diária de AC, PKA ou PKC ϵ pela PGE₂ parece ser fundamental para a instalação da hipernocicepção persistente;
- Corroborando a participação de PKA ou PKC ϵ em processos hipernociceptivos, a administração aguda de agonistas das mesmas proteinoquinases é capaz de induzir hipernocicepção mecânica em patas de ratos;
- A administração crônica da subunidade catalítica da PKA ou do agonista de PKC ϵ induz hipernocicepção persistente quando realizada num regime de 14 dias consecutivos, assim como ocorre com a PGE₂, reforçando a importância da ativação destas quinases para o processo de persistência estudado;

- Da mesma forma que antinocicepção diária não previne a instalação da hipernocicepção persistente, a hipernocicepção diária – induzida pela administração dia sim / dia não das drogas ativadoras de proteinoquinases A e C ϵ não é capaz de induzir o quadro de persistência da hipernocicepção;
- A antinocicepção induzida pela inibição da expressão dos canais Na_v1.8, responsáveis pela capacidade dos nociceptores de disparar potenciais de ação em resposta a estímulos despolarizantes, não previne a instalação da hipernocicepção persistente;
- O aumento da população de Na_v1.8 *per si* parece ser apenas consequência e não um fenômeno importante para a instalação da hipernocicepção persistente;
- A inibição, por meio de anticorpos, da neurotrofina descrita como reguladora da expressão dos canais Na_v1.8 NGF, parece não ser uma abordagem interessante para a prevenção da instalação da hipernocicepção persistente;
- O fator de transcrição ligado à ativação da via de sinalização AC-AMPC-PKA-PKC, CREB parece ser importante para a expressão do fenótipo de hipernocicepção persistente sem, no entanto, possuir papel na indução do mesmo;
- Mecanismos sensíveis a glicocorticóides - dexametasona - como a ativação de fatores de transcrição (NF- κ b) ou ainda a liberação de citocinas pró-inflamatórias parecem não serem ativados localmente (patas) ou centralmente (corpos celulares das aferências nociceptivas + medula espinal) para o processo instalação da hipernocicepção persistente.

REFERÊNCIAS

- AKOPIAN, A.N., Sivilotti, L., e Wood, J.N. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature*, 1996, vol. 379, p. 257-262.
- ALEY, K.O. e Levine, J.D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J.Neurosci.*, 1999, vol. 19, p. 2181-2186.
- ALEY, K.O., Martin, A., McMahon, T., Mok, J., Levine, J.D., e Messing, R.O. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. *J.Neurosci.*, 2001, vol. 21, p. 6933-6939.
- ALEY, K.O., Messing, R.O., Mochly-Rosen, D., e Levine, J.D. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. *J.Neurosci.*, 2000, vol. 20, p. 4680-4685.
- ALVES, D. e Duarte, I. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron. *Eur.J.Pharmacol.*, 2002, vol. 444, p. 47-52.
- ANDERSON, L.E. e Seybold, V.S. Phosphorylated cAMP response element binding protein increases in neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons in rat spinal cord in response to formalin-induced nociception. *Neurosci.Lett.*, 2000, vol. 283, p. 29-32.
- BANIK, R.K., Subieta, A.R., Wu, C., e Brennan, T.J. Increased nerve growth factor after rat plantar incision contributes to guarding behavior and heat hyperalgesia. *Pain*, 2005, vol. 117, p. 68-76.
- BEIRITH, A., Santos, A.R., Rodrigues, A.L., Creczynski-Pasa, T.B., e Calixto, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur.J.Pharmacol.*, 1998, vol. 345, p. 233-245.
- BRUNTON, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.I. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: McGraw-Hill. 2006. p. 702.
- BUCKNILL, A.T., Coward, K., Plumpton, C., Tate, S., Bountra, C., Birch, R., Sandison, A., Hughes, S.P., e Anand, P. Nerve fibers in lumbar spine structures and injured spinal roots express the sensory neuron-specific sodium channels SNS/PN3 and NaN/SNS2. *Spine*, 2002, vol. 27, p. 135-140.
- CANTRELL, A.R. e Catterall, W.A. Neuromodulation of Na⁺ channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Nat.Rev.Neurosci.*, 2001, vol. 2, p. 397-407.
- CHAHL, L.A. e Iggo, A. The effects of bradykinin and prostaglandin E1 on rat cutaneous afferent nerve activity. *Br.J.Pharmacol.* , 1977, vol. 59, p. 343-347.
- CHANDRASEKHARAN, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., e Simmons, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2002, vol. 99, p. 13926-13931.

CHEN, C.C., Sun, Y.T., Chen, J.J., e Chiu, K.T. TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression in human lung epithelial cells: involvement of the phospholipase C-gamma 2, protein kinase C-alpha, tyrosine kinase, NF-kappa B-inducing kinase, and I-kappa B kinase 1/2 pathway. *J.Immunol.*, 2000, vol. 165, p. 2719-2728.

CHEN, H.S., Lei, J., He, X., Qu, F., Wang, Y., Wen, W.W., You, H.J., e Arendt-Nielsen, L. Peripheral involvement of PKA and PKC in subcutaneous bee venom-induced persistent nociception, mechanical hyperalgesia, and inflammation in rats. *Pain*, 2008, vol. 135, p. 31-36.

CHIJIWA, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T., e Hidaka, H. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J.Biol.Chem.*, 1990, vol. 265, p. 5267-5272.

COGGESHALL, R.E., Tate, S., e Carlton, S.M. Differential expression of tetrodotoxin-resistant sodium channels Nav1.8 and Nav1.9 in normal and inflamed rats. *Neurosci.Lett.*, 2004, vol. 355, p. 45-48.

COLEMAN, R.A., Smith, W.L., e Narumiya, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol.Rev.*, 1994, vol. 46, p. 205-229.

COLLIER, H.O. e Schneider, C. Nociceptive response to prostaglandins and analgesic actions of aspirin and morphine. *Nat.New Biol.*, 1972, vol. 236, p. 141-143.

COWARD, K., Plumpton, C., Facer, P., Birch, R., Carlstedt, T., Tate, S., Bountra, C., e Anand, P. Immunolocalization of SNS/PN3 and NaN/SNS2 sodium channels in human pain states. *Pain*, 2000, vol. 85, p. 41-50.

CUMMINS, T.R., Sheets, P.L., e Waxman, S.G. The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain*, 2007, vol. 131, p. 243-257.

CUNHA, F.Q., Teixeira, M.M., e Ferreira, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. *Br.J.Pharmacol.*, 1999, vol. 127, p. 671-678.

CUNHA, J.M., Sachs, D., Canetti, C.A., Poole, S., Ferreira, S.H., e Cunha, F.Q. The critical role of leukotriene B4 in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. *Br.J.Pharmacol.*, 2003, vol. 139, p. 1135-1145.

DA CUNHA, J.M., Rae, G.A., Ferreira, S.H., e Cunha, F.Q. Endothelins induce ETB receptor-mediated mechanical hypernociception in rat hindpaw: roles of cAMP and protein kinase C. *Eur.J.Pharmacol.*, 2004, vol. 501, p. 87-94.

DIB-HAJJ, S.D., Black, J.A., Cummins, T.R., Kenney, A.M., Kocsis, J.D., e Waxman, S.G. Rescue of alpha-SNS sodium channel expression in small dorsal root ganglion neurons after axotomy by nerve growth factor in vivo. *J.Neurophysiol.*, 1998, vol. 79, p. 2668-2676.

DINA, O.A., Chen, X., Reichling, D., e Levine, J.D. Role of protein kinase Cepsilon and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience*, 2001, vol. 108, p. 507-515.

DORN, G.W., Souroujon, M.C., Liron, T., Chen, C.H., Gray, M.O., Zhou, H.Z., Csukai, M., Wu, G., Lorenz, J.N., e Mochly-Rosen, D. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 1999, vol. 96, p. 12798-12803.

DUARTE, Djane Braz. Mecanismos intracelulares envolvidos na hipernocicepção aguda induzida pela administração intratecal de interleucina-1 β . Ribeirão Preto, 2007. Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia. Orientador: Ferreira, Sérgio Henrique.

DUARTE, I.D., dos, S., I, Lorenzetti, B.B., e Ferreira, S.H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur.J.Pharmacol.*, 1992, vol. 217, p. 225-227.

EKBERG, J., Jayamanne, A., Vaughan, C.W., Aslan, S., Thomas, L., Mould, J., Drinkwater, R., Baker, M.D., Abrahamsen, B., Wood, J.N., Adams, D.J., Christie, M.J., e Lewis, R.J. muO-conotoxin MrVIB selectively blocks Nav1.8 sensory neuron specific sodium channels and chronic pain behavior without motor deficits. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2006, vol. 103, p. 17030-17035.

ENGLAND, S., Bevan, S., e Docherty, R.J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J.Physiol*, 1996, vol. 495 (Pt 2), p. 429-440.

FANG, X., Djouhri, L., McMullan, S., Berry, C., Okuse, K., Waxman, S.G., e Lawson, S.N. trkA is expressed in nociceptive neurons and influences electrophysiological properties via Nav1.8 expression in rapidly conducting nociceptors. *J.Neurosci.*, 2005, vol. 25, p. 4868-4878.

FERREIRA, J., Triches, K.M., Medeiros, R., e Calixto, J.B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain*, 2005, vol. 117, p. 171-181.

FERREIRA, S.H. e Nakamura, M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandins*, 1979a, vol. 18, p. 179-190.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat.New Biol.*, 1972, vol. 240, p. 200-203.

FERREIRA, S.H., Lorenzetti, B.B., e Correa, F.M. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur.J.Pharmacol.*, 1978, vol. 53, p. 39-48.

FERREIRA, S.H., Lorenzetti, B.B., e De Campos, D.I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. *Pain*, 1990, vol. 42, p. 365-371.

- FJELL, J., Cummins, T.R., Fried, K., Black, J.A., e Waxman, S.G. In vivo NGF deprivation reduces SNS expression and TTX-R sodium currents in IB4-negative DRG neurons. *J.Neurophysiol.*, 1999, vol. 81, p. 803-810.
- FRIEDEL, R.H., Schnurch, H., Stubbusch, J., e Barde, Y.A. Identification of genes differentially expressed by nerve growth factor- and neurotrophin-3-dependent sensory neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 1997, vol. 94, p. 12670-12675.
- GILCHRIST, C.A., Morrison, C.F., Chapman, K.E., e Harmar, A.J. Identification of nerve growth factor-responsive sequences within the 5' region of the bovine preprotachykinin gene. *DNA Cell Biol.*, 1991, vol. 10, p. 743-749.
- GOLD, M.S., Levine, J.D., e Correa, A.M. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J.Neurosci.*, 1998, vol. 18, p. 10345-10355.
- GOLD, M.S., Reichling, D.B., Shuster, M.J., e Levine, J.D. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 1996, vol. 93, p. 1108-1112.
- GOLD, M.S., Weinreich, D., Kim, C.S., Wang, R., Treanor, J., Porreca, F., e Lai, J. Redistribution of Na(V)1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J.Neurosci.*, 2003, vol. 23, p. 158-166.
- GOULD, H.J., III, Gould, T.N., England, J.D., Paul, D., Liu, Z.P., e Levinson, S.R. A possible role for nerve growth factor in the augmentation of sodium channels in models of chronic pain. *Brain Res.*, 2000, vol. 854, p. 19-29.
- GWAK, Y.S., Nam, T.S., Paik, K.S., Hulsebosch, C.E., e Leem, J.W. Attenuation of mechanical hyperalgesia following spinal cord injury by administration of antibodies to nerve growth factor in the rat. *Neurosci.Lett.*, 2003, vol. 336, p. 117-120.
- HAYASHI, R., Wada, H., Ito, K., e Adcock, I.M. Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur.J.Pharmacol.*, 2004, vol. 500, p. 51-62.
- HEFTI, F.F., Rosenthal, A., Walicke, P.A., Wyatt, S., Vergara, G., Shelton, D.L., e Davies, A.M. Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF. *Trends Pharmacol.Sci.*, 2006, vol. 27, p. 85-91.
- HINGTGEN, C.M., Waite, K.J., e Vasko, M.R. Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. *J.Neurosci.*, 1995, vol. 15, p. 5411-5419.
- HINZ, B., Cheremina, O., Bachmakov, J., Renner, B., Zolk, O., Fromm, M.F., e Brune, K. Dipyron e elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. *FASEB J.*, 2007, vol. 21, p. 2343-2351.
- HIRUMA, H., Ichikawa, T., Kobayashi, H., Hoka, S., Takenaka, T., e Kawakami, T. Prostaglandin E(2) enhances axonal transport and neuritogenesis in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 2000, vol. 100, p. 885-891.

HOEGGER-BEMENT, M.K. e Sluka, K.A. Phosphorylation of CREB and mechanical hyperalgesia is reversed by blockade of the cAMP pathway in a time-dependent manner after repeated intramuscular acid injections. *J.Neurosci.*, 2003, vol. 23, p. 5437-5445.

HONDA, A., Sugimoto, Y., Namba, T., Watabe, A., Irie, A., Negishi, M., Narumiya, S., e Ichikawa, A. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype. *J.Biol.Chem.*, 1993, vol. 268, p. 7759-7762.

HOUSLAY, M.D. 'Crosstalk': a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur.J.Biochem.*, 1991, vol. 195, p. 9-27.

JARVIS, M.F., Honore, P., Shieh, C.C., Chapman, M., Joshi, S., Zhang, X.F., Kort, M., Carroll, W., Marron, B., Atkinson, R., Thomas, J., Liu, D., Krambis, M., Liu, Y., McGaraughty, S., Chu, K., Roeloffs, R., Zhong, C., Mikusa, J.P., Hernandez, G., Gauvin, D., Wade, C., Zhu, C., Pai, M., Scanio, M., Shi, L., Drizin, I., Gregg, R., Matulenko, M., Hakeem, A., Gross, M., Johnson, M., Marsh, K., Wagoner, P.K., Sullivan, J.P., Faltynek, C.R., e Krafte, D.S. A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2007, vol. 104, p. 8520-8525.

Jl, R.R. e Rupp, F. Phosphorylation of transcription factor CREB in rat spinal cord after formalin-induced hyperalgesia: relationship to c-fos induction. *J.Neurosci.*, 1997, vol. 17, p. 1776-1785.

JOHNSON, J.A., Gray, M.O., Chen, C.H., e Mochly-Rosen, D. A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. *J.Biol.Chem.*, 1996, vol. 271, p. 24962-24966.

JOSEPH, E.K., Bogen, O., Alessandri-Haber, N., e Levine, J.D. PLC-beta 3 signals upstream of PKC epsilon in acute and chronic inflammatory hyperalgesia. *Pain*, 2007, vol. 132, p. 67-73.

KANG, D.W., Park, M.H., Lee, Y.J., Kim, H.S., Kwon, T.K., Park, W.S., e Min, d.S. Phorbol ester up-regulates phospholipase D1 but not phospholipase D2 expression through a PKC/Ras/ERK/NFkappaB-dependent pathway and enhances matrix metalloproteinase-9 secretion in colon cancer cells. *J.Biol.Chem.*, 2008, vol. 283, p. 4094-4104.

KASSUYA, C.A., Ferreira, J., Claudino, R.F., e Calixto, J.B. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Br.J.Pharmacol.*, 2007, vol. 150, p. 727-737.

KHASAR, S.G., Gold, M.S., e Levine, J.D. A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat. *Neurosci.Lett.*, 1998, vol. 256, p. 17-20.

KHASAR, S.G., Lin, Y.H., Martin, A., Dadgar, J., McMahon, T., Wang, D., Hundle, B., Aley, K.O., Isenberg, W., McCarter, G., Green, P.G., Hodge, C.W., Levine, J.D., e Messing, R.O. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron*, 1999, vol. 24, p. 253-260.

- KOPP, E. e Ghosh, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*, 1994, vol. 265, p. 956-959.
- KUMAZAWA, T., Mizumura, K., Koda, H., e Fukusako, H. EP receptor subtypes implicated in the PGE2-induced sensitization of polymodal receptors in response to bradykinin and heat. *J.Neurophysiol.*, 1996, vol. 75, p. 2361-2368.
- LAI, J., Gold, M.S., Kim, C.S., Bian, D., Ossipov, M.H., Hunter, J.C., e Porreca, F. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. *Pain*, 2002, vol. 95, p. 143-152.
- LAI, J., Porreca, F., Hunter, J.C., e Gold, M.S. Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 2004, vol. 44, p. 371-397.
- LAVAGNO, L., Gunella, G., Bardelli, C., Spina, S., Fresu, L.G., Viano, I., e Brunelleschi, S. Anti-inflammatory drugs and tumor necrosis factor-alpha production from monocytes: role of transcription factor NF-kappa B and implication for rheumatoid arthritis therapy. *Eur.J.Pharmacol.*, 2004, vol. 501, p. 199-208.
- LEE, K.M., Kang, B.S., Lee, H.L., Son, S.J., Hwang, S.H., Kim, D.S., Park, J.S., e Cho, H.J. Spinal NF-kB activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur.J.Neurosci.*, 2004, vol. 19, p. 3375-3381.
- LI, T.F., Zuscik, M.J., Ionescu, A.M., Zhang, X., Rosier, R.N., Schwarz, E.M., Drissi, H., e O'Keefe, R.J. PGE2 inhibits chondrocyte differentiation through PKA and PKC signaling. *Exp.Cell Res.*, 2004, vol. 300, p. 159-169.
- LIN, C.R., Amaya, F., Barrett, L., Wang, H., Takada, J., Samad, T.A., e Woolf, C.J. Prostaglandin E2 receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 2006, vol. 319, p. 1096-1103.
- LINDSAY, R.M. e Harmor, A.J. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature*, 1989, vol. 337, p. 362-364.
- LORENZETTI, B.B. e Ferreira, S.H. Mode of analgesic action of dipyrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *Eur.J.Pharmacol.*, 1985, vol. 114, p. 375-381.
- MA, W., Hatzis, C., e Eisenach, J.C. Intrathecal injection of cAMP response element binding protein (CREB) antisense oligonucleotide attenuates tactile allodynia caused by partial sciatic nerve ligation. *Brain Res.*, 2003, vol. 988, p. 97-104.
- MAO, L.M., Tang, Q., e Wang, J.Q. Protein kinase C-regulated cAMP response element-binding protein phosphorylation in cultured rat striatal neurons. *Brain Res.Bull.*, 2007, vol. 72, p. 302-308.
- MAROK, R., Winyard, P.G., Coumbe, A., Kus, M.L., Gaffney, K., Blades, S., Mapp, P.I., Morris, C.J., Blake, D.R., Kaltschmidt, C., e Baeuerle, P.A. Activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB in human inflamed synovial tissue. *Arthritis Rheum.*, 1996, vol. 39, p. 583-591.

MARTIN, H.A., Basbaum, A.I., Kwiat, G.C., Goetzl, E.J., e Levine, J.D. Leukotriene and prostaglandin sensitization of cutaneous high-threshold C- and A-delta mechanonociceptors in the hairy skin of rat hindlimbs. *Neuroscience*, 1987, vol. 22, p. 651-659.

MCGARAUGHTY, S., Chu, K.L., Scanio, M.J., Kort, M.E., Faltynek, C.R., e Jarvis, M.F. A selective Nav1.8 sodium channel blocker, A-803467 [5-(4-chlorophenyl-N-(3,5-dimethoxyphenyl)furan-2-carboxamide)], attenuates spinal neuronal activity in neuropathic rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 2008, vol. 324, p. 1204-1211.

Merck Biosciences Home Page. Disponível em <http://www.merckbiosciences.com/product/print/569397?x=12&y=7>. Acesso em 1 abril. 2008.

MESSERSMITH, D.J., Kim, D.J., e Iadarola, M.J. Transcription factor regulation of prodynorphin gene expression following rat hindpaw inflammation. *Brain Res.Mol.Brain Res.*, 1998, vol. 53, p. 260-269.

MESTRE, C., Pelissier, T., Fialip, J., Wilcox, G., e Eschalier, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods*, 1994, vol. 32, p. 197-200.

MOCHLY-ROSEN, D., Wu, G., Hahn, H., Osinska, H., Liron, T., Lorenz, J.N., Yatani, A., Robbins, J., e Dorn, G.W. Cardioprotective effects of protein kinase C epsilon: analysis by in vivo modulation of PKCepsilon translocation. *Circ.Res.*, 2000, vol. 86, p. 1173-1179.

MONCADA, S., Ferreira, S.H., e Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin biosynthesis as the mechanism of analgesia of aspirin-like drugs in the dog knee joint. *Eur.J.Pharmacol.*, 1975, vol. 31, p. 250-260.

MORIYAMA, T., Higashi, T., Togashi, K., Iida, T., Segi, E., Sugimoto, Y., Tominaga, T., Narumiya, S., e Tominaga, M. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol.Pain*, 2005, vol. 1, p. 3-

NEURATH, M.F., Pettersson, S., Meyer zum Buschenfelde, K.H., e Strober, W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat.Med.*, 1996, vol. 2, p. 998-1004.

NICOL, G.D. e Cui, M. Enhancement by prostaglandin E2 of bradykinin activation of embryonic rat sensory neurones. *J.Physiol*, 1994, vol. 480 (Pt 3), p. 485-492.

NIEDERBERGER, E., Ehnert, C., Gao, W., Coste, O., Schmidtko, A., Popp, L., Gall, C., Korf, H.W., Tegeder, I., e Geisslinger, G. The impact of CREB and its phosphorylation at Ser142 on inflammatory nociception. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 2007, vol. 362, p. 75-80.

NOVAKOVIC, S.D., Tzoumaka, E., McGivern, J.G., Haraguchi, M., Sangameswaran, L., Gogas, K.R., Eglen, R.M., e Hunter, J.C. Distribution of the tetrodotoxin-resistant

sodium channel PN3 in rat sensory neurons in normal and neuropathic conditions. *J.Neurosci.*, 1998, vol. 18, p. 2174-2187.

OBREJA, O., Rathee, P.K., Lips, K.S., Distler, C., e Kress, M. IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. *FASEB J.*, 2002, vol. 16, p. 1497-1503.

O'NEILL, L.A. e Kaltschmidt, C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.*, 1997, vol. 20, p. 252-258.

PARADA, C.A., Reichling, D.B., e Levine, J.D. Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCepsilon second messenger pathways. *Pain*, 2005, vol. 113, p. 185-190.

PARADA, C.A., Yeh, J.J., Reichling, D.B., e Levine, J.D. Transient attenuation of protein kinase Cepsilon can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. *Neuroscience*, 2003, vol. 120, p. 219-226.

PORRECA, F., Lai, J., Bian, D., Wegert, S., Ossipov, M.H., Eglen, R.M., Kassotakis, L., Novakovic, S., Rabert, D.K., Sangameswaran, L., e Hunter, J.C. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 1999, vol. 96, p. 7640-7644.

PRIEST, B.T. e Kaczorowski, G.J. Subtype-selective sodium channel blockers promise a new era of pain research. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2007, vol. 104, p. 8205-8206.

RAMER, M.S. e Bisby, M.A. Adrenergic innervation of rat sensory ganglia following proximal or distal painful sciatic neuropathy: distinct mechanisms revealed by anti-NGF treatment. *Eur.J.Neurosci.*, 1999, vol. 11, p. 837-846.

RANDALL, L.O. e SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*, 1957, vol. 111, p. 409-419.

RATHEE, P.K., Distler, C., Obreja, O., Neuhuber, W., Wang, G.K., Wang, S.Y., Nau, C., e Kress, M. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J.Neurosci.*, 2002, vol. 22, p. 4740-4745.

REGAN, J.W. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci.*, 2003, vol. 74, p. 143-153.

REGAN, J.W., Bailey, T.J., Pepperl, D.J., Pierce, K.L., Bogardus, A.M., Donello, J.E., Fairbairn, C.E., Kedzie, K.M., Woodward, D.F., e Gil, D.W. Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Mol.Pharmacol.*, 1994, vol. 46, p. 213-220.

RENTON, T., Yiangou, Y., Plumpton, C., Tate, S., Bountra, C., e Anand, P. Sodium channel Nav1.8 immunoreactivity in painful human dental pulp. *BMC.Oral Health*, 2005, vol. 5, p. 5-

RICHARDS, J.P., Bachinger, H.P., Goodman, R.H., e Brennan, R.G. Analysis of the structural properties of cAMP-responsive element-binding protein (CREB) and phosphorylated CREB. *J.Biol.Chem.*, 1996, vol. 271, p. 13716-13723.

RO, L.S., Chen, S.T., Tang, L.M., e Jacobs, J.M. Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Pain*, 1999, vol. 79, p. 265-274.

RODRIGUES, Marcos Antônio. Papel dos receptores EP periféricos na hipernocicepção inducida por PGE₂. Ribeirao Preto, 2007. Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia. Orientador: Parada, Carlos Amílcar.

SACHS, D., Cunha, F.Q., e Ferreira, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2004, vol. 101, p. 3680-3685.

SACHS, D., Cunha, F.Q., e Ferreira, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2004, vol. 101, p. 3680-3685.

SACHS, D., Cunha, F.Q., Poole, S., e Ferreira, S.H. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. *Pain*, 2002, vol. 96, p. 89-97.

SACHS, Daniela. Aspectos moleculares envolvidos na indução, desenvolvimento e bloqueio da hipernocicepção mecânica persistente. Ribeirão Preto, 2004. Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia. Orientador: Ferreira, Sergio Henrique.

SAH, D.W., Ossipo, M.H., e Porreca, F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. *Nat.Rev.Drug Discov.*, 2003, vol. 2, p. 460-472.

SIEBEL, J.S., Beirith, A., e Calixto, J.B. Evidence for the involvement of metabotropic glutamatergic, neurokinin 1 receptor pathways and protein kinase C in the antinociceptive effect of dipyrone in mice. *Brain Res.*, 2004, vol. 1003, p. 61-67.

SIEBENLIST, U., Franzoso, G., e Brown, K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu.Rev.Cell Biol.*, 1994, vol. 10, p. 405-455.

SMITH, J.A., Amagasu, S.M., Eglén, R.M., Hunter, J.C., e Bley, K.R. Characterization of prostanoid receptor-evoked responses in rat sensory neurones. *Br.J.Pharmacol.*, 1998, vol. 124, p. 513-523.

SMOAK, K.A. e Cidlowski, J.A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech.Ageing Dev.*, 2004, vol. 125, p. 697-706.

SOUTHALL, M.D. e Vasko, M.R. Prostaglandin receptor subtypes, EP3C and EP4, mediate the prostaglandin E2-induced cAMP production and sensitization of sensory neurons. *J.Biol.Chem.*, 2001, vol. 276, p. 16083-16091.

SOUZA, A.L., Moreira, F.A., Almeida, K.R., Bertollo, C.M., Costa, K.A., e Coelho, M.M. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. *Br.J.Pharmacol.*, 2002, vol. 135, p. 239-247.

SOUZA, Guilherme Rabelo de. Papel do fator de transcrição κ B na manutenção da hipernocicepção persistente inducida por PGE₂. Ribeirao Preto, 2007. Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia. Orientador: Parada, Carlos Amílcar.

SUGIMOTO, Y., Namba, T., Honda, A., Hayashi, Y., Negishi, M., Ichikawa, A., e Narumiya, S. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J.Biol.Chem.*, 1992, vol. 267, p. 6463-6466.

TAIWO, Y.O. e Levine, J.D. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience*, 1991, vol. 44, p. 131-135.

TAIWO, Y.O., Bjerknes, L.K., Goetzl, E.J., e Levine, J.D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience*, 1989, vol. 32, p. 577-580.

TAMAOKI, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., e Tomita, F. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 1986, vol. 135, p. 397-402.

TANIGUCHI, K., Shinjo, K., Mizutani, M., Shimada, K., Ishikawa, T., Menniti, F.S., e Nagahisa, A. Antinociceptive activity of CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit antagonist. *Br.J.Pharmacol.*, 1997, vol. 122, p. 809-812.

TEGEDER, I., Niederberger, E., Schmidt, R., Kunz, S., Guhring, H., Ritzeler, O., Michaelis, M., e Geisslinger, G. Specific inhibition of I κ B kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats. *J.Neurosci.*, 2004, vol. 24, p. 1637-1645.

VAN KOLEN, K., Pullan, S., Neefs, J.M., e Dautzenberg, F.M. Nociceptive and behavioural sensitisation by protein kinase C epsilon signalling in the CNS. *J.Neurochem.*, 2008, vol. 104, p. 1-13.

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat.New Biol.*, 1971, vol. 231, p. 232-235.

VANEGAS, H. e Tortorici, V. Opioidergic effects of nonopioid analgesics on the central nervous system. *Cell Mol.Neurobiol.*, 2002, vol. 22, p. 655-661.

VASKO, M.R., Campbell, W.B., e Waite, K.J. Prostaglandin E2 enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J.Neurosci.*, 1994, vol. 14, p. 4987-4997.

VIJAYARAGHAVAN, S., Goueli, S.A., Davey, M.P., e Carr, D.W. Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility. *J.Biol.Chem.*, 1997, vol. 272, p. 4747-4752.

- VILLARREAL, C.F., Sachs, D., Cunha, F.Q., Parada, C.A., e Ferreira, S.H. The role of Na(V)1.8 sodium channel in the maintenance of chronic inflammatory hypernociception. *Neurosci.Lett.*, 2005, vol. 386, p. 72-77.
- WARREN, C.A., Mok, L., Gordon, S., Fouad, A.F., e Gold, M.S. Quantification of neural protein in extirpated tooth pulp. *J.Endod.*, 2008, vol. 34, p. 7-10.
- WATABE, A., Sugimoto, Y., Honda, A., Irie, A., Namba, T., Negishi, M., Ito, S., Narumiya, S., e Ichikawa, A. Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. *J.Biol.Chem.*, 1993, vol. 268, p. 20175-20178.
- WILD, K.D., Bian, D., Zhu, D., Davis, J., Bannon, A.W., Zhang, T.J., e Louis, J.C. Antibodies to nerve growth factor reverse established tactile allodynia in rodent models of neuropathic pain without tolerance. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 2007, vol. 322, p. 282-287.
- WILLIS, A.L. e Cornelsen, M. Repeated injection of prostaglandin E2 in rat paws induces chronic swelling and a marked decrease in pain threshold. *Prostaglandins*, 1973, vol. 3, p. 353-357.
- WINSTON, J., Toma, H., Shenoy, M., e Pasricha, P.J. Nerve growth factor regulates VR-1 mRNA levels in cultures of adult dorsal root ganglion neurons. *Pain*, 2001, vol. 89, p. 181-186.
- WOOLF, C.J. e Costigan, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 1999, vol. 96, p. 7723-7730.
- WOOLF, C.J., Allchorne, A., Safieh-Garabedian, B., e Poole, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br.J.Pharmacol.*, 1997, vol. 121, p. 417-424.
- ZHOU, H.Z., Karliner, J.S., e Gray, M.O. Moderate alcohol consumption induces sustained cardiac protection by activating PKC-epsilon and Akt. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 2002, vol. 283, p. H165-H174.
- ZHOU, X.F., Deng, Y.S., Chie, E., Xue, Q., Zhong, J.H., McLachlan, E.M., Rush, R.A., e Xian, C.J. Satellite-cell-derived nerve growth factor and neurotrophin-3 are involved in noradrenergic sprouting in the dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in the rat. *Eur.J.Neurosci.*, 1999, vol. 11, p. 1711-1722.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 1983, vol. 16, p. 109-110.

ANEXO

Nas páginas a seguir encontra-se o manuscrito que está em preparação
e refere-se aos dados desta tese

Investigation of mechanisms underlying the installation of a PGE₂-induced state of persistent hypersensitivity

I. The symptom management by the peripheral antinociception or Na_v1.8 knockdown does not prevent PGE₂-induced state of persistent hypersensitivity

II. The PGE₂-induced PKA and PKC ϵ activation rather than nociception seems to be the underlying mechanism of PGE₂-induced state of persistent hypersensitivity

III. The inhibition of transcription factors CREB or NF- κ B does not prevent PGE₂-induced state of persistent hypersensitivity

Funez, MI¹; Villarreal, CF¹; Cunha, FQ¹; Parada, CA¹; Ferreira, SH^{1*}

¹Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medicine School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

* Corresponding author: Sérgio Henrique Ferreira

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Av. Bandeirantes, 3900

Ribeirão Preto, SP, Brazil

14049-900

fax: 55 16 3633 –0021, phone: 55 16 3602-3222

Keywords: chronic pain; PGE₂; nociceptor; PKA; PKC ϵ .

Abbreviations: non-steroidal anti-inflammatory, NSAIDs; prostaglandin E₂, PGE₂; tetrodotoxin-resistant sodium channel Na_v1.8, Na_v1.8; nerve growth factor, NGF; adenylyl cyclase, AC; cAMP-dependent protein kinase, PKA; protein kinase C ϵ , PKC ϵ ; PKA catalytic subunit, csPKA; nuclear factor κ B, NF- κ B; cAMP responsive element-binding protein, CREB; oligodeoxynucleotides, ODNs; nitric oxide, NO; cyclic guanosine monophosphate, cGMP; cGMP-dependent protein kinase, PKG; ATP-sensitive potassium channel, K⁺_{ATP}; dorsal root ganglion, DRG.

Abstract

We have investigated the mechanisms underlying the persistence of mechanical hypernociception induced by the major inflammatory mediator PGE₂ inhibited by NSAIDs. It was observed that peripheral antinociception brought about dipyron or ODNs antisense for the Na_v1.8 during the whole period of persistent hypernociception induction is not sufficient to prevent the chronification process. Our second hypothesis is that there must be something in the signaling pathway of PGE₂ that triggers daily the chronification process and reinforcing this, we observed that the persistent condition is dependent on the EP receptors-activation. Next, we pharmacologically inhibited on a daily basis the adenylyl cyclase and two major kinases activated by PGE₂, PKA and PKCε, and a prevention of the process was observed. Both kinases are important because the concomitant or the isolated inhibition is sufficiently effective. Accordingly, the 14-day administration of the PKA or PKCε-activators in the hind paws of rats can induce a very similar picture of persistent hypernociception. Our third hypothesis is that the inhibition of the transcription factors described as being activated by PKC or PKA and involved in inflammatory and pain processes - NF-κB or CREB - could prevent the persistent hypernociception installation. It was observed that CREB seems be important to the persistent phenotype expression, but the inhibition of the two transcription factors did not prevent the persistent condition installation. Until now, own whole results have strongly suggested that causing analgesia without inhibiting the inflammatory process is an ineffective treatment when prevention of nociceptor changes as to pain chronification is desired. In addition, the PKA and PKCε seem to have a key role during the induction of acute and persistent nociceptor sensitization.

Introduction

Chronic pain conditions are difficult to manage. An interesting approach of basic sciences studies is the understanding of the mechanisms underlying chronic conditions in the sense of contributing to the improvement of symptoms management. However, few studies are conducted in order to understand the installation of chronic processes. In this sense, prevention of chronification is an important approach during acute pain conditions treatment. Our group has developed a model to investigate persistent hypersensitivity induced by inflammatory mediators like PGE₂ (Ferreira et al., 1990). The persistent condition installation is dependent on the time in which the inflammatory stimulus is present in the hind paw of rats since neither 3 nor 7 but 14 daily injections of the inflammatory mediator are effective (Ferreira et al., 1990). The PGE₂-induced persistent hypernociception is insensitive to COX inhibitors like indomethacin during the whole period of animal's nociceptive threshold evaluation (Ferreira et al., 1990). After its induction, persistent hypernociceptive state can be controlled by one single local administration of the analgesics activating the L-arginine-NO-cGMP-PKG-K⁺_{ATP} pathway as dipyrone or morphine (Ferreira et al., 1990; Sachs et al., 2004). These unpredictable effects are abolished if the hind paws of the rats are re-stimulated, for example, with a ten-time-smaller-than-the-frequent-employed PGE₂ dose (Ferreira et al., 1990). Thus, the analgesic effects are long lasting but do not reverse the hypersensitivity condition since a shorter stimulus is able to reinstall the persistent hypernociception. Additionally, the up-regulation of the Na_v1.8 sodium channels is observed during the persistent hypernociception state and it seems that it is important to this new phenotype (Villarreal et al., 2005). This sodium channel is important to the acute PGE₂-induced sensitivity since it can not be detected in animals treated with ODN to Na_v1.8 (Khasar et al., 1998).

Although the maintenance of the persistent hypernociception induced by PGE₂ has been studied, little is known about its induction process. We propose to study the underlying mechanisms of this persistent state of sensitivity. It was investigated the hypothesis that the daily antinociception provided by dipyrone or the inhibition of the up-regulation of the Na_v1.8 during its installation phase could prevent it. In addition, we investigated whether the PGE₂-signaling pathway activation, rather than nociception, could be the underlying mechanism of the persistent hypernociception.

Finally, to complete the study, we sought to determine whether the NF- κ B or CREB transcription factors could be important to the investigated condition.

Methods

Animals

Male Wistar rats (110-250 g) were housed in temperature-controlled rooms (22-25°C) with an alternating 12 h light-dark cycle. Water and food were available *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with International Association for Study of Pain Guidelines (Zimmermann, 1983) and approved by the Ethics Committee of the School of Medicine of Ribeirão Preto (University of São Paulo, Brazil). Each animal was used only in a single experimental group.

Nociceptive test: Rat-Paw Constant Pressure Test

The term “hypernociception” was used to indicate an increase in the nociception due to the sensitization of the paws to mechanical stimuli. The latency of the nociceptive response was measured by the rat-paw constant pressure test as previously described (Ferreira et al., 1978). In this method, a constant pressure of 20 mmHg (measured by a manometer) was applied (via a syringe piston moved by compressed air) to a 15 mm² area on the dorsal surface of the hind paw and discontinued when the rat presented a typical “freezing reaction” (nociceptive endpoint). The latency time of the freezing reaction onset was measured before and after experimental treatment. The intensity of mechanical hypernociception was quantified as the decrease in reaction time, calculated by subtracting the latency, in seconds: 1) after treatment versus before treatment (Δ reaction time) to acute experiments; or 2) after daily treatment versus before starting treatments in the first day of protocol (Δ reaction time) to chronic experiments. Typically, the reaction time before treatment was 31.5 ± 1 s (mean \pm SEM; n=5).

Experimental Protocols

Induction of the persistent hypernociception condition:

The persistent hypernociception was induced as previously described (Ferreira et al., 1990). The subcutaneous intraplantar (i.pl.) administration of PGE₂ (100 ng / 50 μ L / paw) induces acute hypernociception measured 3 h after injection (Ferreira et al., 1978). The induction of persistent hypernociception was performed by injecting PGE₂, at the same dose, over 14 days. The intensity of hypernociception was measured before and after (3h) the daily i.pl. injections in all the experiments.

After the discontinuation of the treatment, the hypernociception was evaluated once a day for 7, 14, 21 or 30 days, as necessary and depending on the animal's response and the protocol. The data from persistent experiments are expressed in two forms, indicated in the ordinate of the graphics: as the *basal* mechanical threshold or as mechanical threshold. The *basal* threshold is evaluated daily before any treatment. In our study the *basal* threshold of animals is the major sign because its alteration is indicative of plastic changes in the studied tissue and installation of persistent hypernociception. The mechanical threshold is the result of the treatments.

Investigation of the dipyrrone-treatment effect during the installation period of PGE₂-induced persistent hypernociception:

To induce peripheral-local antinociception, dipyrrone (160 µg / 50 µL / paw) was administrated daily 30 minutes before the PGE₂ (100 ng / 50 µL / paw) administration. The nociceptive test was conducted before – to record the basal threshold – and after treatments, as appropriated.

Investigation of the Na_v1.8 up-regulation role in the installation of PGE₂-induced persistent hypernociception:

The ODN antisense to Na_v1.8 treatment (20 µg / 10 µL / intrathecal; Mestre et al., 1994; Khasar et al., 1998; Parada et al., 2003; Villarreal et al., 2005) was conducted following the protocol: 1) for 4 consecutive days before starting PGE₂-treatment (100 ng / 50 µL / paw) to ensure that the Na_v1.8 synthesis became inhibited at the start of PGE₂-treatment; and 2) every day during the PGE₂-inducing persistent hypernociception period (14 days). Different from dipyrrone, that presents a punctual antinociception, the ODN treatment has the aim to guarantee that during the installation process animals will not present nociception at any time. The nociceptive test was conducted before – to record the basal threshold – and after PGE₂-treatments, as appropriated.

Investigation of the AC, PKA or PKCε activation role during the installation period of PGE₂-induced persistent hypernociception:

To evaluate if the AC, PKA or PKCε daily activation by PGE₂ is important to the installation of the persistent hypernociception condition it were performed the

hind paw of rats pre-treatment, with its inhibitors: SQ 22536 (AC inhibitor, 30 minutes before, 25 µg / 50 µL); AKAP (PKA inhibitor, 5 minutes before, 0.3 µg / 50 µL) and PKCε inhibitor peptide (5 minutes before, 3 µg / 50 µL) in association or not (same doses and volumes); H89 (PKA inhibitor, 30 minutes before, 27µg / 50 µL); staurosporine (PKC inhibitor, 30 minutes before, 1µg / 50 µL). In addition, it was investigated if the PKA or PKCε activators injected in the hind paw of rats could induce persistent hypernociception condition. In previous dose-response studies it was found that the PKA or PKCε activators can induce mechanical hypernociception with the same magnitude of PGE₂-induced hypernociception, but the duration time was long-lasting (more than 24 hours, unpublished data). Intending to approximate the stimulation of the enzymes by its activators to that induced by PGE₂, and based on the time-duration of hypernociception caused by the stimulus, it were followed two protocols: 1) each two days or 2) every day to the catalytic PKA subunit (3 U / paw / 50 µL) or the PKCε agonist, ψεRACK (3 U / paw / 50 µL). The nociceptive test was conducted before – to record the basal threshold – and after treatments, as appropriated.

Investigation of the NF-κB or CREB activation role during the installation period of PGE₂-induced persistent hypernociception:

To investigate the role of the two transcription factors related to pain and inflammation it was conducted the daily inhibition of them during the installation of persistent condition. To CREB it was used the ODN antisense treatment (20 µg / 10 µL / intrathecal; Mestre et al., 1994; Ma et al., 2003) approach following the protocol: 1) for 4 consecutive days before starting PGE₂-treatment (100 ng / 50 µL / paw) to ensure that the CREB synthesis became inhibited at the start of PGE₂-treatment; and 2) every day during the PGE₂-inducing persistent hypernociception period (14 days). To NF-κB it was performed the pharmacological inhibition with the PDTC treatment (20 µM / 50µL or 200 µM / 10 µL, once a day, 1 hour before PGE₂-treatment). The PDTC treatment was performed by intraplantar or intrathecal routes to achieve the possible activation of NF-κB through daily PGE₂ i.pl. treatments in the peripheral or central tissue. As a control experiment we treated the animals by intraplantar (25 µg/ 50 µL) or intrathecal (25 µg/ 10 µL) routes with the glucocorticoid dexamethasone during the whole period PGE₂-induced persistent hypernociception installation. The

nociceptive test was conducted before – to record the basal threshold – and after treatments, as appropriated.

Data Analysis

Results were expressed as means \pm SEM of measurements made on 5-10 animals in each group and represent the intensity of mechanical hypernociception or the intensity of mechanical *basal* hypernociception as indicated. Comparisons between three or more treatments were made using one-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni *t*-tests or repeated measures two-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni *t*-tests, as appropriate (Prism 4, GraphPad, San Diego, USA). $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Induction of persistent hypernociception condition

As expected, the daily i.pl PGE₂ injections induce a persistent hypernociceptive condition lasting 30 days after finishing the treatment (fig 1). With special interest to our study is the observation that the basal threshold of animals start to become hypernociceptive after nearly 4 - 7 days of PGE₂ treatment. It was interpreted as plastic changes that will guide to the new hind paws of the rats hypernociceptive phenotype after finishing treatment (14 days).

The symptom management with dipyron did not prevent the installation of PGE₂-induced persistent hypernociception

The daily treatment with dipyron induces antinociception on the PGE₂-induced acute hypernociception during the whole period of persistent condition induction (fig 2A). The dipyron daily antinociception (fig. 2A) did not prevent the progressive changes in the basal threshold of the hind paw of the rats and was not different from control animals (saline + PGE₂) (fig 2B). After finishing treatments the animals presented persistent hypernociception.

Na_v1.8 knockdown induces antinociception and inhibition of basal changes in the sensitivity of animals, but did not prevent persistent hypernociception induced by daily PGE₂ treatment

The ODN antisense to Na_v1.8 knockdown induced antinociception from the first day of PGE₂-treatment to 14th when the evaluation of PGE₂-induced hypernociception showed difference between the ODN-antisense-treated group compared with control groups (saline or ODN control sequence + PGE₂)(fig 2D). The basal threshold of animals remained no different from saline or control sequence-treated groups during the installation period (fig 2C). After finishing treatment (7th) the threshold of animals treated with ODN antisense to Na_v1.8 became hypernociceptive and not significantly different from the control groups (fig 3A). At the finish of the intrathecal treatments (1th pos-treatment period) the animals were submitted to Rota-Rod treadmill test to achieve the possible motor impairment due to 18 intrathecal injections. All animals present the ability to stay on the treadmill compared with control saline animals (data not shown). Additionally, the spinal cord (L4-L5

segments) was collected to tissue integrity analysis and no differences between the groups were found (data not shown).

Because NGF is described to regulate the $\text{Na}_v1.8$ sensory neurons expression in basal and in different pathological conditions as inflammation and axotomy (Fjell et al., 1999; Dib-Hajj et al., 1998) we investigated whether the antibodies against NGF (sheep anti-rat αNGF , Cunha et al., 2003) treatment could prevent the installation of persistent condition. The αNGF intraplantar or intrathecal treatments during the installation period did not prevent the PGE_2 -induced persistent hypernociception and did not influence the mechanical threshold of animals in any time of evaluation (data not shown). At the finish of the intrathecal treatment the spinal cord (L4-L5 segments) were collected to tissue integrity analysis and no differences between the groups were found (data not shown).

The AC, PKA or $\text{PKC}\epsilon$ activation seems be the underlying mechanism of PGE_2 -induced persistent hypernociception installation

It is important to mention that the pre-treatments with EP-receptors antagonists completely prevent the induction of the PGE_2 -persistent hypernociception, showing that its installation mechanism is dependent on the EP-receptors activation (data not shown).

The AC or the association of the PKA plus $\text{PKC}\epsilon$ inhibitors pre-treatment prevented the PGE_2 acute hypernociception (figures 3A and 3C, respectively). The same treatments made chronically previous to PGE_2 -injections completely prevented the installation of persistent hypernociception (figures 3B for SQ 22536, 3D for association of AKAP plus $\text{PKC}\epsilon$ inhibitor peptide). Additionally, the pre-treatments with the inhibitors of the kinases isolated (without association), presented acute antinociception as well as the prevention of the persistent hypernociception condition: AKAP or H89 (figure 4A for acute treatments); AKAP (figure 4C for chronic treatment); H80 (figure 4E for chronic treatment), $\text{PKC}\epsilon$ inhibitor peptide or staurosporine (figure 4B for acute treatments), $\text{PKC}\epsilon$ inhibitor peptide (4D for chronic treatment) or staurosporine (figure 4F for chronic treatment). To complement this data set, it was observed that the catalytic PKA subunit, csPKA or the $\text{PKC}\epsilon$ agonist, $\psi\epsilon\text{RACK}$ injected in hind paws of rats each two days, as described in experimental protocols, in spite of induces hypernociception during the whole time of the

installation period, did not lead to persistent hypernociception phenotype (fig 5A to csPKA and fig 5C to PKC ϵ agonist). After this unexpected result there was conducted the daily administration protocol and it was observed, as to the each two days administration protocols, changes in the basal nociceptive threshold of animals at the first days of treatment; after it finished the animals present persistent hypernociception evaluated until 21 days (fig 5B to csPKA and fig 5D to PKC ϵ agonist).

Activation of CREB seems be important to new phenotype expression but neither the NF- κ B or CREB activation during the installation period seems be the key to PGE₂-induced persistent hypernociception

The CREB ODN antisense-daily treatment prevented the changes in the basal mechanical threshold of animals during the whole installation period, but at the finish of the treatment at the 7th day, approximately, the animals present the persistent hypernociception (figure 6A). This treatment did not interfere with the daily acute sensitization induced by PGE₂ injections (figure 6B). The treatments with the NF- κ B-inhibitor PDTC (at doses previously described, Duarte et al., personal communication; Lee et al., 2004) or dexamethasone (at doses previously described, Ferreira et al., 1997) did not influence the changes in the basal nociceptive threshold of animals neither prevented the PGE₂-induced persistent hypernociception installation (figure 6C-D to PDTC or 6E-F for dexamethasone).

At the finish of the intrathecal treatments (1th pós-treatment period) the animals belonging to CREB studies were submitted to Rota-Rod treadmill test to achieve the possible motor impairment. All animals present the ability to stay on the treadmill compared with control saline animals (data not shown). Additionally, the spinal cord (L4-L5 segments) of the animals belonging to CREB, NF- κ B or dexamethasone studies were collected to tissue integrity analysis and no differences between the groups were found (data not shown).

Discussion

We have shown that our PGE₂-induced persistent hypernociception model have an installation (14 days) as well as a persistent period that allows to identify elements underlying its mechanism. The installation of the condition is dependent on the time of injections (in days, Ferreira et al., 1990) and the EP-receptors activation (data not shown). The antinociception brought about by two different tools, as dipyrone and the Na_v1.8 knockdown, is not sufficient to prevent hypernociception persistence. In the same way, the daily hypernociception also could not induce persistent condition. The activation of the PGE₂-signalling pathway seems to be the underlying mechanism to persistent hypernociception installation. This model is insensitive to dexamethasone or the NF-κB-inhibitor (PDTC) daily treatment. The transcription factor CREB seems to be important to new hypernociceptive phenotype expression rather than the installation of the persistent condition.

The biggest challenge during the acute pain treatments is preventing the chronification in addition to its management. This approach is largely used as the pre-emptive analgesia. Based on these informations we tested the hypothesis that the absence of nociception could prevent the installation of the PGE₂-induced persistent hypernociception. The first protocol was conducted using the well-known analgesic dipyrone, classically described as a NSAID (Goodman & Gilman's, 2006). Previous studies have shown that it is effective to control acute as well as persistent sensitization induced by inflammatory agents as PGE₂ (Lorenzetti & Ferreira, 1985; Duarte et al., 1992; Alves & Duarte, 2002; Sachs et al., 2004). Its local effects are attributed mainly to activation of a nitric-oxide signaling pathway that counteracts the signaling pathway activated by inflammatory mediators, i.e. cAMP pathway (Ferreira & Nakamura, 1979a; Cunha et al., 1999; Sachs et al., 2004). We used in addition to that, the knockdown of the Na_v1.8 by the treatment with antisense ODNs – this sodium channel is described as the main sodium channel involved in the maintenance of the persistent hypernociception (Villarreal et al., 2005) as well as in acute PGE₂-induced sensitization (Gold et al., 1996; England et al., 1996; Khasar et al., 1998; Gold et al., 1998). The possible regulation of the Na_v1.8 expression by the NGF was accessed elsewhere (data not shown). Our data strongly suggest that the antinociception brought about by two different mechanisms was not sufficient to prevent the plastic changes taking place in the nociceptors concerning the chronification in our model. Moreover, the generation of a counteracting mechanism - by dipyrone, or

the painful-phenotype breakdown - by ODNs antisense treatments could not influence the changes in the nociceptors.

It is important to distinguish that the absence of effect on the prevention of persistent condition observed in this study does not invalidate the use of the mentioned approach to pain conditions treatment. Certainly, they are very useful treatments. Dipyrrone have little undesirable effects, it is cheap and has been used in combination with other analgesics during the multimodal analgesia. In addition, the subtype-selective sodium-channel $Na_v1.8$ blockers have the possible advantage to act selectively on the nociceptive fibers, and drugs have been developed in this sense (Akopian et al., 1996; Ekberg et al., 2006; Jarvis et al., 2007; Priest and Kaczorowski, 2007). Likewise, antibodies to NGF as been used with success to control some inflammatory or neuropathic chronic pain in rodents and it has been proposed the development of drugs with the property of antagonizing it (Ramer and Bisby, 1999; Ro et al, 1999; Banik et al., 2005; Wild et al., 2007; Sah et al., 2003; Hefti et al., 2006). It is necessary to consider, in addition, that our antinociceptive approach have a poor central element and our data can not exclude that providing central or systemic antinociception could be a preventive mechanism against the installation of the PGE_2 -induced persistent hypernociception.

Next we evaluated the contribution of the PGE_2 -activated signaling pathways for the induction of persistent hypernociception. As mentioned above we tested two EP receptors antagonists and observed that the persistent condition is dependent on EP-receptors activation (data not shown). Interestingly, the inhibition of EP1, EP2 and EP4 concomitantly is necessary to inhibit the installation of persistent condition, despite the inhibition of only one receptor is sufficient to inhibit the PGE_2 -induced acute hypernociception (data not shown). This data reinforce that antinociception is not sufficient to prevent the persistent hypernociception installation. One possible explanation is that the antagonism of one receptor is sufficient to prevent the sensitization detectable by the behavioral test, but the activation of other EP receptors could generate quantities of second messengers sufficient to sensitize at long term. In fact, it is necessary the inhibition of EP3C and EP4 concomitantly to reach significant inhibition on the cAMP formation in DRG cells (Southall and Vasko, 2001). Subsequently, it was investigated the contribution of the AC as well as the two kinases activated downstream the EP receptors, the PKA and PKC ϵ . The EP2, EP3 and EP4 are described as coupled to the AC and its activation could generate or

diminish the enzyme activity (Regan et al., 1994; Sugimoto et al., 1992; Honda et al., 1993; for review Coleman et al., 1994). We observed the prevention of the persistent condition installation by treating animals with the AC inhibitor, SQ 22536. The generation of the cAMP is well described as part of the nociceptor sensitization mechanism (Ferreira and Nakamura, 1979a; Taiwo et al., 1989; Taiwo and Levine, 1991; Cunha et al., 1990) and our data suggest that this second messenger could have an additional role in regulating nociceptor plasticity. The PKA and PKC activation also are described as part of the molecular mechanisms in which PGE₂ sensitizes nociceptors acutely, since these kinases could modulate the Na_v1.8 sodium channels, by phosphorylation, increasing sodium currents in nociceptors (England et al., 1996; Gold et al., 1998; Fitzgerald et al., 1999; Lai et al., 2004, for review Cantrell & Catterall, 2001). There are increasing suggestions of the important role of the PKA and PKCε in the modulation of the neuronal plasticity as well as in the chronic pain processes; moreover, in some cases the two enzymes seems to act in combination (Aley and Levine, 1999; Aley et al., 2000; Parada et al., 2003; Parada et al., 2005; Joseph et al., 2007; Kolen et al., 2008; for review Cantrell & Catterall, 2001). Its inhibition - by the use of two different inhibitors to each kinase, with different action mechanisms, induces antinociception during the PGE₂-acute hypernociception and the prevention of the animal's basal threshold changes during the installation period. Moreover, PKA or PKCε inhibition treatments completely prevented the persistent hypernociception condition. Confirming the PKA or PKCε role, the administration of their activators during 14 days induced a persistent hypernociception condition apparently not different from that induced by PGE₂. However, the activator's acute effect did not mimic the PGE₂-induced acute hypernociception because it is not resolved 24 hours after its injections. In this case, it is important to understand that the use of the activators does not mimic, totally, that of the inflammatory mediator. However, the protocol injecting each two days the activators provided the important information that hypernociception is not sufficient to persistence of hypernociception condition. These activators have been used by us and other researchers (Sachs et al., personal communication; Aley and Levine, 1999; Parada et al., 2005; Joseph et al., 2007).

Due to the results with the PKA and PKCε it was imperative to test the hypothesis that some transcription factor could be activated by the two kinases. The

activation of CREB by cAMP-PKA signaling is well described and is involved in some chronic pain conditions in rodents (Richards et al., 1996; Hoeger-Bement and Sluka, 2003; Ma et al., 2003; Wang et al., 2006). The involvement of PKC in the activation of CREB is described else, and this effect of PKC in cultured neurons comprise a PKA component implicated (Mao et al., 2007). In spite of CREB inhibition did not prevent the persistence of PGE₂-induced persistent hypernociception after finishing the treatment, our data suggest that CREB is involved in the persistent phenotype expression without affect the nociceptors response to the PGE₂-daily injected. This result reveals the difference between the repeated acute phenomenon induced by injections of PGE₂ and the changes in the nociceptive basal threshold of animals and pathogenesis of the chronic inflammatory conditions.

NF- κ B is a transcription factor activated by a large amount of stimuli, including PGE₂, during the acute and chronic inflammatory process (for review Siebenlist et al., 1994; Kopp and Ghosh, 1994; Marok et al., 1996; Neurath et al., 1996; Chen et al., 2000; Lavagno et al., 2004). Its activation in spinal cord contributes to inflammatory hypersensitivity and its inhibition reduces the hyperalgesia present in inflammatory and neuropathic pain models in rats (Lee et al., 2004; Tegeder et al., 2004). In another way, some of the effects of anti-inflammatory drugs is dependent on the NF- κ B inhibition and it is proposed to be significant for treatment of chronic pain conditions like rheumatoid arthritis (Smoak and Cidlowski, 2004; Hayashi et al., 2004; Lavagno et al., 2004). Our results suggest that NF- κ B is not involved in the induction of the persistent hypernociception phenotype. It were made local treatments – hind paw or spinal cord – with it's selective-inhibitor PDTC and with the glucocorticoid dexamethasone and any treatment was effective. The PDTC treatment has been used by other researchers with success in the same concentrations and routes (Lee et al., 2004; Duarte et al. and Souza et al., personal communication).

It is imperative to propose effective treatments to control chronic pain. Additionally, the elucidation of the mechanisms underlying it could contribute to propose treatments more efficient in managing pain during its acute phase to preventing its chronification. In the present work we demonstrated that antinociception can not prevent the chronification of a persistent inflammatory sensitization. Complementing the idea, the hypernociception also is not sufficient to induce that condition. However, the management of the PGE₂-signalling pathway

was the only effective treatments. Our results strongly sustain the hypothesis that analgesia without an anti-inflammatory approach for the treatment of long-lasting inflammatory conditions could facilitate the pain chronification. Moreover, the two kinases-related to nociceptor sensitization by inflammatory mediators, PKA and PKC ϵ , seem to have key role in the underlying mechanism of inflammatory pain chronification. Understanding the two enzymes behavior and the development of drugs more selective may provide new tools to pain treatment. Finally, the transcription factor CREB inhibition appear to inhibit the chronic pain phenotype, fact that need more research and could be promising as well.

Acknowledgements

We thank Ieda Regina dos Santos Schivo, Fabíola L. Mestriner, Sérgio Roberto Rosa, Tadeu Franco Vieira and Eleni L. Tamburus Gomes for technical assistance. This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP - Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Brazil). We are also grateful to Antônio Carlos Alfieri for English editing of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

References

As referências bibliográficas citadas neste manuscrito podem ser encontradas na lista geral de referências citadas deste documento.

Figure and legends

Figure 1

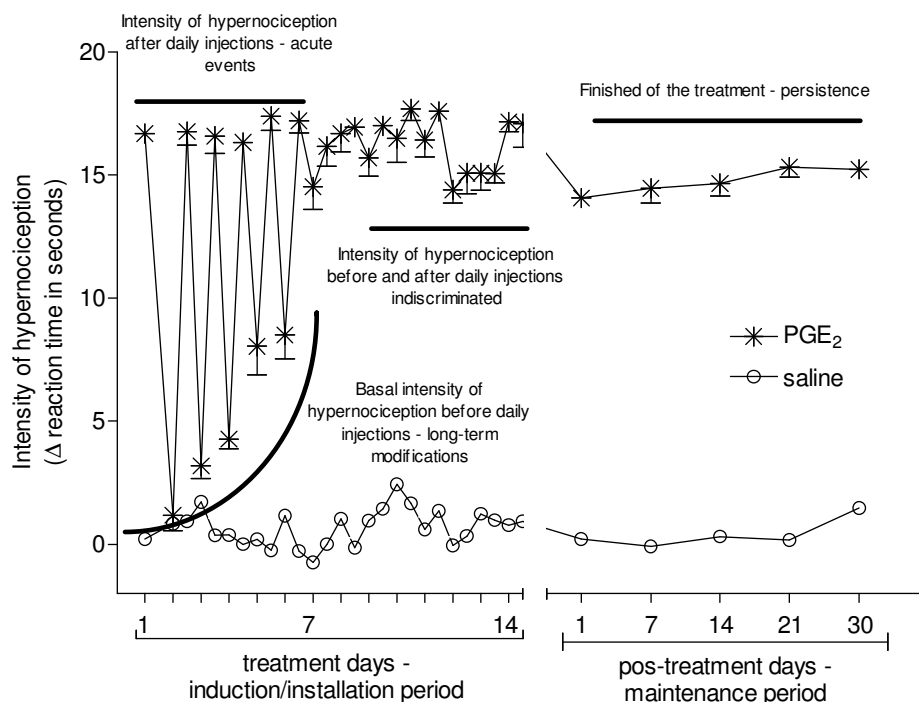


Figure 1. Induction and maintenance of persistent hypernociception condition.

The PGE₂ injection (100ng/50μL/paw) induced hypernociception (evaluated 3 hours after its administration during all the treatment period – 14 days) is resolved 24 hours after. In the 3-4th day after the PGE₂-daily administration the nociceptive mechanical threshold of animals did not return to the initial basal values beginning a progressive change turning it hypernociceptive. The nociceptive test was conducted daily before (basal threshold) and after the injections during the whole treatment period and at the 1, 7, 14, 21 and 30th days after finishing treatment. The figure is representative of experiments were data correspond to mean ± SEM, 4-6 animals.

Figure 2

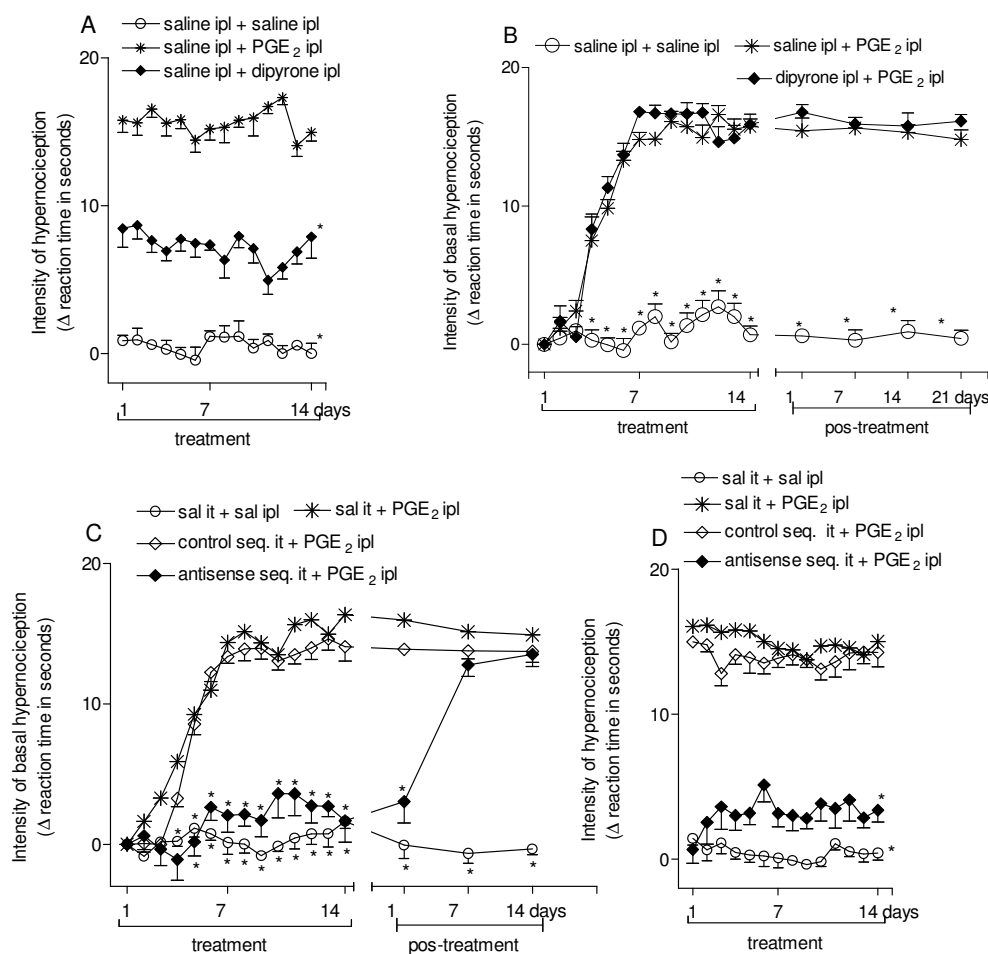


Figure 2. The symptom management by dipyrrone or Na_v1.8 knockdown did not prevent the installation of PGE₂-induced persistent hypernociception. The dipyrrone pre-treatment (160μg/50μL/paw) induced antinociception during the 14-days-treatment period with PGE₂ (100ng/50μL/paw)(panel A). The same treatment however did not prevent the progressive changes in the basal threshold of animals and the expression of the persistent hypernociception (panel B). The ODN antisense to Na_v1.8 administration (20μg/10μL/intrathecal) was conducted during 4 days before starting the PGE₂ treatment (100ng/50μL/paw) and daily during the installation period. Although, the ODN-treatment induced antinociception during the 14-days of treatment with PGE₂ (panel D) and prevented the expression of changes in basal threshold of hind paws of rats (panel C) it did not prevented the persistent hypernociception installation (panel C). The nociceptive test was conducted daily before (basal threshold, panels B and C) and after the treatments (panels A and D) during the installation period and once a day during the pos-treatment period (panels B and C). The data represent mean ± SEM, 4-6 animals, * significantly difference compared PGE₂ group, panels A and D all the curve dots; p<0.05 (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

Figure 3

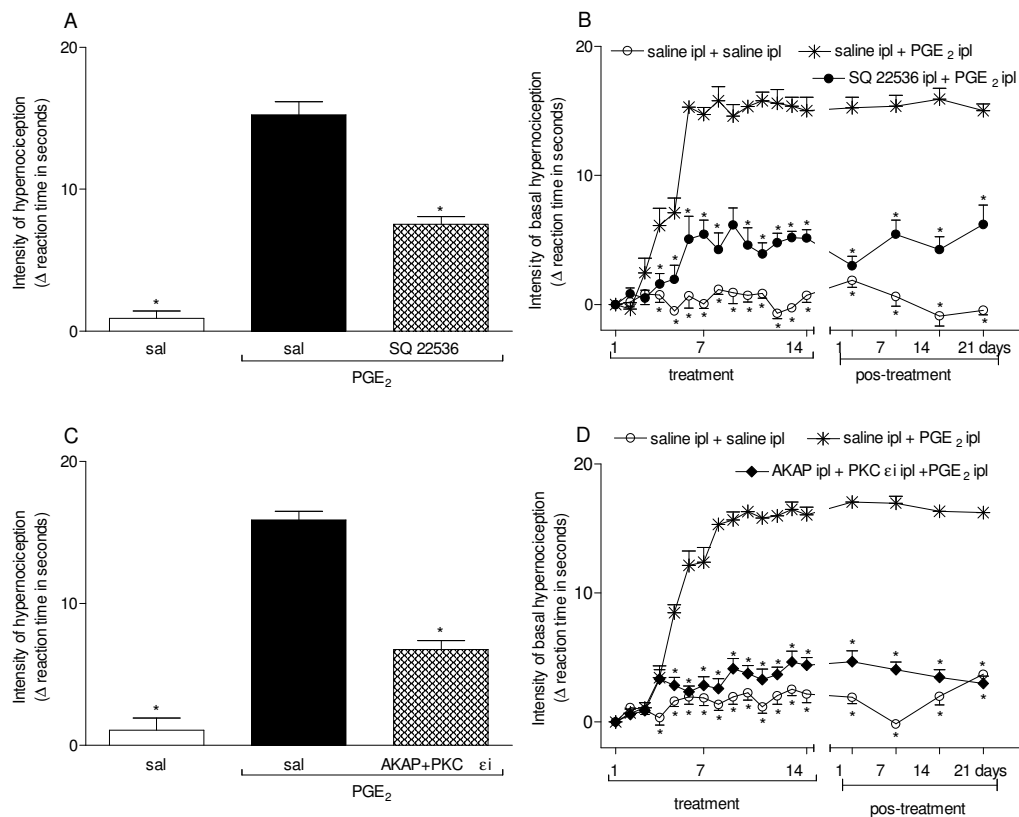


Figure 3. The AC, PKA and PKC ϵ activation seems be the underlying mechanism of PGE₂-induced persistent hypernociception installation. The pre-treatments with the AC inhibitor (SQ 22536, 25 μ g/50 μ L/paw), panels A-B), or the association of the PKA inhibitor (AKAP, 0.3 μ g/50 μ L/paw) plus the PKC ϵ inhibitor peptide (PKC ϵ i, 3 μ g/50 μ L/paw) (panels C-D) inhibited the acute (panels A and C), the changes in the basal nociceptive threshold of animals and the PGE₂-induced persistent hypernociception (100ng/50 μ L/paw)(panels B and D). The nociceptive test was conducted daily (basal threshold, panels B and C) or once, 3 hours after the treatments (panels A and D). The data represent mean \pm SEM, 4-6 animals, * significantly difference compared PGE₂ group; $p < 0.05$ (one-way ANOVA to panels A and C, and two-way ANOVA to panels B and D, followed by Bonferroni's test).

Figure 4

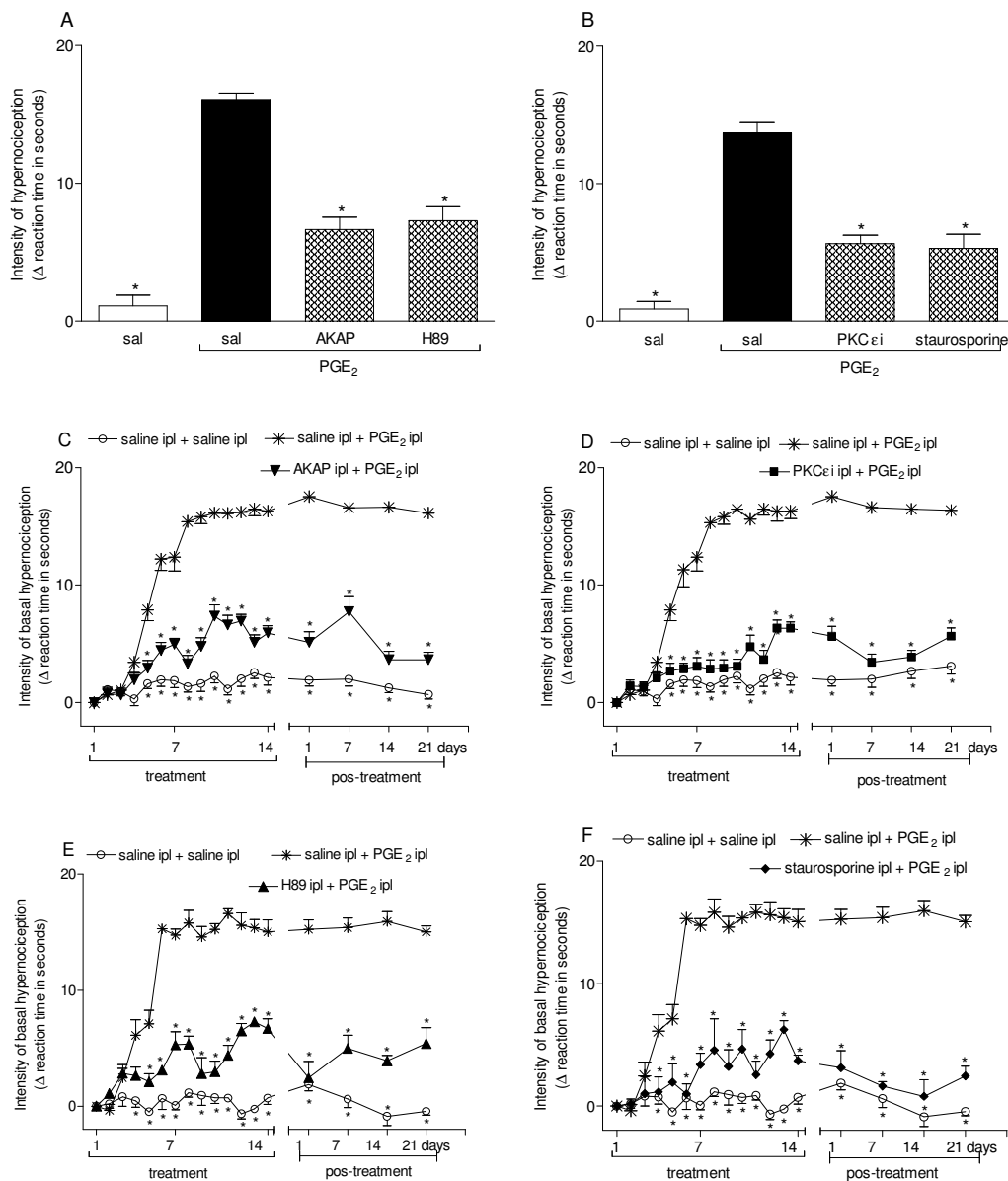


Figure 4. The PKA or PKC ϵ activation seems to have same importance to the underlying mechanism of PGE₂-induced persistent hypernociception installation. The pre-treatments with the PKA inhibitors: AKAP (0.3 μ g/50 μ L/paw, panel A and C) or H89 (27 μ g/50 μ L/paw, panel A and E); or with the PKC inhibitors: PKC ϵ inhibitor peptide (PKC ϵ i, 3 μ g/50 μ L/paw, panels B and D) or staurosporine (1 μ g/50 μ L/paw, panels B and F) inhibited the acute (panels A and B), the changes in the basal nociceptive threshold of animals and the PGE₂-induced persistent hypernociception (100ng/50 μ L/paw)(panels C-F). The nociceptive test was conducted daily (basal threshold, panels C-F) or once, 3 hours after the treatments (panels A and B). The data represent mean \pm SEM, 4-6 animals, * significantly difference compared PGE₂ group; $p < 0.05$ (one-way ANOVA to panels A and B, and two-way ANOVA to panels C-F, followed by Bonferroni's test).

Figure 5

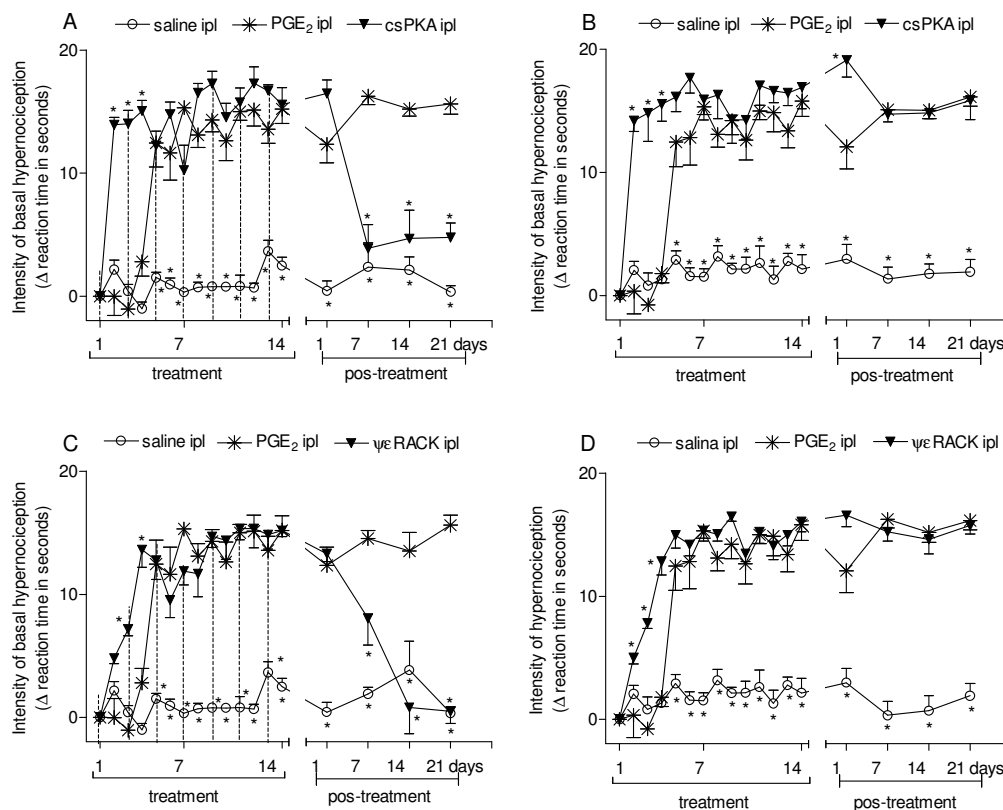


Figure 5. The csPKA or PKC ϵ agonist administration can induce a persistent hypernociception condition. The intraplantar treatments with the csPKA (3 U/paw/50 μ L, panel A) or the PKC ϵ -agonist, $\psi\epsilon$ RACK (3 U/pata/50 μ L, panel C) were conducted each two days, the days or treatments are indicated as dotted vertical lines. It was observed that the animals nociceptive threshold became hypernociceptive 24 - 48 hours after the first injection and returned to values no different from the saline-treated group in the 7th pos-treatment day, approximately. The treatments made daily (same doses and times) induced daily hypernociception during the whole treatment-period and the animals presented the persistent hypernociception phenotype during the pos-treatment period (21 days) (panel B to csPKA and panel D to PKC ϵ -agonist). The basal nociceptive threshold of animals in this case was a result of hypernociception and plastic changes observed to PGE₂-daily-treatment can not be detected using these drugs. The nociceptive test was conducted daily before the treatments during the installation period and during the installation period. The data represent mean \pm SEM, 4-6 animals, * significantly difference compared PGE₂ group, p < 0.05 (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

Figure 6

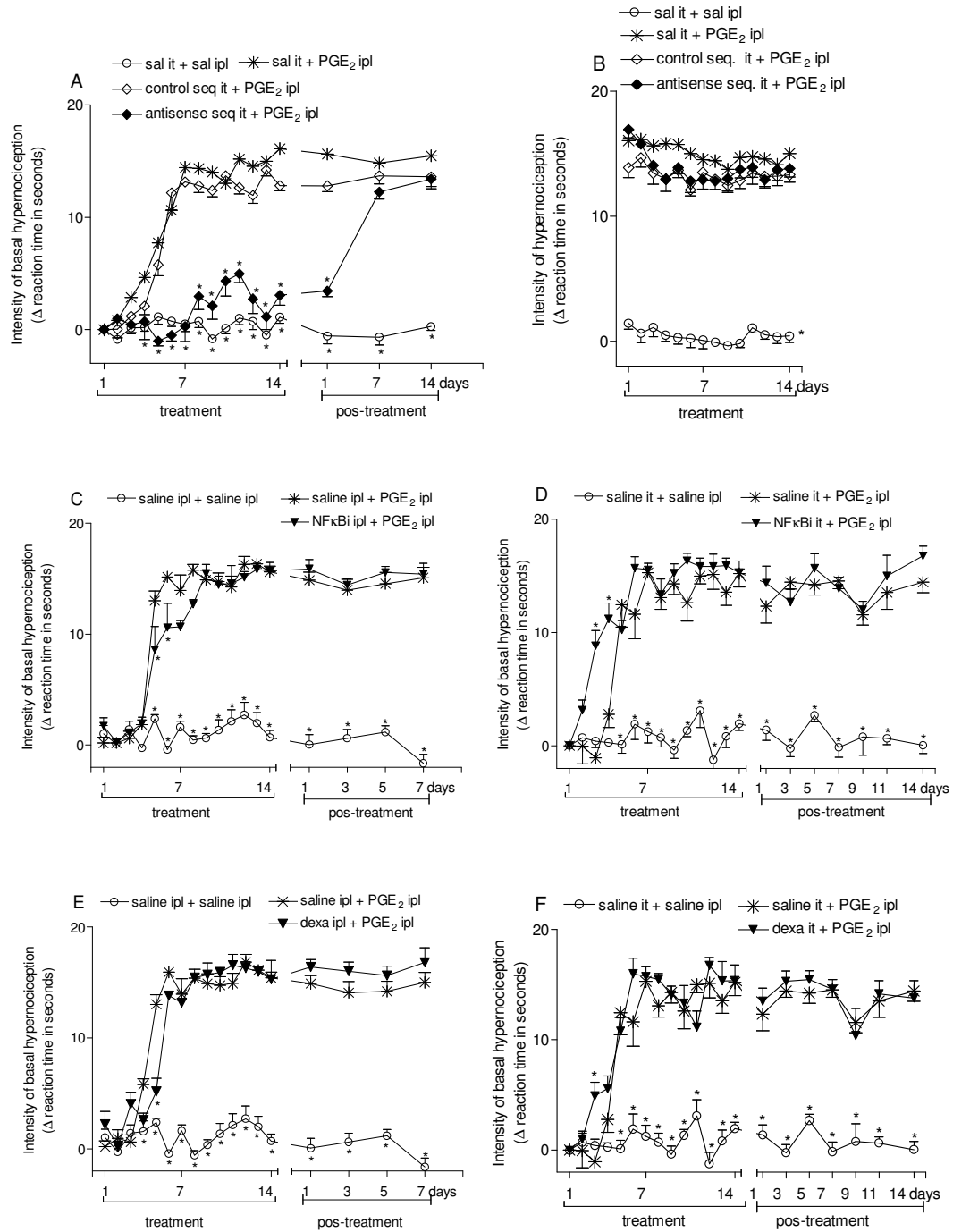


Figure 6. The installation of the PGE₂-induced persistent hypernociception is insensitive to treatments with glucocorticoids or transcription factors CREB and NF- κ B-inhibition. The administration of ODN antisense to CREB (20 μ g/10 μ L/intrathecal, panels A and B) was conducted during 4 days before starting the PGE₂ treatment (100ng/50 μ L/paw) and daily during the installation period. Although, the ODN-treatment inhibited the expression of the basal nociceptive threshold changes, it did not prevent the installation of the persistent condition (panel A). The ODN-treatment did not influence the hypernociception induced by PGE₂ when evaluated daily 3 hours after its administration (panel B). The daily pre-treatments with the NF- κ B inhibitor PDTC (20 μ M/50 μ L/paw, panel C or 200 μ M/10 μ L/intrathecal, panel D) or the glucocorticoid dexamethasone (25 μ g/50 μ L/paw, panel E or 25 μ g/10 μ L/intrathecal, panel F) did not prevent the PGE₂-induced persistent hypernociception installation. The nociceptive test was conducted daily before (panels A, C, D, E, F) and after the treatments (panel B) during the installation period and once a day during the pos-treatment period (panels A, C, D, E, F). The data represent mean \pm SEM, 4-6 animals, * significantly difference compared PGE₂ group, panel B all the curve dots; $p < 0.05$ (two-way ANOVA followed by Bonferroni's test).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)