

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**THIAGO MATTAR CUNHA**

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO  
PRODUZIDO PELA AÇÃO PERIFÉRICA DOS OPIÓIDES: ATIVAÇÃO DA VIA DE  
SINALIZAÇÃO INTRACELULAR PI3K $\gamma$ /AKT/ÓXIDO NÍTRICO.**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**THIAGO MATTAR CUNHA**

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO  
PRODUZIDO PELA AÇÃO PERIFÉRICA DOS OPIÓIDES: ATIVAÇÃO DA VIA DE  
SINALIZAÇÃO INTRACELULAR PI3K $\gamma$ /AKT/ÓXIDO NÍTRICO**

**Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo como  
requisito para a obtenção do grau de  
Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Farmacologia**

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique  
Ferreira.**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando de  
Queiroz Cunha.**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2008**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago Mattar Cunha

Mecanismos moleculares envolvidos no efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides: ativação da via de sinalização intracelular PI3K $\gamma$ /AKT/óxido nítrico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia

Aprovada em:

### **Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira

Instituição: FMRP-USP Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Wiliam Alves do Prado

Instituição: FMRP-USP Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas

Instituição: FMRP-USP Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dra. Yara Cury

Instituição: Instituto Butantan Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Instituição: UFSC Assinatura: \_\_\_\_\_

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

***DEDICATÓRIA***

## **À minha eterna amada Fafá**

“Eu sei que vou te amar

Por toda a minha vida eu vou te amar

Em cada despedida eu vou te amar

Desesperadamente, eu sei que vou te amar

E cada verso meu será

Prá te dizer que eu sei que vou te amar

Por toda minha vida

Eu sei que vou chorar

A cada ausência tua eu vou chorar

Mas cada volta tua há de apagar

O que esta ausência tua me causou

Eu sei que vou sofrer a eterna desventura de viver

A espera de viver ao lado teu

Por toda a minha vida”

# ***AGRADECIMENTOS***



## Agradeço

Aos meus pais, Pedro e Vera e ao meu irmão Daniel, por todo o apoio em mais esta jornada. Muito obrigado pela dedicação durante estes anos, e mais ainda pelo amor incondicional.

À minha maravilhosa família, que sempre acreditou em mim e que vem sonhando comigo todos estes anos. Muito obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira, pela orientação e a confiança em meu trabalho. Muito obrigado por sua amizade.

Ao grande mestre, Prof. Dr. Fernando Cunha, pela confiança em meu trabalho, oportunidade de trabalhar em seu laboratório e principalmente sua amizade.

Aos Profs. Dr. Guilherme Lucas, Dr. William Alves Prado, Dr. Giles Alexander Rae e Dra. Yara Cury pela disponibilidade de participar da minha banca examinadora, pela atenção, e principalmente pela maneira tão gentil em que me atenderam.

Ao Prof. Dr. Mauro Teixeira pela ajuda científica muito importante na minha formação e também pela amizade.

Ao Prof. Dr. John Hothersall, pela ajuda nos experimentos de quantificação de óxido nítrico, discussões científicas e também por sua amizade.

À minha querida amiga Celina Lotufo, você também é responsável por este trabalho, muito obrigado por sua ajuda e amizade.

Ao Prof. Jader Cruz que abriu seu laboratório para a realização dos experimentos de eletrofisiologia e a seu aluno Hugo Leonardo, que prontamente aceitou o desafio de realizar estes experimentos.

Ao Prof. Dra. Silvana Chiavegatto, pela gentileza em nos conceder os animais deficientes para nNOS.

Ao Prof. Dr. Francisco Guimarães, pelas orientações nas análises estatísticas deste trabalho e também pela amizade.

Ao meu querido amigo, Guilherme, não só por sua ajuda imprescindível neste trabalho, mas também pela amizade tão sincera. Valeu Tião.

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Waldiceu, pelas altas discussões científicas durante estes anos, pela ajuda neste trabalho, mas principalmente pela confiança e amizade.

À minha ex-aluna de iniciação científica Andressa Domingues pela ajuda na realização de experimentos deste trabalho e também pela amizade.

Ao meu “grande” amigo, Sergio Rosa, por sua ajuda durante estes 7 anos, mas principalmente por sua amizade. Muito obrigado, meu amigo.

À Fabíola Mestriner, pela ajuda nos experimentos de Blot e PCR, e também pela amizade. Muito obrigado fofinha.

Ao meu grande amigo Silvio Vieira, pela ajuda com várias figuras desta tese, mas principalmente pelo companheirismo e amizade sincera.

Aos meus amigos, Fernando Spiller e Fabrício Souto, pela amizade e companheirismo.

Ao mais novo Prof. do Departamento de Farmacologia, Dr. Leonardo Resstel, muito obrigado por esses anos de convivência e principalmente por nossa tão sincera amizade.

À Mani Funez, muito obrigado por sua ajuda e discussão na parte inicial deste trabalho.

As minhas queridas amigas, Ana Tereza Guerrero, Andressa de Freitas, Dani Secco e Vanessa Carregaro pela amizade sincera e pelo apoio em todos os

momentos. Agradeço por conviver com pessoas tão sensatas e integras como vocês.

À minha querida amiga Giuliana Bertozzi Francisco, muito obrigado por sua ajuda em vários experimentos e principalmente por seu enorme carinho.

À Ieda Regina dos Santos Schivo, por sua ajuda neste trabalho e pela amizade.

À Ana Kátia dos Santos (Katinha), pela ajuda profissional, mas principalmente pelo carinho e amizade durante estes anos.

À Diva Amábile de Sousa pela convivência, pelo carinho e amizade.

À Dr. Eleni Tamburus e Tadeu Vieira pela ajuda nos experimentos de histologia e pelo carinho.

À Vani Correa, pelas discussões e dicas em relação aos experimentos de imunofluorescência e também pelo carinho e amizade.

Aos amigos do laboratório de Inflamação e Dor: Larissa, Henrique, Renata, Sandra, Zeca, Luiz Fernando, Paulo, Adriana, Paulinha, Joze, Paula, Dani Nascimento, Dani Carlos, Fabiane, Trícia, Eleonora, Vítor, Maria, Mari, Ibraim, Danilo, Rafaela, Thiago G e Francine. Obrigado por transformar nosso laboratório em um lugar maravilhoso pra se trabalhar.

Aos amigos Valéria Cristina Squissato e Acácio Antunes Cardoso pela ajuda nesta fase de minha vida, dedicação em suas atividades, mas principalmente pela amizade.

Aos amigos do DOL, pelas produtivas discussões, mas também pela amizade.

A todos os docentes do Departamento de Farmacologia da FMRP e FCFRP-USP, em especial áqueles que participaram mais diretamente da minha formação científica: Prof. Dr. Adalberto Rosa, Prof. Dr. Alexandre Conrado, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana

Maria de Oliveira, Prof. Dr. Antônio Roberto Martins, Prof. Dr. Fernando Morgan, Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, Prof. Dr. Gustavo Ballejo Oliveira, Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr, Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lusiane Maria Bendhack, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Cristina de Oliveira Salgado, Por. Dr. Norberto Coimbra por todo ensinamentos durante esta jornada mas também pelo convívio.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, pelo convívio e amizade. Gostaria muito de citá-los individualmente, mas deixo aqui meu agradecimento especial a todos vocês.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP: Sônia Maria Stefanelli, Fátima Helena Petean, e José Valdik Ramon pela dedicação, amizade e competência nas resoluções administrativa. Obrigado pelo nosso maravilhoso convívio.

Aos bioteristas, Julio Siqueira, Maria Inês Castrechini Nemoto e Eliana Beatriz Castrechini de Barros, pelo cuidado com os animais do biotério, tão importantes para nosso trabalho, e principalmente pelo carinho comigo.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, pela competência e dedicação e também pelo convívio.

À FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e também a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante este período.

“O sábio procura a ausência de dor e não o prazer”.

**Aristóteles**

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

(-/-): deficientes homozigotos

μg: micrograma –  $10^{-6}$  do grama

μL: microlitros –  $10^{-6}$  do litro

AINES: antiinflamatórios não-esteroidais

AKT: proteína quinase B

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

ATP: adenosina trifosfato

°C: graus Celsius

CFA: adjuvante completo de Freund

Cg: carragenina

CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

cm: centímetros

COX: enzima cicloxigenase

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

E.P.M.: erro padrão da média

g: gramas

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

GRD: gânglio da raiz dorsal

h: hora

hs: horas

IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain*)

i.p: intraperitoneal

i.pl.: intraplantar

K<sub>ATP</sub>: canais de potássio sensíveis ao ATP

kg: quilograma

mg: miligrama

mL: mililitro

mm<sup>2</sup>: milímetros quadrados

mmHg: milímetros de mercúrio

ng: nanogramas

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

NGF: Fator de Crescimento do Nervo

PAG: substância cinzenta periaquedutal

pg: picogramas

PI3K $\gamma$ : Fosfatidilinositol 3-quinase isoforma gama

PGE<sub>2</sub> : prostaglandinas E<sub>2</sub>

s: segundos

SP: substância P

***RESUMO***



## RESUMO

Cunha, T.M. **Mecanismos moleculares envolvidos no efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides: ativação da via de sinalização intracelular PI3K $\gamma$ /AKT/óxido nítrico.** 2008. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2008.

O aumento da intensidade dolorosa durante o processo inflamatório (hiperalgesia/hipernocicepção) é causado, principalmente, pela sensibilização de uma classe específica de neurônios nociceptivos primários (nociceptores), devido à ação direta de um conjunto de mediadores inflamatórios, descritos como mediadores hipernociceptivos finais (prostaglandinas e aminas simpáticas). Neste sentido, o controle farmacológico periférico da dor inflamatória baseia-se em duas estratégias principais: a) uso de fármacos que previnem a sensibilização dos nociceptores (ex: inibidores de COX), ou seja, inibem a liberação e/ou ação de substâncias que os sensibilizam; b) fármacos que revertem diretamente à sensibilização dos nociceptores já instalada, como a dipirona e principalmente os opióides. Em relação aos efeitos analgésicos produzidos pela ação periférica dos opióides, demonstrou-se que este é dependente da ativação da via óxido nítrico/GMPc, a qual culmina na abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP, restaurando o potencial de membrana dos neurônios nociceptivos. No entanto, os mecanismos intracelulares envolvidos na ativação desta via, ainda não estão estabelecidos. No presente estudo, foram descritas tanto evidências *in vivo* quanto *in vitro* de que a ativação desta via de sinalização depende da estimulação da via intracelular PI3K $\gamma$ /AKT. Estes resultados revelam um até então desconhecido papel da via PI3K $\gamma$ /AKT para o efeito periférico dos opióides. Além disso, os resultados obtidos abrem uma nova perspectiva no mecanismo molecular de ação de velhas drogas analgésicas com efeito periférico e também no desenvolvimento de novas drogas.

Palavras-Chave: Opióides, dor inflamatória, PI3K $\gamma$ , hipernocicepção, morfina, hiperalgesia, antinocicepção.

***ABSTRACT***

## ABSTRACT

CUNHA, T.M. **Molecular mechanisms involved in the peripheral antinociceptive effect of opioids: activation of the intracellular signaling pathway PI3K $\gamma$ /AKT/nitric oxide.** 2008. Thesis (Doctoral) – School of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2008.

The increased intensity of nociception during inflammation (hyperalgesia/hypernociception) is primary due to the sensitization of specific classes of primary nociceptive neurons by direct action of inflammatory mediators such as prostaglandins. In this context, peripheral pharmacologic control of inflammatory pain is mainly based in two principal strategies. The first is the used of NSAIDS (aspirin and aspirin-like drugs) which the mechanism of action based in the inhibition of prostaglandin production consequently preventing nociceptor sensitization. This effect ultimately prevents the development of hyperalgesia in humans or hypernociception in animals (decrease in nociceptive threshold). On the other hand, some peripheral analgesic such as morphine and dipyrrone, are able to directly block ongoing nociceptor sensitization. In fact, these drugs reverse already established hypernociception induced by prostaglandin E<sub>2</sub>-(PGE<sub>2</sub>) injected in the rat hind paws. Opioids directly block hypernociception via the activation of neuronal nitric oxide/cGMP/PKG/K<sub>ATP</sub> channels signaling pathway. However, the mechanism by which opioids activate this pathway is unknown. In the present study, we provide *in vivo* and *in vitro* evidences that the activation of this antinociceptive pathway depends on the initial stimulation of PI3K $\gamma$ /AKT. These results reveals a previous unknown role of PI3K $\gamma$ /AKT signaling on peripheral blockade of hypernociception by opioids. Furthermore, they open new perspectives in the molecular mechanism of old peripheral analgesic drugs and also for development of new analgesic drugs.

Key Words: Opioids, inflammatory pain, PI3K $\gamma$ , hipernociception, morphine, hyperalgesia, antinociception.

# ***SUMÁRIO***

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 Dor .....	16
1.2 Dor Inflamatória .....	22
1.3 Controle Farmacológico Periférico da Hiperalgisia/Hipernocicepção Inflamatória .....	29
1.4 PI3K $\gamma$ /AKT/OXIDO NÍTRICO .....	37
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>41</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
3.1 Animais Experimentais .....	42
3.2 Avaliação Nociceptiva .....	43
3.3 Cultura de Neurônios Derivados do GRD .....	47
3.4 Análises de Western Blot .....	48
3.5 Imunofluorescência .....	51
3.6 Quantificação da Produção de NO por Neurônios do GRD .....	52
3.7 RT-PCR Convencional .....	53
3.8 Drogas .....	54
3.9 Protocolos Experimentais .....	55
3.10 Análise Estatística .....	61
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>62</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>121</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>146</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>147</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>175</b>

# ***INTRODUÇÃO***

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Dor

A dor é um dos principais problemas da nossa sociedade atual. Além de gerar estresses físicos e emocionais para os pacientes, ela traz alto custo financeiro e social, uma vez que leva a uma breve ou, até mesmo, permanente incapacitação de milhões de pessoas. Desde os primórdios do ser humano, segundo alguns registros históricos, o homem sempre procurou esclarecer as razões que justificassem a ocorrência da dor e os procedimentos utilizados em seu controle. Estudos antropológicos relatam que as primeiras tentativas de conter a dor consistiam em rituais, aos quais, posteriormente, foi acrescentado o uso de plantas com possíveis efeitos analgésicos.

Etimologicamente, a palavra dor provém do latim *dolore* e significa sofrimento físico ou moral, pena, desgosto, tormento, aflição e tristeza. Vários indivíduos tentaram definir a dor. Homero, por exemplo, acreditava que ela era resultado de “flechadas atiradas por deuses”, revoltados com os humanos. Para Aristóteles, quem descreveu pela primeira vez as cinco modalidades sensoriais (visão, gustação, olfação, audição e tato), a dor era uma “paixão da alma” (ou padecimento), sendo considerada uma experiência oposta ao prazer. Já Platão considerava que a dor originava-se não somente da estimulação periférica, mas também da experiência emocional originada no espírito, uma idéia que vai além da concepção de distúrbio meramente localizado no organismo e que, talvez, tenha deixado indícios para o conceito de dor como experiência emocional. Por fim, Descartes propôs que a dor resultava da desarmonia entre o sistema nervoso periférico e o encéfalo, sendo a

percepção pela alma da ação de objetos externos sobre o corpo ou no seu interior (TEIXEIRA; OKADA, 2003).

Atualmente, a dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial”. Portanto, além de envolver a percepção dos estímulos nocivos pelo sistema nervoso central quando receptores sensoriais especializados (nociceptores) são ativados (NOBACK et al., 1996; LOESER; MELZACK, 1999), a dor apresenta um componente afetivo-motivacional, incluindo atenção e aprendizagem (LOESER; MELZACK, 1999). Recentemente, nosso grupo vem trabalhando com uma forma mais simplificada dessa definição, considerando a dor a **“percepção desagradável de uma sensação nociceptiva”**. Este conceito também envolve dois componentes da dor, a nocicepção e a sua percepção. A nocicepção (do latim *nocere*, “ferir”), ou sensação nociceptiva, resulta da detecção seletiva de estímulos capazes de comprometer a integridade física de um organismo. A percepção é uma função integrativa modulada por condições emocionais, motivacionais e psicológicas, bem como experiências de vida de cada pessoa. A partir dessas considerações, dor seria o termo mais adequado quando se refere ao ser humano, enquanto nocicepção seria mais indicado para animais experimentais, uma vez que não se entende a percepção nos mesmos (NOBACK et al., 1996).

Os estímulos nocivos (ou nociceptivos), sejam eles físicos (mecânicos ou térmicos) ou químicos (bradicinina, capsaicina, serotonina, prótons etc.), são detectados por nociceptores presentes nos diferentes tecidos. Os nociceptores são terminações nervosas livres, ramificadas e não-mielinizadas, de uma família específica de neurônios sensoriais primários. O termo nociceptor também é comumente utilizado para definir o neurônio nociceptivo primário como um todo, não apenas as suas terminações nervosas livres, sendo que neste trabalho, quando se



utilizar esse termo, estará tratando do neurônio nociceptivo. Os nociceptores são neurônios pseudo-unipolares, possuindo um ramo axonal distal, que se dirige à periferia, e outro ramo axonal proximal, que se dirige ao corno dorsal da medula espinal ou ao tronco cerebral. Eles inervam amplamente pele, mucosas, músculos, articulações e vísceras. Os nociceptores que inervam a cabeça e o pescoço vão compor os nervos cranianos e possuem seus corpos celulares, principalmente, no gânglio trigeminal, mas também se verificam em núcleos presentes no tronco cerebral (eg. núcleo mesencefálico trigeminal). Já os corpos celulares das fibras que inervam tronco e membros estão nos gânglios da raiz dorsal (GRDs) dos nervos espinais (revisado por BESSON; CHAOUCH, 1987; MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Baseado em critérios morfológicos, as fibras nociceptivas podem ser classificadas em fibras de pequeno e médio diâmetro. As fibras de médio diâmetro, também denominadas fibras A $\delta$ , são finamente mielinizadas e possuem velocidades de condução entre 2 e 30 m/s. Elas correspondem a 20% das fibras que conduzem a informação nociceptiva e são responsáveis pela dor de curta duração, aguda e lancinante, sentida após uma estimulação nociva. As fibras de pequeno diâmetro, também denominadas fibras C, não são mielinizadas e por isso possuem velocidade de condução baixa (0,5 - 2 m/s), sendo responsáveis pela dor de longa duração e difusa (revisado por MILLAN, 1999; JULIUS E BASBAUM, 2001). Elas correspondem a 80% das fibras condutoras da informação nociceptiva. Também existem diferenças quanto ao tipo de estímulo nociceptivo capaz de ativar essas fibras. Enquanto as fibras A $\delta$  respondem, principalmente, a estímulos mecânicos e térmicos, as fibras C são ditas polimodais e respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (revisado por JULIUS E BASBAUM, 2001). As fibras C também têm sido implicadas na transmissão de estímulos responsáveis pelo prurido (JOHANEK et al., 2008).

Dentro do grupo de fibras C, há uma população de neurônios que apresentam alto limiar de ativação, que em situações normais não respondem a estímulos térmicos ou mecânicos. No entanto, durante um processo inflamatório esses neurônios passam a ser mais facilmente ativáveis, tornando-se responsivos tanto a estímulos mecânicos quanto térmicos. Eles foram denominados “nociceptores dormentes ou silenciosos” (SCHAIBLE e SCHMIDT, 1988; revisado por MCMAHON e KOLTZENBURG, 1990). Convém ressaltar que, durante processos patológicos (eg. neuropatias) nos quais ocorre uma plasticidade neuronal central, as fibras A $\beta$ , de largo diâmetro e altamente mielinizadas, responsáveis pela detecção de estímulos inócuos (eg. táteis), podem passar a responder como nociceptores. Nestas condições, estímulos táteis inócuos, detectados por estas fibras, são interpretados como nociceptivos, dando origem ao fenômeno de alodinia.

As fibras C são divididas em dois grupos principais com base em estudos histoquímicos. Existem as chamadas fibras C peptidérgicas, que são capazes de produzir e liberar neuropeptídeos, como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Essa classe de fibras C ainda expressam TrkA, o receptor tirosina quinase de alta afinidade para o fator de crescimento do nervo (NGF). A segunda população de fibras C, denominadas não-peptidérgicas, não é capaz de produzir SP nem CGRP, bem como não expressa o receptor TrkA. No entanto, este tipo de fibra pode ser marcado seletivamente com  $\alpha$ -D-galactosil-isolectina B<sub>4</sub> (IB<sub>4</sub>) e expressa o receptor P2X<sub>3</sub>, um subtipo específico de canal ativado por ATP (revisado por JULIUS; BASBAUM, 2001). Uma possível diferença funcional entre essas duas classes de fibras C ainda não está bem definida.

Temporalmente e de forma simplificada, pode-se dizer que, na periferia, a informação nociceptiva (ou seja, um estímulo nociceptivo) é reconhecida por

moléculas sinalizadoras específicas (eg. TRPV1, TRPA1, TRPM8 etc.) presentes nos nociceptores (fibras A $\delta$  e C), convertida em impulsos elétricos e transmitida pelos nervos espinais e cranianos aos neurônios de segunda e terceira ordem no sistema nervoso central. Os nociceptores que transmitem a informação nociceptiva de estruturas cranianas contraem sinapses diretamente com neurônios secundários, em núcleos no tronco cerebral. Já os presentes nos membros e tronco conduzem a informação nociceptiva para o sistema nervoso central através da raiz dorsal da medula espinal, onde contraem sinapses com neurônios de segunda ordem. Estas sinapses ocorrem no corno dorsal da medula espinal na substância cinzenta, que foi dividida com base citoarquitetônica por REXED (1954) em dez lâminas, sendo a lâmina I a mais superficial, a partir da região dorsal. A maioria dos nociceptores termina nas lâminas mais superficiais, sendo que as fibras A $\delta$  contraem sinapse com neurônios secundários presentes nas lâminas I, II e também na V, e as fibras C, principalmente, com neurônios da lâmina II, também conhecida como substância gelatinosa. É importante mencionar, ainda, que as fibras A $\beta$  terminam principalmente nas lâminas III, IV e V (revisado por BESSON; CHAOUCH 1987; RIEDEL; NEECK, 2001). A comunicação entre os neurônios nociceptivos primários e secundários depende da liberação de vários neurotransmissores, sendo que o mais estudado é o glutamato (SCHNEIDER; PERL, 1994; LIU et al., 1997). Outros neurotransmissores, como SP e CGRP, parecem estar envolvidos na modulação da transmissão espinal (WOOLF; WIESENFELD-HALLIN, 1986; GARRY; HARGREAVES, 1992)

A propriedade funcional dos neurônios secundários dentro de cada lâmina da medula espinal tende a ser um reflexo da distribuição das terminações dos neurônios aferentes primários. Por exemplo, as lâminas I e II contêm, principalmente, neurônios que possuem alto limiar de excitabilidade, os quais respondem, exclusivamente, à estimulação cutânea nociva. Estes neurônios secundários são denominados

nociceptivos específicos ou NS, do inglês “nociceptive specific”. Por outro lado, a maioria dos neurônios presentes nas lâminas IV e V respondem à estimulação tátil. Há ainda um grupo de neurônios secundários presentes, principalmente, na lâmina V, que respondem tanto a estímulos de baixa quanto de alta intensidade, provindos tanto de fibras de grande quanto de pequeno diâmetro. Esses são denominados neurônios de amplo espectro dinâmico de resposta (WDR) ou neurônios multi-receptivos (WILSON; KITCHENER, 1996).

A magnitude das respostas dos neurônios no corno dorsal da medula espinal não ocorre simplesmente em função da natureza e intensidade da informação nociceptiva aferente. Ela é também resultado de uma série de sistemas neuronais distintos, que funcionam modulando os eventos, os quais ocorrem durante o processamento da informação nociceptiva em nível espinal. Por exemplo, na lâmina II, ou substância gelatinosa, existem vários interneurônios inibitórios que se projetam para outras regiões do corno dorsal, constituindo um importante mecanismo de regulação da transmissão nociceptiva. Além disso, existem várias evidências de que estruturas no tronco cerebral enviam projeções neuronais até a medula espinal, as quais, pela liberação de diferentes neurotransmissores (serotonina, noradrenalina etc.), são capazes de modular tanto positivamente quanto negativamente a passagem do estímulo nociceptivo. Esses fenômenos são denominados controle descendente facilitatório e inibitório da dor, respectivamente (revisado por MILLAN, 2002).

Após a informação nociceptiva ser passada dos neurônios primários para os secundários e sofrer todas essas modulações, ela ascende através de diferentes tratos nervosos específicos até a convergência com populações de neurônios no núcleo posterior ventral do tálamo. Essa informação neural se projeta, então, do tálamo para áreas sensoriais do córtex cerebral, região onde as várias

submodalidades, como qualidade, intensidade, localização e o seu aspecto afetivo emocional, são integrados na experiência da percepção (NOBACK et al., 1996).

## **1.2 Dor Inflamatória**

Uma resposta inflamatória aguda é iniciada após a lesão tecidual, bem como após o reconhecimento, pelo sistema imunológico, de um agente estranho ao organismo ou de estruturas próprias como sendo não-próprias. Entre os primeiros sinais de um processo inflamatório, estão o rubor e o calor, decorrentes, principalmente, da arteríolo-dilatação local. Estes sinais inflamatórios podem ser considerados uma tentativa do tecido de facilitar a remoção do agente injuriante, como toxinas e bactérias, aumentando a área para migração das células de defesa para o local da lesão. Durante a fase aguda, devido à formação do edema inflamatório (tumor), ocorre também o aumento da drenagem linfática, que ajuda a remover certos elementos estranhos ou restos celulares e, o mais importante, facilita o trânsito de células imunológicas essenciais para a defesa do organismo. Em acréscimo a esses eventos, há o desenvolvimento concomitante de um denominador comum aos processos inflamatórios: o aumento da sensação dolorosa e/ou a diminuição do limiar de dor a estímulos que normalmente não produzem ou produzem pouca dor.

Alterações plásticas nos neurônios que transmitem a nocicepção são responsáveis pelas modificações nas sensações dolorosas observadas durante o processo inflamatório (revisado por MILLAN, 1999). A plasticidade neuronal pode ocorrer tanto em nível periférico quanto central. Ela é importante no aparecimento de dois fenômenos da dor inflamatória: a hiperalgesia e a alodinia. HARDY et al. (1950) definiram hiperalgesia como “um estado de intensificação da sensação dolorosa

mediante uma estimulação nociva”, enquanto alodinia é definida pela IASP como “a dor decorrente de um estímulo normalmente não doloroso”. Enquanto o aparecimento do fenômeno de hiperalgesia parece estar associado, principalmente, à sensibilização dos nociceptores (sensibilização periférica), o processo de alodinia parece também envolver uma plasticidade neuronal no sistema nervoso central, em especial na medula espinal (revisado por WOOLF; SALTER, 2000; ZEILHOFER; ZEILHOFER, 2008). Eletrofisiologicamente, a sensibilização dos nociceptores é caracterizada pela diminuição do limiar de excitabilidade necessário para ativá-lo, pelo aumento da atividade espontânea da célula nervosa e pelo aumento na frequência de disparo em resposta a estímulos supralimiáres (WALL & MELZACK, 1999).

É importante ressaltar que as definições de hiperalgesia e alodinia foram elaboradas para serem usadas em humanos, pois a alodinia possui uma característica fundamental que é induzir também uma mudança qualitativa na percepção da sensação esperada com base nas características do estímulo aplicado, ou seja, ocorre uma perda da especificidade da modalidade sensorial (eg. estímulos táteis causam dor). Assim, alodinia é uma característica principalmente das neuropatias, as quais se caracterizam por lesões neuronais, fazendo com que estímulos de pouca intensidade e pequena duração passem a causar dores lancinantes ou sensações de queimação contínua. Contudo, esta característica de alteração da percepção não pode ser avaliada nos modelos experimentais usuais de nocicepção animal, embora o uso impróprio deste termo tenha se generalizado nas descrições do modo de ação e nas pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de doenças como as neuropatias. Em função disso, a diminuição do limiar nociceptivo, que ocorre durante a inflamação, será referida neste texto como hipernocicepção inflamatória ou, simplesmente, hipernocicepção,

quando houver referências a experimentos de nocicepção animal, e como hiperalgesia, quando ocorrer no homem.

### **1.2.1 Mecanismos Não-Neuronais da Hiperalgesia/Hipernocicepção Inflamatória**

A dor de origem inflamatória resulta, basicamente, da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios. Há mediadores inflamatórios que apenas sensibilizam os nociceptores e mediadores (e estímulos) que desencadeiam a resposta nociceptiva. A dor inflamatória aguda (declarada) resulta da ação de um estímulo desencadeante (mecânico, químico ou térmico) ou de um mediador, como, por exemplo, a bradicinina, que ativa esses neurônios periféricos sensibilizados. Já a hiperalgesia/hipernocicepção inflamatória é o resultado de modificações funcionais nos neurônios aferentes primários nociceptivos por uma ativação metabotrópica em todo neurônio sensitivo. Atualmente, quando se refere à sensibilização dos nociceptores, não se está apenas mencionando suas extremidades periféricas, mas pode-se dizer que a hiperalgesia/hipernocicepção é resultado de um fenômeno que ocorre em toda extensão do neurônio nociceptivo. Essas modificações funcionais da excitabilidade neuronal são induzidas por mediadores inflamatórios liberados diretamente pelas células danificadas pelo trauma tecidual ou pelo reconhecimento de um elemento estranho ao organismo pelas células residentes do sistema imunológico, como os mastócitos, ou, mais especificamente, os macrófagos. Pode-se chamar os macrófagos de células “de alarme”, uma vez que estas reconhecem o “agente estranho” e desencadeiam a resposta inflamatória, ou seja, ativam uma resposta imune inata (ou “de nascença”).

Um ponto importante no que se refere à indução da hipernocicepção/hiperalgesia inflamatória é que a liberação dos mediadores respeita uma hierarquia temporal de liberação e de ação. Quando se realiza uma análise do exsudato inflamatório, colhido em uma fase tardia de um processo inflamatório agudo, é possível detectar uma “sopa” de mediadores. Porém, se for realizada uma análise temporal cuidadosa desse exsudato, observar-se-á que a liberação dos mesmos segue uma seqüência definida. É por esta razão que, ao se bloquear um passo desta seqüência, pode-se inibir o desenvolvimento de determinados eventos, sinais e sintomas do processo inflamatório, inclusive a dor (CUNHA et al., 2007).

Os mediadores inflamatórios liberados durante a resposta inflamatória, no que se refere à dor, podem ser divididos em dois grupos: os mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos intermediários e os mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos finais. Os primeiros são liberados no início e durante a inflamação, sendo responsáveis pela liberação de outros mediadores. Já os mediadores finais interagem diretamente com seus receptores específicos, presentes nos neurônios aferentes primários, provocando sua sensibilização (CUNHA et al., 2007).

Dentre os mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos finais pode-se destacar as prostaglandinas, principalmente, as da série E, como substâncias que sensibilizam diretamente os nociceptores, desencadeando a hipernocicepção. A habilidade das prostaglandinas em sensibilizar diretamente os nociceptores foi observada em humanos e animais, com a utilização de técnicas eletrofisiológicas e também comportamentais (FERREIRA, 1972; FERREIRA et al., 1978; MARTIN et al., 1987). Elas são produzidas pela ação da enzima ciclooxigenase utilizando-se do ácido araquidônico como substrato. Em condições fisiológicas, o ácido araquidônico encontra-se esterificado nos fosfolípídios de membrana, sendo mobilizado durante o



processo inflamatório pela fosfolipase A<sub>2</sub>, que é ativada por estímulos químicos, mecânicos e produtos microbianos (FERREIRA; VANE, 1967; FUNK, 2001; IVANOV & ROMANOVSKY, 2004).

Além das prostaglandinas, inúmeros estudos experimentais também demonstram a existência de um componente simpático na sensibilização dos nociceptores durante um processo inflamatório. Foi observado que substâncias, como as aminas simpáticas (Ex: noradrenalina, adrenalina e dopamina), são capazes de induzir hipernocicepção mecânica de forma semelhante às prostaglandinas (NAKAMURA; FERREIRA, 1987; KHASAR et al., 1999a). Além disso, inibidores da liberação das aminas simpáticas e antagonistas de receptores adrenérgicos reduzem parcialmente a hipernocicepção inflamatória mecânica (NAKAMURA; FERREIRA, 1987; SAFIEH-GARABEDIAN et al., 2002, PARADA et al., 2003). Embora as prostaglandinas e as aminas simpáticas sejam as substâncias que sensibilizam diretamente os nociceptores, mais extensivamente estudadas, outras substâncias também apresentam esta propriedade. Nesse contexto, podem-se destacar as endotelinas e os leucotrienos. (LEVINE et al., 1984; MARTIN et al., 1987; FERREIRA et al. 1989; ZHOU et al., 2002). A liberação desses mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos finais (prostaglandinas, aminas simpáticas e endotelinas), geralmente, é precedida pela liberação de mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos intermediários (CUNHA et al., 1992; VERRI JR et al., 2004; CUNHA et al., 2005). Entre os mediadores intermediários destacam-se as citocinas como sendo os mediadores que possuem papel mais bem caracterizado na dor inflamatória (revisado por VERRI JR et al., 2006). Estes mediadores que, a princípio, pareciam ser importantes apenas no recrutamento de leucócitos (neutrófilos) para o foco inflamatório, mostraram-se relevantes também na gênese da dor. As citocinas mais estudadas na hipernocicepção inflamatória são o Fator de

Necrose Tumoral (TNF)-alfa, a Interleucina(IL)-1 e a IL-8 (revisado por VERRI JR et al., 2006). Foi demonstrado, tanto em ratos, quanto em camundongos, que estas citocinas são liberadas seqüencialmente durante o processo inflamatório e constituem uma ligação entre o estímulo inflamatório e a liberação dos mediadores finais da hipernocicepção (revisado por VERRI JR et al., 2006).

### **1.2.2 Mecanismos Neuronais da Hiperalgisia/Hipernocicepção Inflamatória**

Após a ativação dos receptores presentes nos nociceptores pelos mediadores inflamatórios finais (ex. prostaglandinas e aminas simpáticas), iniciam-se os mecanismos periféricos neuronais da dor inflamatória. Esses mecanismos são representados, principalmente, por vias metabólicas de sinalização com a participação de enzimas e segundos mensageiros intracelulares, culminando na modulação da atividade de canais iônicos (COUTAUX et al., 2005).

Tanto os receptores para as prostaglandinas (EP), quanto para aminas simpáticas ( $\beta_1/\beta_2$ ), expressos nos neurônios nociceptivos primários, fazem parte da família de receptores celulares metabotrópicos acoplados à proteína G. A expressão destes receptores está mais associada com fibras nociceptivas não-mielinizadas, ou seja, fibras C, ou mesmo, em nociceptores “dormentes”. A interação dessas substâncias com seus respectivos receptores levam à ativação de várias vias de sinalização diferentes.

O segundo mensageiro a ser inicialmente implicado na dor inflamatória foi o adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) (FERREIRA et al., 1979a; TAIWO et al., 1989). A produção do AMPc é necessária para que ocorra uma amplificação do processo que se iniciou na membrana da célula neuronal. O aumento da

concentração intracelular de AMPc regula diversas repostas biológicas por modular diretamente a atividade de uma classe de enzimas, as proteínas quinases. Na grande maioria das células, o AMPc exerce seus efeitos por ativar a proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Isso é válido também para os neurônios nociceptivos, cuja sensibilização envolve a ativação da PKA (ALEY; LEVINE et al., 1999). Ainda existem evidências que o AMPc possa ativar uma outra proteína quinase, a proteína quinase C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ), independente da ativação da PKA (HUCHO et al., 2005).

A excitabilidade neuronal é controlada por canais iônicos presentes em sua membrana plasmática, isto é, sua modulação provavelmente é a etapa final na sensibilização dos nociceptores. De fato, a ativação das proteínas quinases (PKA e/ou PKC $\epsilon$ ) tem sido implicada na modulação da atividade de canais iônicos, os quais apresentam resíduos de aminoácidos passíveis de fosforilação por estas enzimas. Uma vez fosforilados, a atividade destes canais é alterada, tornando-os mais ou menos ativos, o que altera as características elétricas da membrana, aumentando sua excitabilidade. Até o momento, os principais canais iônicos implicados na sensibilização dos nociceptores são os canais de sódio tetrodotoxina resistentes (TTX-R), NaV1.8 e NaV1.9. A fosforilação destes canais altera sua condutância e também seu limiar de ativação, levando, por fim, a uma diminuição do limiar de ativação da célula neuronal (ENGLAND et al., 1996; GOLD et al., 1996; GOLD et al., 1998; KHASAR et al., 1998; AKOPIAN et al., 1999; KHASAR et al., 1999b; RUSH; WAXMAN, 2004; AMAYA et al., 2006; MAINGRET et al., 2008). Ainda, pode ocorrer a fosforilação de canais de potássio dependentes de voltagem, que leva à sua inibição e, conseqüentemente, ao aumento do potencial de repouso do neurônio (NICOL et al., 1997; EVANS et al., 1999; LOTUFO et al., resultados não publicados). De forma geral, tais modificações nestes canais (Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>) permitem a ativação do neurônio por estímulos anteriormente inócuos ou muito pouco efetivos.

### **1.3 Controle Farmacológico Periférico da Hiperalgisia/Hipernocicepção Inflamatória**

Com base nos eventos celulares e moleculares envolvidos na sensibilização dos nociceptores durante um processo inflamatório e, conseqüentemente, no aparecimento da hiperalgisia/hipernocicepção inflamatória, os fármacos “analgésicos” de ação periférica podem ser classificados em duas classes principais:

a) a primeira, talvez a mais utilizada, são as drogas que previnem a sensibilização dos nociceptores, como os inibidores de COX, os simpatolíticos, os corticóides e, mais recentemente, os bloqueadores de citocinas. Essas drogas atuam através da inibição da liberação e/ou da ação de substâncias que sensibilizam direta ou indiretamente os nociceptores.

b) a segunda classe inclui as drogas que revertem a sensibilização dos nociceptores já instalada, como dipirona e alguns AINES (diclofenaco e cetorolaco). Os agonistas de receptores opióides também são incluídos neste segundo grupo (FERREIRA et al., 2002).

#### **1.3.1 Opióides**

A história dos opióides vem de longa data, existindo, por exemplo, evidências de que a papoula era cultivada há 5.000 mil anos pelos sumérios, sendo descrita em um ideograma desse povo como “planta da alegria” (revisado por DUARTE, 2005). Além disso, há também registros egípcios indicando o uso do ópio para diminuir a dor (revisado por TRESOT et al., 2008). O ópio (do grego *ópion*, “suco de papoula”) é o extrato das sementes das papoulas roxas (*Papaver somniferum*), o qual é constituído de uma mistura de vários opióides. Apenas em 1803/1804 o

farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam Serturner isolou a morfina como o principal alcalóide presente no ópio. Por muitos anos, os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos dos opióides não eram entendidos. Somente em 1973, PERT e SNYDER (1973), usando naloxona (droga que bloqueava os efeitos do opióides) marcada com trício, demonstraram a existência de regiões específicas no cérebro e no intestino, onde ocorria uma grande ligação dessa droga, sugerindo, então, a existência de receptores opióides (PERT; SNYDER, 1973). Esta descoberta deflagrou uma intensa busca pela existência de possíveis ligantes endógenos para esses receptores. Pouco depois, HUGHES et al. (1975), usando extratos cerebrais, demonstraram a existência de “morfina endógena” ou endorfinas (HUGHES et al., 1975).

Atualmente, os opióides constituem uma das mais usadas e efetivas classes de drogas empregadas no tratamento de dores moderadas e severas de diferentes origens, incluindo-se dores pós-operatórias e também as de origem inflamatória (GUTSTEIN; AKIL, 2001). Os opióides exercem seus efeitos, por ação, em três classes principais de receptores, mi ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ) e delta ( $\delta$ ), que são produtos de três diferentes genes, os quais já foram clonados. Esta nomenclatura dos receptores opióides foi baseada na sua ativação por diferentes agonistas opióides, como descrito a seguir (revisado por TRESOT et al., 2008):

1) Receptor  $\mu$  opióide (MOR) – medeia os efeitos da morfina. Este tipo de receptor é responsável por vários efeitos dos opióides, incluindo analgesia supraespinal, depressão respiratória, euforia, sedação, diminuição da motilidade gastrointestinal, bem como dependência física.

2) Receptor  $\kappa$  opióide (KOR) – medeia os efeitos da cetociclazocina. São responsáveis pela analgesia espinal, sedação, dispnéia, dependência, disforia e depressão respiratória.

3) Receptor  $\delta$  opióide (DOR) – medeia os efeitos da [d-Ala-d-Leu]- encefalina. Este tipo de receptor está envolvido principalmente em efeitos psicomiméticos e de disforia.

Atualmente, a União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR) recomenda que a nomenclatura dos receptores opióides siga a ordem em que eles foram clonados e a abreviação do nome genérico da família OP (opióides) (DHAWAN et al., 1996). Dessa forma, eles deveriam ser denominados por OP<sub>1</sub> ( $\delta$ ), OP<sub>2</sub> ( $\kappa$ ) e OP<sub>3</sub> ( $\mu$ ). Entretanto, devido à ampla utilização da nomenclatura que usa as letras gregas, neste estudo se utilizará a nomenclatura antiga.

Todos esses três subtipos de receptores opióides pertencem à superfamília dos receptores com sete domínios trans-membrana e produzem seus efeitos celulares pelo acoplamento com uma proteína G<sub>i/o</sub> sensível a toxina pertussis (revisado por LAW et al., 2000). Os principais efeitos celulares observados após a ativação dos receptores opióides são: inibição da adenilato ciclase com conseqüente inibição da formação de AMPc, diminuição das correntes de cálcio, principalmente por inibição de canais de cálcio voltagem-dependentes, e aumento das correntes de potássio, entre outras ações (revisado por LAW et al., 2000). Em geral, estas ações inibem a liberação de neurotransmissores, induzem hiperpolarização da membrana celular, ou seja, reduzem as atividades neuronais.

Até três décadas atrás, os efeitos analgésicos dos opióides eram exclusivamente associados às suas ações no sistema nervoso central. Os primeiros estudos de localização dos receptores opióides apontavam a substância cinzenta periaquedutal (PAG) como uma região que apresenta uma densidade muito alta de receptores opióides (KUHAR et al., 1973). Posteriormente, vários estudos demonstraram que a estimulação elétrica da PAG produz analgesia, que é inibida pelo tratamento com naloxona (REYNOLDS, 1969; MAYER et al., 1971; AKIL et al.,

1976). Em reforço a esses achados, a administração seletiva de opióides na PAG produz analgesia (FRENK et al., 1978). Avançando nos mecanismos envolvidos na analgesia produzida pela ativação dos receptores opióides presentes nestas áreas do troco cerebral, foi demonstrado que este efeito envolve vias descendentes de controle da dor, as quais em última instância reduzem a entrada da informação nociceptiva na medula espinal (BASBAUM et al., 1976; FIELDS; ANDERSON, 1978).

Contribuindo para um papel seletivo dos receptores opióides na modulação da dor, foi demonstrado que o tálamo medial, importante área relacionada ao componente emocional da dor (modulada por opióides), apresenta uma densidade de receptores opióides quatro vezes maior que o tálamo lateral, o qual está envolvido na sensação de toque e na informação refinada sobre a qualidade da dor. Estes últimos elementos não são afetados pelos opióides. Outras regiões envolvidas no componente emocional da dor, como a amígdala, também apresentam uma densidade alta de receptores opióides.

Além destas estruturas supra-espinais, ATWEH e KUHAR (1977) demonstraram uma alta densidade de receptores opióides na medula espinal, principalmente, no corno dorsal, nas Lâminas I e II, as quais estão associadas à primeira integração da informação nociceptiva que vem da periferia. Estudos posteriores demonstraram que os três tipos de receptores opióides estão presentes no corno dorsal da medula espinal e que a administração de agonistas opióides diretamente na medula espinal produz efeitos analgésicos (YAKSH; RUDY, 1976). Corroborando estes achados, existem várias demonstrações de que os opióides podem modular a atividade de neurônios secundários na medula espinal (YAKSH, 1978; MACDONALD; NELSON, 1978). Por exemplo, a administração intratecal de agonistas opióides inibe a geração dos potenciais de ação dos neurônios

secundários, em resposta à ativação de fibras C (YAKSH, 1978; RANDIC et al., 1995). Existem ainda, evidências que agonistas opióides são capazes de hiperpolarizar neurônios nociceptivos específicos da lamina II da medula espinal, sugerindo um efeito pós-sináptico importante (YOSHIMURA; NORTH, 1983; LIGHT; WILLCOCKSON, 1999). Este efeito pós-sináptico dos opióides parece estar relacionado à ativação de canais de potássio retificadores de entrada ativados pela proteína G (GIRKs; NORTH, 1989). Neste contexto, foi demonstrado que animais deficientes de alguns dos GIRKs não apresentam analgesia frente aos opióides (MARKER et al., 2002; MITROVIC et al., 2002).

Além desse reconhecido efeito central, nas últimas décadas, um novo conceito tem sido estabelecido para as ações analgésicas dos opióides. No final da década de 70, em um trabalho seminal, FERREIRA e NAKAMURA (1979b) demonstraram pela primeira vez que os opióides apresentam também efeitos analgésicos por ação periférica sobre a hipernocicepção inflamatória. Esta conclusão foi baseada nas observações de que a administração local de morfina ou encefalinas na pata de ratos, em doses que não tem efeito central, ou mesmo de opióides quaternários que não atravessam a barreira hematoencefálica, são capazes de inibir a hipernocicepção inflamatória mecânica induzida tanto por carragenina quanto por PGE<sub>2</sub> (FERREIRA; NAKAMURA 1979b). Estas primeiras evidências foram muito criticadas de início, mas depois da demonstração da existência de receptores opióides expressos nas terminações nervosas periféricas livres, muitos grupos iniciaram estudos para entender a ação periférica dos opióides (FIELDS et al., 1980). Conseqüentemente, vários outros grupos demonstraram que os opióides apresentavam efeito antinociceptivo quando administrados periféricamente em diferentes modelos experimentais (STEIN et al., 1988; LEVINE; TAIWO, 1989). Convém ressaltar que este conceito parece não estar limitado a modelos



experimentais, existindo vários trabalhos demonstrando a aplicabilidade clínica dos efeitos analgésicos pela ação periférica dos opióides (KHOURY et al., 1990; STEIN et al. 1991; OELTJENBRUNS; SCHAFFER, 2005).

Hoje sabemos que além do efeito antinociceptivo causado pela administração periférica de agonistas opióides, existem evidências que durante o processo inflamatório há um aumento na concentração de opióides endógenos no sítio inflamatório, os quais poderiam modular negativamente a hipernocicepção (STEIN et al., 2003). Nesse sentido, STEIN et al. (1993) demonstraram que a administração de naloxona na articulação de pacientes submetidos a artroscopia de joelhos produz um aumento na intensidade dolorosa, sugerindo uma modulação da dor por opióides endógenos. Parece que os leucócitos, principalmente neutrófilos, que migram para o local da inflamação são os responsáveis pela produção e liberação destes opióides endógenos (RITTNER et al., 2005).

### **1.3.2 Ativação da Via Óxido Nítrico/GMPc/PKG/Canais de Potássio Sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) e Antinocicepção Produzida pela Ação Periférica dos Opióides.**

Desde a descrição de que os opióides tinham efeito antinociceptivo por agirem na periferia, vários grupos têm investigado os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse efeito. Considerando que a hiperalgesia/hipernocicepção inflamatória dependia da produção intracelular de AMPc e que, em vários sistemas, os receptores opióides estavam acoplados a um tipo de proteína G, a qual inibia a produção de AMPc, a primeira hipótese para o efeito antinociceptivo pela ação periférica dos opióides foi que eles estariam inibindo a produção deste segundo mensageiro e, conseqüentemente, prevenindo a sensibilização (FERREIRA;

NAKAMURA 1979b; LEVINE; TAIWO, 1989). Embora este mecanismo deva contribuir para o efeito periférico dos opióides, atualmente, existem fortes evidências de que outros mecanismos também devam ser importantes. A principal evidência que suporta esta hipótese é que os opióides, administrados periféricamente duas horas após a injeção de PGE<sub>2</sub>, revertem a hipernocicepção já estabelecida em resposta à PGE<sub>2</sub>, enquanto um inibidor seletivo da adenilato ciclase não apresenta efeito (dados não publicados de nosso laboratório). Além disto, a administração local de morfina é capaz de bloquear a hipernocicepção persistente em um momento que a atividade da adenilato ciclase já não é mais importante para este fenômeno (SACHS et al., 2004).

No mesmo período em que se observou a importância do AMPc para a gênese da hiperalgesia/hipernocicepção inflamatória, já se sabia que em alguns sistemas biológicos o aumento de GMPc tinha efeitos opostos aos do AMPc (GOLDBERG et al., 1975). Nesse sentido, investigou-se o efeito do GMPc sobre a hipernocicepção induzida por PGE<sub>2</sub>. Assim, demonstrou-se que o dibutilil-GMPc era capaz de reverter a hipernocicepção instalada (FERREIRA; NAKAMURA 1979a). A descoberta de que o NO produzido pela ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) ativa a guanilato ciclase, com conseqüente produção de GMPc (KNOWLES et al., 1989), associada à viabilização de ferramentas farmacológica específicas que inibem a via NO/GMPc, permitiram demonstrar que o NO também bloqueia a hipernocicepção mecânica e que este efeito é mediado por GMPc (DUARTE et al., 1990).

Sabendo da existência desta possível via de sinalização intracelular antinociceptiva e que os opióides são capazes de induzir a produção de GMPc em neurônios, testou-se a hipótese de que o efeito antinociceptivo da ação periférica da morfina dependia da estimulação da via NO/GMPc (MINNEMAN, IVERSEN, 1976).

De fato, foi observado que o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica da morfina depende da ativação da via NO/GMPc, uma vez que este é bloqueado por inibidores da NOS (L-NMMA e L-NIO), bem como por inibidores da guanilato ciclase (azul de metileno ou ODQ) (FERREIRA et al., 1991). Essa hipótese foi confirmada por outros investigadores (BRIGNOLA et al., 1994; DAMBISYA, LEE, 1995; AGUIRRE-BANUELOS; GRANADOS-SOTO, 1999).

Conforme mencionado, a excitabilidade neuronal depende da modulação da atividade de certos canais iônicos. Dessa forma, não é de se estranhar que a ativação da via NO/GMPc module a atividade de alguma população de canais iônicos, finalmente restabelecendo a excitabilidade neuronal normal. Nesse sentido, a ativação desta via metabólica intracelular pelas drogas analgésicas bloqueadoras diretas da hiperalgesia/hipernocicepção parece se contrapor à sensibilização dos nociceptores por promover a abertura dos  $K_{ATP}$  (RODRIGUES, DUARTE, 2000). Esta modulação, possivelmente, favorece o efluxo deste íon, de modo à contrabalancear o limiar neuronal aumentado devido às alterações funcionais dos canais de  $Na^+$  e  $K^+$  associados à sensibilização. Além disso, foi demonstrado que a modulação dos canais  $K_{ATP}$  pela morfina depende de uma outra proteína quinase, a PKG, a qual é ativada pelo GMPc (SACHS et al., 2004). Estes resultados comportamentais foram recentemente corroborados por achados eletrofisiológicos em neurônios nociceptivos primários (CHI et al., 2007). Neste estudo, CHI et al., (2007) demonstraram que a modulação de canais  $K_{ATP}$  pelo GMPc reduz a sensibilização induzida pela  $PGE_2$  (CHI et al., 2007).

Em resumo, analgésicos, como os opióides, bloqueiam a hipernocicepção aguda instalada por ativar a via NO/GMPc/PKG/ $K_{ATP}$ . No entanto, os mecanismos pelos quais a interação dos agonistas opióides com seus receptores periféricos

ativam esta via de sinalização intracelular, causando antinocicepção, ainda não foram elucidados.

#### **1.4 PI3K $\gamma$ /AKT/NO**

A produção endógena de NO é feita por uma família de enzimas denominadas NOS. Três isoformas de NOS já foram isoladas e clonadas, sendo que duas são consideradas constitutivas, a neuronal e a endotelial, e a outra é freqüentemente induzida durante processos inflamatórios (revisado por HOBBS et al., 1999)

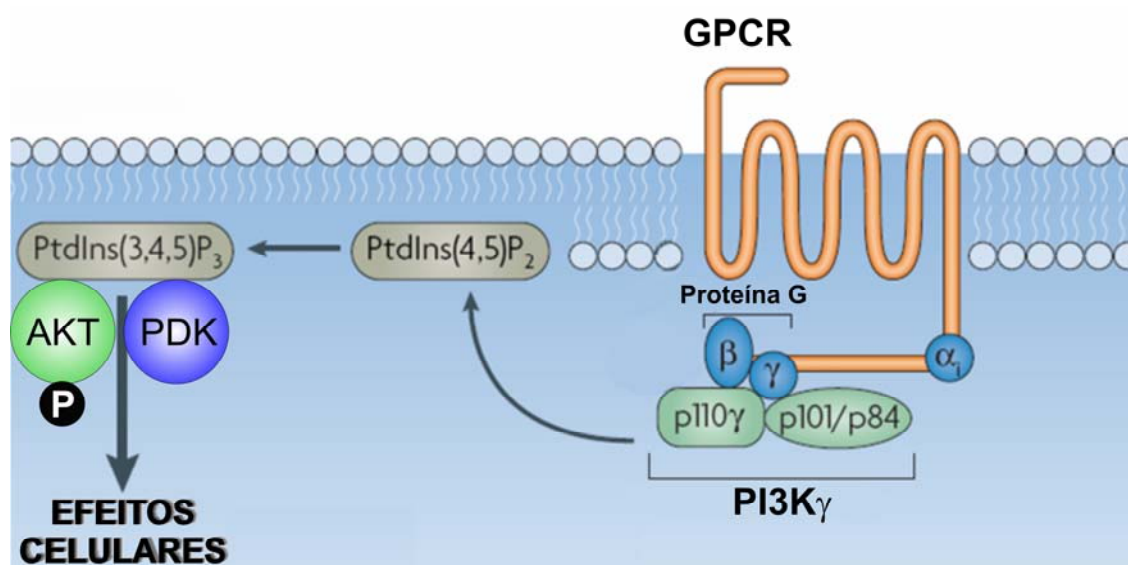
A ativação das NOS constitutivas (eNOS e/ou nNOS) foi, por muito tempo, creditada à entrada de Ca<sup>++</sup> com conseqüente ligação da Ca<sup>++</sup>/Calmodulina, o que resultava na produção de NO (revisado por HOBBS et al., 1999). No entanto, no final da década de 90, várias evidências sugeriram que estas enzimas tinham outros mecanismos de ativação. Um destes mecanismos depende da ativação da via intracelular PI3K/AKT (DIMMELER et al., 1999; FULTON et al., 1999). Exemplificando, a produção de NO induzida pelo estresse de estiramento vascular é mediada pela PI3K/AKT, que leva à fosforilação e ativação da NOS endotelial, por um mecanismo independente de cálcio (DIMMELER et al., 1999; FULTON et al., 1999). Ainda, a produção de NO pelas células endoteliais induzidas pela endotelina-1 e insulina também é dependente da fosforilação da eNOS pela AKT numa via estimulada pela PI3K $\gamma$  (HARTELL et al., 2005; LIU et al., 2003). Também em neurônios, a insulina é capaz de estimular a produção de NO dependente da ativação da nNOS pela via PI3K/AKT (CANABAL et al., 2007).

As PI3Ks são enzimas de especificidade dupla que exercem tanto papéis como lipídeo-quinase quanto como proteína-quinase. As PI3Ks foram inicialmente

identificadas por sua atividade associada a várias oncoproteínas e receptores de fatores de crescimento, participando da proliferação e sobrevivência celular. Existem múltiplas isoformas de PI3K em células de mamíferos e elas são divididas em três classes. A classe I é, sem dúvida, a mais profundamente estudada, uma vez que está acoplada a estímulos extracelulares. As funções da classe II não são bem compreendidas, enquanto as da classe III estão relacionadas à regulação do transporte vesicular (revisado por FRUMAN et al., 1998; VANHAESEBROECK; WATERFIELD, 1999; HAWKINS et al., 2006).

As PI3Ks pertencentes à classe I são enzimas heterodiméricas, estruturalmente constituídas de uma subunidade catalítica p110 que se pode apresentar em diferentes isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) e uma subunidade adaptadora. Dentre as isoformas pertencentes a esta classe, a denominada PI3K $\gamma$  é ativada por receptores acoplados a proteínas G sensíveis à toxina pertussis, enquanto as outras estão envolvidas na sinalização de receptores acoplados a tirosina quinases (STEPHENS et al., 1994; HAWKINS et al., 2006). A PI3K $\gamma$  está associada com dois tipos de subunidades regulatórias, a p101 e a p84, as quais controlam sua expressão, ativação e localização subcelular (STEPHENS et al., 1997; HAWKINS et al., 2006). A ativação PI3K $\gamma$  é mediada pela direta associação entre sua subunidade regulatória e as subunidades  $\beta\gamma$  da proteína G<sub>0</sub> (STEPHENS et al., 1997). Uma vez ativada, a isoforma PI3K $\gamma$  fosforila o composto lipídico fosfatidilinositol 3,4 bifosfato (PIP<sub>2</sub>), produzindo fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP<sub>3</sub>). Este último composto serve então como plataforma para o recrutamento seletivo de outras proteínas que apresentam um domínio homólogo a pleckitrina (PH) para a membrana. Essas interações levam a sinalizações intracelulares subseqüentes, sendo uma das mais importantes a ativação de outra quinase, a proteína quinase B, também denominada AKT (revisado por COFFER et al., 1998; CANTRELL, 2001). Após sua ligação ao

PIP3, esta serina/treonina quinase, torna-se susceptível à fosforilação por outra quinase, chamada PDK1, que também apresenta o domínio PH e é recrutada para a membrana, ligando-se ao PIP3 (revisado por COFFER et al., 1998; CANTRELL, 2001). A PDK1 é responsável pela fosforilação da AKT e sua conseqüente ativação (Figura 1; revisado por Vanhaesebroeck; Alessi, 2000). Após essa ativação, a AKT irá amplificar a sinalização intracelular também por meio de fosforilação de diferentes proteínas alvo. A primeira proteína descrita como sendo alvo para a AKT foi a GSK-3, uma importante enzima envolvida no metabolismo do glicogênio (CROSS et al., 1995). Atualmente, várias outras proteínas foram descritas como sendo fosforiladas e ativadas pela AKT, entre elas, eNOS e nNOS (WRIGHT; WARD, 2000; FULTON et al., 1999).



**Figura 1-** Ilustração representativa da ativação da via de sinalização intracelular PI3K $\gamma$ /AKT. Adaptado de ROMMEL et al., 2007.

Considerando as evidências experimentais de que os receptores opióides estão acoplados a proteínas G $_{i/o}$ , é possível sugerir que a ativação destes receptores ativaria vias de sinalizações intracelulares dependentes da PI3K $\gamma$ . Nesta linha de raciocínio, foi demonstrado que a ativação dos receptores opióides estimula a via de

sinalização PI3K/AKT em neurônios derivados do gânglio da raiz dorsal (GRD), bem como em células de linhagem transfectadas com estes receptores. Entre os efeitos opióides nessas células, foi demonstrado que a via PI3K/AKT medeia o efeito desensibilizante que o agonista opióide exerce sobre seu receptor (POLAKIEWICZ et al. 1998a; TAN et al. 2003). Além disso, o efeito opióide sobre a sobrevivência neuronal também parece depender da ativação desta via (POLAKIEWICZ et al. 1998b). Ainda, o efeito cardioprotetor (pré-condicionamento) que os opióides apresentam, em modelos de isquemia e reperfusão, também depende da ativação da via PI3K/AKT (GROSS et al., 2007) .

Outra forte evidência de que os receptores opióides podem ativar a via de sinalização intracelular dependente de PI3K $\gamma$  vem do fato de que a analgesia causada pela injeção intracerebroventricular de agonistas opióides é bloqueada por um inibidor reversível (LY294002) e/ou irreversível (wortmannin) da PI3K (NARITA et al., 2002). Ademais, foi demonstrado que a administração central de morfina causa um aumento na imunorreatividade para a isoforma PI3K $\gamma$  na PAG, local reconhecidamente importante para os efeitos analgésicos centrais dos opióides (NARITA et al., 2004).

Este conjunto de evidências levou à seguinte hipótese: a ativação da via NO/GMP<sub>c</sub>/PKG/K<sub>ATP</sub>, envolvida nos efeitos antinociceptivos produzidos pelas ações periféricas dos opióides, depende da estimulação inicial da via de sinalização intracelular PI3K $\gamma$ /AKT.

# ***OBJETIVOS***



## 2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi testar a hipótese de que o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides depende da ativação da via de sinalização intracelular PI3K $\gamma$ /AKT/NO.

# ***MATERIAL E MÉTODOS***

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo comitê de ética para experimentação animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Processo nº 142/2005, ver anexo 1) e as diretrizes para uso de animais experimentais em estudos de dor da IASP (ZIMMERMANN, 1983).

#### **3.1 Animais Experimentais**

Foram utilizados camundongos machos C57/BL6 selvagens (WT) ou deficientes para a enzima PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>; 20-30 g) provenientes do biotério do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP-RP), bem como camundongos deficientes para a enzima nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>) concedidos gentilmente pela Dr. Silvana Chiavegatto (ICB-USP). Foram utilizados ainda ratos Wistar machos pesando em torno de 100 g para realização das culturas de neurônios, ou em torno de 180 a 200 g para os experimentos comportamentais, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo Campus de Ribeirão Preto (USP-RP). Os animais permaneceram cerca de 2 dias no biotério do Departamento de Farmacologia, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água, antes de serem submetidos aos experimentos.

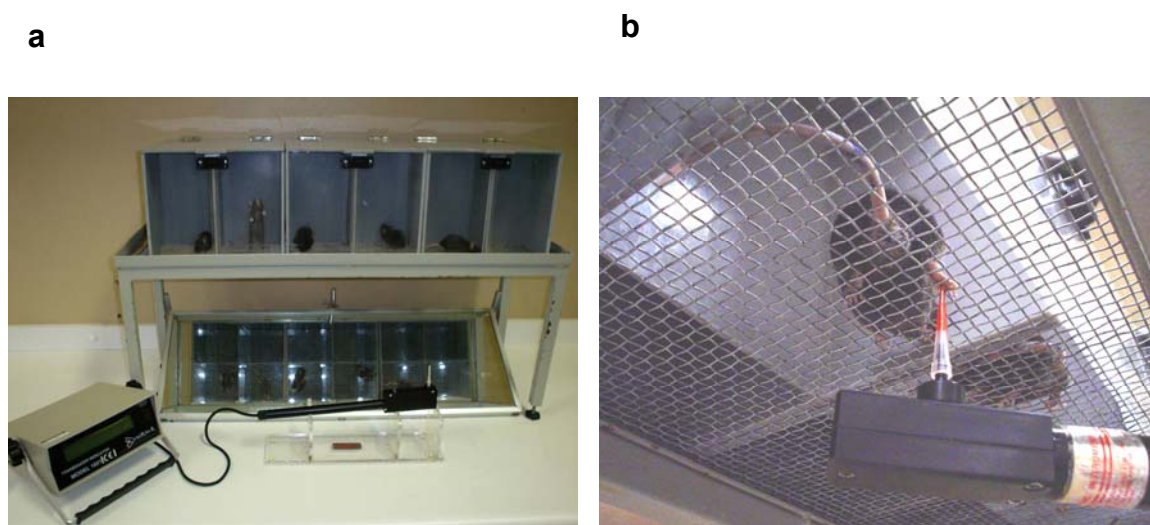
## **3.2 Avaliação Nociceptiva**

Os testes nociceptivos foram realizados entre 8:00 e 17:00 h.

### **3.2.1 Medida de Hipernocicepção Mecânica em Patas de Camundongos: Teste de Pressão Crescente na Pata (von Frey eletrônico).**

A avaliação da hipernocicepção mecânica foi realizada pelo método de pressão crescente na pata de camundongos previamente descrito (CUNHA et al., 2004). Resumidamente, este método utiliza-se de um estesiômetro eletrônico (Modelo 1601C, IITC Life Science Instruments, CA, USA, Figura 2a). Este aparelho é composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas. Ao transdutor foi adaptada uma ponteira descartável de 0,5 mm<sup>2</sup> que estimula diretamente a pata do animal (Figura 2b). O experimentador é treinado a aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da pata traseira do animal, com uma pressão gradualmente crescente, até que provoque uma resposta de flexão característica com retirada da pata. O estímulo é então interrompido e a força exercida para promover a resposta característica, foi registrada. Foram realizadas três medidas distintas para cada animal, antes e após a administração dos estímulos, sendo calculada a média aritmética das medidas. A intensidade de hipernocicepção é quantificada como a variação na força ( $\Delta$  de reação em gramas), obtida subtraindo-se o valor observado antes do procedimento experimental (0 hora), do valor de reação após a administração dos estímulos hipernociceptivos que variam de acordo com o experimento.

Durante os experimentos, os animais foram mantidos em caixas acrílicas medindo  $12 \times 10 \times 17$  cm, com assoalho formado por uma rede de malhas medindo cerca de  $5 \text{ mm}^2$  constituída de arame não maleável de 1 mm de diâmetro. As caixas foram mantidas a cerca de 25 cm da superfície de uma bancada, de modo a permitir a estimulação mecânica da pata traseira dos animais. Antes do início dos experimentos os animais permaneceram nessas caixas por quinze minutos para a adaptação.



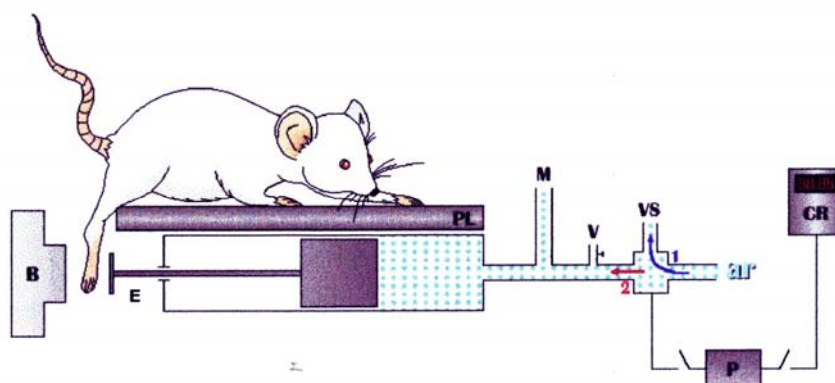
**Figura 2 – Foto do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de camundongos. Painel a-** A foto apresenta o estesiômetro eletrônico (Modelo 1601C, Life Science Instruments CA, USA), as caixas de acrílico, o assoalho em rede de malhas e o espelho, utilizados no teste de pressão crescente na pata. **Painel b-** A foto apresenta a ponteira de área ( $0,5 \text{ mm}^2$ ) em contato com a pata do animal. O experimentador aplica, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal emita o comportamento nociceptivo.

### 3.2.2 Medida de hipernociceção mecânica em patas de ratos

#### 3.2.2.1 Randall-Sellito Modificado

Para quantificação da hipernociceção mecânica em patas de ratos, utilizou-se a metodologia proposta por RANDALL e SELITTO (1957) e modificada por

FERREIRA et al. (1978). Nesse método, o animal é colocado em uma plataforma e mantido em decúbito ventral pela mão do experimentador o que permite que qualquer uma das patas traseiras seja submetida a uma pressão constante de 20 mmHg, aferida utilizando-se um esfignomanoômetro. A referida pressão é aplicada por um pistão de diâmetro aproximado de 2 cm (vide figura 3). O estímulo mecânico é interrompido assim que o animal apresenta uma reação típica que compreende inicialmente uma breve apnéia, seguida pela retração da cabeça e patas traseiras e redução dos movimentos de fuga desenvolvidos pelo animal em resposta à posição imposta pelo experimentador. Geralmente, a apnéia é acompanhada de fasciculações no dorso. A latência para apresentação da reação típica para cada animal foi avaliada antes de qualquer procedimento experimental (reação basal controle). A intensidade de hipernocicepção foi, portanto, quantificada como a variação no tempo de reação obtida subtraindo-se o valor observado depois do estímulo nociceptivo do valor de reação basal controle. O tempo de reação basal ou o tempo de reação após injeção intraplantar de salina varia de 32 a 34 s (E.P.M. de 0,5 a 1 s).



**Figura 3-** Diagrama do aparelho utilizado para o teste de pressão crescente na pata de ratos.

### 3.2.2.2 Teste de Pressão Crescente na Pata de Ratos (Von Frey automático).

O teste automático de pressão crescente na pata de ratos é uma modificação do teste de von Frey filamentos e também do teste manual de pressão crescente em ratos (MOTTA et al., 2006). Resumidamente, este método utiliza-se de um estesiômetro dinâmico plantar automático (modelo 37400; Ugo Basile, Milão, Itália). Este aparelho é composto de um transdutor de pressão ligado a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas (Figure 4). O experimentador é treinado a aplicar uma ponteira metálica na região central da pata traseira do animal com uma pressão gradualmente crescente (50 g em 20 s), o qual provoca uma resposta de flexão característica com retirada da pata. O estímulo é interrompido após a observação da resposta característica, como descrita anteriormente. As análises subsequentes foram realizadas como descritas na secção 3.2.1.

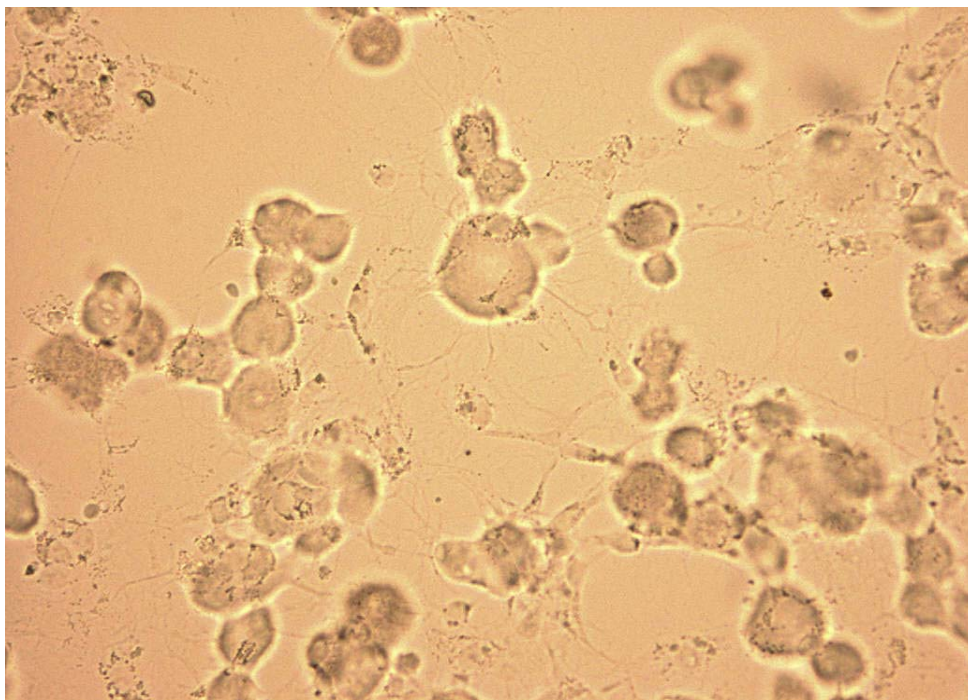


**Figura 4— Foto do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de ratos.** A foto apresenta o estesiômetro dinâmico plantar (modelo 37400; Ugo Basile, Milão, Itália), as caixas de acrílico, o assoalho em rede de malha utilizados no teste de pressão crescente na pata de ratos.

### 3.3 Cultura de neurônios derivados do GRD

As culturas de neurônios derivadas do GRD foram realizadas conforme protocolo descrito anteriormente (LINHART et al., 2003). Resumidamente, os animais foram anestesiados (Tribromoetanol, 250 mg/kg, i.p), sacrificados, colocados em uma mesa cirúrgica própria com tricotomia da região dorso-lombar. Posteriormente, foi feita incisão póstero-mediana seguida de abertura por planos até lâmina óssea e feita laminectomia para expor e visualizar os GRD. Em seguida os GRDs da região lombar e torácica foram removidos (16 a 18 gânglios por animal), dissecados e colocados em solução salina de Hank. estéril, livre de cálcio e magnésio (4 °C). As células foram dissociadas por incubação a 37 °C por 75 minutos em solução salina de Hank contendo 0,28 U/mL de colagenase e depois por 12 minutos em solução contendo 0,25 mg/mL de tripsina. Os gânglios foram lavados em meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado, 2 mM de glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina. As células foram dissociadas mecanicamente e contadas em azul de tripano para determinar a viabilidade celular. As células foram cultivadas em placas cobertas com Matrigel e mantidas em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> (37 °C) com o mesmo meio de cultura já descrito e utilizadas dentro de 24 e 48 h após a obtenção (Figura 5).





**Figure 5-** Foto representativa de uma cultura de neurônios derivados do GRD de ratos, após um dia de incubação.

### **3.4 Análises de Western Blot**

#### **3.4.1 Preparação das Amostras das Culturas de GRD: Extração das Proteínas.**

Após as diferentes estimulações, as culturas de neurônios derivadas de GRD foram homogeneizadas e lisadas manualmente em tampão de lise constituído de Tris-HCl 0,01 mM, pH 7,6, contendo NaCl 0,1 M, SDS 0,1% e inibidores de protease e fosfatases: Etilenodiaminatetracetato de sódio (EDTA) 1 mM, Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM, Aprotinina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Leupeptina 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Ortovanadato de Sódio 1 mM, Pirofosfato de Sódio 1 mM e Fluoreto de Sódio 25 mM, em banho de gelo. O homogenato foi centrifugado a 13000 g durante 4 minutos a 4 °C. Uma alíquota do sobrenadante foi separado para dosagem de proteínas pelo método colorimétrico Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

### 3.4.2 Eletroforese e ImunoBlot

Amostras do homogenato foram desnaturadas a 100 °C durante 4 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas (30 µg por grupo) em gel de poli(acrilamida) (1,5 mm de espessura) na presença de SDS (SDS-PAGE) para separação por eletroforese, utilizando-se o sistema Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). O gel de separação foi de acrilamida 10% p/v, bisacrilamida 0,3% p/v, Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 e SDS 0,1% p/v. O gel de concentração foi de acrilamida 4% p/v, bisacrilamida 0,3% p/v, Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 e SDS 0,1% p/v. A corrida foi feita sob voltagem constante 100 V, utilizando-se o tampão de corrida Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM e SDS 0,1% p/v.

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose 0,2 µm (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) utilizando-se o sistema de transferência Mini-Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Após o fracionamento das proteínas, o gel e a membrana de nitrocelulose foram incubados no tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, 20% de metanol) por 30 minutos. A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V, durante 1 hora e 15 minutos. Após a transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em TCA 3% para certificação de que houve transferência das proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas em água deionizada e o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado pela incubação das membranas por 1 hora à temperatura ambiente em solução tampão salina tris (TBS) contendo 5% (p/v) de leite desnatado (mólico) e 0,1% de Tween 20 sob agitação contínua. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com TBS contendo 0,1% de Tween 20 por cinco minutos. Em seguida foram incubadas “overnight” em solução TBS contendo

5% (p/v) BSA e 0,1% de Tween 20, onde foi adicionado anticorpo policlonal de coelho contra AKT-fosforilada (Ser473; 1:500; Cell Signaling, MA, USA). Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS contendo 0,1% Tween 20 e em seguida incubadas com anticorpo IgG de cabra anti-coelho conjugado à peroxidase (1:20.000; HRP; Jackson ImmunoResearch, PA, USA), por uma hora, a temperatura ambiente. Após esta incubação, as membranas foram novamente lavadas três vezes com TBS contendo 0,1% Tween 20 por cinco minutos. Para a revelação as membranas foram incubadas com uma mistura de reagentes do kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) como descrito no manual de instruções. As membranas foram expostas a filme sensível (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) durante 30-40 minutos e revelados conforme instrução do fabricante. Os controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário. Cabe ressaltar que este protocolo revelou apenas blots de banda única na posição equivalente ao peso molecular da AKT (60 KDa).

Após a revelação, as membranas foram recuperadas pela incubação das mesmas por 30 minutos à 50 °C em tampão Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7 contendo 2% de SDS (p/v) e mercaptoetanol 100 mM. O procedimento de blot foi repetido, agora utilizando-se anticorpo policlonal de coelho contra AKT total (1:1000, Cell Signaling, MA, USA).

### 3.5 Imunofluorescência

Após anestesia (Uretana 25%, 0,5 mL/100 g de animal) os animais foram perfundidos com solução salina 0,9% seguido de solução de paraformaldeído 4% (PFA) tamponado com tampão fosfato 0,1 M. Foram usados aproximadamente 250 mL de cada solução durante a perfusão. Em seguida foi realizada cirurgia para extração do gânglio da raiz dorsal (GRD) ao nível de L5 e estes foram pós-fixados em solução de PFA 4% a 4 °C por aproximadamente 2 horas. Logo após, retirou-se a solução de PFA e adicionou-se solução de sacarose 30%, mantendo-se os gânglios em média 48 horas até sua sedimentação. Os tecidos foram congelados em composto próprio para cortes histológicos contendo uma mistura de álcool polivinílico, polietileno glicol diluídos em PBS (OCT- Tissue-Tek) e cortados em criostato a 14 µm. Antes do ensaio de imunofluorescência, as lâminas foram mantidas em estufa à vácuo por aproximadamente 2 horas para melhor adesão dos cortes às lâminas. Logo após, foram lavadas 2 vezes com PBS. As lâminas foram submersas em solução de glicina 0,1 M em PBS por 30 minutos para retirada completa de grupos aldeídos. Em seguida realizou-se o bloqueio de ligações inespecíficas, pela incubação com solução de BSA 2% e Triton x 100 a 0,2% diluídos em PBS, por 1 hora. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com os anticorpos primários diluídos em solução PBS contendo BSA 1% e Triton 0,1% por 2 horas em temperatura ambiente. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-PI3Kγ feito em coelho (1:200; Santa Cruz, CA, USA); anti-TRPV1 feito em cabra (1:400; Santa Cruz, CA, USA); anti-receptor  $\mu$  opióide feito em coelho (1:2000; Neuromics, Edina, MN, USA) e feito em cabra (1:200; Santa Cruz, CA, USA), anti-substância P feito em cobaia (1:500; Millipore, Billerica, MA, USA), anti-NF200 feito em camundongo (1:100; AbCam, Cambridge, MA, USA). Em seguida, as lâminas

foram lavadas 5 vezes com PBS, por 5 minutos cada lavagem. Antes de incubar as lâminas com o anticorpo secundário, estes foram centrifugados (10000 g por 10 min) para se evitar a formação de grumos. Os anticorpos secundários estavam sempre duas vezes mais diluídos (1% de BSA em PBS) que os respectivos anticorpos primários. Eles foram incubados por 1 h à temperatura ambiente. Todos anticorpos secundários eram marcados com Alexa Fluor (488 ou 594; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) ou ainda foi utilizado isolectina B<sub>4</sub> marcada com FITC (Sigma, St Louis, MO, EUA). Em seguida as lâminas foram lavadas (5x com PBS, 5 min cada) para se retirar o excesso de anticorpo secundário. Finalmente, as lâminas foram montadas com solução de fluormount diluído em PBS (1:2). As imagens foram obtidas através de microscopia confocal (SP5, Leica, Wetzlar, Alemanha). As imagens com dois marcadores foram obtidas seqüencialmente, para evitar cruzamento entre as fluorescências nos dois comprimentos de onda utilizados. Para cada marcação foram avaliados aproximadamente 2 campos por GRD provindos de diferentes ratos.

### **3.6 Quantificação da produção de NO por neurônios do GRD.**

A produção de NO pelos neurônios sensitivos primários foi determinada como descrito anteriormente (HABERBERGER et al., 2003), com algumas modificações. Após cirurgia, como descrito anteriormente, GRDs da região lombar de ratos foram removidos e transferidos para uma solução estéril dissecados e colocados em solução salina de Hank's estéril contendo HEPES 10 mM. GRDs foram incubados em placas de cultura contendo esta mesma solução na presença de 10 µM de 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-FM; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) por 1 hora à 37 °C. Após o carregamento das células com o DAF, os GRDs foram

transferidos para novos poços com meio sem DAF e foram expostos aos seguintes tratamentos: controle (apenas meio); Morfina (10  $\mu$ M, CANO et al., 1999) mais veículos ou morfina mais inibidor seletivo da PI3K $\gamma$  (AS605240; 100 nM; CAMPS et al., 2005) ou inibidor seletivo de AKT (100 nM). Os inibidores foram incubados 10 minutos antes da morfina. Em experimentos controle, a produção de NO foi inibida utilizando um inibidor não seletivo da NOS, L-NMMA (100  $\mu$ M, HABERBERGER et al., 2003). Após uma hora de incubação com morfina, os GRDs foram fixados com paraformaldeído 4% por 30 min e posteriormente lavados em PBS, pH 7,4 em temperatura ambiente. Os GRDs foram cortados em pequenas secções que foram montados com fluormount em um sistema de lâmina/lamínulas. As secções foram examinadas usando microscópio confocal (SP-5, Leica, Wetzlar, Alemanha). Aproximadamente 4-6 campos por GRD foram avaliados. Além disto, foram utilizados de 3-5 GRDs por tratamento. Os resultados foram expressos como porcentagem de neurônios positivos por campo, sendo que os neurônios foram considerados positivos para NO quando a fluorescência do DAF foi 2 vezes maior que a fluorescência do fundo.

### **3.7 RT-PCR Convencional**

A expressão do RNAm da subunidade catalítica da PI3K $\gamma$  (p100 $\gamma$ ) foi determinada por RT-PCR convencional. Após anestesia, camundongos selvagens ou PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram sacrificados e GRDs (L4-6) foram isolados bilateralmente, dissecados, retirados e estocados a temperatura de -70 °C. Materiais plásticos e soluções livres de RNAses foram utilizados durante todo procedimento. No momento do processamento, os GRDs foram homogeneizados e deixados em contato com Trizol (Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA) por 10 min a temperatura

ambiente para extração do RNA total. Um micrograma do RNA total foi transcrito por ação da enzima transcriptase reversa Pré-improm II (Promega, Madison, Wisconsin, USA). O DNAc assim obtido foi utilizado para a amplificação específica para a p110 $\gamma$ . A amplificação específica foi feita com a utilização dos seguintes primers: p100 $\gamma$  (sense, 5'-TCA GGC TCG GAG ATT AGG TA-3'; antisense, 5'-GCC CAA TCG GTG GTA GAA CT-3') e GAPDH (sense, 5'-GCC ATC AAC GAC CCC TTC ATT G-3'; antisense, 5'-TGC CAG TGA GCT TCC CGT TC-3'). A expressão do mRNA para GAPDH foi usada como um controle da integridade do tecido e da reação em todas as amostras. O protocolo de PCR começou com 4 min de incubação à 94 °C, seguido de 40 ciclos de desnaturação à 94 °C por 1 min, anelamento à 56°C por 1 min, e extensão à 72°C por 1 min. A extensão final foi realizada à 72°C por 10 min.

### 3.8 Drogas

<b>Drogas</b>	<b>Veículo</b>
<b>Prostaglandina E<sub>2</sub></b> (Sigma, St Louis, MO, EUA)	Salina 0,9 %
<b>Sulfato de Morfina</b> (Cristália, Brasil)	Salina 0,9 %
<b>DAMGO</b> (Ala <sup>2</sup> -MePhe <sup>4</sup> -Gly <sup>5</sup> -Encefalina) (Sigma, St Louis, MO, EUA)	Salina 0,9 %
<b>U50488</b> 2-(3,4-diclorofenil)-N-metil-N-[(1R,2R)-2-pirrolidina-1-ciclohexil]acetamida (Sigma, St Louis, MO, EUA)	DMSO 2 %

<b>L-NMMA</b>	Salina 0,9 %
NG-Monometil-L-Arginina (Tocris, Missouri, USA)	
<b>SNAP</b>	Salina 0,9 %
S-nitroso-N-acetilpenicilamina (Tocris, Missouri, USA)	
<b>Wortmannin</b>	DMSO 2 %
(Sigma, St Louis, MO, EUA)	
<b>LY 294002</b>	DMSO 2 %
2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (Sigma, St Louis, MO, EUA)	
<b>AS605240</b>	DMSO 2 %
5-quinoxilina-6-metileno-1,3-tiazolidina-2,4-diona (Calbiochem, San Diego, CA, USA)	
<b>Inibidor de AKT IV</b>	DMSO 2 %
(Calbiochem, San Diego, CA, USA)	
<b>Cloridrato de Naloxona</b>	Salina 0,9 %
(Sigma, St Louis, MO, EUA)	

### **3.9 Protocolos Experimentais**

#### **3.9.1 Efeito da administração intraplantar (i.pl.) de PGE<sub>2</sub> sobre o limiar nociceptivo mecânico em camundongos.**

O efeito da administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (10-100 ng/pata – 20 µL) sobre o limiar nociceptivo mecânico em camundongos foi avaliado pelo teste de pressão



crescente (CUNHA et al., 2004). O grupo controle recebeu injeção i.pl. de salina (20  $\mu$ L). O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado antes e 0,5, 1, 3, 5 e 7 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Foram utilizados grupos experimentais de 5-6 animais. Os experimentos foram repetidos de 2 a 3 vezes.

### **3.9.2 Avaliação do efeito da administração i.pl. de agonistas opióides sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> em camundongos.**

A hipernocicepção foi induzida pela administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata). Após 30 min, o limiar nociceptivo dos animais foi avaliado seguido da administração de diferentes doses de morfina (3-30  $\mu$ g/pata – 20  $\mu$ L), DAMGO (0.3-3  $\mu$ g/pata – 20  $\mu$ L), U50488 (1-9  $\mu$ g/pata – 20  $\mu$ L) ou salina (20  $\mu$ L) na pata ipsilateral. Além disso, foi avaliado também o efeito da administração de morfina (10-30  $\mu$ g/pata), DAMGO (1-3  $\mu$ g/pata), U50488 (1-9  $\mu$ g/pata) ou salina (20  $\mu$ L) na pata contralateral. O efeito da administração i.pl. de morfina (10  $\mu$ g/pata), DAMGO (1  $\mu$ g/pata) ou U50488 (3  $\mu$ g/pata) sobre o limiar nociceptivo também foi avaliado no grupo que recebeu administração i.pl. de salina ao invés de PGE<sub>2</sub>. O limiar nociceptivo foi avaliado posteriormente nos seguintes tempos: 0,5, 1, 1,5, 3 e 5 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Foram utilizados grupos experimentais de 5-6 animais. Os experimentos foram repetidos de 2 a 3 vezes.

### **3.9.3 Avaliação do envolvimento do óxido nítrico no efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides em camundongos.**

A hipernocicepção foi induzida pela administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata). Concomitantemente com a administração de PGE<sub>2</sub> os animais foram tratados com diferentes doses de um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (L-NMMA, 3-30 mg/kg i.p). Após 30 min, os animais receberam uma injeção i.pl. morfina (10 µg/pata – 20 µL), DAMGO (1 µg/pata – 20 µL), U50488 (3 µg/pata – 20 µL) ou veículo (20 µL) na pata ipsilateral. O limiar nociceptivo foi novamente avaliado 1,5 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Foram utilizados grupos experimentais de 5-6 animais. Os experimentos foram repetidos de 2 vezes.

Em outro experimento, a hipernocicepção foi induzida pela administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata) ou veículo (salina – 20 µL) em animais selvagens (WT) ou nNOS<sup>-/-</sup>. Após 30 min, foi administrada morfina (10 µg/pata – 20 µl) ou veículo (salina - 20 µl), tanto em animais WT quanto em animais nNOS<sup>-/-</sup>. O limiar nociceptivo foi avaliado 1,5 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Foram utilizados grupos experimentais de 6 animais.

### **3.9.4 Avaliação do efeito da administração i.pl. de SNAP sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> em camundongos selvagens e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>.**

A hipernocicepção foi induzida pela administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata). Após 30 min, os animais receberam uma injeção i.pl. de SNAP (1-10 µg/pata – 20 µL) ou salina (20 µL) na pata ipsilateral. O limiar nociceptivo foi novamente avaliado

1 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Foram utilizados grupos experimentais de 5 animais. Os experimentos foram repetidos 2 vezes.

Em outro experimento a hipernocicepção foi induzida pela administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata) em camundongos selvagens ou PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Após 30 min, camundongos selvagens ou PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> receberam uma injeção i.pl. de SNAP (3  $\mu$ g/pata – 20  $\mu$ L) ou salina (20  $\mu$ L) na pata ipsilateral. O limiar nociceptivo foi novamente avaliado 1 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Foram utilizados grupos experimentais de 5-6 animais. Os experimentos foram repetidos de 2 vezes.

### **3.9.5 Avaliação do envolvimento da via PI3K $\gamma$ /AKT no efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica de agonistas opióides em ratos.**

A hipernocicepção mecânica foi induzida pela administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata) ou veículo (salina – 50  $\mu$ L). Uma hora e trinta minutos após a administração PGE<sub>2</sub>, os animais foram tratados com diferentes doses de dois inibidores não-seletivos da PI3K (wortmannin; 1-10  $\mu$ g/pata – 50  $\mu$ L ou LY 294002, 3-30  $\mu$ g/pata), ou com um inibidor seletivo da PI3K $\gamma$  (AS605240, 10-90  $\mu$ g/pata-CAMPS et al., 2005), ou com um inibidor seletivo da AKT (AKT inhibitor IV; SUN et al., 2006) ou ainda com veículo (DMSO 2% em salina - 50  $\mu$ L). Após 30 min, os animais receberam uma injeção i.pl. de morfina (6  $\mu$ g/pata – 50  $\mu$ L), ou DAMGO (1  $\mu$ g/pata – 50  $\mu$ L), ou U50488 (10  $\mu$ g/pata – 50  $\mu$ L) ou veículo (salina - 50  $\mu$ L). O limiar nociceptivo foi novamente avaliado 3 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Foram utilizados grupos experimentais de 5-6 animais. Os experimentos foram repetidos 2 vezes.

### **3.9.6 Avaliação do envolvimento da PI3K $\gamma$ no efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides em camundongos.**

A hipernocicepção foi induzida pela administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata) ou veículo (salina – 20  $\mu$ L) em animais selvagens (WT) ou PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Após 30 min, o limiar nociceptivo dos animais foi avaliado seguido da administração de morfina (10  $\mu$ g/pata – 20  $\mu$ L), DAMGO (1  $\mu$ g/pata – 20  $\mu$ L), U50488 (3  $\mu$ g/pata – 20  $\mu$ L) ou veículo, tanto em animais WT quanto em animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>. O efeito da administração i.pl. de morfina (10  $\mu$ g/pata), DAMGO (1  $\mu$ g/pata) ou U50488 (3  $\mu$ g/pata) sobre o limiar nociceptivo também foi avaliado no grupo que recebeu administração i.pl. de salina ao invés de PGE<sub>2</sub>. O limiar nociceptivo foi avaliado posteriormente nos seguintes tempos: 1, 1,5, 3 e 5 após a administração de PGE<sub>2</sub>. Foram utilizados grupos experimentais de 5-6 animais. Os experimentos foram repetidos 2 vezes

### **3.9.7 Avaliação da ativação da AKT em culturas de neurônios derivados do GRD de ratos pela incubação com opióides: decurso temporal e participação dos receptores opióides e da PI3K.**

Um dia após a realização das culturas de neurônios derivados do GRD, o meio de cultura (DMEM) contendo soro fetal bovino e antibióticos foi substituído por meio sem estes fatores. Logo após as células foram incubadas por 5, 10 e 30 minutos com morfina (10  $\mu$ M), DAMGO (1  $\mu$ M; WALWYN et al., 2006) ou U50488 (100 nM; GSCHOSSMANN et al., 2000). Ainda, a ativação da AKT pelos agonistas opióides foi analisada na presença ou não de um antagonista não seletivo de receptores opióides (naloxona 1  $\mu$ M; CANO et al., 1999), de um inibidor não-seletivo

da PI3K (wortmannin 100 nM; ZHUANG et al., 2004) ou um seletivo da PI3K $\gamma$  (AS605240, 100 nM; CAMPS et al., 2005). Os inibidores foram incubados 10 min antes da morfina. Após a incubação o meio foi retirado, e as células foram lisadas como descrito anteriormente. O aumento na atividade da AKT foi avaliada pela análise do aumento de sua forma fosforilada por Western blot.

### **3.9.8 Efeito da administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> sobre o limiar nociceptivo mecânico de ratos avaliado pelo teste de pressão crescente automático.**

O efeito da administração i.pl de PGE<sub>2</sub> (30-300 ng/pata – 50  $\mu$ L) sobre o limiar nociceptivo mecânico de ratos foi avaliado pelo teste de pressão crescente automático (MOTTA et al., 2006). O grupo controle recebeu injeção i.pl. de salina (50  $\mu$ L). O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado antes e 1, 3, 5 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Foram utilizados grupos experimentais de 5-6 animais. Os experimentos foram repetidos 2 vezes.

### **3.9.9 Avaliação do efeito da administração i.pl de U50488 sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> em ratos.**

A hipernocicepção foi induzida pela administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata – 50  $\mu$ L). Duas horas após a administração de PGE<sub>2</sub>, os ratos receberam diferentes doses de U50488 (3-30  $\mu$ g/pata – 50  $\mu$ L) ou veículo (DMSO 2% em salina - 50  $\mu$ L) na pata ipsilateral. Além disso, foi avaliado também o efeito da administração de U50488 (10-30  $\mu$ g/pata – 50  $\mu$ L) ou veículo (50  $\mu$ L) na pata contralateral. O efeito da administração i.pl. de U50488 (10  $\mu$ g/pata) sobre o limiar nociceptivo também foi

avaliado no grupo que recebeu administração i.pl. de salina ao invés de PGE<sub>2</sub>. O limiar nociceptivo foi avaliado 3 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Foram utilizados grupos experimentais de 5-6 animais. Os experimentos foram repetidos 2 vezes.

### **3.10 Análise Estatística**

Resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de 5-6 animais por grupo. A análise dos resultados foi feita pelo teste de análise de variância (ANOVA TWO-WAY) quando existiu interação entre os tratamentos e o tempo, seguido de Teste Bonferroni. Quando os resultados são de apenas um ponto (tempo) a análise foi feita usando ANOVA ONE-WAY. O nível de significância foi de  $P < 0.05$ .

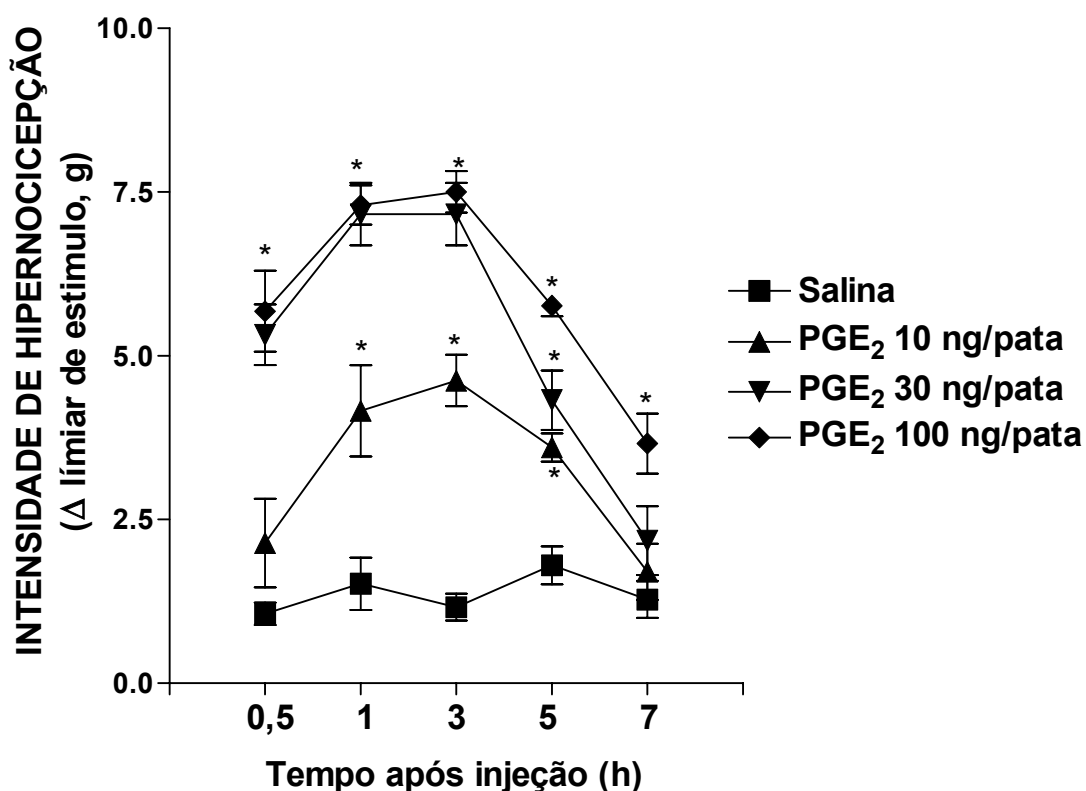
# ***RESULTADOS***

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PGE<sub>2</sub> induz hipernocicepção mecânica em camundongos

Antes de iniciar a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na antinocicepção produzida pela ação periférica dos opióides, foram realizados experimentos para padronização das doses (agonistas opióides) e dos tempos de tratamento que seriam utilizados em camundongos. Primeiramente, foram determinados a dose e o tempo de resposta de hipernocicepção induzido pela PGE<sub>2</sub>, que foi o agente hipernociceptivo utilizado neste trabalho. A injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> em camundongos selvagens induziu hipernocicepção mecânica de maneira dependente da dose (10-100 ng/pata; Figura 6). A resposta hipernociceptiva máxima foi observada com a dose de 30 ng de PGE<sub>2</sub>. A hipernocicepção foi significativa 0,5 h após a injeção de 30 ng de PGE<sub>2</sub>, alcançando um platô entre a primeira e terceira horas após a injeção, retornando aos níveis normais 7 h após. Para os experimentos seguintes foi escolhida a dose de 30 ng/pata de PGE<sub>2</sub>.

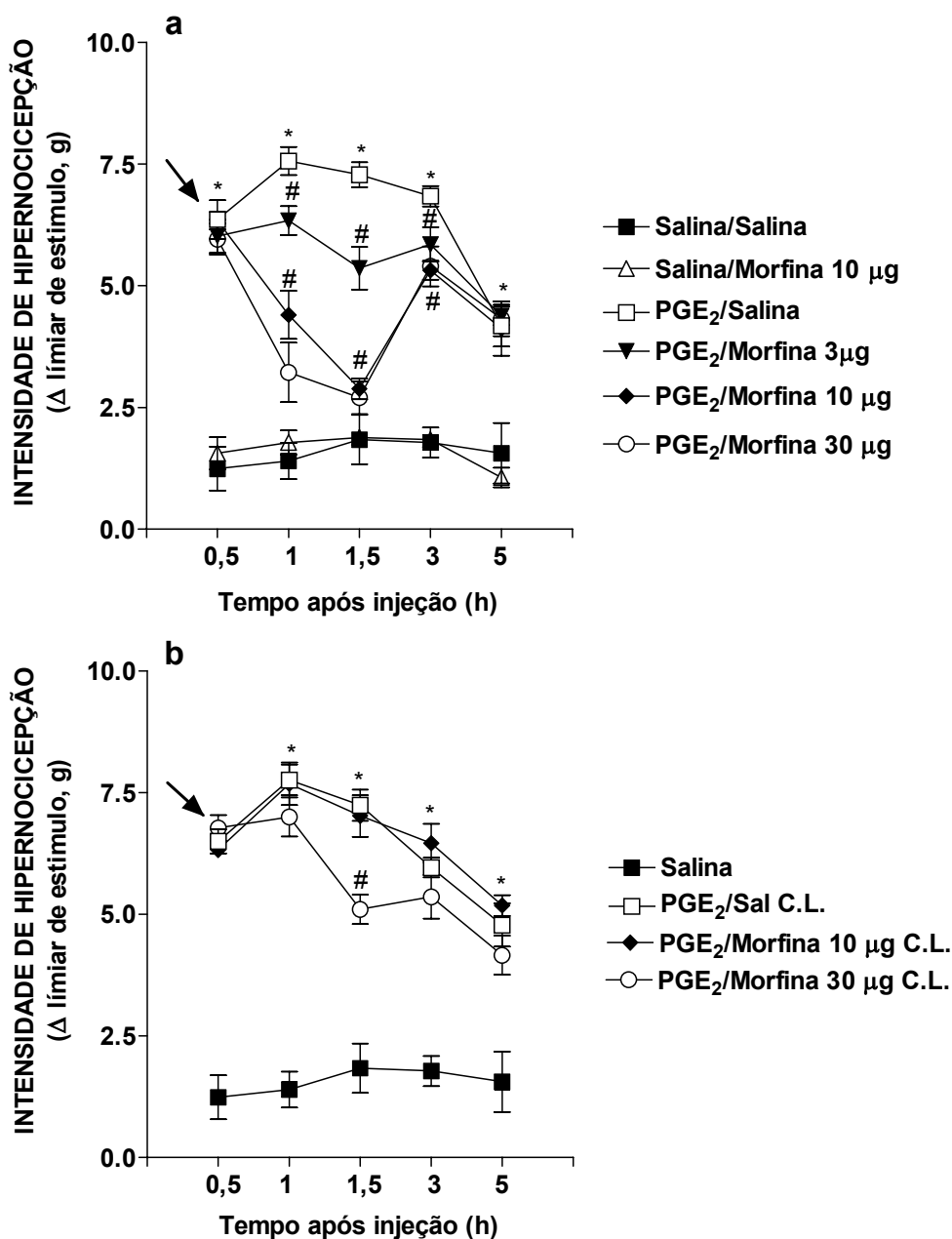




**Figura 6- Hipernociceção mecânica em camundongos induzida por PGE<sub>2</sub>.** Curvas dose- e tempo-resposta de hipernociceção induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (10, 30, 100 ng/pata) ou salina (controle). Os efeitos hipernociceptivos foram avaliados 0,5, 1, 3, 5 e 7 h após a injeção do estímulo. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5-6 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com valor correspondente do grupo que recebeu salina ( $P < 0.05$ ).

## **4.2 Morfina administrada perifericamente reverte a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> em camundongos.**

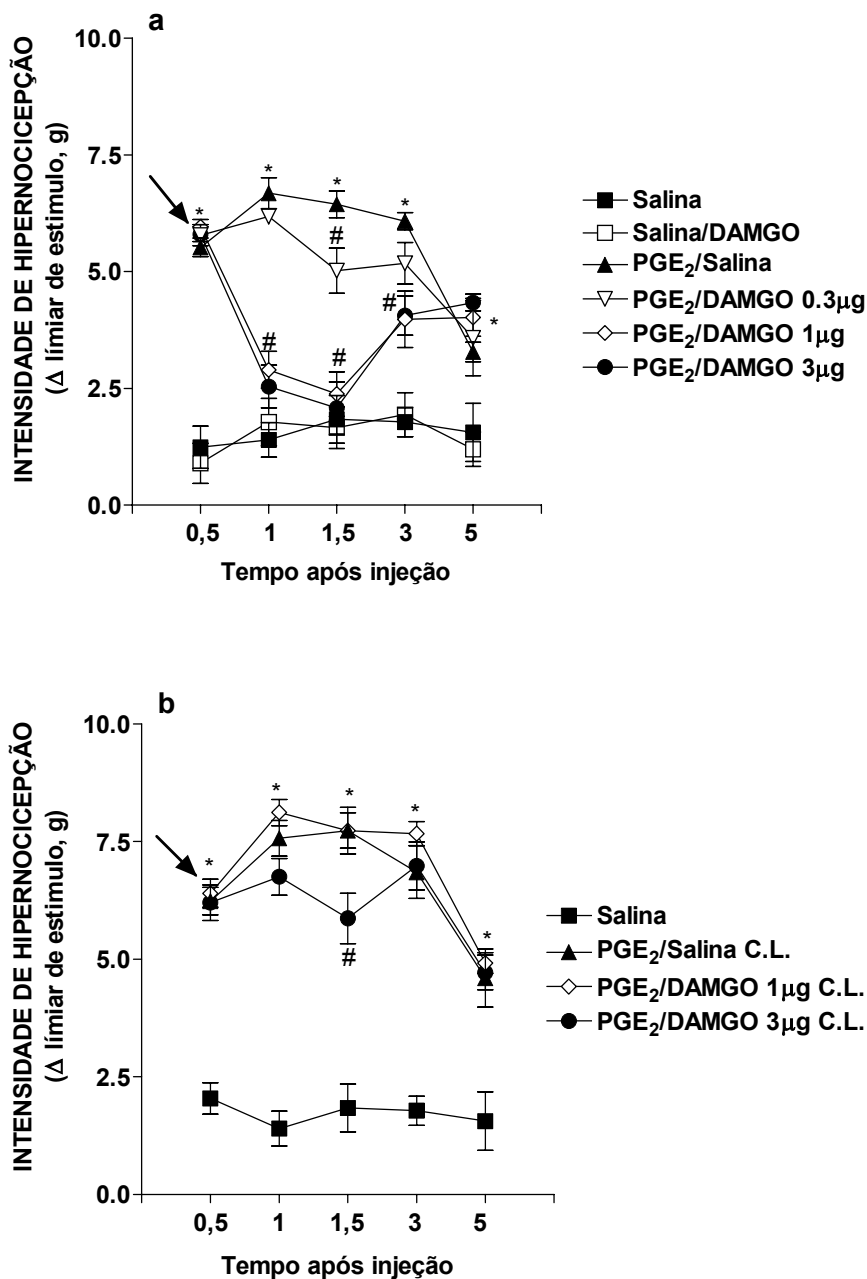
Após a escolha da dose de PGE<sub>2</sub> necessária para produzir hipernocicepção mecânica em camundongos, foram realizados experimentos para testar o efeito antinociceptivo pela administração periférica de diferentes agonistas opióides em camundongos. A administração i.pl. de morfina reverteu de maneira dependente da dose (3-10µg/pata) a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> (Figura 7a). O efeito antinociceptivo foi significativo 30 min após a administração de morfina, alcançando o máximo 1 h após sua administração. O efeito observado com a dose de 10 µg/pata foi considerado local, uma vez que a administração do opióide na pata contralateral, com a mesma dose, não foi capaz de alterar a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub>. Já a dose de 30 µg/pata, embora tenha inibido a hipernocicepção quando injetada na pata ipsilateral, também inibiu a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub>, quando injetada na pata contralateral. Portanto, esta dose parece apresentar efeitos sistêmicos. Ainda que se tenha observado efeito antinociceptivo periférico da morfina sobre a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub>, a morfina não alterou o limiar nociceptivo basal dos animais que receberam salina ao invés de PGE<sub>2</sub>.



**Figura 7- Efeito antinociceptivo pela ação periférica da morfina sobre a hipernociceção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> em camundongos.** A hipernociceção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata). Após 30 min (seta), morfina (3-30  $\mu$ g/pata) ou salina (20  $\mu$ l) foram administradas ipsilateralmente (painel a) ou contralateralmente (C.L. painel b). Os resultados são expressos pela média  $\pm$  E.P.M. de 5-6 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo que recebeu apenas salina i.pl. ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo tratado com PGE<sub>2</sub>/salina na pata ( $P < 0.05$ ).

### **4.3 DAMGO administrado periféricamente reverte a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> em camundongos.**

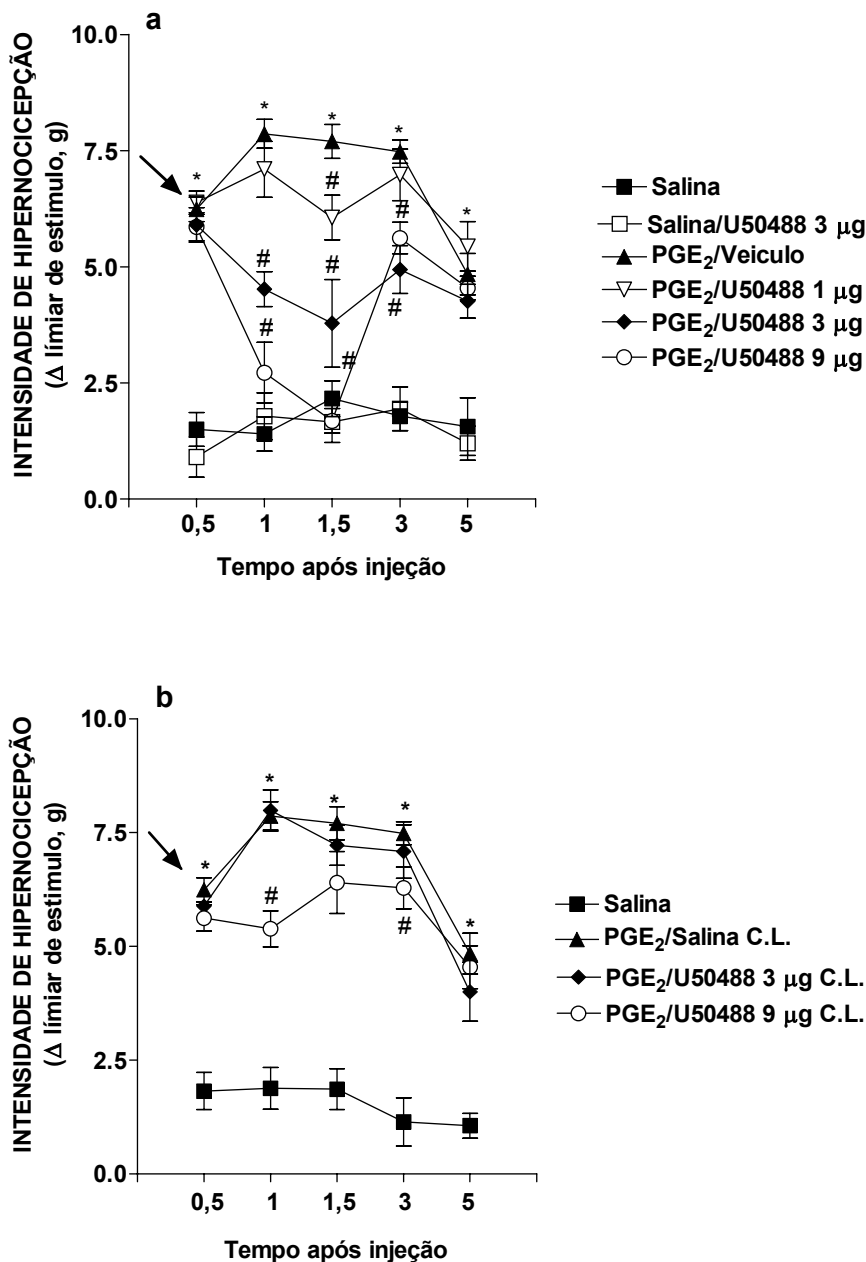
Uma vez que a morfina apresentou efeito antinociceptivo quando administrada na periferia em camundongos, o próximo passo foi investigar se um agonista seletivo de receptores  $\mu$  opióides também apresenta este efeito. A administração i.pl. de DAMGO reverteu de maneira dose (0,3-3  $\mu$ g/pata) dependente a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> (Figura 8a). O efeito antinociceptivo foi significativo 30 min após a administração, alcançando o máximo 1 h após. O efeito observado com a dose de 1  $\mu$ g/pata foi considerado local, uma vez que a administração na pata contralateral, com a mesma dose, não foi capaz de alterar a hipernocicepção da PGE<sub>2</sub>. No entanto, a dose de 3  $\mu$ g/pata parece ter apresentado efeitos sistêmicos uma vez que sua administração na pata contralateral reduziu a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub> (Figura 8b). Como observado com a morfina, a administração i.pl. de DAMGO não alterou o limiar nociceptivo basal dos animais.



**Figura 8- Efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica do DAMGO sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> em camundongos.** A hipernocicepção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata). Após 30 min (seta), DAMGO (0.3-3  $\mu$ g/pata) ou salina (20  $\mu$ l) foram administradas ipsilateralmente (painel a) ou contralateralmente (C.L. painel b). Os resultados são expressos pela média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo que recebeu salina i.pl. ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo tratado com PGE<sub>2</sub>/salina na pata ( $P < 0.05$ ).

#### **4.4 U50488 administrado perifericamente reverte a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> em camundongos.**

Também foi avaliado o efeito antinociceptivo produzido pela administração periférica de um agonista seletivo de receptores  $\kappa$  opióides em camundongos. A administração i.pl. de U50488 reverteu de maneira dose (1-9  $\mu\text{g/pata}$ ) dependente a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> (Figura 9a). O efeito antinociceptivo foi significativo 30 min após sua administração, alcançando o máximo 1 h após. O efeito observado com a dose de 3  $\mu\text{g/pata}$  foi considerado local, uma vez que a administração na pata contralateral, com a mesma dose, não foi capaz de alterar a hipernocicepção da PGE<sub>2</sub>. No entanto, a dose de 9  $\mu\text{g/pata}$  parece ter apresentado efeitos sistêmicos uma vez que sua administração na pata contralateral reduziu a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub> injetada na outra pata (Figura 9b). Ainda, a administração i.pl. de U50488 não alterou o limiar nociceptivo basal dos animais.



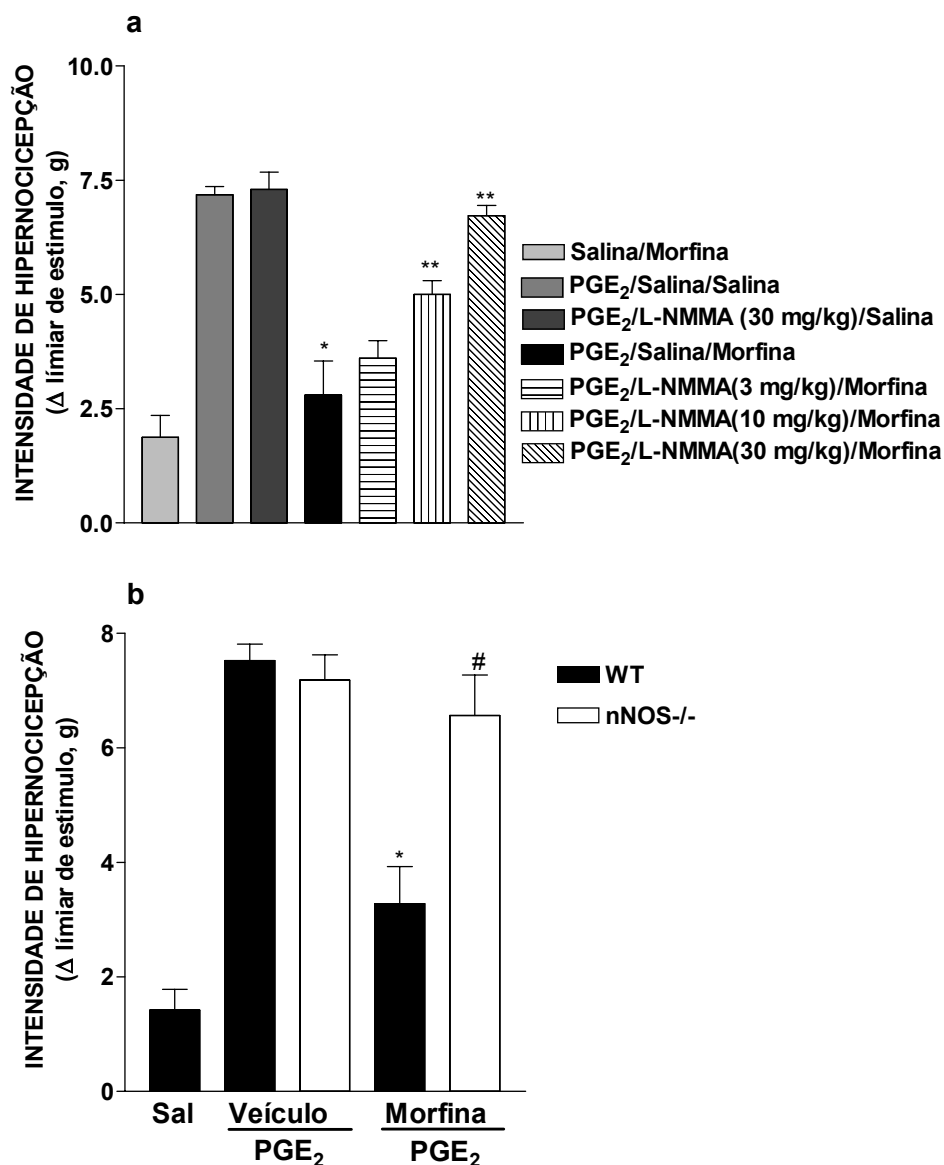
**Figura 9- Efeito antinociceptivo pela ação periférica do U50488 sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> em camundongos.** A hipernocicepção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata). Após 30 min (seta), U50488 (1-9 µg/pata) ou veículo foram administrados ipsilateralmente (painel a) ou contralateralmente (C.L. painel b). Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5-6 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo que recebeu salina i.pl. ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo tratado com PGE<sub>2</sub>/salina na pata ( $P < 0.05$ ).

#### **4.5 NO medeia a antinocicepção produzida pela ação periférica da morfina em camundongos.**

O próximo objetivo foi avaliar, se a antinocicepção produzida pela ação periférica dos diferentes agonistas opióides em camundongos, como observado em ratos, também dependia da produção de NO. A administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata) induziu hipernocicepção mecânica que foi inibida pela morfina (10 µg/pata) injetada na pata ipsilateral (Figura 10a). O efeito antinociceptivo periférico da morfina foi prevenido de maneira dose (3-30 mg/kg) dependente pelo tratamento dos animais com L-NMMA (Figura 10a). Ainda, o tratamento com L-NMMA não alterou o limiar nociceptivo basal dos animais, bem como não alterou a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub> (Figura 10a).

Também avaliamos o efeito antinociceptivo periférico da morfina em animais nNOS<sup>-/-</sup>. Enquanto a administração local de morfina (10 µg/pata) reverteu a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata) em animais selvagens, a mesma dose de morfina não teve efeito em animais nNOS<sup>-/-</sup> (Figura 10b). É importante mencionar que a injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> induziu hipernocicepção mecânica de magnitude semelhante em animais selvagens e nNOS<sup>-/-</sup> (Figura 10b).

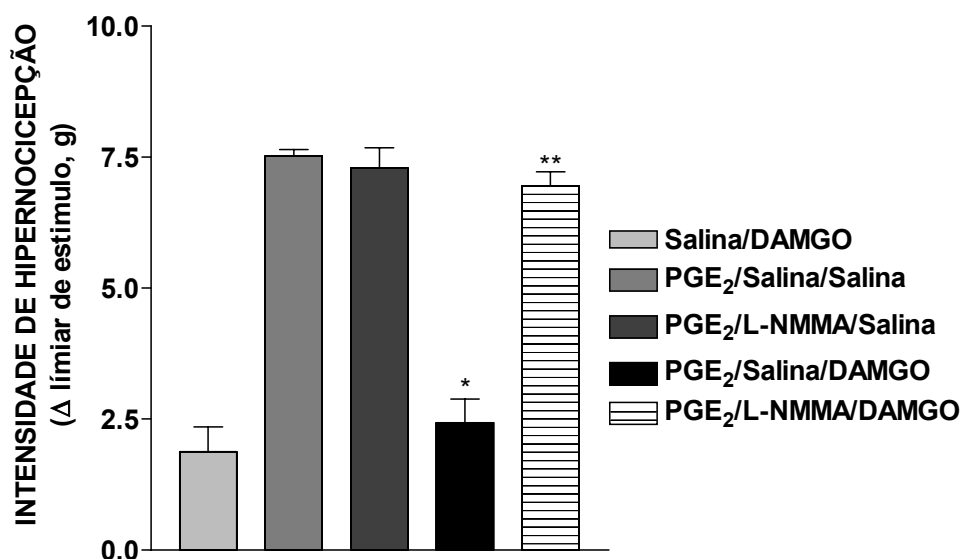




**Figura 10- Papel do NO para o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica da morfina em camundongos.** A hipernocicepção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata). Concomitantemente os animais foram tratados com L-NMMA (3-30 mg/kg; i.p). Após 30 min, morfina (10  $\mu$ g/pata) ou salina (20  $\mu$ l) foram administrados ipsilateralmente (Painel a). O efeito da morfina (10  $\mu$ g/pata) também foi avaliada em animais nNOS<sup>-/-</sup> comparando com animais selvagens (WT- Painel b). A hipernocicepção foi determinada 1,5 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo tratado com salina ( $P < 0.05$ ). \*\* diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo tratado com morfina ( $P < 0.05$ ). # comparado com o grupo de animais selvagens (WT).

#### **4.6 NO medeia a antinocicepção produzida pela ação periférica do DAMGO em camundongos.**

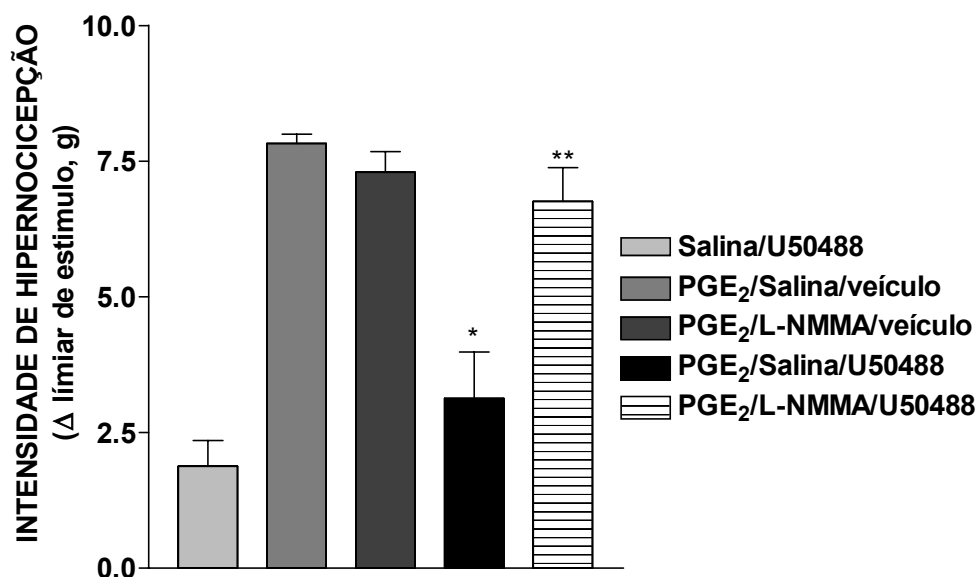
A administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata) induziu hipernocicepção mecânica que foi inibida pelo DAMGO (1 µg/pata) injetado na pata ipsilateral (Figura 11). O efeito antinociceptivo periférico do DAMGO foi prevenido pelo tratamento dos animais com L-NMMA (30 mg/kg - Figura 11). Ainda, o tratamento com L-NMMA não alterou o limiar nociceptivo basal dos animais, bem como não alterou a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub> (Figura 11).



**Figura 11- Efeito do L-NMMA sobre a antinociceção produzida pela ação periférica do DAMGO em camundongos.** A hipernociceção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata). Concomitantemente os animais foram tratados com L-NMMA (30 mg/kg; i.p). Após 30 min, DAMGO (1 μg/pata) ou salina (20 μl) foram administrados ipsilateralmente. A hipernociceção foi determinada 1,5 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significante quando comparado com o valor do grupo tratado com salina ( $P < 0.05$ ). \*\* indica diferença estatisticamente significante quando comparado com o grupo tratado com DAMGO ( $P < 0.05$ ).

#### **4.7 NO medeia a antinocicepção produzida pela ação periférica do U50488 em camundongos.**

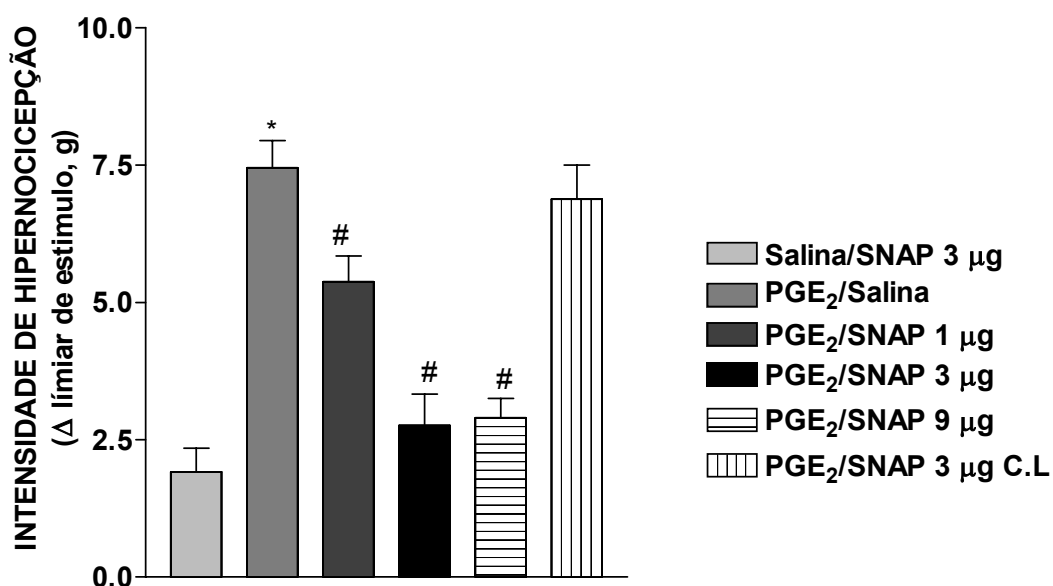
A administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata) induziu hipernocicepção mecânica que foi inibida pelo U50488 (3 µg/pata) injetado na pata ipsilateral (Figura 12). O efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica do U50488 foi prevenido pelo tratamento dos animais com L-NMMA (30 mg/kg - Figura 12). Ainda, o tratamento com L-NMMA não alterou o limiar nociceptivo basal dos animais, bem como não alterou a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub> (Figura 12).



**Figura 12- Efeito do L-NMMA sobre a antinociceção periférica do U50488 em camundongos.** A hipernociceção foi induzida pela injeção i.p. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata). Concomitantemente os animais foram tratados com L-NMMA (30 mg/kg; i.p). Após 30 min, U50488 (3 μg/pata) ou salina (20 μl) foram administrados ipsilateralmente. A hipernociceção foi determinada 1,5 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo tratado com salina ( $P < 0.05$ ). \*\* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo tratado com U50488 ( $P < 0.05$ ).

#### **4.8 SNAP administrado perifericamente reverte a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> em camundongos.**

Para comprovar o papel antinociceptivo do NO na periferia, foi testada a capacidade de um doador de NO (SNAP) em produzir antinocicepção quando injetado na pata de camundongos. A administração i.pl. de SNAP reverteu de maneira dose (1-9 µg/pata) dependente a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> (Figura 13). O efeito antinociceptivo foi significativo 30 min após sua administração, em todas as doses avaliadas (1-9 µg/pata). Os efeitos antinociceptivos produzidos pelas doses de 3 e 9 µg/pata não foram diferentes entre si. Além disto, a dose de 3 µg/pata de SNAP não apresentou efeitos sistêmicos, uma vez que não alterou a hipernocicepção produzida pela PGE<sub>2</sub> quando foi administrado na pata contralateral (Figura 13).

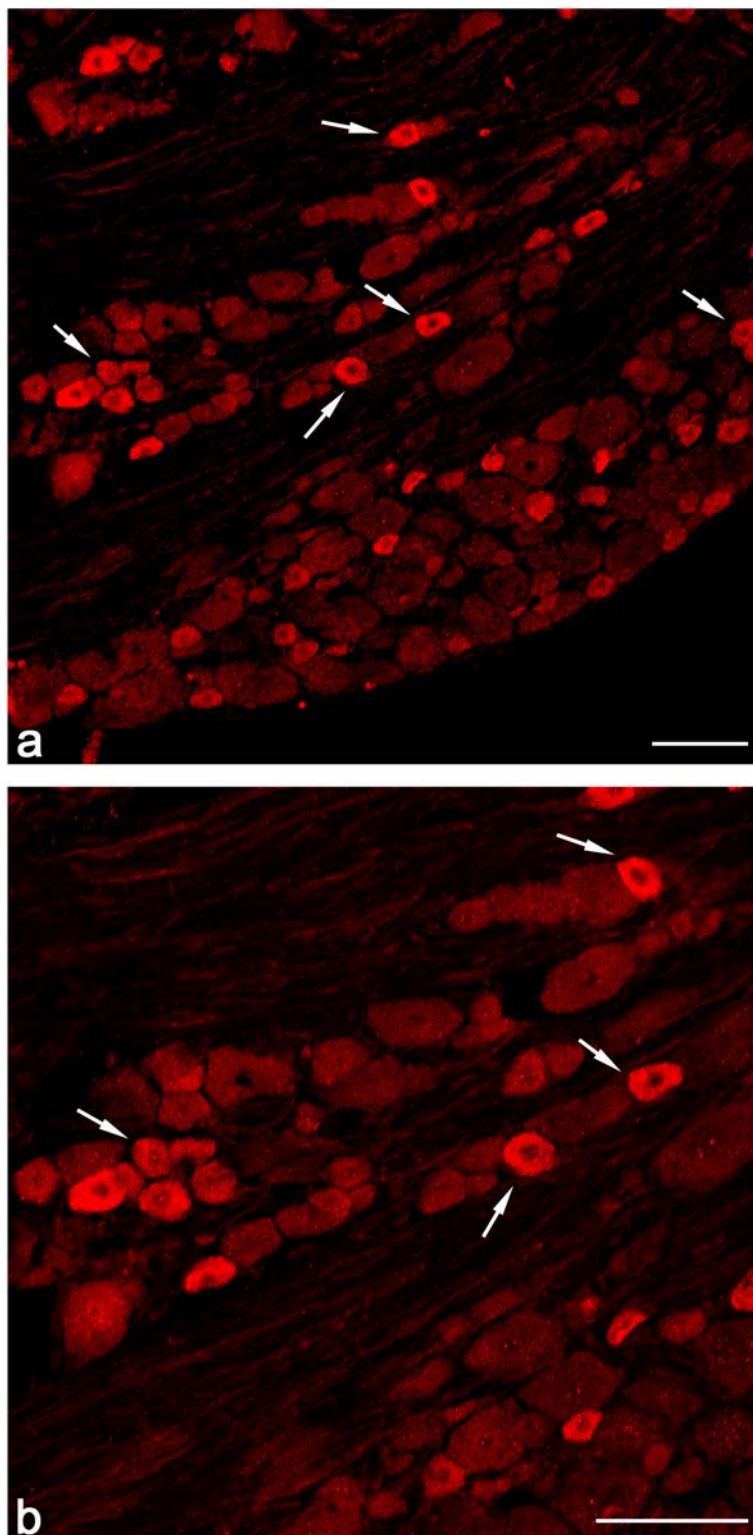


**Figura 13- Efeito antinociceptivo pela ação periférica do SNAP sobre a hipernociceção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub> em camundongos.** A hipernociceção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata). Após 30 min, SNAP (1-9 µg/pata) ou salina (20 µl) foram administrados ipsilateralmente ou contralateralmente (C.L.). A hipernociceção foi determinada 1,5 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo que recebeu salina/SNAP i.pl. ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo que recebeu PGE<sub>2</sub> e foi tratado com salina ( $P < 0.05$ ).

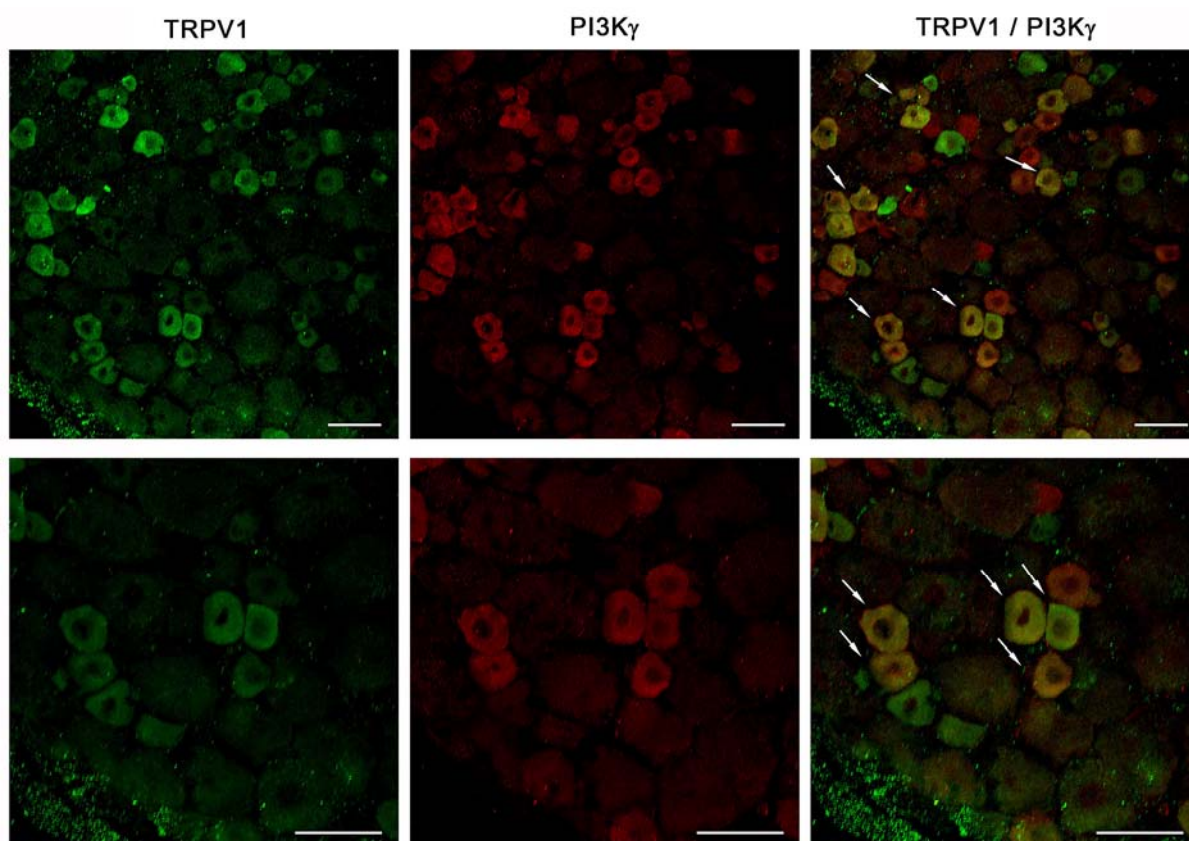
**4.9 PI3K $\gamma$  é expressa em neurônios sensoriais primários de pequeno diâmetro: co-expressão com neurônios positivos para TRPV1 e IB<sub>4</sub> mas não naqueles positivos para SP ou em fibras mielinizadas.**

Após a padronização das doses dos diferentes agonistas opióides necessárias para produzir efeito antinociceptivo periférico em camundongos, iniciou-se os experimentos para comprovar a hipótese principal deste estudo. Primeiramente foi analisado se os neurônios aferentes primários expressam a PI3K $\gamma$ . Para este fim realizou-se a imunomarcacão da PI3K $\gamma$  em cortes histológicos de GRD de ratos. A análise por microscopia confocal revelou que neurônios aferentes primários expressam a PI3K $\gamma$  (Figura 14). Foi observado que a maioria dos neurônios que expressam a PI3K $\gamma$  são de pequeno diâmetro (<25  $\mu$ m), ou seja, provavelmente, fibras nociceptivas. Reforçando esta hipótese, observou-se que aproximadamente 95% ( $96 \pm 2\%$ ) dos neurônios que expressam a PI3K $\gamma$  apresentam ligação para a isolectina B<sub>4</sub> (Figura 15). Ainda, aproximadamente 70% ( $68 \pm 3\%$ ) dos neurônios que expressam a PI3K $\gamma$  também expressam o receptor TRPV1 (Figura 16). Por outro lado, foi observado que menos de 10% ( $9 \pm 1,5\%$ ) dos neurônios que expressam a PI3K $\gamma$  são positivos para SP (Figura 17) e que nenhum neurônio positivo para PI3K $\gamma$  apresenta imuno-marcação para NF-200, um marcador de fibras mielinizadas (Figura 18).

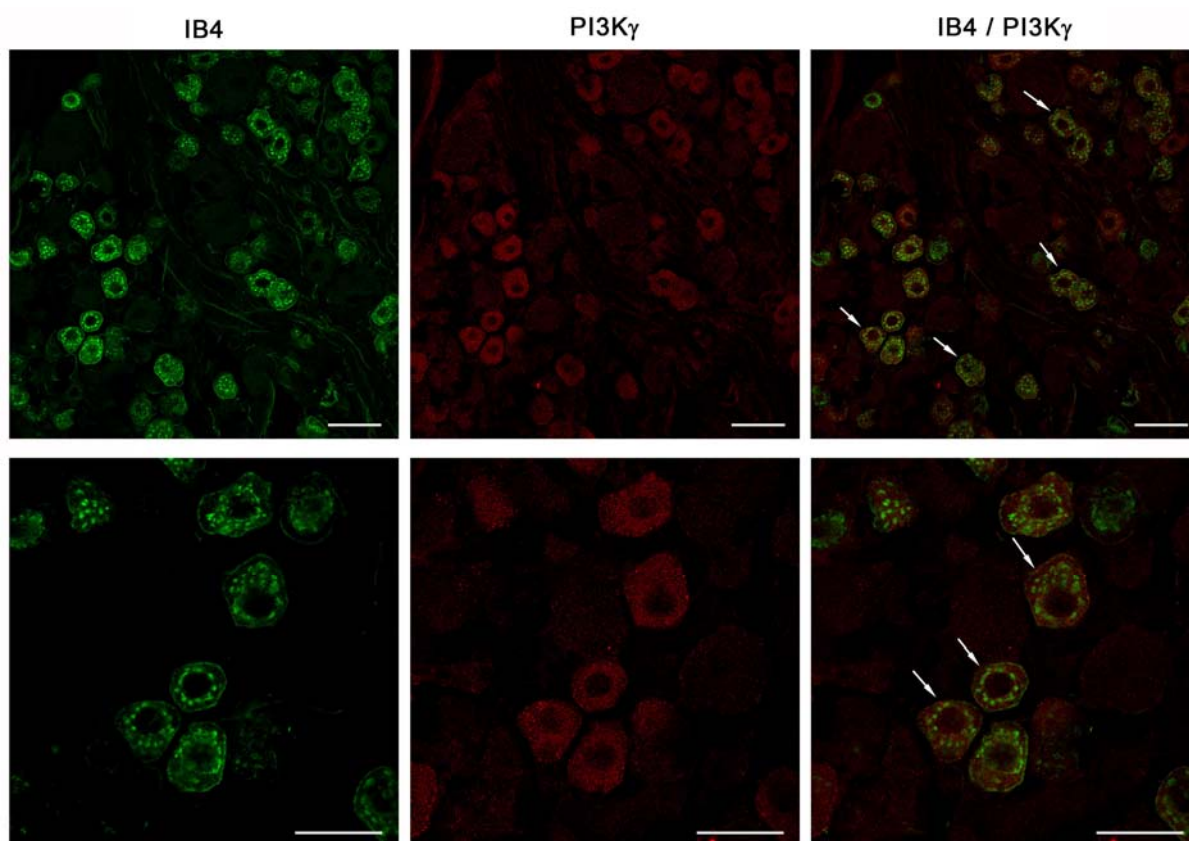




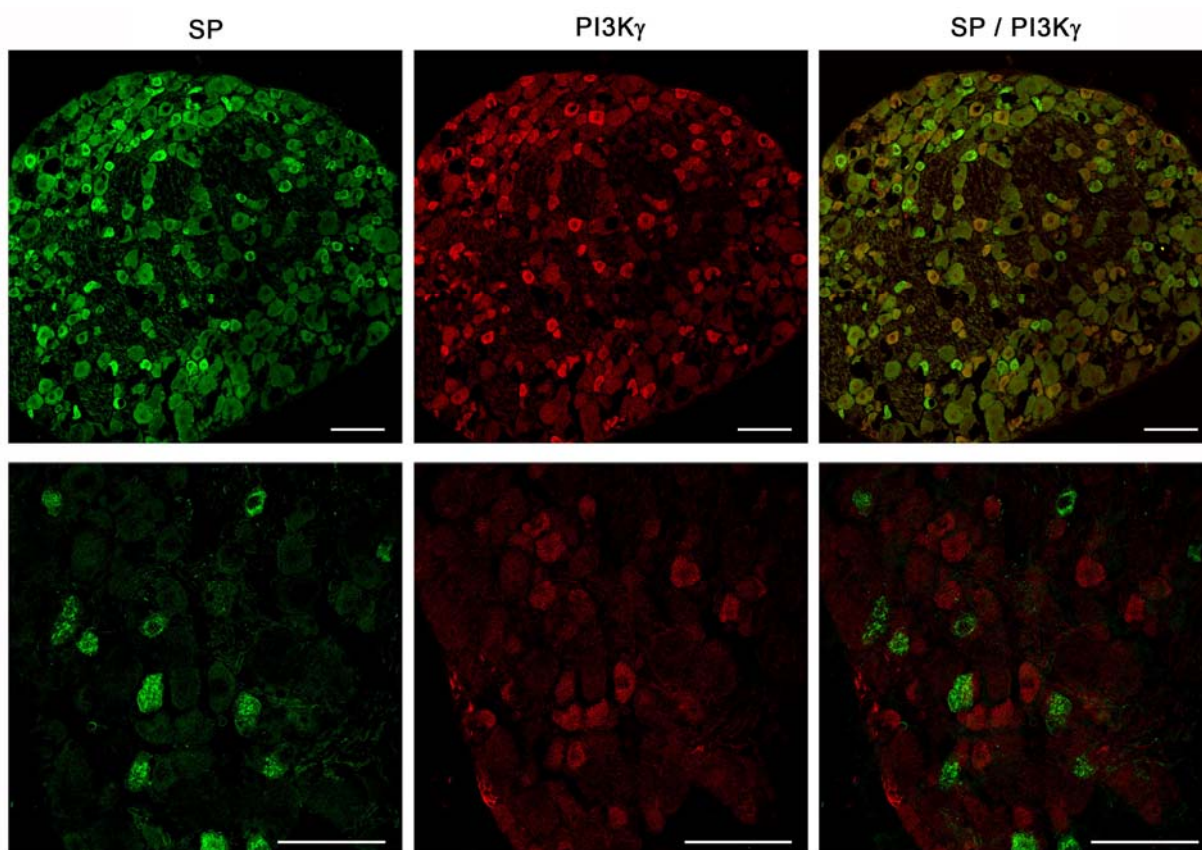
**Figura 14 – Expressão da PI3K $\gamma$  em neurônios do GRD de ratos.** Secções típicas da imunoreatividade para PI3K $\gamma$  em neurônios do GRD (Painel a,b). Painel b representa um aumento de duas vezes em uma região do painel a. A análise da imunofluorescência foi feita por microscopia confocal. As células positivas para PI3K $\gamma$  são indicadas pelas setas. Barra de escala 100  $\mu$ m.



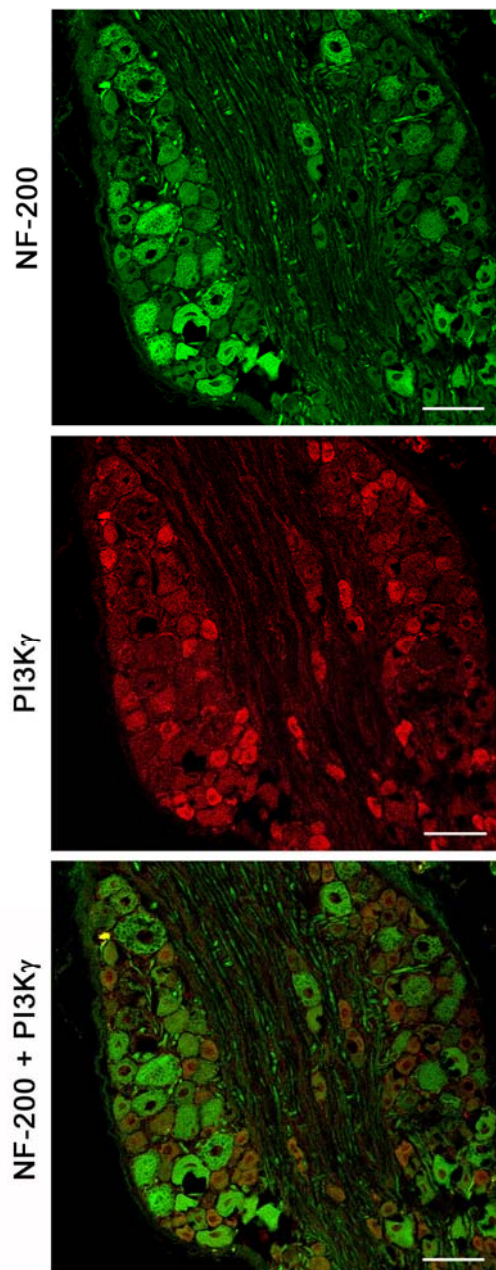
**Figura 15 – Expressão da PI3K $\gamma$  e TRPV1 em neurônios do GRD de ratos.** Secções típicas da imunoreatividade para PI3K $\gamma$  e para TRPV1 em neurônios do GRD (n=6 campos). A análise da imunoflorescência foi feita por microscopia confocal. As imagens inferiores indicam um aumento de duas vezes em uma região das imagens superiores. As setas indicam alguns neurônios que apresentam dupla marcação. Barras de escala de 50  $\mu$ m.



**Figura 16 – Expressão da PI3K $\gamma$  e ligação da IB<sub>4</sub> em neurônios do GRD de ratos.** Seções típicas da imunoreatividade para PI3K $\gamma$  e ligação para IB<sub>4</sub> em neurônios do GRD (n=6 campos). A análise da imunofluorescência foi feita por microscopia confocal. As imagens inferiores indicam um aumento de duas vezes em uma região das imagens superiores. As setas indicam alguns neurônios que apresentam dupla marcação. Barras de escala de 50  $\mu$ m.



**Figura 17 – Expressão da PI3K $\gamma$  e SP em neurônios do GRD de ratos.** Secções típicas da imunoreatividade para PI3K $\gamma$  e para SP em neurônios do GRD (n=7 campos). A análise da imunoflorescência foi feita por microscopia confocal. As imagens inferiores indicam um aumento de duas vezes e meia em uma região das imagens superiores. Barras de escala de 50  $\mu$ m.

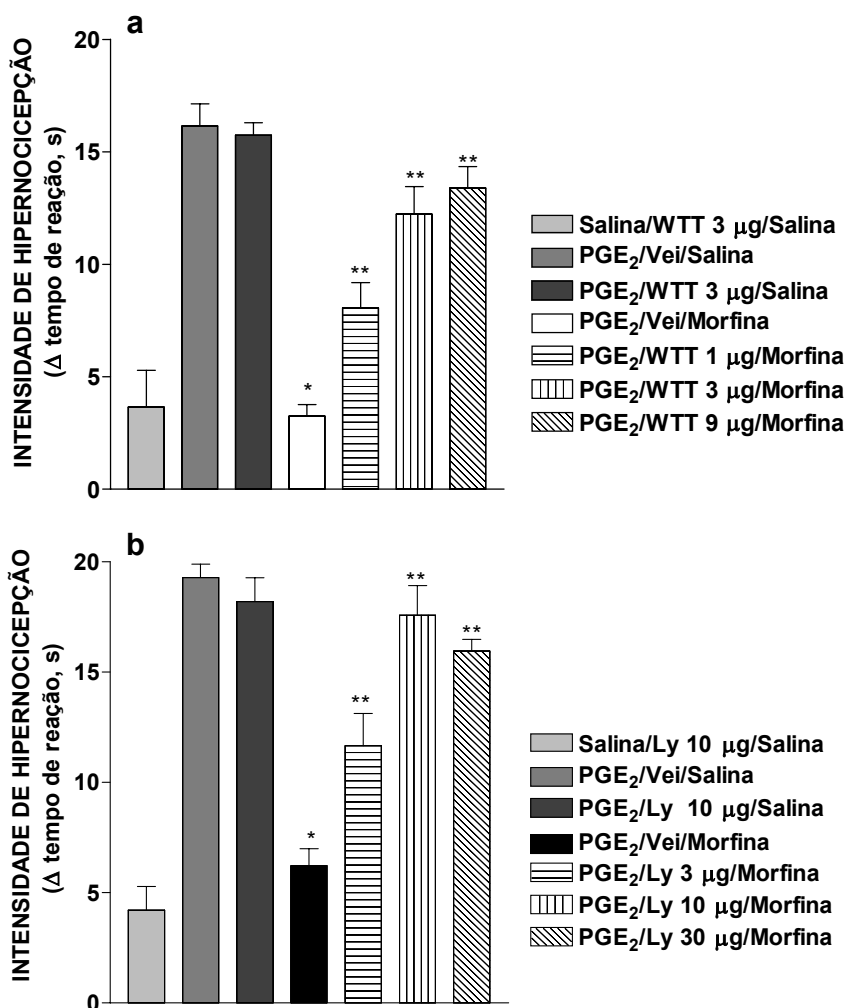


**Figura 18 – Expressão da PI3K $\gamma$  e NF-200 em neurônios do GRD de ratos.** Secções típicas da imunoreatividade para PI3K $\gamma$  e para NF-200 em neurônios do GRD (n=6 campos). A análise da imunofluorescência foi feita por microscopia confocal. Barras de escala de 50  $\mu$ m.

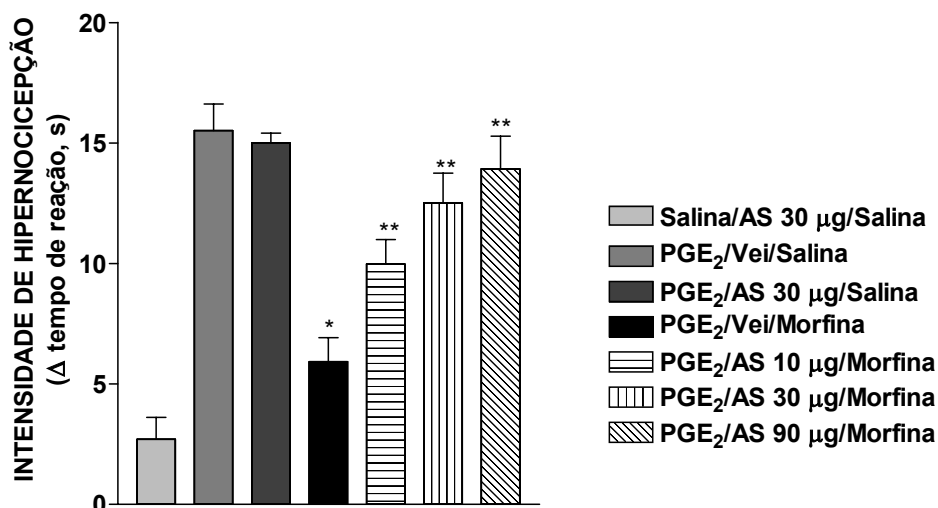
#### 4.10 PI3K $\gamma$ medeia a antinocicepção periférica da morfina em ratos.

Uma vez confirmada a expressão PI3K $\gamma$  em neurônio nociceptivos primários, o próximo passo foi investigar a participação desta quinase no efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides. A administração i.pl. de PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata) em ratos induziu hipernocicepção mecânica que foi inibida pela morfina (6  $\mu$ g/pata - Figura 19). O efeito antinociceptivo produzido pela administração periférica de morfina foi prevenido de maneira dose-dependente pelo tratamento dos animais com inibidores não-seletivos da PI3K, wortmannin (1, 3 e 10  $\mu$ g/pata Figura 19a) ou LY 294002 (3-30  $\mu$ g/pata; Figura 19b). Ainda, o tratamento local com wortmannin (3  $\mu$ g/pata Figura 19a) ou com LY 294002 (10  $\mu$ g/pata, Figura 19b) não alterou o limiar nociceptivo basal dos animais, bem como não alterou a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub> (Figura 19a,b).

Investigando se a PI3K de isoforma  $\gamma$  era responsável pelo efeito antinociceptivo periférico da morfina, foi observado que o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica deste opióide foi prevenido de maneira dose-dependente pelo tratamento dos animais com um inibidor seletivo da PI3K $\gamma$ , AS 605240 (10-90  $\mu$ g/pata Figura 20). Ainda, o tratamento local com AS 605240 (30  $\mu$ g/pata) não alterou o limiar nociceptivo basal dos animais, bem como não alterou a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub> (Figura 20).



**Figura 19 - Efeito da inibição da PI3K, por inibidores não-seletivos, sobre a antinocicepção produzida pela ação periférica da morfina em ratos.** A hipernocicepção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata), seguido (1.5 h após a injeção de PGE<sub>2</sub>) da administração de wortmannin (WTT; Painel a, 1-10 μg/pata), ou LY294002 (Ly; Painel b, 3-30 μg/pata) ou veículo. Após 30 min, morfina (6 μg/pata) ou veículo (50 μl) foram administrados ipsilateralmente. A hipernocicepção foi determinada 3 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo tratado com salina ( $P < 0.05$ ). \*\* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo tratado com morfina ( $P < 0.05$ ).



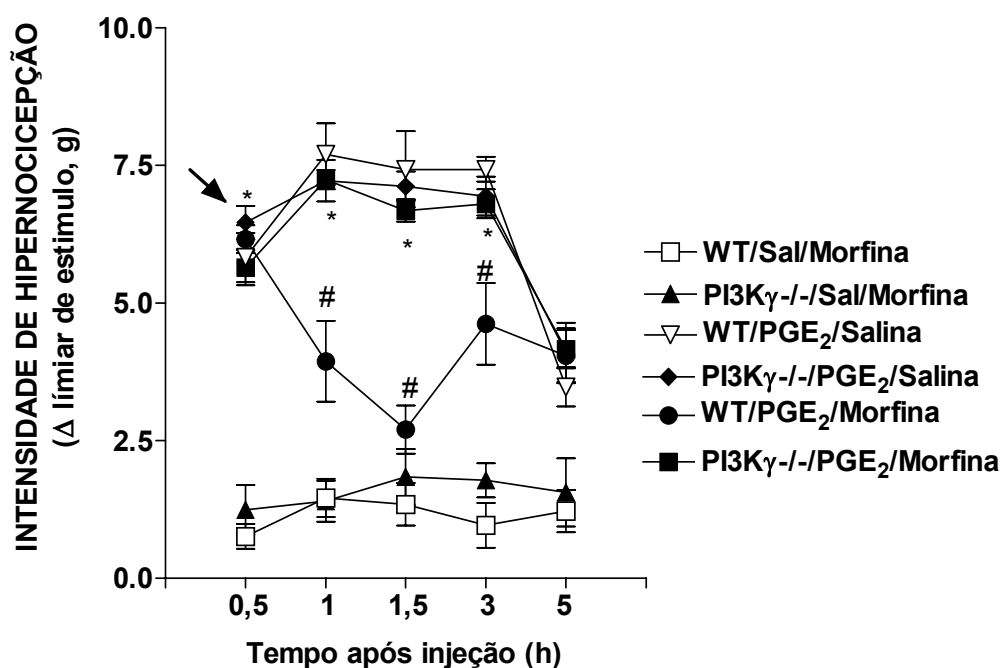
**Figura 20 - Efeito da inibição seletiva da PI3K $\gamma$  sobre a antinociceção produzida pela ação periférica da morfina em ratos.** A hipernociceção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata), seguido (1.5 h após a injeção de PGE<sub>2</sub>) da administração de AS 605240 (AS; 10-90 μg/pata) ou veículo. Após 30 min, morfina (6 μg/pata) ou veículo (50 μl) foram administrados ipsilateralmente. A hipernociceção foi determinada 3 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo tratado com veículo ( $P < 0.05$ ). \*\* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo tratado com morfina ( $P < 0.05$ ).



#### **4.11 PI3K $\gamma$ medeia a antinociceção produzida pela ação periférica da morfina em camundongos.**

Corroborando os achados obtidos em ratos, foi observado que a PI3K $\gamma$  também é importante para o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica da morfina. Esta sugestão é baseada no fato de que a administração i.pl. de morfina (10  $\mu$ g/pata) não altera a hipernociceção induzida pela PGE<sub>2</sub> em animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>, fato que foi observado quando a morfina foi administrada em animais selvagens (Figura 21). Cabe salientar que, o limiar nociceptivo mecânico basal dos animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> não diferiu significativamente do de animais selvagens, e que a PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata) produz hipernociceção mecânica de mesma intensidade nestes animais.

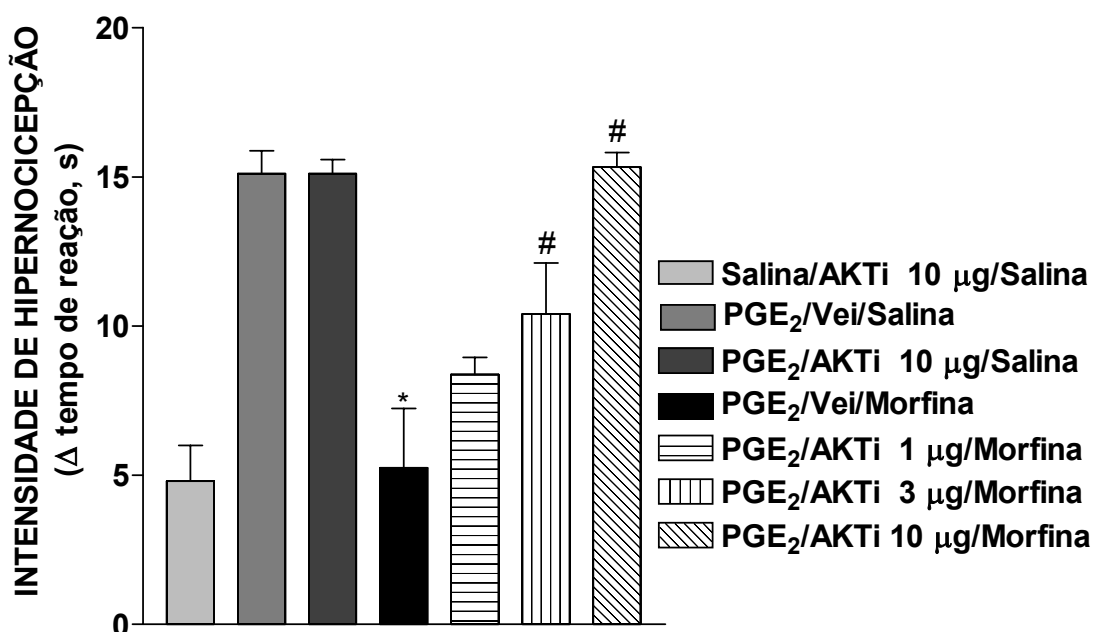
Para confirmar que os camundongos utilizados neste estudo eram realmente deficientes para a PI3K $\gamma$ , determinou-se a expressão do RNAm para esta proteína em amostras extraídas de GRD de animais selvagens e de PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Como pode ser observado, animais selvagens apresentam expressão de RNAm para a PI3K $\gamma$  no GRD, enquanto isso não foi observado em animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> (Anexo 2).



**Figura 21 – Efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica da morfina em camundongos PI3K $\gamma^{-/-}$ .** A hipernocicepção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata) em animais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ . Após 30 min (seta), morfina (10  $\mu$ g/pata) ou salina (20  $\mu$ l) foram administradas ipsilateralmente (painel A). Os resultados são expressos pela média  $\pm$  E.P.M. de 5-6 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo de animais WT que receberam morfina ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo de animais WT tratados com salina ( $P < 0.05$ ).

#### **4.12 AKT medeia a antinocicepção produzida pela ação periférica da morfina em ratos.**

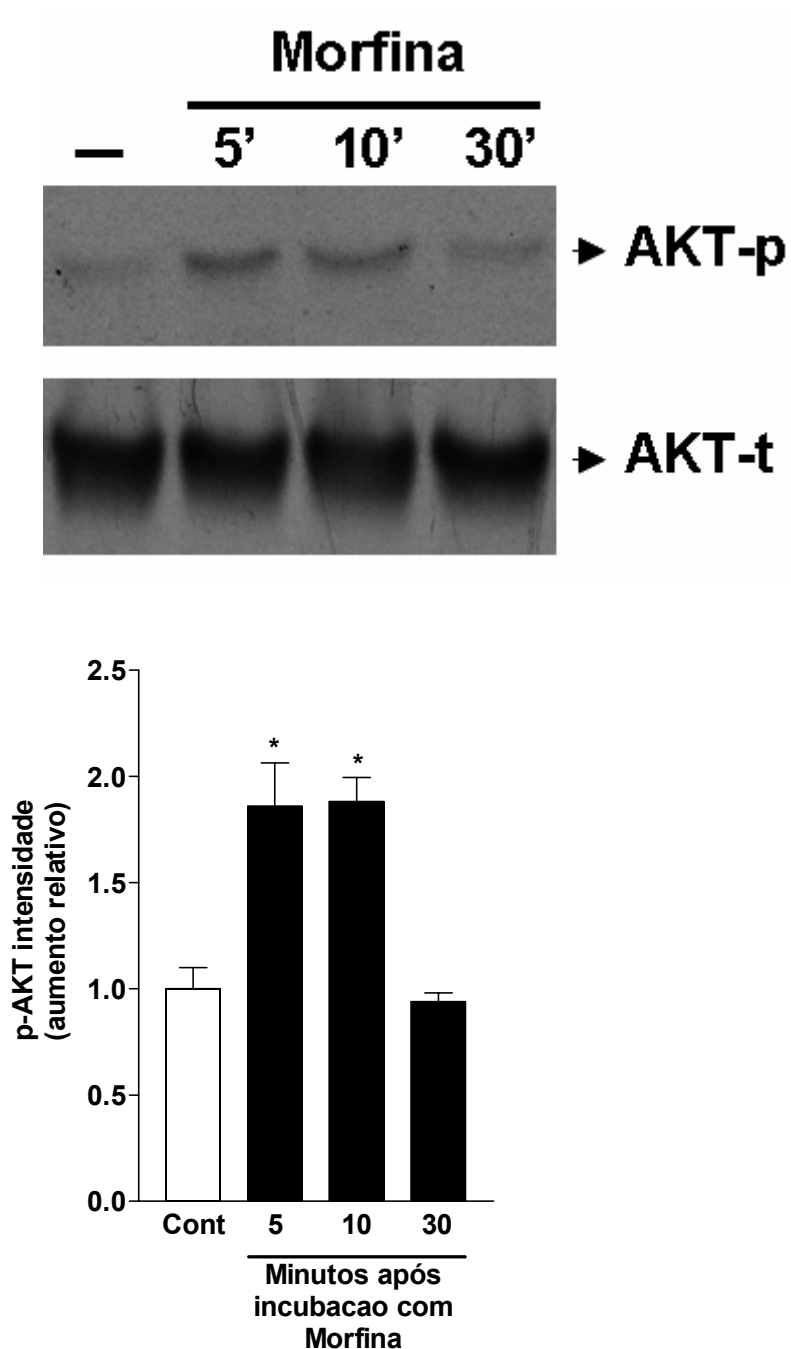
Uma das principais enzimas responsáveis pela transmissão dos sinais intracelulares iniciados pela PI3K $\gamma$  é a proteína quinase B, mais conhecida como AKT (ENGELMAN et al., 2006). Sabendo disso, foi analisado a participação desta quinase nos efeitos antinociceptivos produzidos pela ação periférica da morfina. Assim, foi observado que o bloqueio da hipernocicepção pela morfina administrada perifericamente, foi prevenido de maneira dose-dependente pelo tratamento local dos animais com um inibidor seletivo da AKT, inibidor de AKT IV (AKTi; 1-10  $\mu$ g/pata; Figura 22). Cabe ressaltar que o tratamento local com o AKTi (10  $\mu$ g/pata) não alterou o limiar nociceptivo basal dos animais, ou seja não produziu efeito hipernociceptivo *per se*, e nem alterou a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub> (Figura 22).



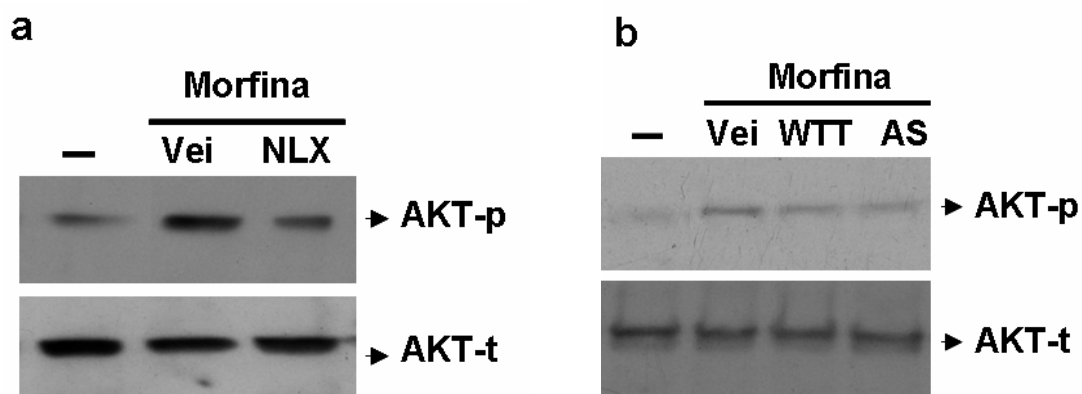
**Figura 22 - Efeito da inibição seletiva da AKT sobre a antinocicepção periférica da morfina em ratos.** A hipernocicepção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata), seguido (1,5 h após a injeção de PGE<sub>2</sub>) da administração de um inibidor seletivo da AKT (AKTi; 1-10 μg/pata) ou veículo. Após 30 min, morfina (6 μg/pata) ou veículo (20 μl) foram administrados ipsilateralmente. A hipernocicepção foi determinada 3 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo tratado com veículo ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo tratado com morfina ( $P < 0.05$ ).

#### **4.13 Morfina ativa AKT em culturas de neurônios derivadas do GRD: papel dos receptores opióides e da PI3K $\gamma$ .**

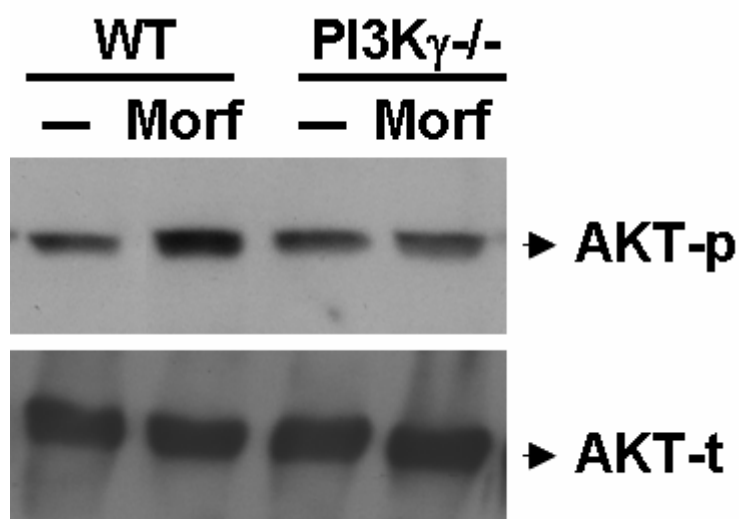
Uma das maneiras de se estudar o mecanismo de sinalização intracelular envolvidos na ação de drogas analgésicas de efeito periféricas, é analisando seus efeitos em culturas de neurônios derivados do GRD (HALL, 2006). Para se comprovar a possível ativação da via PI3K $\gamma$ /AKT pela morfina, analisou-se a atividade da AKT, frente à exposição destas células à morfina. Quando ativada, a AKT se torna fosforilada. A incubação de culturas de neurônios derivados do GRD de ratos, com morfina produziu um aumento na forma fosforilada da AKT, sendo que este aumento foi máximo 5 minutos após a incubação, mantendo-se nos mesmos níveis até 10 minutos após, e voltando aos níveis basais após 30 minutos (Figura 23). Além disto, foi observado que o aumento nos níveis da AKT fosforilada induzida pela morfina foi prevenido pela incubação prévia das culturas com naloxona (Figura 24a), um antagonista não seletivo dos receptores opióides, com um inibidor não-seletivo da PI3K, wortmannin, ou ainda com um inibidor seletivo da PI3K $\gamma$ , AS 605240 (Figura 24b). Adicionalmente, foi investigado se a morfina também é capaz de ativar a AKT em culturas de neurônios sensitivos provindos de camundongos. Foi observado que a incubação de morfina em culturas de neurônios de camundongos selvagens é capaz de aumentar os níveis de AKT fosforilada, o que não foi observado em culturas derivadas de camundongos PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> (Figura 25).



**Figura 23 – Efeito da morfina sobre a ativação da AKT em neurônios derivados do GRD de ratos.** Neurônios derivados do GRD foram incubados com morfina (10  $\mu$ M) ou meio por 5, 10 e 30 minutos. Após a incubação as células foram lisadas, as proteínas extraídas e separadas por eletroforese e identificadas por Western blot como descrito. Blots representativos de dois experimentos são mostrados. A análise da densidade ótica das bandas foi feita com o auxílio do programa Image J. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo incubado com meio ( $P < 0.05$ ).



**Figura 24 – Ativação da AKT pela morfina em neurônios derivados do GRD depende dos receptores opióides e da PI3K $\gamma$ .** Neurônios derivados do GRD forma incubados com morfina (10  $\mu$ M) na presença ou não de naloxona (NLX, 1  $\mu$ M; **Painel a**), wortmannin (100 nM) ou AS 605240 (100 nM; **Painel b**). Os inibidores foram incubados 10 minutos antes da morfina. Após 5 minutos de incubação com morfina as células foram lisadas, as proteínas extraídas e separadas por eletroforese e identificadas por Western blot como descrito. Blots representativos são mostrados.



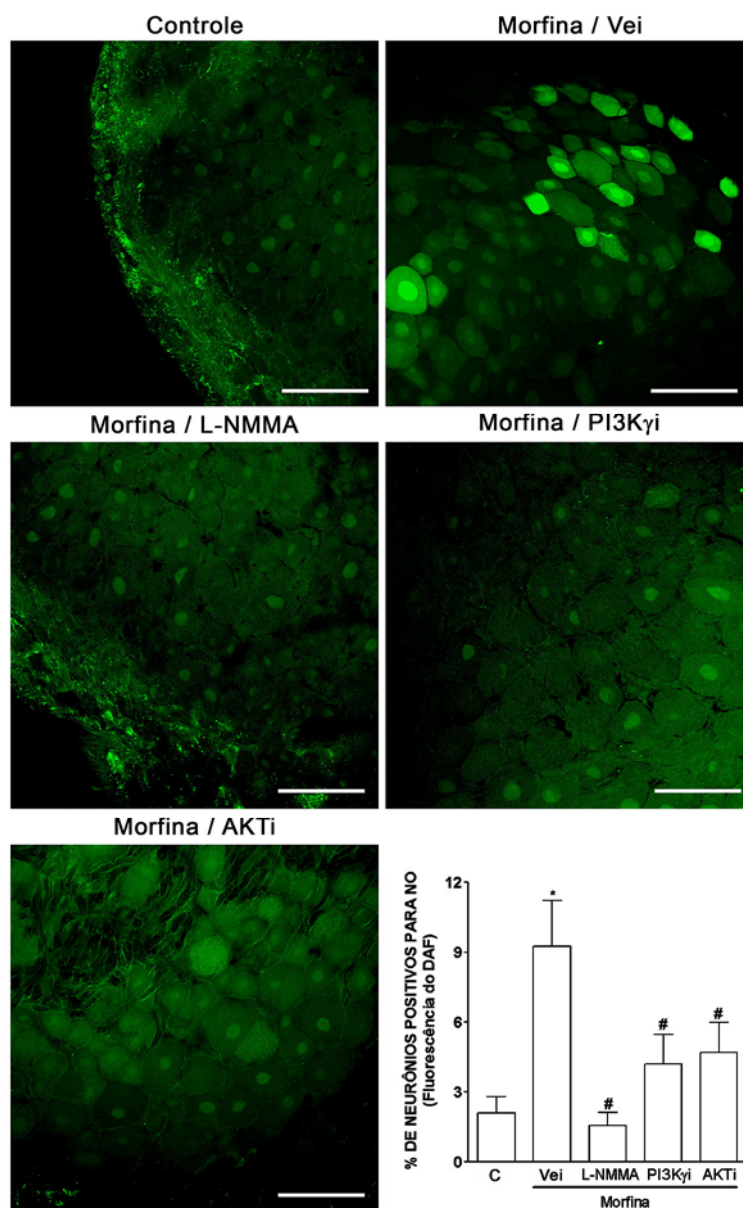
**Figura 25 – Efeito da morfina sobre a ativação de AKT em culturas de neurônios derivados do GRD de camundongos selvagens e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>.** Neurônios derivados do GRD de camundongos selvagens (WT) ou deficientes para a PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>) foram incubados com morfina (Morf; 10  $\mu$ M) ou veículo. Após 5 minutos de incubação com morfina as células foram lisadas, as proteínas extraídas e separadas por eletroforese e identificadas por Western blot como descrito. Blots representativos são mostrados.



#### **4.14 Morfina induz a produção de NO por neurônios sensoriais primários: papel da via PI3K $\gamma$ /AKT**

Após a observação de que o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférico da morfina depende da ativação da via de sinalização PI3K $\gamma$ /AKT, o próximo passo deste trabalho foi investigar se a morfina seria capaz de estimular a produção de NO pelos neurônios nociceptivos primários, e se a via PI3K $\gamma$ /AKT estaria envolvida neste efeito. Para isso foi utilizado um indicador intracelular da produção de NO, o DAF-FM (KOJIMA, et al., 1998; BROWN et al., 1999). Assim, observou-se que a incubação de GRDs com morfina aumenta o número de células DAF-fluorescentes, indicando um aumento na produção de NO (Figura 26). Cabe ressaltar que a maioria destas células positivas para NO, eram de médio e pequeno diâmetro. Para comprovar que esta fluorescência se tratava realmente de NO, o mesmo experimento foi realizado, só que na presença de L-NMMA. Foi observado que o L-NMMA aboliu o efeito da morfina sobre a produção de NO (Figura 26). Ainda, a incubação com SNAP, um doador de NO, também produziu fluorescência (dado não mostrado).

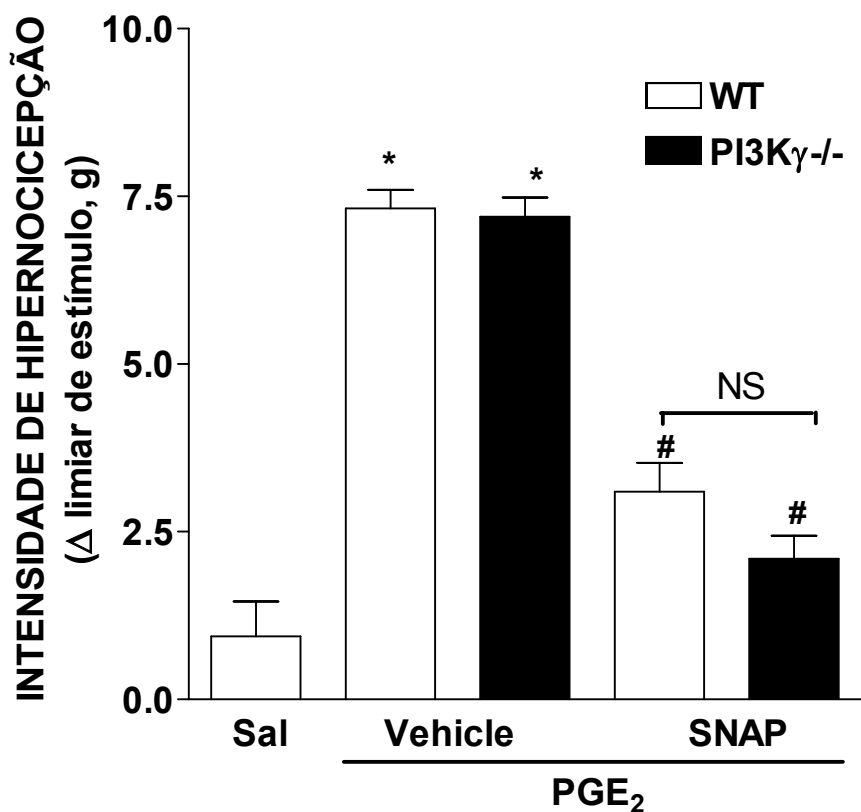
Investigando a participação da via PI3K $\gamma$ /AKT no efeito da morfina sobre a produção de NO por neurônios sensoriais primários, foi observado que a incubação prévia dos neurônios com inibidores seletivos da PI3K $\gamma$ , AS 605240 (Figura 26) ou da AKT (AKTi) preveniram o efeito da morfina.



**Figura 26 - Efeito da morfina sobre a produção de NO pelos neurônios nociceptivos primários: papel da PI3K $\gamma$ /AKT.** Imagens representativas de cortes de GRD, após a incubação *ex vivo* com morfina (10  $\mu$ M) por 1 h na presença ou ausência das seguintes substâncias: L-NMMA (100  $\mu$ M); AS605240 (PI3K $\gamma$ i, 100 nM) ou inibidor de AKT (AKTi; 100 nM). SNAP (10  $\mu$ M) foi usado como controle positivo de fluorescência. A fluorescência (DAF-FM) indica a produção de NO (Painel a). Análise quantitativa da porcentagem de neurônios positivos para NO (DAF-FM; Painel b; n= 10 cortes). \* indica diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo controle ( $P<0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo tratado com morfina ( $P<0.05$ ).

#### **4.15 NO produz efeito antinociceptivo por ação periférica em animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>**

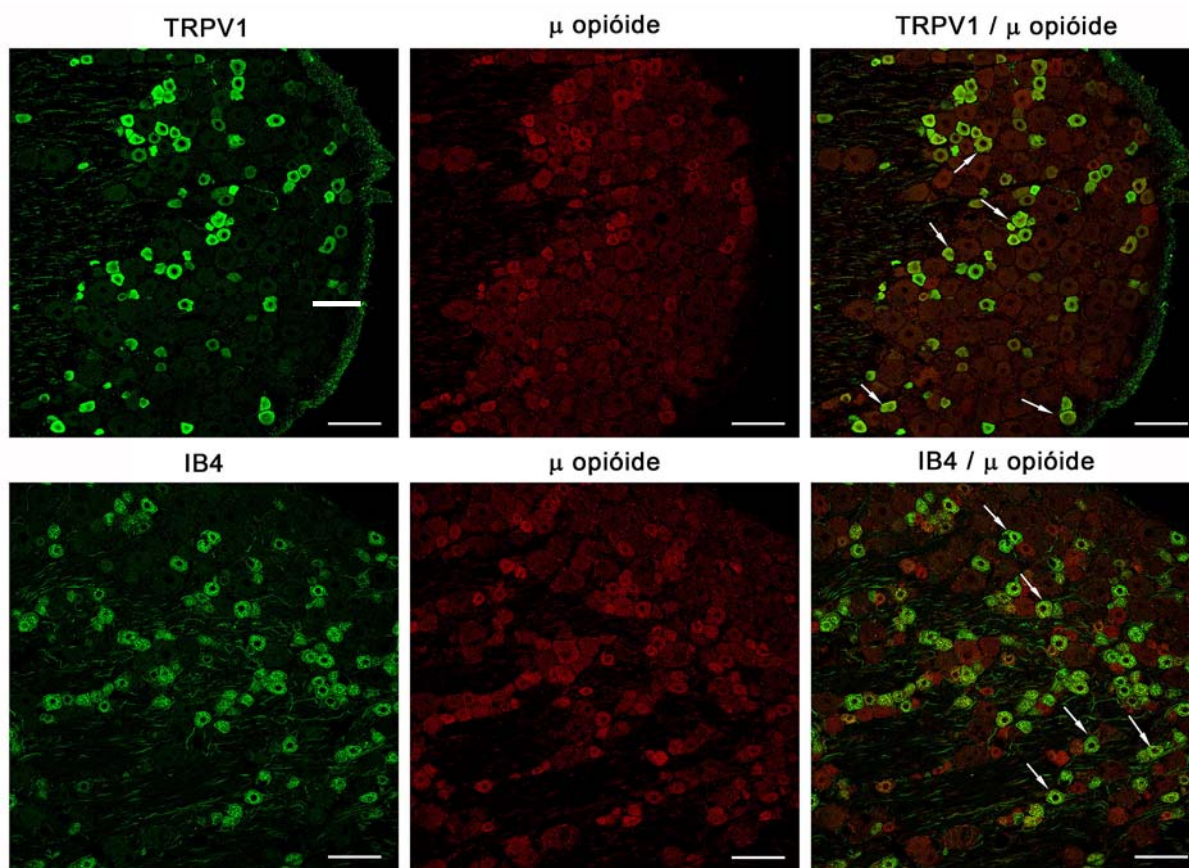
Para confirmar que, na cascata de sinalização intracelular envolvida no efeito antinociceptivo produzido pela ação periférico da morfina, a PI3K $\gamma$  está em uma posição anterior à da produção do NO, foi investigado o efeito antinociceptivo do NO, administrado periféricamente, em animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Assim como observado em camundongos selvagens, a administração i.pl. de SNAP (3  $\mu$ g/pata) inibiu a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub> em animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> (Figura 27).



**Figura 27** Efeito antinociceptivo pela ação periférica do SNAP em animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>. A hipernocicepção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata) em camundongo selvagens (WT) ou PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Após 30 min, SNAP (3  $\mu$ g/pata) ou salina (20  $\mu$ l) foram administrados ipsilateralmente. A hipernocicepção mecânica foi avaliada 1 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média  $\pm$  EPM de 5-6 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo controle ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo tratado com salina ( $P < 0.05$ ). NS indica diferença não significativa.

#### **4.16 Expressão de receptores $\mu$ opióides em neurônios nociceptivos primários de ratos positivos para TRPV1 e marcados com IB<sub>4</sub>.**

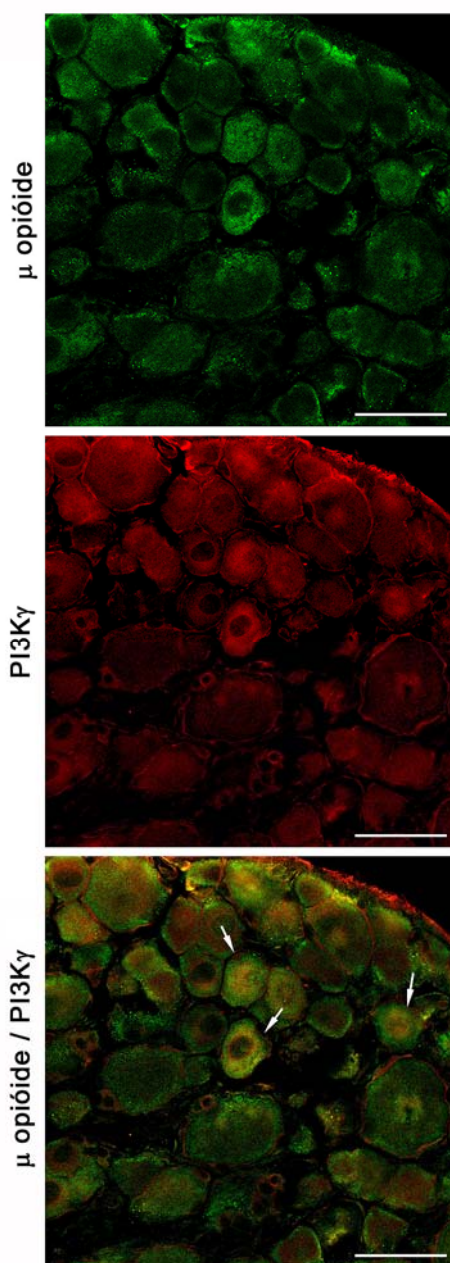
Após ter sido investigado o papel da via de sinalização PI3K $\gamma$ /AKT no efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica da morfina, o próximo passo deste trabalho foi analisar se esta via também participaria do efeito antinociceptivo de agonistas seletivos dos receptores opióides. O primeiro receptor que se investigou foi o receptor  $\mu$  opióide. Primeiramente, foi analisada a expressão deste receptor pelos neurônios nociceptivos primários, em cortes de GRD de ratos. Assim como observado com a PI3K $\gamma$ , os receptores  $\mu$  opióides são principalmente expressos em neurônios de pequeno e médio diâmetro, corroborando as evidências do papel destes receptores no sistema nociceptivo periférico. Suportando este fato, foi observado que a maioria dos neurônios do GRD que os expressam, também expressa TRPV1 ( $65 \pm 2,5\%$ ) e são marcados pela IB<sub>4</sub> ( $46 \pm 1\%$ ; Figura 28).



**Figura 28 – Expressão dos receptores  $\mu$  opióides em neurônios do GRD de ratos.** Secções típicas da imunoreatividade para receptores  $\mu$  opióides em neurônios do GRD, imunoreativos para TRPV1 e que apresentam ligação para IB<sub>4</sub>. As setas indicam neurônios duplamente positivos. A análise da imunofluorescência foi feita por microscopia confocal. Barras de escala de 50  $\mu$ m.

#### **4.17 Expressão de receptores $\mu$ opióides em neurônios do GRD positivos para a PI3K $\gamma$ .**

A análise por microscopia confocal também revelou que a PI3K $\gamma$  é expressa por neurônios do GRD que também expressam receptores  $\mu$  opióides ( $38 \pm 3$  %; Figura 29). Este dado proporciona a base celular para a interação funcional entre os receptores  $\mu$  opióides e a PI3K $\gamma$ , ou seja, mais uma evidência de que ela é necessária para o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides.



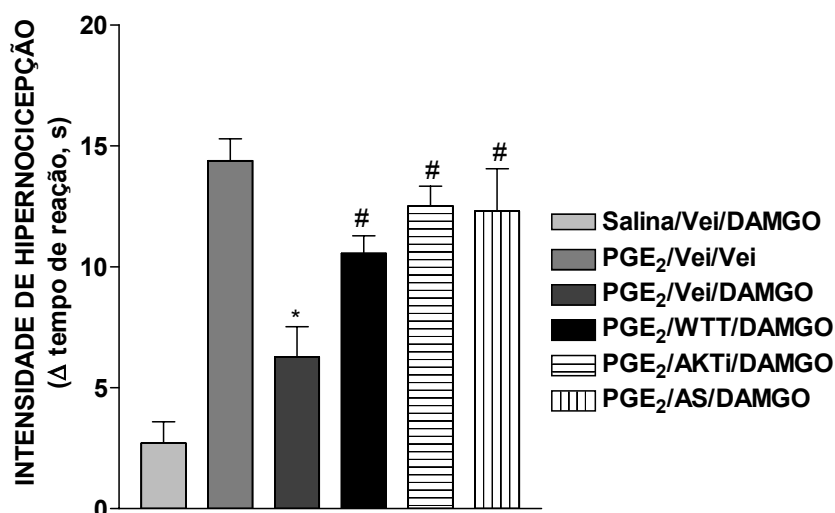
**Figura 29 – Co-expressão entre a PI3K $\gamma$  e os receptores  $\mu$  opióides em neurônios do GRD de ratos.** Secções típicas da imunoreatividade para receptores  $\mu$  opióides em neurônios do GRD, imunoreativos para PI3K $\gamma$ . As setas indicam neurônios duplamente positivos. A análise da imunofluorescência foi feita por microscopia confocal. Barras de escala de 50  $\mu$ m.



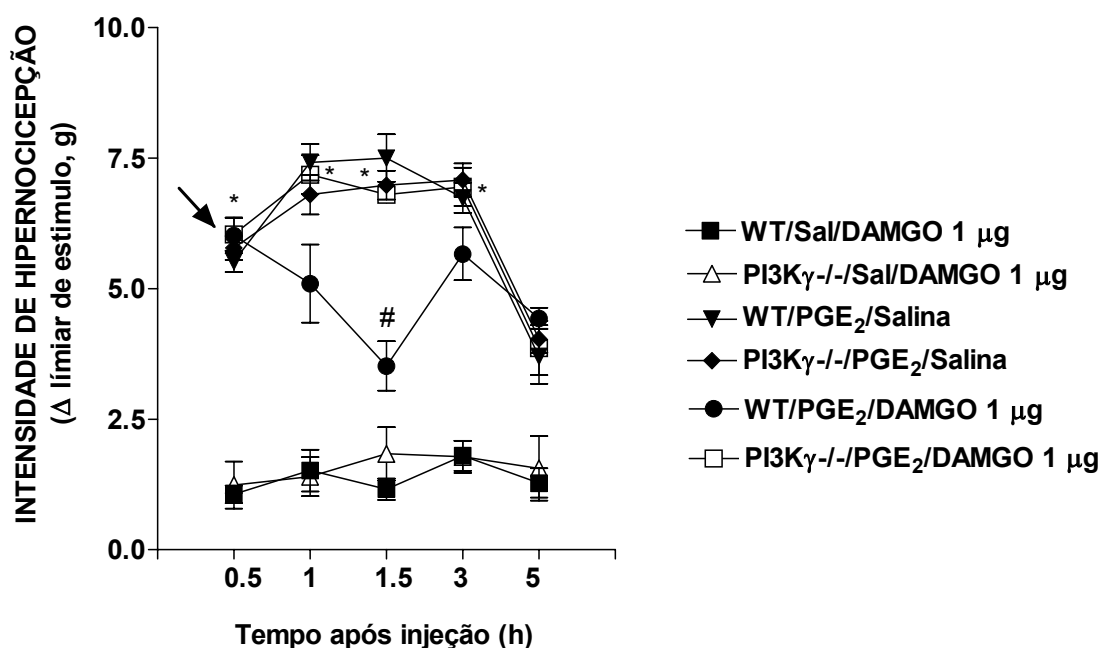
#### **4.18 PI3K $\gamma$ /AKT medeia a antinocicepção produzida pela ação periférica do DAMGO em ratos e camundongos.**

Os efeitos antinociceptivos produzidos pela ação periférica da morfina se devem principalmente a sua atuação em receptores  $\mu$  opióides (STEIN et al., 1989; HAN et al., 2008). Em linha com a hipótese de que este efeito da morfina depende da via PI3K $\gamma$ /AKT, foi observado que o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica de um agonista seletivo para os receptores  $\mu$  opióides, também é prevenido pelo tratamento local dos animais com um inibidor não-seletivo da PI3K, wortmannin (3  $\mu$ g/pata Figura 30), por um inibidor seletivo da PI3K $\gamma$ , AS 605240 (AS, 30  $\mu$ g/pata, Figura 30), bem como por um inibidor seletivo da AKT (10  $\mu$ g/pata, Figura 30).

Assim como observado com a morfina, a administração i.pl. de um agonista seletivo para os receptores  $\mu$  opióides (DAMGO; 1  $\mu$ g/pata), também não produziu antinocicepção por ação periférica em animais PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>, quando comparado com animais selvagens (Figura 31).



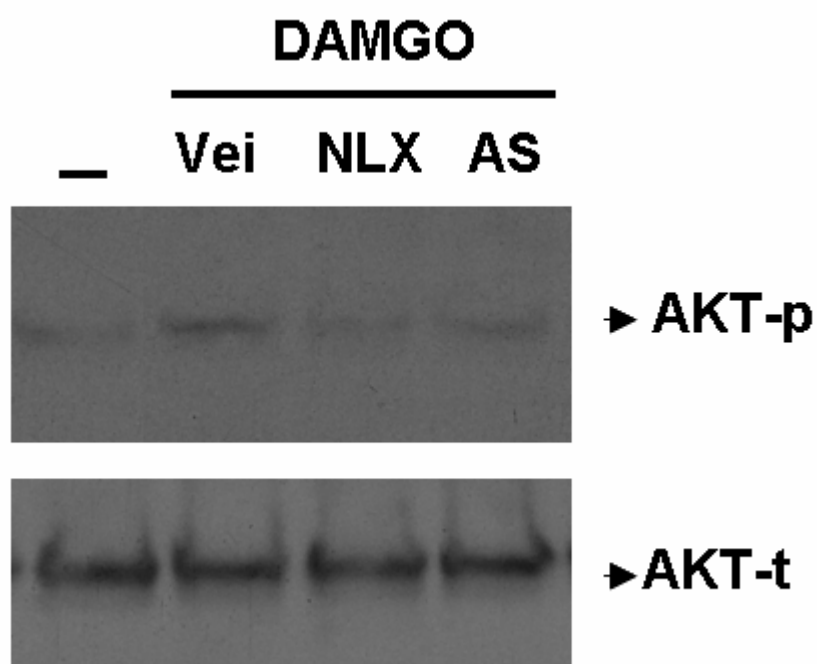
**Figura 30 - Efeito da inibição da PI3K $\gamma$  e da AKT sobre a antinociceção produzida pela ação periférica do DAMGO em ratos.** A hipernociceção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata), seguido (1.5 h após a injeção de PGE<sub>2</sub>) da administração de wortmannin (WTT, 3  $\mu$ g/pata), AS 605240 (AS, 30  $\mu$ g/pata), AKTi (10  $\mu$ g/pata) ou veículo. Após 30 min, DAMGO (1  $\mu$ g/pata) ou veículo foram administrados ipsilateralmente. A hipernociceção foi determinada 3 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo tratado com veículo ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo tratado com DAMGO ( $P < 0.05$ ).



**Figura 31 – Efeito antinociceptivo periférico do DAMGO em camundongos PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>.** A hipernocicepção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata) em animais selvagens (WT) e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Após 30 min (seta), DAMGO (1 μg/pata) ou salina (20 μl) foram administradas ipsilateralmente. A hipernocicepção foi determinada 1.5 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo de animais WT que receberam DAMGO ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo de animais WT tratados com salina ( $P < 0.05$ ).

#### **4.19 DAMGO ativa AKT em culturas de neurônios derivadas do GRD: papel dos receptores opióides e da PI3K $\gamma$ .**

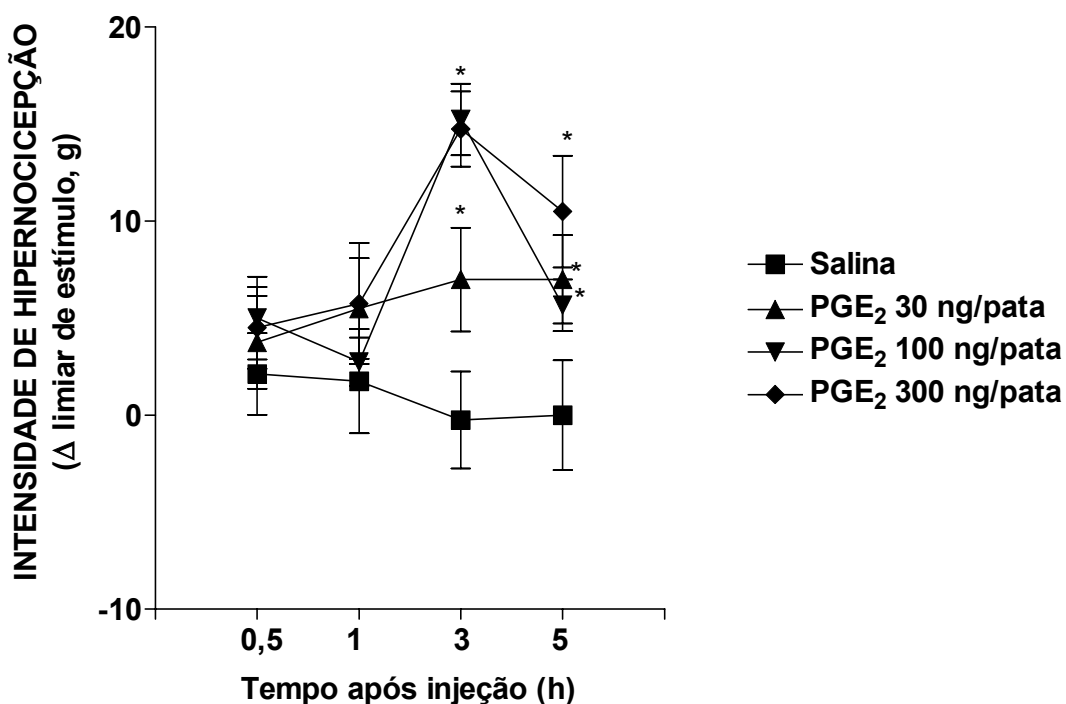
Suportando os resultados *in vivo*, a incubação da cultura de neurônios derivados do GRD de ratos, por 5 minutos com DAMGO, também foi capaz de aumentar a AKT fosforilada, sendo esta ativação inibida pela incubação das células com naloxona. Ainda, a incubação das culturas com o inibidor seletivo da PI3K $\gamma$ , o AS 605240, também foi capaz de prevenir o efeito do DAMGO sobre o aumento da AKT fosforilada (Figura 32). Este conjunto de resultados sugere que a ativação dos receptores  $\mu$  opióides, presentes nos neurônios nociceptivos primários, promove a ativação subsequente da via de sinalização intracelular PI3K $\gamma$ /AKT.



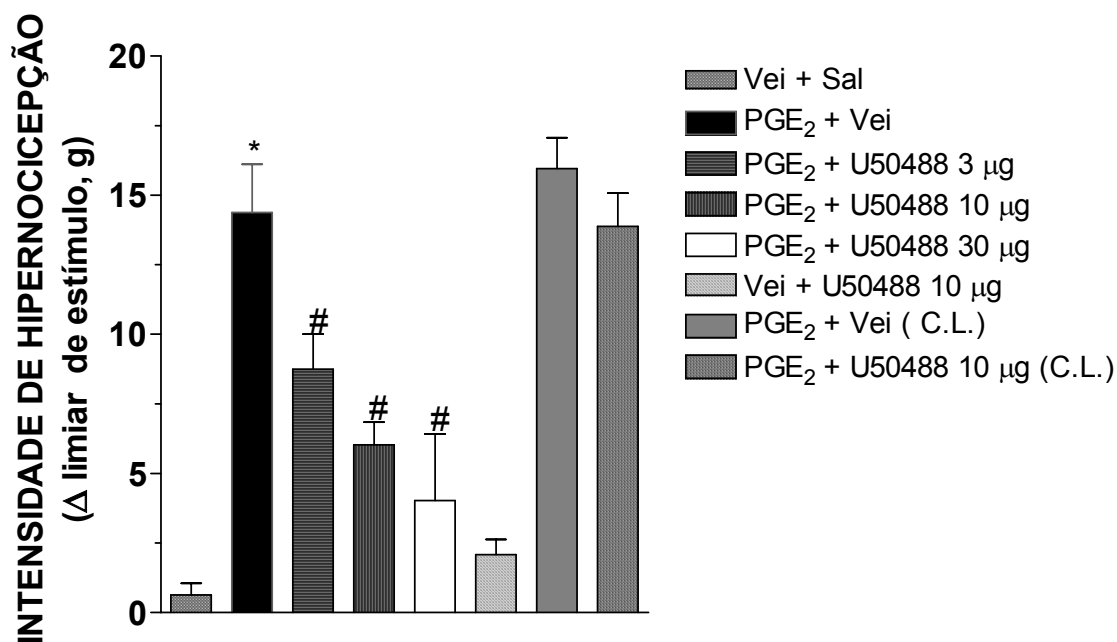
**Figura 32 – Efeito do DAMGO na ativação da AKT em neurônios derivados do GRD: papel do receptor  $\mu$  opióide e da PI3K $\gamma$ .** Neurônios derivados do GRD forma incubados com DAMGO (1  $\mu$ M) na presença ou não de naloxona (1  $\mu$ M) ou AS 605240 (100 nM). Os inibidores foram incubados 10 minutos antes do DAMGO. Após 5 minutos de incubação com DAMGO as células foram lisadas, as proteínas extraídas e separadas por eletroforese e identificadas por Western blot como descrito. Blots representativos para AKT fosforilada (AKT-p) e total (AKT-t) são mostrados.

#### 4.20 Ativação do receptor $\kappa$ opióide na periferia produz antinocicepção

O passo seguinte deste trabalho foi investigar os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo produzido pela ativação periférica do receptor  $\kappa$  opióide. Nesta parte do trabalho optou-se por utilizar uma outra metodologia de avaliação da hipernocicepção, uma adaptação do teste de pressão crescente na pata, agora numa versão automática (vide métodos). Com esta metodologia foi possível detectar efeito hipernociceptivo produzido pela  $PGE_2$ , de maneira dose- dependente, com efeito significativo três horas após sua administração (Figura 33). As doses de  $PGE_2$  que causaram hipernocicepção mecânica significativa, quando avaliada por este método, foram muito semelhantes às detectadas pelo método manual (VIVANCOS et al., 2004). Após ter sido selecionada a dose de  $PGE_2$  necessária para induzir hipernocicepção detectável por este método, passou-se a avaliar o efeito do agonista seletivo de receptores  $\kappa$  sobre esta hipernocicepção. Como observado utilizando-se outros métodos nociceptivos (FUNEZ et al., dados não publicados), a administração local de U50488 foi capaz de reverter a hipernocicepção induzida pela  $PGE_2$  de maneira dose-dependente (Figura 34). Cabe ressaltar que o efeito foi considerado local, uma vez que a administração na pata contralateral, com a dose efetiva (10  $\mu$ g/pata), não foi capaz de alterar a hipernocicepção da  $PGE_2$  (Figura 34). No entanto, a dose de 30  $\mu$ g apresentou efeito sistêmico (dado não mostrado), por isso optou-se pelo emprego da dose de 10  $\mu$ g para os experimentos subsequentes. Além disto, a administração i.pl. de U50488 10  $\mu$ g não foi capaz de alterar *per se* o limiar nociceptivo basal dos animais (Figura 34).



**Figura 33- Hipernociceção mecânica induzida por PGE<sub>2</sub> em ratos.** Curvas dose- e tempo-resposta da hipernociceção mecânica induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (10, 30, 100 ng/pata) ou salina (controle) em ratos, avaliada com o von Frey automático. Os efeitos hipernociceptivos foram avaliados 0,5, 1, 3 e 5 h após a injeção do estímulo. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5-6 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo tratado com salina i.pl. ( $P < 0.05$ ).

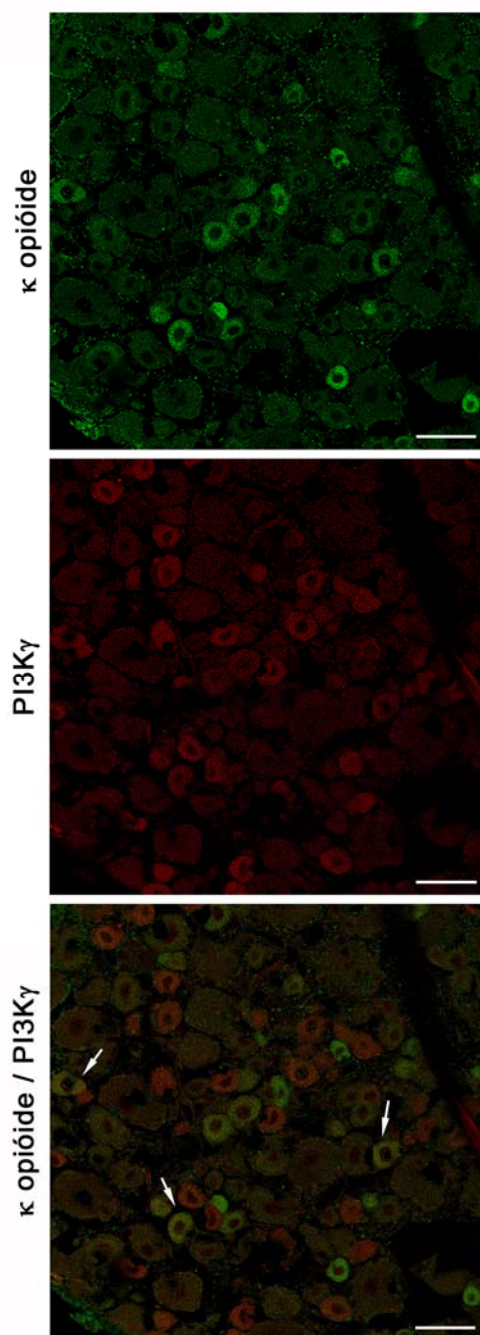


**Figura 34- Efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica do U50488 em ratos.** A hipernocicepção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata). Após 2 h, U50488 (3-30 μg/pata) ou veículo foram administrados ipsilateralmente ou contralateralmente (CL). A hipernocicepção foi avaliada 3 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5-6 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo tratado com salina i.pl. ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo tratado com veículo/PGE<sub>2</sub> ( $P < 0.05$ ).



#### **4.21 PI3K $\gamma$ é expressa em neurônios nociceptivos primários positivos para os receptores $\kappa$ opióides**

Assim como observado para o receptor  $\mu$  opióide, a expressão do receptor  $\kappa$  também foi detectada em neurônios sensoriais primários, principalmente em fibras de pequeno diâmetro. Além disto, aproximadamente 30% ( $33 \pm 2\%$ ) das células que expressam o receptor  $\kappa$  opióide, também expressam a PI3K $\gamma$  (Figura 35).

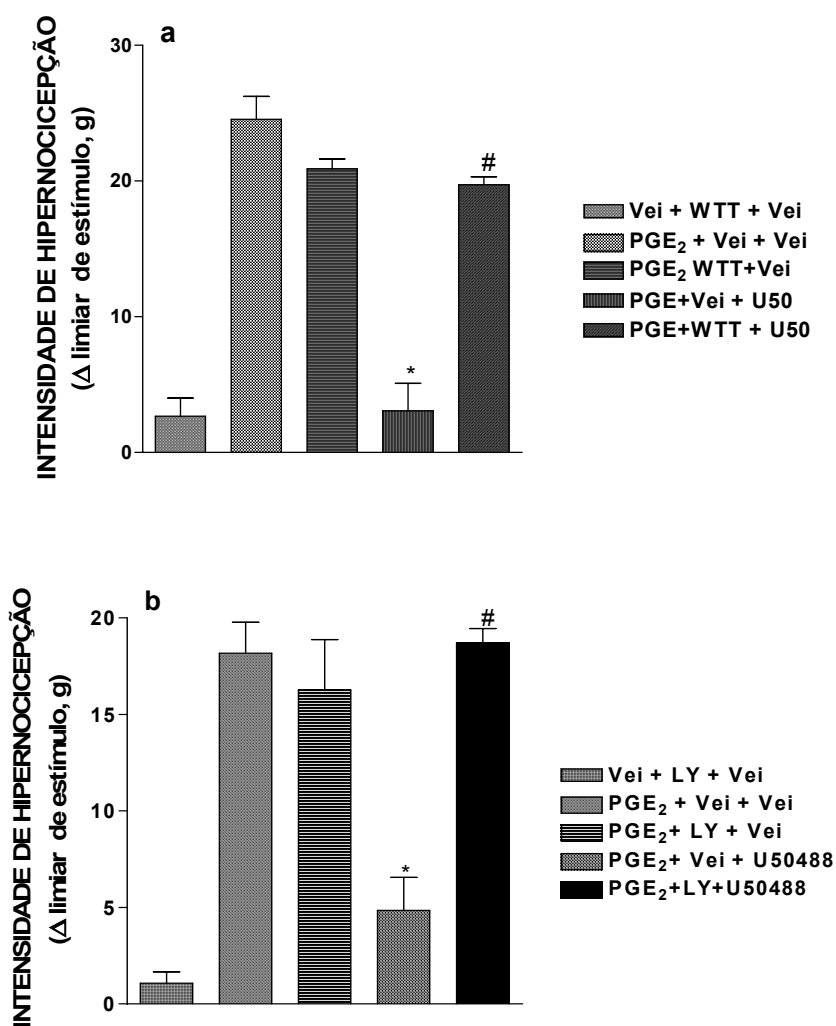


**Figura 35 – Expressão dos receptores  $\kappa$  opióides em neurônios do GRD.** Secções típicas da imunoreatividade para receptores  $\kappa$  opióides em neurônios do GRD, imunoreativos para PI3K $\gamma$ . As setas indicam neurônios duplamente positivos. A análise da imunofluorescência foi feita por microscopia confocal. Barras de escala de 50  $\mu$ m.

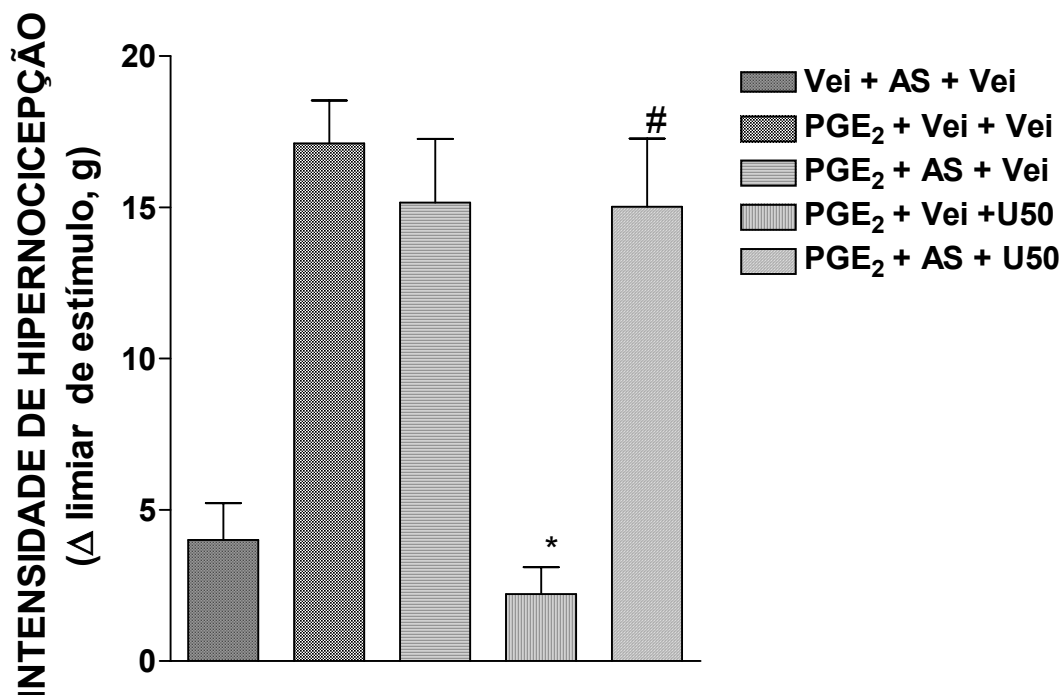
#### **4.22 A via PI3K $\gamma$ /AKT medeia a antinociceção promovida pela ativação periférica dos receptores $\kappa$ opióides em ratos.**

Investigando a participação da PI3K $\gamma$  no efeito antinociceptivo produzido pela ativação periférica do receptor  $\kappa$  opióide, foi observado que o efeito antinociceptivo do U50488, sobre a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub>, foi prevenido quando os ratos eram tratados localmente com inibidores não-seletivos da PI3K $\gamma$ , wortmannin (Figura 36a) e LY294002 (Figura 36b), e também por um inibidor seletivo desta quinase (AS 605240; Figura 37). Suportando estes resultados obtidos em ratos, também foi observado que o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica do U50488 em camundongos selvagens não é observado em camundongos PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> (Figura 38).

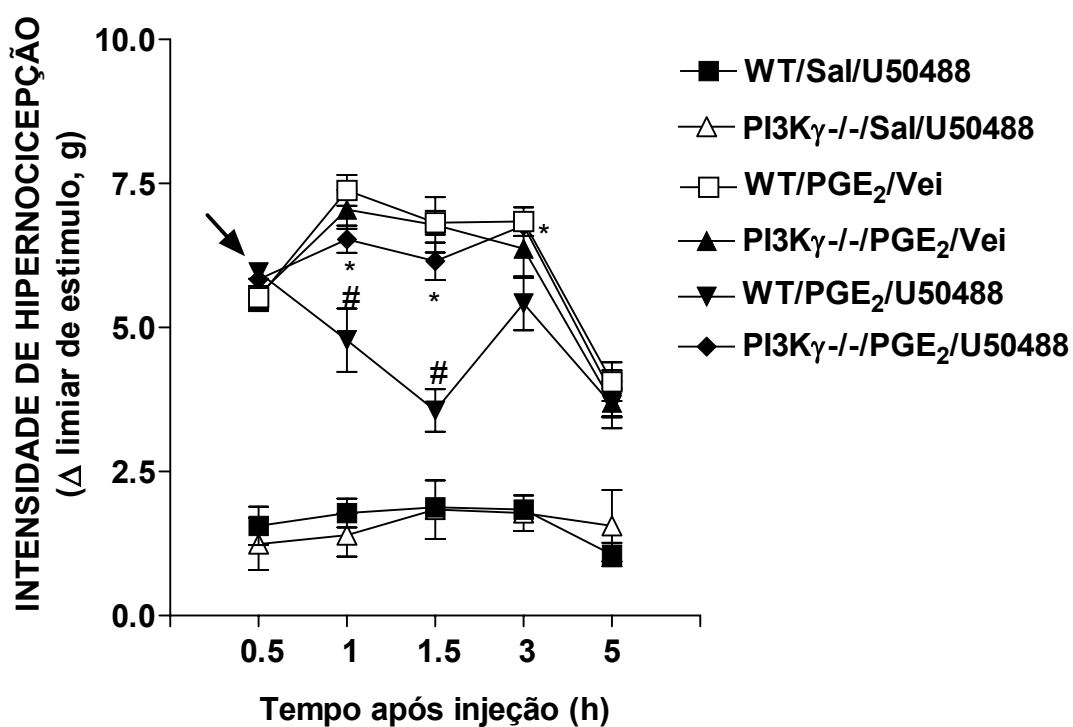
O efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica do U50488 sobre a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub>, também foi prevenido quando os ratos foram tratados com um inibidor seletivo da AKT (AKTi; Figura 39).



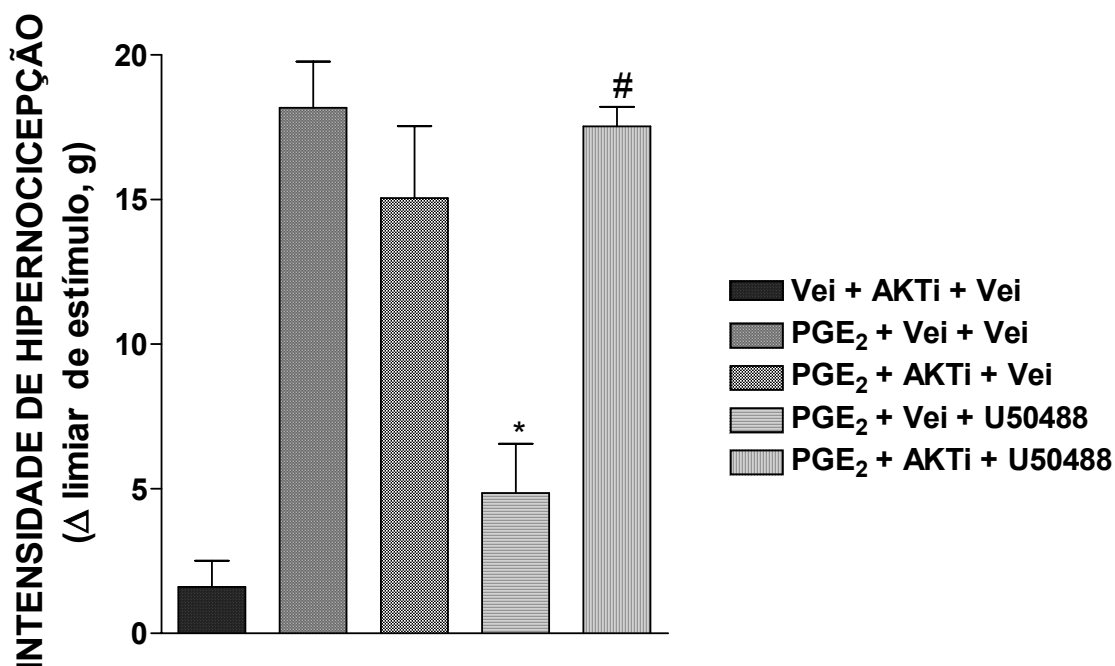
**Figura 36 - Efeito da inibição da PI3K sobre a antinocicepção periférica do U50488 em ratos.** A hipernocicepção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata), seguido (1.5 h após a injeção de PGE<sub>2</sub>) da administração de wortmannin (Painel a, 3 μg/pata), LY294002 (Painel b, 10 μg/pata) ou veículo (ve). Após 30 min, U50488 (U50; 10 μg/pata) ou veículo foram administrados ipsilateralmente. A hipernocicepção foi determinada 3 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5-6 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo tratado com veículo e PGE<sub>2</sub> i.pl. ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo tratado com U50488 ( $P < 0.05$ ).



**Figura 37 - Efeito da inibição seletiva da PI3K $\gamma$  sobre a antinociceção promovida pela ação periférica do U50488 em ratos.** A hipernociceção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata), seguido (1.5 h após a injeção de PGE<sub>2</sub>) da administração de AS 605240 (AS; 30  $\mu$ g/pata) ou veículo. Após 30 min, U50488 (U50; 10  $\mu$ g/pata) ou veículo (vei) foram administrados ipsilateralmente. A hipernociceção foi determinada 3 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo tratado com veículo e PGE<sub>2</sub> i.pl. ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo tratado com U50488 ( $P < 0.05$ ).



**Figura 38 – Efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica do U50488 em camundongos PI3K $\gamma^{-/-}$ .** A hipernociceção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (30 ng/pata) em animais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ . Após 30 min (seta), U50488 (3  $\mu$ g/pata) ou veículo (vei) foram administrados ipsilateralmente. Os resultados são expressos pela média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo de animais WT que receberam U50488 ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo de animais WT tratados com veículo ( $P < 0.05$ ).

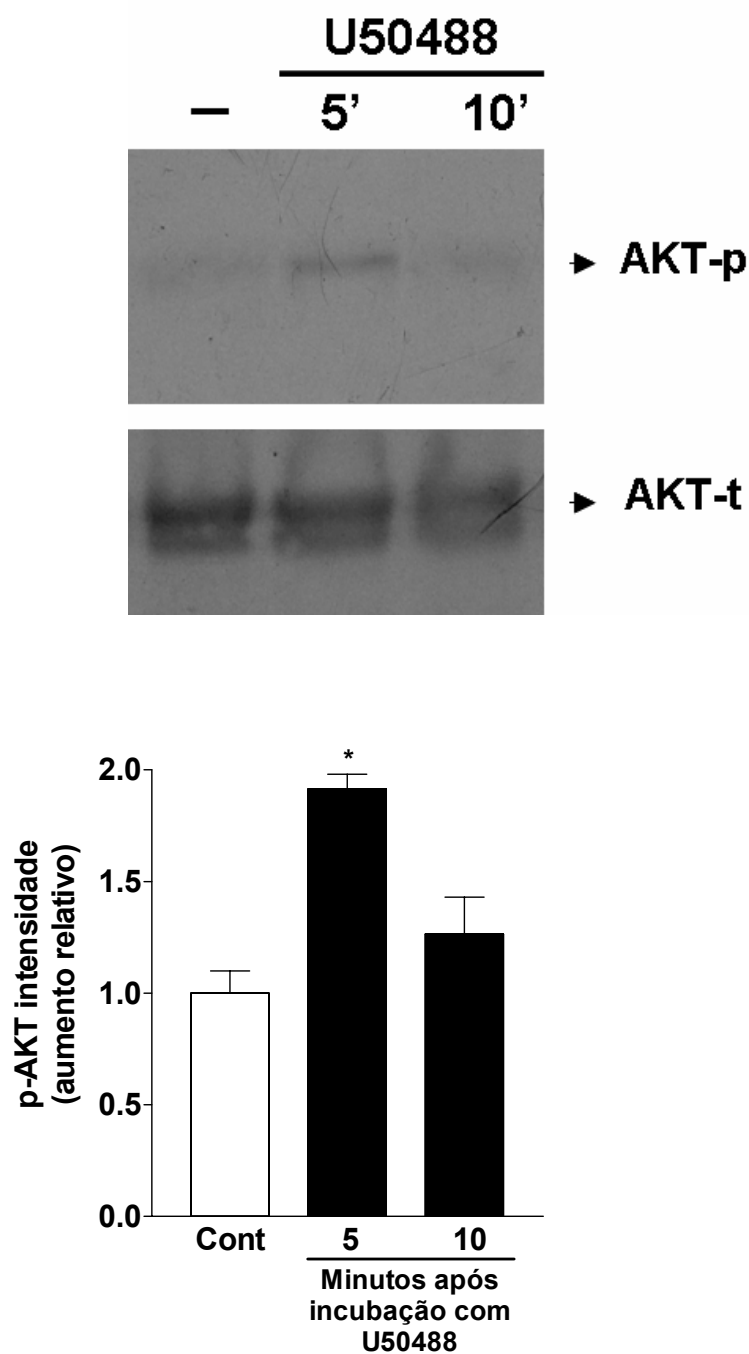


**Figura 39 - Efeito da inibição seletiva da AKT sobre a antinocicepção produzida pela ação periférica do U50488 em ratos.** A hipernocicepção foi induzida pela injeção i.pl. de PGE<sub>2</sub> (100 ng/pata), seguido (1,5 h após a injeção de PGE<sub>2</sub>) da administração de um inibidor seletivo da AKT (AKTi; 10 µg/pata) ou veículo. Após 30 min, U50488 (10 µg/pata) ou veículo (vei) foram administrados ipsilateralmente. A hipernocicepção foi determinada 3 h após a administração de PGE<sub>2</sub>. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. de 5 animais por grupo. \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o valor do grupo tratado com veículo e PGE<sub>2</sub> i.pl. ( $P < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo tratado com U50488 ( $P < 0.05$ ).

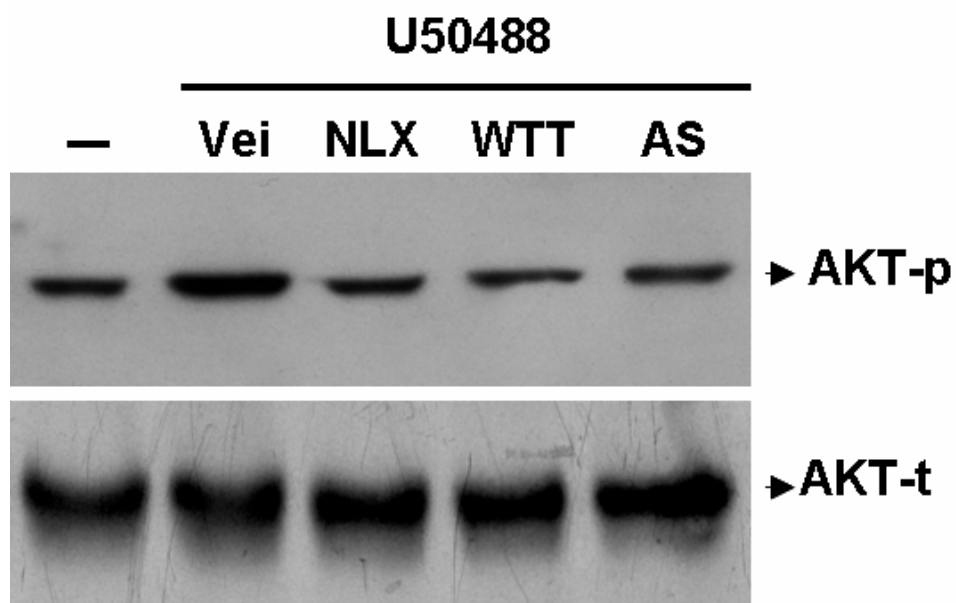
#### **4.23 Ativação do receptor $\kappa$ opióide fosforila AKT em cultura de neurônios sensitivos primários: papel dos receptores opióides e da PI3K $\gamma$ .**

Dando suporte a esses resultados *in vivo*, a incubação de culturas de neurônios derivados do GRD de ratos com U50488 foi capaz de aumentar a concentração de AKT fosforilada, sugerindo um aumento em sua ativação (Figura 40). A ativação da AKT foi máxima 5 min após a incubação com U50488, retornando a valores basais 10 min após a incubação (Figura 40). Em adição, o efeito do U50488 sobre a ativação da AKT, foi prevenido quando as culturas eram tratadas com um antagonista não-seletivo dos receptores opióides, naloxona (NLX, Figura 41), por um inibidor não-seletivo da PI3K $\gamma$  (wortmannin; Figura 41) e também por um inibidor seletivo desta quinase (AS 605240, Figura 41).





**Figura 40 – Efeito do U50488 na ativação da AKT em neurônios derivados do GRD de ratos.** Culturas de neurônios derivados do GRD foram incubadas com U50488 (100 nM) ou meio por 5 e 10 minutos. Após a incubação as células foram lisadas, as proteínas extraídas e separadas por eletroforese e identificadas por Western blot como descrito. Blots representativos são mostrados (Painel a). A análise da densidade óptica das bandas foi feita com o auxílio do programa Image J (Painel b). \* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle



**Figura 41 – Ativação da AKT pelo U50488 em neurônios derivados do GRD depende dos receptores opióides e da PI3K $\gamma$ .** Cultura de neurônios derivados do GRD forma incubados com U50488 (100 nM) na presença ou não de naloxona (NLX, 1  $\mu$ M), wortmannin (WTT; 100 nM) ou AS605240 (AS, 100 nM). Os inibidores foram incubados 10 minutos antes do U50488. Após 5 minutos de incubação com U50488 as células foram lisadas, as proteínas extraídas e separadas por eletroforese e identificadas por western blot como descrito. Blots representativos são mostrados.

***DISCUSSÃO***

## 5 DISCUSSÃO

Nas últimas duas décadas, baseados em resultados obtidos com modelos experimentais de nocicepção, nosso grupo de pesquisa e outros grupos têm sugerido que o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides, depende, pelo menos em parte, da ativação da via neuronal de sinalização intracelular NO/GMPc/PKG, a qual culmina com a modulação de canais  $K_{ATP}$ . No entanto, durante esses anos os mecanismos envolvidos na ativação desta via de sinalização, após a estimulação dos receptores opióides presentes nas fibras aferentes primárias, permaneceram desconhecidos. No presente estudo, obteve-se, pela primeira vez, evidências tanto *in vivo* quanto *in vitro* de que a ativação inicial da PI3K $\gamma$ /AKT é fundamental à estimulação da via NO/GMPc/PKG/ $K_{ATP}$  pelos agonistas opióides.

### 5.1 Dor inflamatória: papel das prostaglandinas

A dor é um dos sinais clínicos da inflamação e, certamente, uma das principais razões que levam o paciente a procurar ajuda médica. Neste sentido, muitos esforços têm sido aplicados para entender os mecanismos envolvidos na gênese da dor inflamatória. Atualmente, sabe-se que após uma injúria tecidual ou inflamação, os neurônios aferentes primários nociceptivos (nociceptores) são sensibilizados de tal maneira que estímulos mecânicos, térmicos ou mesmo químicos, normalmente inócuos, tornam-se dolorosos. Durante um longo tempo, a sensibilização dos nociceptores foi creditada à ação excitatória causada pela liberação de uma “sopa” com vários mediadores inflamatórios no local do tecido inflamado ou lesado. No entanto, esta hipótese foi desafiada pela descoberta do

mecanismo de ação das drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINEs) e pela demonstração de que, em humanos e animais, eicosanóides (como a PGE<sub>2</sub>) não causam dor espontânea, mas sensibilizam os nociceptores à estimulação subsequente (FERREIRA, 1972). Devido a estes achados, as prostaglandinas, tornaram-se as moléculas mais estudadas no contexto da dor inflamatória. As prostaglandinas são consideradas mediadores inflamatórios finais da sensibilização dos nociceptores, ou mesmo, como mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos de ação direta. O presente estudo corrobora estes conceitos ao confirmar que a administração intraplantar de PGE<sub>2</sub> induz hipernocicepção mecânica em camundongos. No entanto, o tempo necessário para que a PGE<sub>2</sub> produza seus efeitos hipernociceptivos em camundongos foi diferente daquele observado em ratos (FERREIRA et al., 1978). Enquanto em ratos a administração subcutânea intraplantar de PGE<sub>2</sub> induz um quadro hipernociceptivo com pico de ação na terceira hora, em camundongos, o efeito hipernociceptivo da PGE<sub>2</sub> já se apresentou significativo 30 minutos após sua administração, e o pico de efeito foi alcançado após 1 h (FERREIRA et al., 1978; VIVANCOS et al., 2004). Estes resultados díspares devem estar relacionados à diferença na espécie utilizada. Ainda é importante mencionar que, mesmo em ratos, a administração intradérmica de PGE<sub>2</sub>, ao invés de subcutânea, induz hipernocicepção mecânica de rápida e curta duração (TAIWO et al., 1987). Uma hipótese para tal fato é que nestes diferentes tecidos a PGE<sub>2</sub> atue em fibras nociceptivas de diferentes tipos, ou ainda, que a PGE<sub>2</sub> esteja agindo em receptores diferentes. Além disso, os mecanismos moleculares envolvidos na origem da hipernocicepção podem ser diferentes. Nesse sentido, enquanto a hipernocicepção induzida pela administração intradérmica de PGE<sub>2</sub> independe da ativação de uma via intracelular dependente de PKC $\epsilon$  (KHASAR et al.,

1999b), a hipernocicepção induzida por sua administração subcutânea depende desta proteína quinase (SACHS et al., resultados não publicados) .

## **5.2 Controle periférico da dor inflamatória: bloqueio direto da hiperalgesia/hipernocicepção pelos opióides.**

Embora os AINES sejam extensivamente utilizados no controle da dor inflamatória, seu uso prolongado está associado a graves efeitos adversos que limitam sua utilização. Com o intuito de resolver estes problemas, no final da década de 90, uma nova classe de drogas foi introduzida no mercado. Os inibidores seletivos da COX-2 emergiram como uma milagrosa classe de drogas para controlar a dor durante doenças inflamatória crônicas, como a artrite reumatóide, substituindo os AINES (MASFERRER et al., 1994; DEWITT et al., 1999). No entanto, estas drogas também apresentaram efeitos colaterais importantes e, recentemente, vários membros desta classe de medicamentos têm sido retirados do mercado, uma vez que parecem aumentar a incidência de ataques cardíacos, bem como por causar outros efeitos cardiovasculares (FITZGERALD, 2004; BRESALIER et al., 2005; LEVESQUE et al., 2006). Hoje, conseqüentemente, esta classe de drogas, antes considerada insubstituível, tem sido questionada e o controle da dor inflamatória continua a constituir um grande desafio.

Uma outra forma de controlar a dor inflamatória, diferente do uso de drogas que previnem a instalação da hipernocicepção (como os inibidores de COX), é a utilização de drogas que revertem a hipernocicepção já instalada. Dentre estas drogas, destacam-se os opióides de ação periférica, a dipirona e alguns AINES, como diclofenaco e cetorolaco (FERREIRA et al., 1979b; DUARTE et al., 1990;

DUARTE et al., 1992; TONUSSI et al., 1994; GRANADOS-SOTO et al., 1995). Nessa classe, os opióides talvez sejam os mais conhecidos, tanto por seus efeitos analgésicos, como também por seu uso como drogas de abuso. Embora sua efetividade analgésica tenha sido reconhecida há muitos séculos, o modo como agem estas drogas foi descrito há pouco tempo. Nesse sentido, foi demonstrado que a ação analgésica dos opióides se dá principalmente por sua ação no sistema nervoso central e envolve várias áreas cerebrais implicadas nos mecanismos da dor (revisado por CHEVLEN, 2003). De fato, uma densidade muito alta de receptores opióides tem sido encontrada em estruturas cerebrais e medulares (KUHAR et al., 1973; KALYUZHNY et al., 1996).

Além deste reconhecido efeito central dos opióides, nas últimas décadas um novo conceito tem sido estabelecido para suas ações analgésicas. Assim, foi demonstrado que os opióides podem promover analgesia por ação em estruturas do sistema nociceptivo periférico (FERREIRA et al., 1979b; revisado por JANSON; STEIN, 2003). Algumas evidências para este fato datam do começo do século XX, no entanto, a primeira demonstração inequívoca do efeito analgésico por ação periférica dos opióides vem do final da década de 70 (FERREIRA et al., 1979b).

No presente trabalho, observou-se que agonistas opióides seletivos para diferentes receptores promovem antinocicepção por uma ação periférica em camundongos. De fato, a administração local tanto de morfina, um agonista não seletivo dos receptores opióides, quanto de DAMGO (um agonista seletivo para receptores  $\mu$ ) e de U50488 (um agonista seletivo de receptores  $\kappa$ ) reverte a hipernocicepção mecânica induzida pela PGE<sub>2</sub>. Embora algumas doses destas drogas tenham apresentado efeito sistêmico, uma vez que a administração delas na pata contralateral inibiu a hipernocicepção da PGE<sub>2</sub>, doses mais baixas destas drogas foram capazes de produzir antinocicepção por um efeito estritamente local. É

importante salientar que estas drogas foram administradas quando a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub> já estava estabelecida, ou seja, como já demonstrado em ratos, elas são capazes de reverter a hipernocicepção já instalada. Esses dados serão importantes para entender os mecanismos envolvidos nestes efeitos dos opióides.

O efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides tem sido demonstrado em vários modelos experimentais. No entanto, os mecanismos pelos quais estas drogas produzem tais efeitos ainda não estão totalmente esclarecidos. Uma questão que é bem documentada na literatura, mas pouco entendida, é o fato de que os opióides só apresentam efeito antinociceptivo por ação periférica durante um quadro hipernociceptivo inflamatório, ou seja, sua administração local não altera o limiar nociceptivo basal dos animais. Os resultados do presente estudo confirmam tais observações, uma vez que nenhum dos opióides que revertem a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub> foi capaz de alterar o limiar nociceptivo basal dos animais. Durante estes últimos anos, várias hipóteses foram levantadas na literatura para explicar este fato. Nosso grupo tem trabalhado com a hipótese de que os opióides agem periféricamente, principalmente em neurônios, que não são importantes para o limiar basal dos animais, como, por exemplo, fibras C e nociceptores silenciosos (BARTHO et al., 1990). Estas últimas são fibras nociceptivas de alto limiar mecânico que, normalmente, não respondem a estímulos mecânicos de alta intensidade, mas que, durante um processo inflamatório, são sensibilizadas, tornando-se ativáveis, sendo responsáveis pela hipernocicepção (revisado por MCMAHON; KOLTZENBURG, 1990). Assim, a sensibilidade aumentada dessas fibras durante um processo inflamatório seria revertida pela ação dos opióides. Em um recente estudo eletrofisiológico, WENK et al. (2006) investigaram o efeito da administração local de morfina sobre a excitabilidade de



fibras sensoriais de diversos tipos. Corroborando achados *in vivo*, eles demonstraram que a morfina normalmente é incapaz de diminuir a atividade de qualquer tipo de fibra sensitiva periférica. No entanto, após um processo inflamatório, ela reduz a atividade, principalmente, de fibras do tipo C. Além disso, os autores ressaltam que só conseguiam resultados significativos para o efeito dos opióides quando se incluía no grupo fibras que não eram responsivas a estímulos mecânicos antes da inflamação. Eles sugerem que essas fibras são prováveis fibras “silenciosas” (WENK et al., 2006).

Outras hipóteses têm sido levantadas para explicar esta seletividade de ação antinociceptiva produzida pelos opióides na periferia durante um processo inflamatório. Uma delas é que, durante uma inflamação, há um aumento no número de receptores opióides disponíveis na periferia (STEIN, 2003). De fato, a inflamação na periferia tem sido associada a um aumento no transporte axonal de receptores opióides (HASSAN et al., 1993). Consistente com esta idéia há uma elevação na ligação de endorfinas marcadas radioativamente no nervo ciático, bem como um aumento na marcação por imuno-histoquímica para receptores opióides em fibras cutâneas de pequeno calibre, 24 h após a administração de adjuvante completo de Freund (CFA; HASSAN et al., 1993). Ademais, em um modelo de inflamação plantar também ocorre um aumento de receptores  $\mu$  opióides no gânglio da raiz dorsal 24 h após a injeção do estímulo inflamatório (SHAQURA et al., 2004). Com certeza, este aumento na expressão periférica dos receptores opióides pode explicar em parte o aumento na ação antinociceptiva destas drogas durante um processo inflamatório. No entanto, considerando o tempo que seria necessário para ocorrerem mudanças na síntese protéica e subsequente transporte axonal, o que levaria a um aumento na expressão periférica destes receptores, é muito pertinente assumir que o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides, observado no presente

estudo (1,5 h após a administração de prostaglandinas), depende, principalmente, de um aumento na disponibilidade funcional destes receptores, devido a mecanismos periféricos locais. Assim, uma vez que os receptores opióides são normalmente expressos, é possível que eventos inflamatórios iniciais induzam mudanças no estado funcional ou na disponibilidade destes receptores já existentes.

Esta hipótese encontra suporte em várias evidências demonstradas na literatura. Por exemplo, durante uma condição inflamatória, os ligantes opióides têm seu acesso aumentado ao receptor, resultando em um aumento na potência de agonistas dos mesmos. Dando suporte a este fato, a antinocicepção produzida pela ação periférica dos opióides pode ser potencializada em um tecido normal quando o perineuro é artificialmente rompido pela injeção de uma solução hiperosmótica (ANTONIJEVIC et al., 1995). Isso sugere que opióides devem ter acesso aumentado aos seus receptores durante uma inflamação devido a uma quebra da barreira perineural. Além deste aumento no acesso dos ligantes opióides aos seus respectivos receptores, durante um processo inflamatório, também há um aumento na sinalização do receptor opióide. Foi observado que o acoplamento entre os receptores opióides e a ativação da proteína G, em neurônios nociceptivos, está aumentado após uma inflamação (ZOLLNER et al., 2003; SHAQURA et al., 2004).

### **5.3 Mecanismos moleculares envolvidos na antinocicepção produzida pela ação periférica dos opióides: Papel da via do NO/GMPc.**

Conforme mencionado anteriormente, a hipernocicepção inflamatória é causada pela ação dos mediadores hipernociceptivos finais, como as prostaglandinas, preferencialmente em seus receptores metabotrópicos presentes na membrana neuronal de fibras C e de nociceptores silenciosos. Esta ação leva à

ativação de vias intracelulares sinalizadas por segundos mensageiros. A principal via intracelular ativada pela PGE<sub>2</sub> é dependente da ativação de uma proteína Gs, que leva à ativação da adenilato ciclase, aumentando as concentrações intracelulares de AMPc. Por sua vez, o AMPc é responsável pela ativação de proteínas quinases, como PKA e PKC $\epsilon$  (FERREIRA et al., 1997a; ALEY; LEVINE, 1999; KHASAR et al., 1999b). Os alvos finais dessas vias de sinalização intracelulares são canais iônicos de sódio e potássio dependentes de voltagem que têm sua atividade alterada (ENGLAND et al., 1996; EVANS et al., 1999). Tal modulação acarreta uma diminuição do limiar de ativação dos nociceptores e um aumento na excitabilidade da membrana neuronal (revisado por LAI et al., 2004). Além disto, essas vias podem modular a função de um importante canal iônico seletivamente expresso em fibras nociceptivas, o receptor vanilóide ou TRPV1. Quando fosforilado por estas quinases, este canal se torna facilmente ativado por estímulos térmicos, bem como por seu reconhecido agonista, capsaicina, sendo então responsável pelo aumento da excitabilidade das fibras nociceptivas (SZALLASI et al., 2007). Sabendo, então, que a produção de AMPc é importante para a hipernocicepção e que, em alguns sistemas biológicos, os opióides agindo em seus receptores causam ativação de uma proteína Gi, que inibe a adenilato ciclase, a primeira hipótese que surgiu para explicar os efeitos antinociceptivos causado pela ação periférica dos opióides foi de que eles inibiriam a formação de AMPc, prevenindo a instalação da hipernocicepção (COLLIER; ROY, 1974a; COLLIER; ROY, 1974b; KLEE, 1979). Sustentando esta hipótese, foi demonstrado que os opióides administrados periféricamente não são capazes de inibir a hipernocicepção induzida pela injeção i.pl. de um análogo do AMPc permeável a membrana celular (FERREIRA et al., 1979b; LEVINE; TAIWO, 1989).

É muito provável que este mecanismo esteja envolvido no efeito antinociceptivo periférico dos opióides. Assim, poderíamos considerar os opióides como uma classe de drogas que previnem a hipernocicepção inflamatória. No entanto, como já mencionado e como observado no presente estudo, os opióides periféricos também são capazes de reverter a hipernocicepção já instalada. Por exemplo, a administração periférica de opióides, 2 h após a administração de PGE<sub>2</sub> em ratos, e 30 minutos após, em camundongos, é capaz de reverter a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub>. Vários trabalhos de nosso grupo e de outros demonstraram que o efeito antinociceptivo causado pela ação periférica deste tipo de droga, que reverte a hipernocicepção já instalada, depende da estimulação da via do NO (FERREIRA et al., 1991). Cabe lembrar que a maioria destes trabalhos utilizou o rato como animal experimental. Também em camundongos o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides parece depender do NO. De fato, no presente trabalho foi observado que o tratamento dos camundongos com um inibidor não-seletivo da NOS (L-NMMA) previne o efeito periférico de diferentes agonistas opióides. Ainda, observou-se que a morfina não apresenta efeito antinociceptivo por ação periférica em animais deficientes para a nNOS. Dando suporte ao papel antinociceptivo periférico do NO, a administração local de um doador de NO (SNAP) foi capaz de reverter a hipernocicepção induzida pela PGE<sub>2</sub>. Estes resultados permitem sugerir que os opióides apresentam efeitos antinociceptivos por ação periférica também em camundongos e que tais efeitos também dependem da ativação da nNOS, com conseqüente produção de NO. Esta hipótese está de acordo com um estudo recente, no qual se demonstrou que a ativação de receptores opióides periféricos produzem antinocicepção em um modelo de nocicepção induzida por osteosarcoma e que este efeito depende da ativação da via do NO/GMPc (MENENDEZ et al., 2007). A importância desta via intracelular

também foi demonstrada para outras drogas não-opiíides que apresentam ação antinociceptiva produzida por efeito periférico sobre a hipernocicepção já instalada, incluindo dipirona, adenosina e outros (FERREIRA et al., 1991; SACHS et al., 2004, LIMA et al., dados não publicados).

A exemplo do que se observa em vários outros sistemas biológicos, o NO parece exercer um papel dual no sistema nociceptivo. Neste sentido, além do efeito antinociceptivo sugerido acima, existem evidências que o NO é importante na nocicepção tanto por uma ação periférica quanto central, principalmente em nível medular. Várias são as explicações para estas contradições. Primeiro, parece que, dependendo das concentrações de NO, este gás tem um efeito pro- ou anti-nociceptivo. Exemplificando, a administração intratecal ou subcutânea (pata) de um doador de NO pode causar, dependendo da dose, tanto efeito antinociceptivo quanto intensificação da nocicepção em um modelo de dor pós-incisional (SOUSA; PRADO et al., 2001; PRADO et al., 2002). Nosso grupo também demonstrou que, se por um lado, a administração intraplantar subcutânea de um doador de NO causa antinocicepção, a injeção intradérmica causa hipernocicepção mecânica (VIVANCOS et al., 2003). ALEY et al. (1998) também demonstraram que o efeito hipernociceptivo da PGE<sub>2</sub> administrada intradermicamente depende da síntese de NO na periferia. Este resultado se contrapõe ao que foi obtido no presente trabalho, no qual a PGE<sub>2</sub> induziu hipernocicepção de magnitude semelhante em animais selvagens e deficientes para a nNOS. A diferença entre os tecidos poderia explicar este resultado contraditório, uma vez que, no presente trabalho, a PGE<sub>2</sub> foi administrada subcutaneamente. Conforme já mencionado, pode haver diferenças funcionais entre as fibras que inervam o tecido subcutâneo e dérmico, ou mesmo uma diferença na densidade destas fibras em ambos os tecidos.

#### 5.4 PI3K $\gamma$ : expressão nos neurônios do DRG.

A primeira evidência obtida no presente estudo de que a PI3K $\gamma$  poderia ser importante no efeito antinociceptivo promovido pela ação periférica dos opióides é que esta enzima está constitutivamente expressa nos neurônios nociceptivos primários. Essa observação está de acordo com dados da literatura que mostram a expressão do RNAm para a PI3K $\gamma$  em neurônios do DRG (BARTLETT et al., 1999). No entanto, nenhum trabalho havia descrito a expressão desta quinase em nível protéico, nem no tipo de célula do GRD que ela é expressa. Notavelmente, foi observado também que a expressão desta enzima está restrita a neurônios de pequeno e médio diâmetro, os quais são predominantemente fibras do tipo C e A $\delta$ , ou seja, possivelmente fibras que conduzem a informação nociceptiva. Para reforçar essa idéia, foi procedida a análise da dupla marcação da PI3K $\gamma$  com diferentes marcadores de fibras nociceptivas, o canal TRPV1, a substância P e a ligação para IB $_4$ . Também analisamos a co-marcação da PI3K $\gamma$  com um marcador de fibras mielinizadas (não-nociceptivas), o NF-200, um neurofilamento importante na composição do citoesqueleto, e na formação do axônio de fibras mielinizadas (PERRY et al., 1991). O primeiro marcador, canal TRPV1, anteriormente descrito como canal vanilóide, é o responsável pelos efeitos nociceptivos da capsaicina, o qual pertence a uma família de receptores ionotrópicos, e está envolvido na detecção de diferentes estímulos extracelulares. O TRPV1 é um canal catiônico não seletivo, ou seja, por ele passam diferentes íons, mas com uma certa preferência pelo Ca $^{++}$ . No GRD, este canal é expresso exclusivamente em fibras nociceptivas, principalmente fibras não-mielinizadas. Fisiologicamente, este canal tem sido implicado como responsável pela transdução de estímulos térmicos em potenciais

elétricos pelas células nervosas. Além disso, ele também pode ser ativado por estímulos químicos exógenos, como pela capsaicina, e também por estímulos endógenos, como mediadores produzidos durante a inflamação (mediadores lipídicos e prótons; SZALLASI et al., 2007). O segundo marcador que utilizamos foi à ligação para a IB<sub>4</sub> marcada. Esta lectina se liga preferencialmente a fibras nociceptivas não-peptidérgicas, ou seja, fibras nociceptivas que não expressam SP nem CGRP (AOKI et al., 2004; FULLMER et al., 2004). Outra característica das fibras IB<sub>4</sub> é que elas expressam seletivamente o receptor P2X<sub>3</sub>, importante nos efeitos nociceptivos do ATP (BRADBURY et al., 1998; GUO et al., 1999). Uma outra diferença em relação às fibras peptidérgicas é que estas fibras não sofrem ação do fator de crescimento do nervo (NGF), mas são influenciadas pelo fator neurotrófico derivado da glia (GDNF; AVERILL et al., 1995; VERGE et al., 1995; MOLLIVER et al., 1997).

Usando estes diferentes marcadores de fibras sensoriais levantaram-se mais evidências da possível importância da PI3K $\gamma$  no sistema nociceptivo periférico. De fato, a PI3K $\gamma$  é expressa principalmente em neurônios que também expressam TRPV1 ( $\cong$ 70%) e também com fibras que apresentam ligação para IB<sub>4</sub> ( $\cong$ 95%). Entretanto, menos de 10% das fibras peptidérgicas, ou seja, que expressam SP também são positivas para PI3K $\gamma$ . Corroborando esses achados, nenhuma fibra positiva para PI3K $\gamma$  apresentou marcação para NF-200, isto é, realmente a PI3K $\gamma$  só é expressa em fibras não-mielinizadas do GRD. Embora esta seletividade na expressão da PI3K $\gamma$  em neurônios positivos para marcação com IB<sub>4</sub> não seja imediatamente compreendida, ela sugere que a PI3K $\gamma$  possa ser considerada um marcador de um tipo de fibra nociceptiva. Em relação à funcionalidade desse achado, embora ainda não se compreenda totalmente as diferenças funcionais entre

as fibras nociceptivas peptidérgicas e não-peptidérgicas, existem evidências na literatura de que as fibras não-peptidérgicas (IB<sub>4</sub> positivas) possam ser as fibras sensibilizadas durante o processo inflamatório induzido por CFA ou também após a administração de epinefrina (BREESE et al., 2005; HUCHO et al., 2005). Além disso, neste tipo de fibra C, as correntes de sódio são geradas, principalmente, por canais TTX-R, os quais são fundamentais para a sensibilização dos nociceptores (WU; PAN; 2004). Ainda, camundongos que não contêm este tipo de fibra, devido a uma deficiência no receptor do GDNF (GFR $\alpha$ 2), apresentam uma redução nos comportamentos nociceptivos na segunda fase (i.e. a fase inflamatória) do teste da formalina, mas não na primeira fase (LINDFORS et al., 2006). Estes resultados sugerem uma forte associação entre as fibras IB<sub>4</sub> positivas e a dor inflamatória, dando suporte a nossa hipótese da importância da PI3K $\gamma$  no sistema nociceptivo.

Com relação à importância da co-expressão da PI3K $\gamma$  em neurônios TRPV1 positivos e a possível participação desta enzima na mediação dos efeitos periféricos dos opióides, foi demonstrado, recentemente, que a morfina é capaz de reduzir a ativação de neurônios nociceptivos causada pela capsaicina (ENDRES-BECKER et al., 2007). Nesse mesmo trabalho, os autores sugerem que a morfina esteja inibindo as correntes de capsaicina por inibir a formação de AMPc. No entanto, esta conclusão deixa algumas dúvidas, uma vez que é muito provável que as correntes ativadas por capsaicina não dependam de AMPc. Dessa forma, teria sido mais pertinente se os autores tivessem utilizado também um inibidor da adenilato ciclase para demonstrar qual o seu efeito nestas correntes.



### **5.5 A via PI3K $\gamma$ /AKT é de fundamental importância para o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica da morfina e do agonista $\mu$ opióide, DAMGO.**

A PI3K $\gamma$  é uma enzima pertencente a uma família de lipídio-quinases descritas como sendo de fundamental importância no controle da proliferação e da sobrevivência celular (ENGELMAN et al., 2006). Já a isoforma  $\gamma$  parece ter um papel muito importante na migração celular, uma vez que está associada a receptores quimiotáticos (revisado por SOTSIOS; WARD, 2000). A PI3K $\gamma$  pertence à classe IB das PI3K, sendo que é a única representante desta classe. Essa enzima foi separada, uma vez que sua ativação se dá principalmente pelas subunidades  $\beta\gamma$  da proteína G, enquanto as demais PI3Ks, pertencentes à classe IA, são, na maioria das vezes, ativadas por receptores tirosina quinase (VANHAESEBROECK; WATERFIELD, 1999). Esta distinção foi relevante para se estabelecer a hipótese do presente estudo, uma vez que os receptores opióides são, em sua maioria, acoplados a proteína G<sub>i</sub> (WALDHOER et al., 2004). Dessa forma, a ativação da proteína G<sub>i</sub>, que está acoplada aos receptores opióides, poderia levar, além da inibição adenilato ciclase, à ativação da PI3K $\gamma$  pela ação de sua subunidade  $\beta\gamma$ .

Para testar essa hipótese, investigou-se o efeito da inibição local da PI3K $\gamma$  sobre o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica da morfina. Assim, foi observado que, tanto a inibição não-seletiva das PI3Ks com dois diferentes inibidores, wortmannin ou LY 294002, quanto a inibição seletiva com um novo inibidor da PI3K $\gamma$  (AS605240), reverteram de maneira dose-dependente o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica da morfina. Os dois primeiros inibidores são capazes de inibir todas as isoformas de PI3K, sendo que a wortmannin inibe irreversivelmente estas quinases (VANHAESEBROECK et al.,

2001). Já o inibidor seletivo da PI3K $\gamma$ , o AS605240 tem sido utilizado freqüentemente para se demonstrar o papel específico da PI3K $\gamma$  em vários modelos experimentais (CAMPS et al., 2005, ROMMEL et al., 2007). Em adição ao emprego dessas ferramentas farmacológicas, também se lançou mão de abordagens genéticas. Primeiramente, testou-se o efeito periférico da morfina em animais deficientes para a subunidade catalítica da PI3K $\gamma$  (p110 $\gamma$ <sup>-/-</sup>; SASAKI et al., 2000). Desse modo, foi verificado que o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica da morfina, observado em animais selvagens (WT), é praticamente abolido em animais deficientes para a PI3K $\gamma$ . Outra abordagem que vem sendo utilizada para se demonstrar a participação de moléculas no sistema nociceptivo periférico se dá pelo uso de ODN antisense contra proteínas alvos. Nesse sentido, vários trabalhos vêm demonstrando que a injeção intratecal de ODNs antisenses inibe a expressão protéica pelos neurônios aferentes primários (KHASAR et al., 1996; KHASAR et al., 1998). Por exemplo, a injeção intratecal de ODNs contra receptores opióides previne a antinocicepção induzida por seus agonistas quando injetados na periferia (BILSKY et al., 1996; KHASAR et al., 1996; JOSHI et al., 2000). Assim, observou-se que o tratamento intratecal por quatro dias com ODN antisense contra a PI3K $\gamma$  previne o efeito antinociceptivo da morfina quando administrada na pata de ratos. Esses resultados preliminares (não apresentados) estão sendo confirmados, e também está sendo analisado se o ODN foi capaz de inibir a expressão da PI3K $\gamma$  pelos neurônios aferentes primários.

A PI3K tem sido envolvida em outros efeitos dos opióides. Por exemplo, o efeito antinociceptivo induzido por agonistas opióides quando administrados centralmente (i.c.v.) parece depender da ativação da PI3K (NARITA et al., 2002; NARITA et al., 2004). Neste último trabalho, inibidores não seletivos da PI3K foram

capazes de reverter a antinocicepção induzida pela morfina. Os autores atribuíram esse efeito à PI3K $\gamma$ , uma vez que esta enzima é expressa em neurônios que também expressam receptores opióides na PAG e, também, porque a administração de morfina aumentou a expressão da PI3K $\gamma$  nessa região (NARITA et al., 2004). Como a morfina administrada centralmente tem um efeito antinociceptivo rápido, com pico de ação entre 10 e 30 minutos, supõe-se que este efeito antinociceptivo central, muito provavelmente, não depende da síntese de novas proteínas, como da neo-síntese de PI3K $\gamma$ . O uso de inibidores seletivos para esta isoforma de PI3K, ou mesmo, de animais deficientes para ela, poderia esclarecer essa questão.

Por outro lado, existem trabalhos sugerindo um papel pró-nociceptivo para a via intracelular dependente de PI3K (ZHUANG et al., 2004; MA et al., 2006; SUN et al., 2006). Estes trabalhos demonstraram que a sensibilização dos nociceptores induzida por diferentes substâncias hipernociceptivas depende da ativação da PI3K/AKT. Exemplificando, a hipernocicepção térmica e mecânica induzida pela capsaicina e pelo NGF são inibidas quando os animais são tratados localmente com inibidores da PI3K e da AKT (ZHUANG et al., 2004; SUN et al., 2006). Embora a maioria destes estudos não discuta qual das isoformas é responsável por este efeito, um trabalho recente sugere que a PI3K $\gamma$  seja fundamental para a hipernocicepção mecânica induzida pelo NGF (MALIK-HALL et al., 2005). A interpretação dos resultados feita pelos autores deve ser melhor analisada, uma vez que o receptor TrKA, ativado pelo NGF, é um receptor tirosina quinase, o qual dificilmente estaria ativando a isoforma  $\gamma$ , mas alguma outra isoforma da PI3K (STEIN et al., 2006). De fato, os autores não fizeram uso de qualquer inibidor seletivo da PI3K $\gamma$  ou de animal deficiente para esta enzima para testarem esta hipótese (MALIK-HALL et al., 2005). Ela foi baseada no fato de que a administração

intraplantar da subunidade catalítica da PI3K $\gamma$  produz efeito hipernociceptivo (MALIK-HALL et al., 2005). Outro aspecto problemático no entendimento deste resultado diz respeito a como uma proteína de 110 KDa, administrada localmente na pata de um rato, seria capaz de adentrar seletivamente em fibras nociceptivas. Ainda em contraposição a esta sugestão, os presentes experimentos de co-expressão mostraram que a PI3K $\gamma$  é expressa em apenas uma pequena porcentagem de fibras peptidérgicas, as quais expressam o receptor para NGF, e provavelmente são sensibilizadas por ele.

Ainda com relação à contraposição entre os efeitos pró-nociceptivos atribuídos à via PI3K/AKT e os presentes resultados, que indicam esta via como tendo um papel antinociceptivo, deve-se ressaltar que as vias de sinalização intracelulares são muito bem compartimentalizadas. Assim sendo, as especificidades funcionais de proteínas sinalizadoras dependem das proteínas às quais estão associadas. Isso se dá através de seus domínios de ligação com outras proteínas, como domínio SH-2, homólogo à pleckstrina (PH), entre outros (HUNTER, 2000; PAPIN et al., 2005). Em outras palavras, quando ativada por um receptor específico, pode ser que uma enzima desempenhe um papel, pois esta pode ser modulada, ou pode modular diferentes vias após sua ativação, mas quando a mesma é ativada por outro receptor, ela sinaliza de uma forma diferente. Esses fatos explicariam como uma mesma via de sinalização pode estar envolvida em efeitos antagônicos em uma mesma célula e, conseqüentemente, explicaria este papel dual da via PI3K/AKT na nocicepção *versus* antinocicepção. Por outro lado, a ativação de diferentes isoformas da PI3K também poderia estar envolvida no efeito pró-nociceptivo, enquanto a ativação da PI3K $\gamma$  estaria mediando os efeitos antinociceptivos.

Uma vez ativada pela porção  $\beta\gamma$  de receptores acoplados a proteína Gi, a PI3K $\gamma$  fosforila o composto lipídico PIP<sub>2</sub>, produzindo PIP<sub>3</sub>. Este último composto pode se ligar seletivamente a outras proteínas que apresentam o domínio PH, levando a vias de sinalização posteriores, sendo uma das mais importantes a ativação da AKT (COFFER et al., 1998). Sendo a AKT uma importante ativadora da NOS, foi investigada a sua participação nos efeitos antinociceptivos produzidos pela ação periférica da morfina. Corroborando esta hipótese, observou-se que a inibição farmacológica da AKT com um inibidor seletivo (SUN et al., 2006; WU; HUANG, 2007), previne o efeito antinociceptivo produzido pela morfina quando administrada periféricamente. Além disso, a análise *in vitro* revelou que a incubação de neurônios derivados do DRG, de ratos e camundongos, com morfina induz a ativação da AKT, evidenciada pelo aumento do níveis de sua forma fosforilada. É importante ressaltar que esse aumento na atividade da AKT, induzido pela morfina, foi inteiramente dependente da PI3K, mais especificamente da PI3K $\gamma$ . A ativação da AKT por agonistas opióides tem sido demonstrada em vários tipos celulares. Por exemplo, a morfina, ou um agonista seletivo de receptores  $\mu$  opióides, produzem um aumento na atividade da AKT em neurônios corticais, sendo que este efeito está relacionado com a proteção celular causada por estas drogas (IGLESIAS et al., 2003). Existem ainda evidências de que a ativação da AKT por agonistas opióides também está envolvida na dessensibilização de seus receptores (POLAKIEWICZ et al., 1998 ; TAN et al., 2003).

Embora existam várias evidências indicando que os efeitos antinociceptivos produzidos pela ação periférica dos opióides dependem da estimulação da NOS, com conseqüente produção de NO, não existem, até o momento, evidências bioquímicas de que estas drogas aumentam a produção de NO por neurônios nociceptivos primários. Em culturas de células endoteliais, a incubação com morfina

induz um aumento na síntese de NO, a qual foi determinada utilizando-se um eletrodo seletivo para este gás (STEFANO et al., 1995). Reforçando as evidências comportamentais, o presente trabalho, utilizando um marcador fluorescente para NO (DAF), demonstra pela primeira vez que a incubação de neurônios sensoriais primários com morfina induz um aumento na produção de NO. Ainda, corroborando a hipótese inicial deste estudo, observou-se que este efeito da morfina na produção de NO depende da via PI3K $\gamma$ /AKT. Embora, até o momento, não se tenha investigado os mecanismos pelos quais a via PI3K $\gamma$ /AKT leva à ativação da nNOS, existem evidências de que a fosforilação de um resíduo de serina, na posição 1417 desta enzima, pela AKT, leve à sua ativação e conseqüente aumento na produção de NO (CANABAL et al., 2007).

Deve-se ter em mente que a excitabilidade dos nociceptores depende da atividade de vários canais iônicos. Assim, a ativação da via PI3K $\gamma$ /AKT/NO pelos opióides poderia modular a atividade de diversas populações de canais iônicos para restabelecer a excitabilidade neuronal à normalidade. Nesse sentido, inibidores de canais K<sub>ATP</sub> previnem a antinocicepção produzida pela ação periférica da morfina, por agonistas seletivos dos receptores opióides, por doadores de NO, bem como por outras drogas antinociceptivas de ação periférica (SOARES et al., 2000; ALVES et al., 2002; PICOLO et al., 2003; ALVES et al., 2004; AMARANTE et al., 2004; ORTIZ et al., 2005; PACHECO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005). Embora não apresentado no presente trabalho, têm-se evidências eletrofisiológicas, obtidas por “patch-clamp”, de que a morfina aumenta correntes de potássio em neurônios nociceptivos primários e que este aumento se deve à ativação de uma população de canais sensíveis à glibenclamida, provavelmente do tipo K<sub>ATP</sub> (dados não mostrados). Ainda, nestes mesmos experimentos, foi observado que inibidores da via PI3K $\gamma$ /AKT/NO inibem o aumento das correntes de K<sup>+</sup> induzidas pela morfina

(dados não mostrados). Desta forma, estas evidências obtidas *in vitro*, juntamente com as obtidas *in vivo*, sugerem fortemente que a antinocicepção produzida pela ação periférica dos opióides depende da modulação de uma população seletiva de canais de potássio, os  $K_{ATP}$ . Dando suporte a esses resultados, CHI et al., (2007) demonstraram que a ativação de tais canais pelo GMPc reduz a excitabilidade produzida pela  $PGE_2$  em uma sub-população de neurônios nociceptivos. Ainda nesta linha, foi demonstrado que a ativação de receptores  $\mu$  opióides reduz a excitabilidade de neurônios nociceptivos primários derivados do gânglio trigeminal, por modular a condutância ao  $K^+$  (TAKEDA et al., 2004). No entanto, os autores sugerem uma modulação nas correntes de potássio do tipo A, que são bloqueadas pela 4-aminopiridina (TAKEDA et al., 2004).

Pode-se lembrar que outros mecanismos iônicos têm sido propostos para explicar o efeito antinociceptivo produzido pela ação dos opióides nos neurônios nociceptivos primários. Por exemplo, demonstrou-se que opióides inibem a abertura de canais de  $Ca^{++}$ , em terminações nervosas aferentes centrais, com conseqüente bloqueio da liberação de neurotransmissores (WERZ; MACDONALD 1983; SCHROEDER et al., 1991; SCHROEDER; MCCLESKEY, 1993; ACOSTA et al., 1999; MOISES et al., 1994; WU et al., 2004b). A inibição destes canais pelos opióides, em aferências periféricas, está relacionada à ação das subunidades  $\beta\gamma$ , liberadas das proteínas G, associadas a seus receptores (MOISES et al., 1994; BORGLAND et al., 2004). Ainda, em alguns casos, a modulação dos canais de  $Ca^{++}$  pelos opióides parece ser um efeito indireto devido à modulação de canais de  $K^+$  (WERZ; MACDONALD 1983). Por outro lado, talvez este efeito também dependa de NO, uma vez que este é capaz de inibir canais de  $Ca^{++}$  em neurônios sensitivos periféricos (KIM et al., 2000). Existem também evidências de que a morfina reduz as

correntes TTX-R em neurônios nociceptivos primários, as quais estão envolvidas na sensibilização dos nociceptores (KRYLOV et al., 2000).

Outros canais que poderiam estar envolvidos nos efeitos periféricos dos opióides seriam os GIRKs. Como já dito, o efeito antinociceptivo causado pela injeção intratecal de opióides depende destes canais, presentes nos neurônios nociceptivos de segunda ordem. Até pouco tempo só se tinha conhecimento da ocorrência destes canais nos neurônios nociceptivos de segunda ordem. No entanto, foi demonstrado, recentemente, que neurônios aferentes primários também expressam esta classe de canais de potássio, o que abriria a possibilidade dos opióides modularem-nos também na periferia (GAO et al., 2007). Esta sugestão foi testada em um trabalho recente, entretanto, não foi observada qualquer modulação dos GIRKs, expressos em neurônios nociceptivos, por um agonista seletivo de receptores  $\mu$  (NOCKEMANN et al., resumo Neuroscience 2008).

Conforme mencionado, todos os três tipos principais de receptores opióides são expressos pelos neurônios aferentes primários e poderiam estar mediando os efeitos antinociceptivos periféricos da morfina (JI et al., 1995). Por existirem várias evidências na literatura de que os efeitos antinociceptivos produzidos pela ação periférica da morfina dependem, principalmente, da ativação do receptor do tipo  $\mu$ , a participação da via PI3K $\gamma$ /AKT foi testada no efeito periférico de um agonista seletivo destes receptores (HAN et al., 2008). Como observado para o efeito da morfina, o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica do DAMGO, agonista seletivo dos receptores  $\mu$  opióides, também depende da ativação da via de sinalização intracelular PI3K $\gamma$ /AKT.

A contraprova da possível interação molecular entre o receptor  $\mu$  opióide e a PI3K $\gamma$  vem do fato de que estas duas entidades moleculares também são expressas



duplamente em neurônios nociceptivos primários. A co-expressão do receptor  $\mu$  opióide e da PI3K $\gamma$  também foi demonstrada em neurônios presentes na PAG (NARITA et al., 2004). Como observado com a PI3K $\gamma$ , os receptores  $\mu$  opióides também apresentam sua expressão relacionada a fibras que expressam o TRPV1 e marcadas para IB<sub>4</sub>. Funcionalmente, esses resultados estão de acordo com resultados prévios, os quais demonstraram que a ativação do receptor  $\mu$  opióide, em neurônios nociceptivos primários, inibe a hipernocicepção induzida pela ativação do TRPV1 (PELLISSIER et al., 2002; ENDRES-BECKER et al., 2007)

### **5.6 Ativação do receptor $\kappa$ opióide na periferia produz antinocicepção: papel da via PI3K $\gamma$ /AKT**

Agonistas seletivos de receptores  $\kappa$  opióides são de particular interesse clínico devido à sua habilidade de produzir antinocicepção sem causar os efeitos indesejáveis, que são observados com os agonistas  $\mu$ , incluindo constipação, prurido e depressão respiratória. No entanto, seus efeitos indesejáveis centrais, como sedação e disforia, podem também limitar seu uso. Portanto, é extremamente valioso o estudo de agonistas  $\kappa$  que atuem seletivamente na periferia, pois constituiriam drogas analgésicas promissoras. De acordo com esta sugestão, tem sido demonstrado que, além da expressão no SNC, os receptores  $\kappa$  opióides também são expressos nos neurônios aferentes primários (JI et al., 1995). No presente trabalho, também foi detectado imunoreatividade para o receptor  $\kappa$  opióide em neurônios de pequeno diâmetro do GRD de ratos. No entanto, a quantidade de neurônios que expressam o receptor  $\kappa$  opióide parece ser menor do que os que

expressam o receptor  $\mu$  opióide. Funcionalmente, a ativação dos receptores  $\kappa$  opióides na periferia produz antinocicepção em diferentes modelos experimentais e, ainda, como observado com a ativação do receptor  $\mu$ , reverte diretamente a hipernocicepção instalada (AMARANTE et al., 2004; PICOLO; CURY, 2004). Este efeito da ativação periférica dos receptores  $\kappa$  opióides também parece depender da ativação da via NO/GMPc/K<sub>ATP</sub> (NOZAKI-TAGUCHI; YAMAMOTO, 1998; AMARANTE; DUARTE, 2002; AMARANTE et al., 2004; PICOLO; CURY, 2004). Em relação ao agonista  $\kappa$  utilizado no presente estudo (U50488), existem resultados não publicados de nosso grupo demonstrando que ele também produz antinocicepção dependente desta via de sinalização (resultados não publicados).

Neste estudo, o efeito antinociceptivo periférico da ativação do receptor  $\kappa$  opióide foi confirmado utilizando-se o teste de pressão crescente na pata de ratos, numa versão automática. Este teste tem uma vantagem em relação ao método de pressão crescente manual (Von Frey eletrônico; VIVANCOS et al., 2003), uma vez que, com ele, não é necessário que o experimentador aplique a pressão na pata do rato, possibilitando que essa seja realmente constante.

O bloqueio da hipernocicepção produzido pela ativação periférica do receptor  $\kappa$  também foi dependente da via PI3K $\gamma$ /AKT. A estimulação desta via intracelular pela ativação dos receptores  $\kappa$  opióides tem sido reportado em vários modelos e células (BELCHEVA et al., 2005; WU; WONG, 2005; PEART et al., 2008). Por exemplo, agonistas  $\kappa$  opióides promovem pré-condicionamento cardíaco, em modelos de isquemia e reperfusão, dependente da ativação da via PI3K $\gamma$ /AKT (PEART et al., 2008). Por outro lado, não havia evidências de que os receptores  $\kappa$  estavam acoplados a esta via de sinalização em neurônios aferentes primários. Os resultados obtidos neste estudo, juntamente com os comentados anteriormente,

permitem sugerir que, como para a ativação dos receptores  $\mu$ , a ativação dos receptores  $\kappa$  opióides na periferia produz antinocicepção mediada pela via de sinalização intracelular PI3K $\gamma$ /AKT/NO/GMPc/K<sub>ATP</sub>.

Embora não se tenha investigado se a ativação periférica do receptor  $\delta$  também produz antinocicepção dependente desta via de sinalização, existem várias evidências que indicam esta possibilidade: a) estes receptores estão normalmente expressos em neurônios aferentes primários (JI et al., 1995); b) a ativação deste subtipo de receptor na periferia também é capaz de reverter a hipernocicepção já instalada (STEIN et al., 1989; NOZAKI-TAGUCHI; YAMAMOTO, 1995; PICOLO et al., 2003 PICOLO; CURY, 2004; PACHECO, DUARTE, 2005; PACHECO et al., 2005); c) este efeito antinociceptivo também depende da ativação da via NO/GMPc/K<sub>ATP</sub> (PICOLO et al., 2003 PICOLO; CURY, 2004; PACHECO, DUARTE, 2005; PACHECO et al., 2005), d) a ativação dos receptores  $\delta$  está associada à estimulação da via PI3K/AKT, como, por exemplo, no efeito neuroprotetor e antinociceptivo produzido pela ativação central deste receptor (NARITA et al., 2002; Wu; Wong, 2005; NARITA et al., 2006; GROSS et al., 2007).

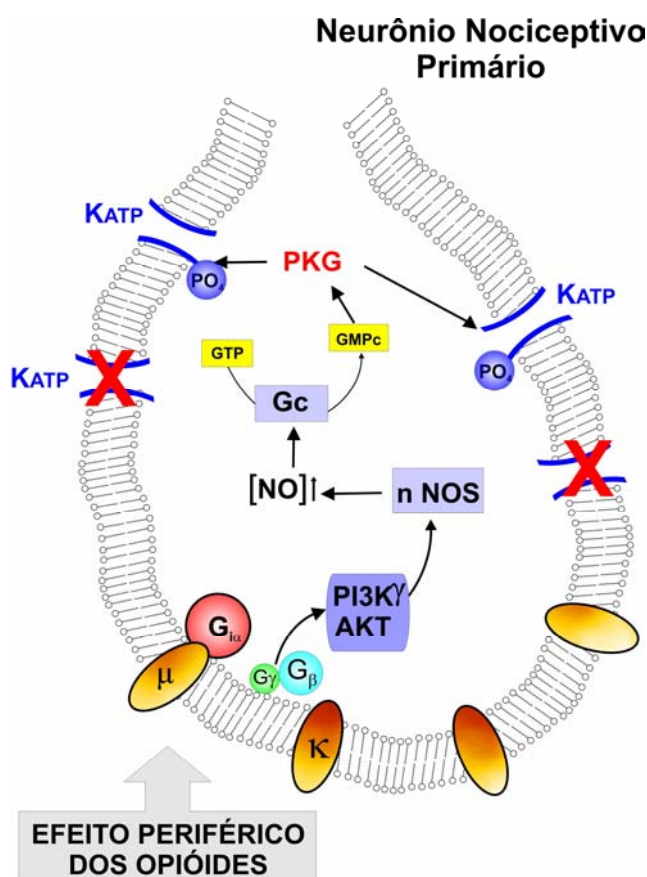
Cabe ressaltar que, além dos opióides, outras drogas que bloqueiam a hipernocicepção instalada por ação periférica podem atuar via NO/GMPc/K<sub>ATP</sub> (SACHS et al., 2004). Dessa forma, parece pertinente investigar, no futuro, se os efeitos destas drogas também dependem da via PI3K $\gamma$ /AKT. Dados preliminares indicam que a dipirona também causa antinocicepção por uma ação periférica mediada pela via PI3K $\gamma$ /AKT/NO/GMPc/K<sub>ATP</sub>. Contudo, necessita-se entender quais os mecanismos envolvidos nesta ativação, uma vez que não existem dados de que a dipirona ative um receptor acoplado à proteína Gi, ao passo que, como já mencionado, é importante na ativação da PI3K $\gamma$  (BROCK et al., 2003).

Com a caracterização do papel da via de sinalização PI3K $\gamma$ /AKT/NO/GMPc/K<sub>ATP</sub> para o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides, uma nova pergunta surge: quais serão as implicações futuras destes achados? Embora as respostas para esta pergunta não sejam imediatas, pode-se sugerir algumas. Primeiro, a caracterização de uma via analgésica comum para os efeitos de várias drogas sugere que esta via seja extremamente importante, tanto no que tange ao entendimento dos mecanismos neuronais periféricos de controle da dor, quanto no estabelecimento de novos alvos terapêuticos em que possam atuar novas drogas. Segundo, no caso dos opióides, necessita-se entender até que ponto esta via de sinalização é importante para os efeitos indesejáveis, e tentar dissociá-los seria de grande valia. Por último, convém retomar um pouco uma questão básica deste conceito. Na maioria dos sistemas onde a via PI3K $\gamma$ /AKT participa dos processos celulares, seus efeitos são contrabalanceados por um sistema de fosfatases. As principais fosfatases envolvidas na modulação e no término das ações da PI3K $\gamma$ /AKT são a PTEN e a SHIP-1 (DAMEN et al., 1996; MAEHAMA; DIXON, 1998; WU et al., 1998). Portanto, caso os resultados do presente estudo venham a ser confirmados ao longo dos anos, seria plausível sugerir que o uso de inibidores destas fosfatases poderia levar à utilização de doses mais baixas dos agonistas opióides, uma vez que, provavelmente, seus efeitos antinociceptivos por ação periférica seriam potencializados.

***CONCLUSÕES***

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados pode-se sugerir que a ativação da via neuronal de sinalização NO/GMPc/PKG/K<sub>ATP</sub>, envolvida no efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos agonistas opióides, depende da estimulação inicial da via PI3K $\gamma$ /AKT (Figure 42). Estes resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos que faltavam na ação periférica destas drogas e revelam um até então desconhecido papel antinociceptivo da via PI3K $\gamma$ /AKT. Por conseguinte, eles abrem uma nova perspectiva no mecanismo molecular de ação de velhas drogas analgésicas de ação periférica e também no desenvolvimento de novas drogas.



**Figura 42-** Esquema ilustrativo do mecanismo molecular proposto para o efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides, ativação da via PI3K $\gamma$ /AKT/NO/GMPc/PKG/K<sub>ATP</sub>.

***REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS***

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ACOSTA, C.G., LOPEZ, H.S. (1999) delta opioid receptor modulation of several voltage-dependent Ca(2+) currents in rat sensory neurons. *J Neurosci* **19**, 8337-48.
- AGUIRRE-BANUELOS, P., GRANADOS-SOTO, V. (1999) Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyrone. *J Pharmacol Toxicol Methods* **42**, 79-85.
- AKIL, H., MAYER, D.J., LIEBESKIND, J.C. (1976) Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science* **191**, 961-2.
- AKOPIAN, A.N., SOUSLOVA, V., ENGLAND, S., OKUSE, K., OGATA, N., URE, J., SMITH, A., KERR, B.J., MCMAHON, S.B., BOYCE, S., HILL, R., STANFA, L.C., DICKENSON, A.H., WOOD, J.N. (1999) The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat Neurosci* **2**, 541-8.
- ALEY, K.O., LEVINE, J.D. (1999) Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci* **19**, 2181-6.
- ALEY, K.O., MCCARTER, G., LEVINE, J.D. (1998) Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci* **18**, 7008-14.
- ALVES, D., DUARTE, I. (2002) Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. *Eur J Pharmacol* **444**, 47-52.
- ALVES, D.P., TATSUO, M.A., LEITE, R., DUARTE, I.D. (2004) Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K+ channels activation. *Life Sci* **74**, 2577-91.



- AMARANTE, L.H., ALVES, D.P., DUARTE, I.D. (2004) Study of the involvement of K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociception of the kappa-opioid receptor agonist bremazocine. *Eur J Pharmacol* **494**, 155-60.
- AMARANTE, L.H., DUARTE, I.D. (2002) The kappa-opioid agonist (+/-)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* **454**, 19-23.
- AMAYA, F., WANG, H., COSTIGAN, M., ALLCHORNE, A.J., HATCHER, J.P., EGERTON, J., STEAN, T., MORISSET, V., GROSE, D., GUNTHORPE, M.J., CHESSELL, I.P., TATE, S., GREEN, P.J., WOOLF, C.J. (2006) The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* **26**, 12852-60.
- AOKI, Y., TAKAHASHI, Y., OHTORI, S., MORIYA, H., TAKAHASHI, K. (2004) Distribution and immunocytochemical characterization of dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar intervertebral disc in rats: a review. *Life Sci* **74**, 2627-42.
- ATWEH, S.F., KUCHAR, M.J. (1977) Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. I. Spinal cord and lower medulla. *Brain Res* **124**, 53-67.
- AVERILL, S., MCMAHON, S.B., CLARY, D.O., REICHARDT, L.F., PRIESTLEY, J.V. (1995) Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci* **7**, 1484-94.
- BARTHO, L., STEIN, C., HERZ, A. (1990) Involvement of capsaicin-sensitive neurones in hyperalgesia and enhanced opioid antinociception in inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **342**, 666-70.
- BARTLETT, S.E., REYNOLDS, A.J., TAN, T., HEYDON, K., HENDRY, I.A. (1999) Differential mRNA expression and subcellular locations of PI3-kinase isoforms in sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci Res* **56**, 44-53.

- BASBAUM, A.I., CLANTON, C.H., FIELDS, H.L. (1976) Opiate and stimulus-produced analgesia: functional anatomy of a medullospinal pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 4685-8.
- BELCHEVA, M.M., CLARK, A.L., HAAS, P.D., SERNA, J.S., HAHN, J.W., KISS, A., COSCIA, C.J. (2005) Mu and kappa opioid receptors activate ERK/MAPK via different protein kinase C isoforms and secondary messengers in astrocytes. *J Biol Chem* **280**, 27662-9.
- BESSION, J.M., CHAOUCH, A. (1987) Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev* **67**, 67-186.
- BILSKY, E.J., WANG, T., LAI, J., PORRECA, F. (1996) Selective blockade of peripheral delta opioid agonist induced antinociception by intrathecal administration of delta receptor antisense oligodeoxynucleotide. *Neurosci Lett* **220**, 155-8.
- BORGLAND, S.L., CONNOR, M., CHRISTIE, M.J. (2001) Nociceptin inhibits calcium channel currents in a subpopulation of small nociceptive trigeminal ganglion neurons in mouse. *J Physiol* **536**, 35-47.
- BRADBURY, E.J., BURNSTOCK, G., MCMAHON, S.B. (1998) The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci* **12**, 256-68.
- BREESE, N.M., GEORGE, A.C., PAUERS, L.E., STUCKY, C.L. (2005) Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. *Pain* **115**, 37-49.
- BRESALIER, R.S., FRIEDEWALD, V.E., JR., RAKEL, R.E., ROBERTS, W.C., WILLIAMS, G.W. (2005) The Editor's roundtable: cyclooxygenase-2 inhibitors and cardiovascular risk. *Am J Cardiol* **96**, 1589-604.

- BRIGNOLA, G., CALIGNANO, A., DI ROSA, M. (1994) Modulation of morphine antinociception in the mouse by endogenous nitric oxide. *Br J Pharmacol* **113**, 1372-6.
- BROCK, C., SCHAEFER, M., REUSCH, H.P., CZUPALLA, C., MICHALKE, M., SPICHER, K., SCHULTZ, G., NURNBERG, B. (2003) Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Cell Biol* **160**, 89-99.
- BROWN, L.A., KEY, B.J., LOVICK, T.A. (1999) Bio-imaging of nitric oxide-producing neurones in slices of rat brain using 4,5-diaminofluorescein. *J Neurosci Methods* **92**, 101-10.
- CAMPS, M., RUCKLE, T., JI, H., ARDISSONE, V., RINTELEN, F., SHAW, J., FERRANDI, C., CHABERT, C., GILLIERON, C., FRANCON, B., MARTIN, T., GREENER, D., PERRIN, D., LEROY, D., VITTE, P.A., HIRSCH, E., WYMANN, M.P., CIRILLO, R., SCHWARZ, M.K., ROMMEL, C. (2005) Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med* **11**, 936-43.
- CANABAL, D.D., SONG, Z., POTIAN, J.G., BEUVE, A., MCARDLE, J.J., ROUTH, V.H. (2007) Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R1418-28.
- CANO, G., ARCAYA, J.L., GOMEZ, G., MAIXNER, W., SUAREZ-ROCA, H. (1999) Multiphasic morphine modulation of substance P release from capsaicin-sensitive primary afferent fibers. *Neurochem Res* **24**, 1203-7.
- CANTRELL, D.A. (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* **114**, 1439-45.
- CHEVLEN, E. (2003) Opioids: a review. *Curr Pain Headache Rep* **7**, 15-23.

- CHI, X.X., JIANG, X., NICOL, G.D. (2007) ATP-sensitive potassium currents reduce the PGE<sub>2</sub>-mediated enhancement of excitability in adult rat sensory neurons. *Brain Res* **1145**, 28-40.
- COFFER, P.J., JIN, J., WOODGETT, J.R. (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* **335 ( Pt 1)**, 1-13.
- COLLIER, H.O., ROY, A.C. (1974) Morphine-like drugs inhibit the stimulation of E prostaglandins of cyclic AMP formation by rat brain homogenate. *Nature* **248**, 24-7.
- COLLIER, H.O., ROY, A.C. (1974) Hypothesis: Inhibition of E prostaglandin-sensitive adenyl cyclase as the mechanism of morphine analgesia. *Prostaglandins* **7**, 361-76.
- COUTAUX, A., ADAM, F., WILLER, J.C., LE BARS, D. (2005) Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* **72**, 359-71.
- CROSS, D.A., ALESSI, D.R., COHEN, P., ANDJELKOVICH, M., HEMMINGS, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-9.
- CUNHA, F.Q., POOLE, S., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. (1992) The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* **107**, 660-4.
- CUNHA, T.M., VERRI, W.A., JR., SILVA, J.S., POOLE, S., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. (2005) A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1755-60.

- CUNHA, T.M., VERRI, W.A., JR., VIVANCOS, G.G., MOREIRA, I.F., REIS, S., PARADA, C.A., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. (2004) An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* **37**, 401-7.
- CUNHA, T.M., VERRI JR., W.A., POOLE, S., PARADA, C.A., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. (2007). Pain facilitation by proinflammatory cytokine actions at peripheral nerve terminals. *Immune and Glial Regulation of Pain*, Iasp Press, Seattle, pp. 67–83.
- DAMBISYA, Y.M., LEE, T.L. (1995) Effects L-NG-nitro arginine methyl ester (L-NAME), L-NG-monomethyl arginine (L-NMMA) and L-arginine on the antinociceptive effects of morphine in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **17**, 577-82.
- DAMEN, J.E., LIU, L., ROSTEN, P., HUMPHRIES, R.K., JEFFERSON, A.B., MAJERUS, P.W., KRYSTAL, G. (1996) The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1689-93.
- DEWITT, D.L. (1999) Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol Pharmacol* **55**, 625-31.
- DHAWAN, B.N., CESSSELIN, F., RAGHUBIR, R., REISINE, T., BRADLEY, P.B., PORTOGHESE, P.S., HAMON, M. (1996) International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev* **48**, 567-92.
- DIMMELER, S., FLEMING, I., FISSLTHALER, B., HERMANN, C., BUSSE, R., ZEIHNER, A.M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601-5.

- DUARTE, D.F. (2005) Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. *Rev Bras Anesthesiol* **55**, 135-146.
- DUARTE, I.D., DOS SANTOS, I.R., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. (1992) Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* **217**, 225-7.
- DUARTE, I.D., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. (1990) Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol* **186**, 289-93.
- ENDRES-BECKER, J., HEPPENSTALL, P.A., MOUSA, S.A., LABUZ, D., OKSCHE, A., SCHAFER, M., STEIN, C., ZOLLNER, C. (2007) Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. *Mol Pharmacol* **71**, 12-8.
- ENGELMAN, J.A., LUO, J., CANTLEY, L.C. (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* **7**, 606-19.
- ENGLAND, S., BEVAN, S., DOCHERTY, R.J. (1996) PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol* **495 ( Pt 2)**, 429-40.
- EVANS, A.R., VASKO, M.R., NICOL, G.D. (1999) The cAMP transduction cascade mediates the PGE2-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. *J Physiol* **516 ( Pt 1)**, 163-78.
- FERREIRA, S.H. (1972) Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol* **240**, 200-3.
- FERREIRA, S.H. (2002) Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. *Int J Clin Pract Suppl*, 2-10.

- FERREIRA, S.H., DUARTE, I.D., LORENZETTI, B.B. (1991a) The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* **201**, 121-2.
- FERREIRA, S.H., DUARTE, I.D., LORENZETTI, B.B. (1991b) Molecular base of acetylcholine and morphine analgesia. *Agents Actions Suppl* **32**, 101-6.
- FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B., CORREA, F.M. (1978) Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur J Pharmacol* **53**, 39-48.
- FERREIRA, S.H., NAKAMURA, M. (1979) I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. *Prostaglandins* **18**, 179-90.
- FERREIRA, S.H., NAKAMURA, M. (1979) II - Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. *Prostaglandins* **18**, 191-200.
- FERREIRA, S.H., NAKAMURA, M., DE ABREU CASTRO, M.S. (1978) The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Prostaglandins* **16**, 31-7.
- FERREIRA, S.H., ROMITELLI, M., DE NUCCI, G. (1989) Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol* **13 Suppl 5**, S220-2.
- FERREIRA, S.H., VANE, J.R. (1967) Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. *Nature* **216**, 868-73.
- FIELDS, H.L., ANDERSON, S.D. (1978) Evidence that raphe-spinal neurons mediate opiate and midbrain stimulation-produced analgesias. *Pain* **5**, 333-49.
- FIELDS, H.L., EMSON, P.C., LEIGH, B.K., GILBERT, R.F., IVERSEN, L.L. (1980) Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibres. *Nature* **284**, 351-3.

- FITZGERALD, G.A. (2004) Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med* **351**, 1709-11.
- FRENK, H., MCCARTY, B.C., LIEBESKIND, J.C. (1978) Different brain areas mediate the analgesic and epileptic properties of enkephalin. *Science* **200**, 335-7.
- FRUMAN, D.A., MEYERS, R.E., CANTLEY, L.C. (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* **67**, 481-507.
- FULLMER, J.M., RIEDL, M.S., HIGGINS, L., ELDE, R. (2004) Identification of some lectin IB4 binding proteins in rat dorsal root ganglia. *Neuroreport* **15**, 1705-9.
- FULTON, D., GRATTON, J.P., MCCABE, T.J., FONTANA, J., FUJIO, Y., WALSH, K., FRANKE, T.F., PAPAPETROPOULOS, A., SESSA, W.C. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**, 597-601.
- FUNK, C.D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871-5.
- GAO, X.F., ZHANG, H.L., YOU, Z.D., LU, C.L., HE, C. (2007) G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in dorsal root ganglion neurons. *Acta Pharmacol Sin* **28**, 185-90.
- GARRY, M.G., HARGREAVES, K.M. (1992) Enhanced release of immunoreactive CGRP and substance P from spinal dorsal horn slices occurs during carrageenan inflammation. *Brain Res* **582**, 139-42.
- GOLD, M.S., LEVINE, J.D., CORREA, A.M. (1998) Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J Neurosci* **18**, 10345-55.



- GOLD, M.S., REICHLING, D.B., SHUSTER, M.J., LEVINE, J.D. (1996) Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current in nociceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1108-12.
- GOLDBERG, N.D., HADDOX, M.K., NICOL, S.E., GLASS, D.B., SANFORD, C.H., KUEHL, F.A., JR., ESTENSEN, R. (1975) Biologic regulation through opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP: the Yin Yang hypothesis. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **5**, 307-30.
- GRANADOS-SOTO, V., FLORES-MURRIETA, F.J., CASTANEDA-HERNANDEZ, G., LOPEZ-MUNOZ, F.J. (1995) Evidence for the involvement of nitric oxide in the antinociceptive effect of ketorolac. *Eur J Pharmacol* **277**, 281-4.
- GROSS, E.R., HSU, A.K., GROSS, G.J. (2007) GSK3beta inhibition and K(ATP) channel opening mediate acute opioid-induced cardioprotection at reperfusion. *Basic Res Cardiol* **102**, 341-9.
- GSCHOSSMANN, J.M., CHABAN, V.V., MCROBERTS, J.A., RAYBOULD, H.E., YOUNG, S.H., ENNES, H.S., LEMBO, T., MAYER, E.A. (2000) Mechanical activation of dorsal root ganglion cells in vitro: comparison with capsaicin and modulation by kappa-opioids. *Brain Res* **856**, 101-10.
- GUO, A., VULCHANOVA, L., WANG, J., LI, X., ELDE, R. (1999) Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* **11**, 946-58.
- GUTSTEIN HB, AKIL H (2001). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, pp. 569-619.
- HABERBERGER, R.V., HENRICH, M., LIPS, K.S., KUMMER, W. (2003) Nicotinic receptor alpha 7-subunits are coupled to the stimulation of nitric oxide synthase in rat dorsal root ganglion neurons. *Histochem Cell Biol* **120**, 173-81.

- HALL, A.K. (2006) Rodent sensory neuron culture and analysis. *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 3**, Unit 3 19.
- HAN, S.R., LEE, M.K., LIM, K.H., YANG, G.Y., JEON, H.J., JU, J.S., YOON, Y.W., KIM, S.K., AHN, D.K. (2008) Intramuscular administration of morphine reduces mustard-oil-induced craniofacial-muscle pain behavior in lightly anesthetized rats. *Eur J Pain* **12**, 361-70.
- HARDY, J.D., WOLFF, H.G., GOODELL, H. (1950) Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J Clin Invest* **29**, 115-40.
- HARTELL, N.A., ARCHER, H.E., BAILEY, C.J. (2005) Insulin-stimulated endothelial nitric oxide release is calcium independent and mediated via protein kinase B. *Biochem Pharmacol* **69**, 781-90.
- HASSAN, A.H., ABLEITNER, A., STEIN, C., HERZ, A. (1993) Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience* **55**, 185-95.
- HAWKINS, P.T., ANDERSON, K.E., DAVIDSON, K., STEPHENS, L.R. (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* **34**, 647-62.
- HOBBS, A.J., HIGGS, A., MONCADA, S. (1999) Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 191-220.
- HUCHO, T.B., DINA, O.A., LEVINE, J.D. (2005) Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4(+) neuron-specific mechanism. *J Neurosci* **25**, 6119-26.
- HUGHES, J., SMITH, T.W., KOSTERLITZ, H.W., FOTHERGILL, L.A., MORGAN, B.A., MORRIS, H.R. (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **258**, 577-80.

- HUNTER, T. (2000) Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-27.
- IGLESIAS, M., SEGURA, M.F., COMELLA, J.X., OLMOS, G. (2003) Mu-opioid receptor activation prevents apoptosis following serum withdrawal in differentiated SH-SY5Y cells and cortical neurons via phosphatidylinositol 3-kinase. *Neuropharmacology* **44**, 482-92.
- IVANOV, A.I., ROMANOVSKY, A.A. (2004) Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci* **9**, 1977-93.
- JANSON, W., STEIN, C. (2003) Peripheral opioid analgesia. *Curr Pharm Biotechnol* **4**, 270-4.
- JI, R.R., ZHANG, Q., LAW, P.Y., LOW, H.H., ELDE, R., HOKFELT, T. (1995) Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci* **15**, 8156-66.
- JOHANEK, L.M., MEYER, R.A., FRIEDMAN, R.M., GREENQUIST, K.W., SHIM, B., BORZAN, J., HARTKE, T., LAMOTTE, R.H., RINGKAMP, M. (2008) A role for polymodal C-fiber afferents in nonhistaminergic itch. *J Neurosci* **28**, 7659-69.
- JOSHI, S.K., SU, X., PORRECA, F., GEBHART, G.F. (2000) kappa -opioid receptor agonists modulate visceral nociception at a novel, peripheral site of action. *J Neurosci* **20**, 5874-9.
- JULIUS, D., BASBAUM, A.I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203-10.
- KALYUZHNY, A.E., ARVIDSSON, U., WU, W., WESSENDORF, M.W. (1996) mu-Opioid and delta-opioid receptors are expressed in brainstem antinociceptive circuits: studies using immunocytochemistry and retrograde tract-tracing. *J Neurosci* **16**, 6490-503.

- KHASAR, S.G., GOLD, M.S., DASTMALCHI, S., LEVINE, J.D. (1996) Selective attenuation of mu-opioid receptor-mediated effects in rat sensory neurons by intrathecal administration of antisense oligodeoxynucleotides. *Neurosci Lett* **218**, 17-20.
- KHASAR, S.G., GOLD, M.S., LEVINE, J.D. (1998) A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat. *Neurosci Lett* **256**, 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., MESSING, R.O. (1999) A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron* **24**, 253-60.
- KHASAR, S.G., MCCARTER, G., LEVINE, J.D. (1999) Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. *J Neurophysiol* **81**, 1104-12.
- KHOURY, G.F., STEIN, C., GARLAND, D.E. (1990) Intra-articular morphine for pain after knee arthroscopy. *Lancet* **336**, 874.
- KIM, S.J., SONG, S.K., KIM, J. (2000) Inhibitory effect of nitric oxide on voltage-dependent calcium currents in rat dorsal root ganglion cells. *Biochem Biophys Res Commun* **271**, 509-14.
- KLEE, W.A. (1979) Opioid peptides as modulators of cyclic AMP levels. *Adv Exp Med Biol* **116**, 225-31.
- KNOWLES, R.G., PALACIOS, M., PALMER, R.M., MONCADA, S. (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5159-62.

- KOJIMA, H., SAKURAI, K., KIKUCHI, K., KAWAHARA, S., KIRINO, Y., NAGOSHI, H., HIRATA, Y., NAGANO, T. (1998) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **46**, 373-5.
- KRYLOV, B.V., DERBENEV, A.V., PODZOROVA, S.A., LYUDYNO, M.I., KUZ'MIN, A.V., IZVARINA, N.L. (2000) Morphine decreases the voltage sensitivity of slow sodium channels. *Neurosci Behav Physiol* **30**, 431-9.
- KUHAR, M.J., PERT, C.B., SNYDER, S.H. (1973) Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature* **245**, 447-50.
- LAI, J., PORRECA, F., HUNTER, J.C., GOLD, M.S. (2004) Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 371-97.
- LAW, P.Y., WONG, Y.H., LOH, H.H. (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 389-430.
- LEVESQUE, L.E., BROPHY, J.M., ZHANG, B. (2006) Time variations in the risk of myocardial infarction among elderly users of COX-2 inhibitors. *Cmaj* **174**, 1563-9.
- LEVINE, J.D., LAU, W., KWIAT, G., GOETZL, E.J. (1984) Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. *Science* **225**, 743-5.
- LEVINE, J.D., TAIWO, Y.O. (1989) Involvement of the mu-opiate receptor in peripheral analgesia. *Neuroscience* **32**, 571-5.
- LIGHT, A.R., WILLCOCKSON, H.H. (1999) Spinal laminae I-II neurons in rat recorded in vivo in whole cell, tight seal configuration: properties and opioid responses. *J Neurophysiol* **82**, 3316-26.

- LINDFORS, P.H., VOIKAR, V., ROSSI, J., AIRAKSINEN, M.S. (2006) Deficient nonpeptidergic epidermis innervation and reduced inflammatory pain in glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha2 knock-out mice. *J Neurosci* **26**, 1953-60.
- LINHART, O., OBREJA, O., KRESS, M. (2003) The inflammatory mediators serotonin, prostaglandin E2 and bradykinin evoke calcium influx in rat sensory neurons. *Neuroscience* **118**, 69-74.
- LIU, H., MANTYH, P.W., BASBAUM, A.I. (1997) NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature* **386**, 721-4.
- LIU, S., PREMONT, R.T., KONTOS, C.D., HUANG, J., ROCKEY, D.C. (2003) Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt. *J Biol Chem* **278**, 49929-35.
- LOESER, J.D., MELZACK, R. (1999) Pain: an overview. *Lancet* **353**, 1607-9.
- MA, W., CHABOT, J.G., QUIRION, R. (2006) A role for adrenomedullin as a pain-related peptide in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16027-32.
- MACDONALD, R.L., NELSON, P.G. (1978) Specific-opiate-induced depression of transmitter release from dorsal root ganglion cells in culture. *Science* **199**, 1449-51.
- MAEHAMA, T., DIXON, J.E. (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**, 13375-8.
- MAINGRET, F., COSTE, B., PADILLA, F., CLERC, N., CREST, M., KOROGOD, S.M., DELMAS, P. (2008) Inflammatory mediators increase Nav1.9 current and excitability in nociceptors through a coincident detection mechanism. *J Gen Physiol* **131**, 211-25.

- MALIK-HALL, M., DINA, O.A., LEVINE, J.D. (2005) Primary afferent nociceptor mechanisms mediating NGF-induced mechanical hyperalgesia. *Eur J Neurosci* **21**, 3387-94.
- MARKER, C.L., CINTORA, S.C., ROMAN, M.I., STOFFEL, M., WICKMAN, K. (2002) Hyperalgesia and blunted morphine analgesia in G protein-gated potassium channel subunit knockout mice. *Neuroreport* **13**, 2509-13.
- MARTIN, H.A., BASBAUM, A.I., KWIAT, G.C., GOETZL, E.J., LEVINE, J.D. (1987) Leukotriene and prostaglandin sensitization of cutaneous high-threshold C- and A-delta mechanonociceptors in the hairy skin of rat hindlimbs. *Neuroscience* **22**, 651-9.
- MASFERRER, J.L., ZWEIFEL, B.S., MANNING, P.T., HAUSER, S.D., LEAHY, K.M., SMITH, W.G., ISAKSON, P.C., SEIBERT, K. (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3228-32.
- MAYER, D.J., WOLFLE, T.L., AKIL, H., CARDER, B., LIEBESKIND, J.C. (1971) Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science* **174**, 1351-4.
- MCCMAHON, S.B., KOLTZENBURG, M. (1990) Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. *Trends Neurosci* **13**, 199-201.
- MCCMAHON, S.B., KOLTZENBURG, M. (1990) Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. *Trends Neurosci* **13**, 199-201.
- MENENDEZ, L., JUAREZ, L., GARCIA, V., HIDALGO, A., BAAMONDE, A. (2007) Involvement of nitric oxide in the inhibition of bone cancer-induced hyperalgesia through the activation of peripheral opioid receptors in mice. *Neuropharmacology* **53**, 71-80.
- MILLAN, M.J. (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* **66**, 355-474.

- MINNEMAN, K.P., IVERSEN, I.L. (1976) Enkephalin and opiate narcotics increase cyclic GMP accumulation in slices of rat neostriatum. *Nature* **262**, 313-4.
- MITROVIC, I., MARGETA-MITROVIC, M., BADER, S., STOFFEL, M., JAN, L.Y., BASBAUM, A.I. (2003) Contribution of GIRK2-mediated postsynaptic signaling to opiate and alpha 2-adrenergic analgesia and analgesic sex differences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 271-6.
- MOISES, H.C., RUSIN, K.I., MACDONALD, R.L. (1994) Mu- and kappa-opioid receptors selectively reduce the same transient components of high-threshold calcium current in rat dorsal root ganglion sensory neurons. *J Neurosci* **14**, 5903-16.
- MOLLIVER, D.C., WRIGHT, D.E., LEITNER, M.L., PARSADANIAN, A.S., DOSTER, K., WEN, D., YAN, Q., SNIDER, W.D. (1997) IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron* **19**, 849-61.
- MOTTA, E.M., CALIXTO, J.B., RAE, G.A. (2006) Mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in rats is mediated via phospholipase C, protein kinase C, and MAP kinases. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**, 1141-5.
- NAKAMURA, M., FERREIRA, S.H. (1987) A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* **135**, 145-53.
- NARITA, M., KUZUMAKI, N., MIYATAKE, M., SATO, F., WACHI, H., SEYAMA, Y., SUZUKI, T. (2006) Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J Neurochem* **97**, 1494-505.
- NARITA, M., OHNISHI, O., NEMOTO, M., YAJIMA, Y., SUZUKI, T. (2002) Implications of phosphoinositide 3-kinase in the mu- and delta-opioid receptor-mediated supraspinal antinociception in the mouse. *Neuroscience* **113**, 647-52.



- NICOL, G.D., VASKO, M.R., EVANS, A.R. (1997) Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons. *J Neurophysiol* **77**, 167-76.
- NOBACK, C.R., STROMINGER, N.L., DMAREST, R.J. (1996) The human nervous system: structure and function. Pain and temperature, 5<sup>a</sup> ed., Williams & Wilkins, New York, pp. 123-137.
- NOCKEMANN, D., STEIN, C., HEPPENSTALL, P. A. (2008) Analysis of Opioid receptor/K<sup>+</sup> channel coupling in sensory neurons. *Anais do Congresso de Neurociências 2008* Washington. Resumo n. 856.6.
- NORTH, R.A. (1989) Twelfth Gaddum memorial lecture. Drug receptors and the inhibition of nerve cells. *Br J Pharmacol* **98**, 13-28.
- NOZAKI-TAGUCHI, N., YAMAMOTO, T. (1998) Involvement of nitric oxide in peripheral antinociception mediated by kappa- and delta-opioid receptors. *Anesth Analg* **87**, 388-93.
- NOZAKI-TAGUCHI, N., YAMAMOTO, T. (1998) Involvement of nitric oxide in peripheral antinociception mediated by kappa- and delta-opioid receptors. *Anesth Analg* **87**, 388-93.
- OELTJENBRUNS, J., SCHAFER, M. (2005) Peripheral opioid analgesia: clinical applications. *Curr Pain Headache Rep* **9**, 36-44.
- ORTIZ, M.I., CASTRO-OLGUIN, J., PENA-SAMANIEGO, N., CASTANEDA-HERNANDEZ, G. (2005) Probable activation of the opioid receptor-nitric oxide-cyclic GMP-K<sup>+</sup> channels pathway by codeine. *Pharmacol Biochem Behav* **82**, 695-703.
- PACHECO, D.F., DUARTE, I.D. (2005) Delta-opioid receptor agonist SNC80 induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Eur J Pharmacol* **512**, 23-8.

- PACHECO, D.F., DUARTE, I.D. (2005) Delta-opioid receptor agonist SNC80 induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Eur J Pharmacol* **512**, 23-8.
- PACHECO, D.F., REIS, G.M., FRANCISCHI, J.N., CASTRO, M.S., PEREZ, A.C., DUARTE, I.D. (2005) delta-Opioid receptor agonist SNC80 elicits peripheral antinociception via delta(1) and delta(2) receptors and activation of the l-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Life Sci* **78**, 54-60.
- PAPIN, J.A., HUNTER, T., PALSSON, B.O., SUBRAMANIAM, S. (2005) Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 99-111.
- PARADA, C.A., YEH, J.J., JOSEPH, E.K., LEVINE, J.D. (2003) Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. *Eur J Neurosci* **17**, 1847-52.
- PEART, J.N., GROSS, E.R., REICHEL, M.E., HSU, A., HEADRICK, J.P., GROSS, G.J. (2008) Activation of kappa-opioid receptors at reperfusion affords cardioprotection in both rat and mouse hearts. *Basic Res Cardiol*.
- PELLISSIER, T., PAJOT, J., DALLEL, R. (2002) The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain* **96**, 81-7.
- PERRY, M.J., LAWSON, S.N., ROBERTSON, J. (1991) Neurofilament immunoreactivity in populations of rat primary afferent neurons: a quantitative study of phosphorylated and non-phosphorylated subunits. *J Neurocytol* **20**, 746-58.
- PERT, C.B., SNYDER, S.H. (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* **179**, 1011-4.

- PICOLO, G., CASSOLA, A.C., CURY, Y. (2003) Activation of peripheral ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Eur J Pharmacol* **469**, 57-64.
- PICOLO, G., CURY, Y. (2004) Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, a delta- and kappa-opioid receptor agonist. *Life Sci* **75**, 559-73.
- POLAKIEWICZ, R.D., SCHIEFERL, S.M., DORNER, L.F., KANSRA, V., COMB, M.J. (1998) A mitogen-activated protein kinase pathway is required for mu-opioid receptor desensitization. *J Biol Chem* **273**, 12402-6.
- POLAKIEWICZ, R.D., SCHIEFERL, S.M., GINGRAS, A.C., SONENBERG, N., COMB, M.J. (1998) mu-Opioid receptor activates signaling pathways implicated in cell survival and translational control. *J Biol Chem* **273**, 23534-41.
- PRADO, W.A., SCHIAVON, V.F., CUNHA, F.Q. (2002) Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. *Eur J Pharmacol* **441**, 57-65.
- RANDALL, L.O., SELITTO, J.J. (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **111**, 409-19.
- RANDIC, M., CHENG, G., KOJIC, L. (1995) kappa-opioid receptor agonists modulate excitatory transmission in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *J Neurosci* **15**, 6809-26.
- REXED, B. (1954) A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* **100**, 297-379.
- REYNOLDS, D.V. (1969) Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* **164**, 444-5.

- RIEDEL, W., NEECK, G. (2001) Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol* **60**, 404-15.
- RITTNER, H.L., MACHELSKA, H., STEIN, C. (2005) Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. *J Leukoc Biol* **78**, 1215-22.
- RODRIGUES, A.R., CASTRO, M.S., FRANCISCHI, J.N., PEREZ, A.C., DUARTE, I.D. (2005) Participation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect of fentanyl in rats. *Braz J Med Biol Res* **38**, 91-7.
- RODRIGUES, A.R., DUARTE, I.D. (2000) The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. *Br J Pharmacol* **129**, 110-4.
- ROMMEL, C., CAMPS, M., JI, H. (2007) PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat Rev Immunol* **7**, 191-201.
- RUSH, A.M., WAXMAN, S.G. (2004) PGE<sub>2</sub> increases the tetrodotoxin-resistant Nav1.9 sodium current in mouse DRG neurons via G-proteins. *Brain Res* **1023**, 264-71.
- SACHS, D., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. (2004) Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3680-5.
- SAFIEH-GARABEDIAN, B., POOLE, S., HADDAD, J.J., MASSAAD, C.A., JABBUR, S.J., SAADE, N.E. (2002) The role of the sympathetic efferents in endotoxin-induced localized inflammatory hyperalgesia and cytokine upregulation. *Neuropharmacology* **42**, 864-72.

- SASAKI, T., IRIE-SASAKI, J., HORIE, Y., BACHMAIER, K., FATA, J.E., LI, M., SUZUKI, A., BOUCHARD, D., HO, A., REDSTON, M., GALLINGER, S., KHOKHA, R., MAK, T.W., HAWKINS, P.T., STEPHENS, L., SCHERER, S.W., TSAO, M., PENNINGER, J.M. (2000) Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. *Nature* **406**, 897-902.
- SCHAIBLE, H.G., SCHMIDT, R.F. (1988) Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *J Neurophysiol* **60**, 2180-95.
- SCHNEIDER, S.P., PERL, E.R. (1994) Synaptic mediation from cutaneous mechanical nociceptors. *J Neurophysiol* **72**, 612-21.
- SCHROEDER, J.E., FISCHBACH, P.S., ZHENG, D., MCCLESKEY, E.W. (1991) Activation of mu opioid receptors inhibits transient high- and low-threshold Ca<sup>2+</sup> currents, but spares a sustained current. *Neuron* **6**, 13-20.
- SCHROEDER, J.E., MCCLESKEY, E.W. (1993) Inhibition of Ca<sup>2+</sup> currents by a mu-opioid in a defined subset of rat sensory neurons. *J Neurosci* **13**, 867-73.
- SHAQURA, M.A., ZOLLNER, C., MOUSA, S.A., STEIN, C., SCHAFER, M. (2004) Characterization of mu opioid receptor binding and G protein coupling in rat hypothalamus, spinal cord, and primary afferent neurons during inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther* **308**, 712-8.
- SOARES, A.C., LEITE, R., TATSUO, M.A., DUARTE, I.D. (2000) Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Eur J Pharmacol* **400**, 67-71.
- SOTSIOS, Y., WARD, S.G. (2000) Phosphoinositide 3-kinase: a key biochemical signal for cell migration in response to chemokines. *Immunol Rev* **177**, 217-35.

- SOUSA, A.M., PRADO, W.A. (2001) The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res* **897**, 9-19.
- STEFANO, G.B., HARTMAN, A., BILFINGER, T.V., MAGAZINE, H.I., LIU, Y., CASARES, F., GOLIGORSKY, M.S. (1995) Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. *J Biol Chem* **270**, 30290-3.
- STEIN, C. (2003) Opioid receptors on peripheral sensory neurons. *Adv Exp Med Biol* **521**, 69-76.
- STEIN, C., COMISEL, K., HAIMERL, E., YASSOURIDIS, A., LEHRBERGER, K., HERZ, A., PETER, K. (1991) Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. *N Engl J Med* **325**, 1123-6.
- STEIN, C., HASSAN, A.H., LEHRBERGER, K., GIEFING, J., YASSOURIDIS, A. (1993) Local analgesic effect of endogenous opioid peptides. *Lancet* **342**, 321-4.
- STEIN, C., MILLAN, M.J., SHIPPENBERG, T.S., HERZ, A. (1988) Peripheral effect of fentanyl upon nociception in inflamed tissue of the rat. *Neurosci Lett* **84**, 225-8.
- STEIN, C., MILLAN, M.J., SHIPPENBERG, T.S., PETER, K., HERZ, A. (1989) Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **248**, 1269-75.
- STEIN, C., SCHAFER, M., MACHELSKA, H. (2003) Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* **9**, 1003-8.
- STEPHENS, L., SMRCKA, A., COOKE, F.T., JACKSON, T.R., STERNWEIS, P.C., HAWKINS, P.T. (1994) A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell* **77**, 83-93.

- STEPHENS, L.R., EGUINO, A., ERDJUMENT-BROMAGE, H., LUI, M., COOKE, F., COADWELL, J., SMRCKA, A.S., THELEN, M., CADWALLADER, K., TEMPST, P., HAWKINS, P.T. (1997) The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* **89**, 105-14.
- SUN, R.Q., TU, Y.J., YAN, J.Y., WILLIS, W.D. (2006) Activation of protein kinase B/Akt signaling pathway contributes to mechanical hypersensitivity induced by capsaicin. *Pain* **120**, 86-96.
- SZALLASI, A., CORTRIGHT, D.N., BLUM, C.A., EID, S.R. (2007) The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 357-72.
- TAIWO, Y.O., BJERKNES, L.K., GOETZL, E.J., LEVINE, J.D. (1989) Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience* **32**, 577-80.
- TAIWO, Y.O., GOETZL, E.J., LEVINE, J.D. (1987) Hyperalgesia onset latency suggests a hierarchy of action. *Brain Res* **423**, 333-7.
- TAKEDA, M., TANIMOTO, T., IKEDA, M., KADOI, J., NASU, M., MATSUMOTO, S. (2004) Opioidergic modulation of excitability of rat trigeminal root ganglion neuron projections to the superficial layer of cervical dorsal horn. *Neuroscience* **125**, 995-1008.
- TAN, M., GROSZER, M., TAN, A.M., PANDYA, A., LIU, X., XIE, C.W. (2003) Phosphoinositide 3-kinase cascade facilitates mu-opioid desensitization in sensory neurons by altering G-protein-effector interactions. *J Neurosci* **23**, 10292-301.
- TEIXEIRA, J.T., OKADA, M.O. (2003). Dor – evolução histórica dos conhecimentos. DOR Contexto interdisciplinar, Maio editora, Curitiba, pp.15-51.

- TONUSSI, C.R., FERREIRA, S.H. (1994) Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol* **251**, 173-9.
- TRESCOT, A.M., DATTA, S., LEE, M., HANSEN, H. (2008) Opioid pharmacology. *Pain Physician* **11**, S133-53.
- VANHAESEBROECK, B., ALESSI, D.R. (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* **346 Pt 3**, 561-76.
- VANHAESEBROECK, B., LEEVERS, S.J., AHMADI, K., TIMMS, J., KATSO, R., DRISCOLL, P.C., WOSCHOLSKI, R., PARKER, P.J., WATERFIELD, M.D. (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* **70**, 535-602.
- VANHAESEBROECK, B., WATERFIELD, M.D. (1999) Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* **253**, 239-54.
- VERGE, V.M., RICHARDSON, P.M., WIESENFELD-HALLIN, Z., HOKFELT, T. (1995) Differential influence of nerve growth factor on neuropeptide expression in vivo: a novel role in peptide suppression in adult sensory neurons. *J Neurosci* **15**, 2081-96.
- VERRI, W.A., JR., CUNHA, T.M., PARADA, C.A., POOLE, S., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. (2006) Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* **112**, 116-38.
- VERRI, W.A., JR., SCHIVO, I.R., CUNHA, T.M., LIEW, F.Y., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. (2004) Interleukin-18 induces mechanical hypernociception in rats via endothelin acting on ETB receptors in a morphine-sensitive manner. *J Pharmacol Exp Ther* **310**, 710-7.
- VIVANCOS, G.G., PARADA, C.A., FERREIRA, S.H. (2003) Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues. *Br J Pharmacol* **138**, 1351-7.



- VIVANCOS, G.G., VERRI, W.A., JR., CUNHA, T.M., SCHIVO, I.R., PARADA, C.A., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. (2004) An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res* **37**, 391-9.
- WALDHOER, M., BARTLETT, S.E., WHISTLER, J.L. (2004) Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* **73**, 953-90.
- WALWYN, W.M., WEI, W., XIE, C.W., CHIU, K., KIEFFER, B.L., EVANS, C.J., MAIDMENT, N.T. (2006) Mu opioid receptor-effector coupling and trafficking in dorsal root ganglia neurons. *Neuroscience* **142**, 493-503.
- WENK, H.N., BREDERSON, J.D., HONDA, C.N. (2006) Morphine directly inhibits nociceptors in inflamed skin. *J Neurophysiol* **95**, 2083-97.
- WERZ, M.A., MACDONALD, R.L. (1983) Opioid peptides selective for mu- and delta-opiate receptors reduce calcium-dependent action potential duration by increasing potassium conductance. *Neurosci Lett* **42**, 173-8.
- WILSON, P., KITCHENER, P.D. (1996) Plasticity of cutaneous primary afferent projections to the spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* **48**, 105-29.
- WOOLF, C., WIESENFELD-HALLIN, Z. (1986) Substance P and calcitonin gene-related peptide synergistically modulate the gain of the nociceptive flexor withdrawal reflex in the rat. *Neurosci Lett* **66**, 226-30.
- WOOLF, C.J., SALTER, M.W. (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* **288**, 1765-9.
- WU, C., HUANG, J. (2007) Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway is essential for neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *J Biol Chem* **282**, 3571-83.

- WU, E.H., WONG, Y.H. (2005) Activation of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors induces phosphorylation of tuberin in transfected HEK 293 cells and native cells. *Biochem Biophys Res Commun* **334**, 838-44.
- WU, X., SENECHAL, K., NESHAT, M.S., WHANG, Y.E., SAWYERS, C.L. (1998) The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15587-91.
- WU, Z.Z., CHEN, S.R., PAN, H.L. (2004) Differential sensitivity of N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel currents to a mu opioid in isolectin B4-positive and -negative dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 939-47.
- WU, Z.Z., PAN, H.L. (2004) Tetrodotoxin-sensitive and -resistant Na<sup>+</sup> channel currents in subsets of small sensory neurons of rats. *Brain Res* **1029**, 251-8.
- YAKSH, T.L. (1978) Opiate receptors for behavioral analgesia resemble those related to the depression of spinal nociceptive neurons. *Science* **199**, 1231-3.
- YAKSH, T.L., RUDY, T.A. (1976) Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. *Science* **192**, 1357-8.
- YOSHIMURA, M., NORTH, R.A. (1983) Substantia gelatinosa neurones hyperpolarized in vitro by enkephalin. *Nature* **305**, 529-30.
- ZEILHOFER, H.U., ZEILHOFER, U.B. (2008) Spinal dis-inhibition in inflammatory pain. *Neurosci Lett* **437**, 170-4.
- ZHOU, Z., DAVAR, G., STRICHARTZ, G. (2002) Endothelin-1 (ET-1) selectively enhances the activation gating of slowly inactivating tetrodotoxin-resistant sodium currents in rat sensory neurons: a mechanism for the pain-inducing actions of ET-1. *J Neurosci* **22**, 6325-30.

ZHUANG, Z.Y., XU, H., CLAPHAM, D.E., JI, R.R. (2004) Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. *J Neurosci* **24**, 8300-9.

ZIMMERMANN, M. (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **16**, 109-10.

ZOLLNER, C., SHAQURA, M.A., BOPAIAH, C.P., MOUSA, S., STEIN, C., SCHAFFER, M. (2003) Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol Pharmacol* **64**, 202-10.

***ANEXOS***

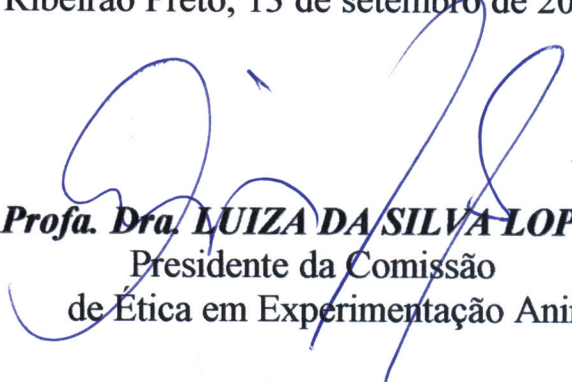


## CERTIFICADO

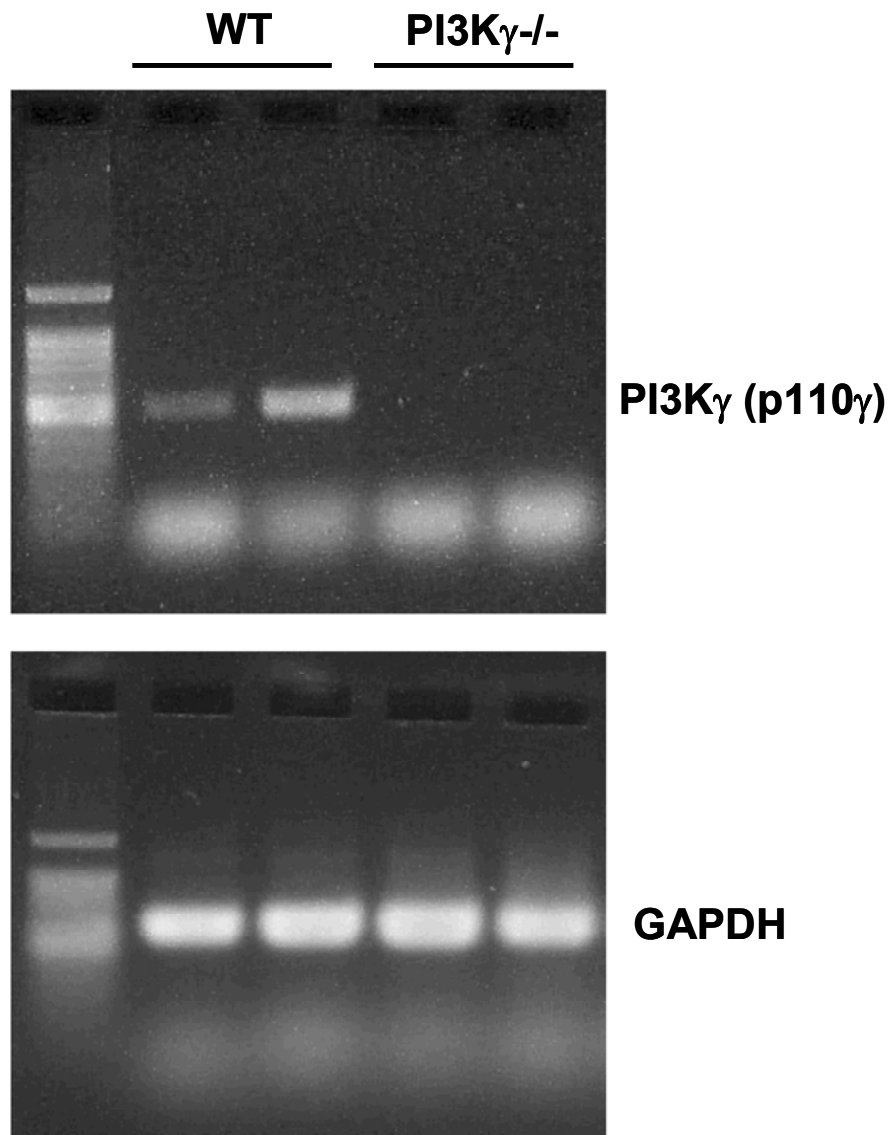
Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação n° 142/2005, sobre o projeto intitulado “*Participação da via de sinalização intracelular fosfatidilinositol-3-Quinase (PL<sub>3</sub>K)/Proteína Quinase B (AKT) no efeito antinociceptivo periférico dos opióides*”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **05 de setembro de 2005**.

(We certify that the protocol n° 142/2005, about “*Participation of the intracellular signaling pathway phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B on the peripheral antinociceptive effect of opioids*” agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in 09/05/2005 meeting).

Ribeirão Preto, 13 de setembro de 2005.

  
**Prof. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES**  
Presidente da Comissão  
de Ética em Experimentação Animal

**Anexo 1- Análise da expressão do RNAm para PI3K $\gamma$  no GRD de camundongos selvagens (WT) e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>.** RNAm total foi extraído do DRG de camundongos WT e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>. O mesmo foi então transcrito para cDNA como descrito em métodos e em seguida o cDNA foi amplificado utilizando primers específicos para p110 $\gamma$  e GAPDH. Amostras representativas de dois animais por grupo são apresentadas.



**The molecular mechanism of peripheral antinociceptive action of morphine: activation of PI3K $\gamma$ /AKT/nitric oxide/K<sub>ATP</sub> channels signaling pathway.**

Thiago M. Cunha<sup>1</sup>, Celina M. Lotufo<sup>1</sup>, Hugo L. Duarte<sup>2</sup>, Waldiceu A. Verri, Jr<sup>1</sup>, Mani I. Funez<sup>1</sup>, Guilherme R. Souza<sup>1</sup>, Andressa C. Domingues<sup>1</sup>, Daniela Sachs<sup>2</sup>, Silvana Chiavegatto<sup>3</sup>, Mauro M. Teixeira<sup>2</sup>, John S. Hothersall<sup>1</sup>, Jader S. Cruz<sup>2</sup>, Fernando Q. Cunha<sup>1</sup> & Sergio H. Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil. <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Science (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, 05508-900, São Paulo, SP - Brazil

Correspondence should be addressed to Sergio Henrique Ferreira

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP,

Avenida Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Fax: + 55 16 3633-0021, Tel: + 55 16 3602-3222

Email: shferrei@fmrp.usp.br

## SUMMARY

Morphine peripheral analgesia was discovered by its direct blockade of the rat paw sensitization either by inflammatory stimuli or PGE<sub>2</sub> administration. However, the molecular mechanism by which morphine initiate this effect is unknown. Here, we provided behavioural (in rats and mice), biochemical and electrophysiological evidences that peripheral opiate receptors activation by morphine in primary nociceptive neurons triggers a cascade of intracellular signalling events initiated by PI3K $\gamma$ /AKT which culminates in the stimulation of neuronal nitric oxide synthase/nitric oxide/K<sub>ATP</sub> channels pathway. These events are probably responsible for the restoration of membrane potential of nociceptive neurons. Thus, these results open new perspectives for understanding the molecular mechanism of old analgesic drugs as well as a target for new analgesics.



## INTRODUCTION

Inflammatory pain is primary due to sensitization of specific classes of primary nociceptive neurons by a direct action of inflammatory mediators such as eicosanoids (Ferreira et al., 1972). It was demonstrated that during the inflammatory process the release of the mediators that direct sensitize the nociceptive neurons are intermediated by the release of inflammatory cytokines (Verri et al., 2006). Consequently, peripheral control of this symptom is mainly based on two types of pharmacological strategies: prevention and direct blockade of nociceptor sensitization. Prevention is accomplished by inhibiting the production and/or action of hypernociceptive mediators like cytokines or prostaglandins as it is the case of glucocorticoids and aspirin-like drugs (NSAIDS), respectively (Ferreira et al., 1972). These effects ultimately prevent the development of hyperalgesia in humans or hypernociception in animals (decrease in nociceptive threshold). In contrast with this class of drugs, some peripheral analgesics such as morphine and dipyrone (metamizol), are able to directly block ongoing nociceptor sensitization, since these drugs reverse already established hypernociception induced by prostaglandin E<sub>2</sub>-(PGE<sub>2</sub>) or by inflammatory agents injected in rat hind paws (Ferreira et al., 1979a; Lorenzetti and Ferreira, 1985).

Together with the pioneer discovery of the peripheral antinociceptive effect of opioids, it was also proposed that cAMP is a crucial intracellular second messenger involved in nociceptor sensitization and consequently in inflammatory hypernociception (Ferreira et al., 1979a,b). Taking these results together with evidences that opioid receptor activation, by morphine for example, were coupled with adenylyl cyclase inhibition (Collier and Roy, 1974; Goldstein et al., 1977) it was suggested that morphine counteracted hypernociception directly through inhibition of PGE<sub>2</sub>-induced adenylyl cyclase activation. However, it is striking that in the rat, two to three hours after intraplantar injection of PGE<sub>2</sub>, when hypernociception reaches the plateau and the adenilate cyclase activity seems to be irrelevant for the maintenance of the

process, morphine display full peripheral activity (Ferreira et al., 1979a). Furthermore, in a model of persistent hypernociception induced in rat paw, in which adenilate cyclase activity seems not to be responsible for the maintenance of the process, morphine injected locally is still an effective antinociceptive drug (Sachs et al., 2004). Furthermore, the reasons why blockage of adenilate cyclase is still assumed as the mechanism for peripheric action of morphine is supported only by indirect evidences, including that adenilate cyclase is inhibited by morphine in cell cultures and the fact that this enzyme plays a key role in the induction of inflammatory hypernociception (Vetter et al., 2006; Levine and Taiwo, 1989; Endres-Becker et al., 2007).

Following experimental evidences that in several biological systems guanosine cGMP has the opposite effect of cAMP (Goldberg, et al., 1975), it was also observed that dibutyryl-cGMP is able to counteract ongoing PGE<sub>2</sub> hypernociception (Ferreira et al., 1979b). Taking into account findings showing that nitric oxide stimulates the soluble guanilate cyclase (Palmer et al., 1987; Knowles et al., 1989) it was demonstrated that the peripheral antinociceptive effect of morphine was due to stimulation of nitric oxide/cGMP pathway (Ferreira et al., 1991). Recently, a couple of studies demonstrated that this pathway probably culminates with the modulation of K<sub>ATP</sub> potassium channels (Rodrigues and Duarte, 2000; Soares et al., 2000; Sachs et al., 2004). These suggestions are based in the following observation: the antinociception achieved with peripheral administration of opioids was inhibited by nitric oxide synthase and guanilate cyclase inhibitors as well as K<sub>ATP</sub> potassium channels blockers (Ferreira et al., 1991; Rodrigues and Duarte, 2000; Soares et al., 2000; Sachs et al., 2004). In addition, the direct blockade of ongoing mechanical hypernociception has been observed by administration of dibutyryl cGMP or substances that stimulate neuronal soluble guanylate cyclase such as the NO donors, SNAP and sodium nitroprusside as well as by K<sub>ATP</sub> channels openers (Ferreira et al., 19979a; Ferreira et al., 1991; Sachs et al., 2004). Thus, this type of peripheral analgesics seems to act by restoring the membrane potential of primary nociceptive

neurons through increasing  $K^+$  permeability. Nevertheless, the missing link in this cascade of events is the understanding of how activation of peripheral opioid receptors could stimulate NO/cGMP/PKG/ $K_{ATP}$  channels pathway.

Besides the well known activation of nitric oxide synthases by calcium/calmodulin, other mechanisms have been proposed in the last decade. One of these mechanisms involves the phosphorylation of these enzymes by the PI3K/AKT signaling pathway (Fulton et al., 1999; Dimmeler et al., 1999). Among the PI3K enzymes family, PI3K $\gamma$  is activated by  $\beta\gamma$  subunits of Gi-protein coupled receptors (Stephens et al., 1994). Considering these information, the present study was performed to test whether PI3K $\gamma$ /AKT signaling is the initial step involved in the stimulation of the NO/cGMP/PKG/ $K_{ATP}$  channels pathway responsible for the peripheral antinociceptive effect of morphine.

## RESULTS

### **Expression of PI3K $\gamma$ in small size dorsal root ganglion (DRG) neurons of rats**

Our main hypothesis implies that primary sensory neurons express PI3K $\gamma$ . Confocal immunofluorescence analyses of rat DRG shows that PI3K $\gamma$  is expressed in small size cell diameter ( $< 30 \mu\text{m}$ ), presumably nociceptive neurons. Actually, confocal analysis of dual immunofluorescence experiments revealed that more than 95% ( $95 \pm 1\%$ ;  $n=6$  fields from 3 different DRGs) of PI3K $\gamma$ -expressing neurons are isolectin-B4 (IB4)-labeled non-peptidergic nociceptors (Fig. 1), and they are also TRPV1-expressing cells ( $68 \pm 3\%$ ; Fig. 1). On the other hand, only 10% ( $9 \pm 1.5\%$ ) of PI3K $\gamma$ -expressing neurons are substance P-expressing peptidergic nociceptors (Fig. 1) and none are large-diameter neurons, which are neurofilament 200 (NF200) immunoreactive (Fig.1). Taken together, these results show that PI3K $\gamma$  is constitutively expressed in a significant proportion of nociceptive neurons.

### **Requirement of PI3K $\gamma$ for peripheral antinociceptive action of morphine in rats**

Inflammatory hypernociception is a consequence of primary sensory neurons sensitization, which can be mimicked by PGE<sub>2</sub> administration in the rat and mice paws (Ferreira et al., 1978). Using the PGE<sub>2</sub> hypernociception model it was possible to analyze several steps in the direct blockade of ongoing nociceptor sensitization by peripheric analgesic drugs (Ferreira et al., 1991; Rodrigues and Duarte, 2000). Therefore, in the present study, the PGE<sub>2</sub> hypernociception model was used instead of inflammatory models (inflammation-induced hypernociception) to ensure that the mechanisms evaluated are restricted to primary nociceptive neurons avoiding the influence of other inflammatory events.

In the first series of experiments, participation of PI3K $\gamma$  in the blockade of PGE<sub>2</sub>-induced hypernociception by peripheral administration of morphine was tested using two non-selective inhibitors of PI3K (wortmannin and LY294002). Local pretreatment of the rat paw with wortmannin or LY294002, inhibited in a dose-dependent manner peripheral morphine antinociceptive effect (Fig. 2a,b). Furthermore, the PI3K gamma ( $\gamma$ ) isoform seems to be responsible for morphine effect since local treatment of rats with a selective inhibitor of PI3K $\gamma$  (AS605240; Camps et al., 2005), inhibited in a dose-dependent manner the antinociceptive effect of morphine (Fig. 2c). The injection of these inhibitors alone in the rat paw did not alter nociceptive baseline (Fig. 2a-c, last bars).

#### **Peripheral administration of morphine has no antinociceptive effect in PI3K null mice**

To further address the contribution of PI3K $\gamma$  for the peripheral antinociceptive action of morphine we analyzed its effect on PI3K $\gamma$  null mice. Firstly, we demonstrated that plantar administration of morphine in WT mice reduced PGE<sub>2</sub>-induced hypernociception in a dose-dependent manner (Fig. 3a;  $P < 0.01$ ). In the following experiments, the chosen dose of morphine was 10  $\mu\text{g}/\text{paw}$ , because it did not present systemic effect as did the dose of 30  $\mu\text{g}/\text{paw}$  as demonstrated by its ineffectiveness upon PGE<sub>2</sub>-induced hypernociception when administrated in the contralateral paw (Fig. 3b;  $P < 0.05$ ). On the other hand, the morphine dose of 30  $\mu\text{g}/\text{paw}$  inhibited PGE<sub>2</sub>-induced hypernociception even when administrated in the contralateral paw, suggesting systemic effect (Fig. 3b;  $P < 0.05$ ).

After these experiments we tested the effect of morphine in PI3K null mice. To confirm the lack of PI3K $\gamma$  expression in our PI3K $\gamma$  null mice, RT-PCR was performed using mRNA samples extracted from DRG neurons as well as whole blood. Indeed, the PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice did not express mRNA for p100 $\gamma$  catalytic subunit of PI3K $\gamma$  in DRG cells (supplementary Fig. 1) as well as in whole blood (data not show) while it was detected in samples form wild type

mice. In PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice, in which the baseline for mechanical (electronic paw pressure test) and thermal (hot plate test) nociceptive test did not differ from wild type mice (data not shown), the mechanical hypernociception induced by PGE<sub>2</sub> was similar to wild type mice (Fig. 3f). However, morphine did not present antinociceptive effect in this PI3K $\gamma$  null mice (Fig. 3f), thus further supporting the importance of PI3K $\gamma$  for the peripheral antinociceptive action of morphine.

### **AKT, a PI3K $\gamma$ downstream signaling kinase, is involved in peripheral antinociceptive effect of morphine**

Several PI3K $\gamma$  downstream signaling effects are mediated by the kinase AKT, which is also called PKB (Coffer and Woodgett, 1998). Therefore, in the next step we investigated whether AKT is involved in the peripheral effect of morphine. Local pretreatment with a selective AKT inhibitor (AKT inhibitor IV; Wu and Huang, 2007) reverted in a dose-dependent manner the antinociceptive effect of morphine (Fig. 4a). AKT inhibitor at dose that inhibited morphine effect did not alter the nociceptive baseline when injected alone in the rat paw (Fig. 4a, last bar).

Corroborating with this *in vivo* observation, the incubation of DRG culture neurons with morphine induced a rapid and transient activation of AKT, revealed by the increase in its phosphorylated form (Fig. 4b). This effect was opioid receptor dependent since it was blocked by naloxone (Fig. 4c). Furthermore, the activation of AKT in primary sensory neurons by morphine seems to be also dependent on PI3K $\gamma$  as it was prevented by treatment of the cells with wortmannin and AS605240, non-selective and selective PI3K $\gamma$  inhibitors, respectively (Fig. 4d). In addition, it was also found that AKT activation by morphine is drastically reduced in cultured DRG neurons of PI3K $\gamma$  null mice (Fig. 4e).

**Morphine activates neuronal nitric oxide synthase/nitric oxide antinociceptive pathway via PI3K $\gamma$ /AKT.**

After finding evidences that PI3K $\gamma$ /AKT pathway is involved in the peripheral antinociceptive effect of morphine, we tested whether PI3K $\gamma$ /AKT is responsible for the activation of nitric oxide antinociceptive pathway. As previously showed in rats (Ferreira et al., 1991), peripheral antinociceptive effect of morphine in mice, was also dependent on nitric oxide, since its effect was prevented by treatment with L-NMMA (non-selective nitric oxide synthase inhibitor; Fig. 5a;  $P < 0.001$ ). Furthermore, a strong support for the contribution of nitric oxide pathway in the morphine peripheral antinociception was given by the absence of morphine effect in neuronal nitric oxide synthase null mice (Fig. 5b  $P < 0.01$ ). In line with the hypothesis of an antinociceptive role of nitric oxide in the periphery, SNAP (a nitric oxide donor), injected locally in the mice paw, is an effective inhibitor of PGE<sub>2</sub>-induced hypernociception in mice. (Fig. 5c).

In attempt to investigate whether PI3K $\gamma$ /AKT signaling pathway mediates the activation of nitric oxide synthase/nitric oxide pathway by morphine, it was analyzed the production of nitric oxide by DRG neurons using a fluorescent indicator of nitric oxide (DAF; Kojima et al., 1998). It was observed that *ex vivo* incubation of DRG neurons with morphine induced an increase in the number of neurons positive for nitric oxide production (Fig. 5d,e). The increase in nitric oxide production was observed mainly in DRG neurons of small size (Fig. 5d). Moreover, morphine induced increase in nitric oxide production by DRG neurons was blocked by incubating cells with L-NMMA, a selective PI3K $\gamma$  inhibitor (AS605240), and by an AKT inhibitor (Fig. 5d,e). The fact that L-NMMA treatment reduced the number of positive neurons also suggests that the fluorescent signal actually represent nitric oxide production (Fig. 5d,e). These results strongly suggest that morphine induces neuronal nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in DRG neurons by a mechanism dependent on

PI3K/AKT signaling pathway. Corroborating the assumption that PI3K $\gamma$  activation is an upstream event in nitric oxide pathway responsible for peripheral antinociceptive action of morphine, the intraplantar injection of SNAP (nitric oxide donor) induced antinociceptive effect on PI3K $\gamma$  null mice as well as in wild-type mice (Fig. 5 P< 0.01).

### **Morphine up-regulates K<sub>ATP</sub> channels in primary nociceptive neurons: role of PI3K $\gamma$ /AKT/NO signaling pathway**

To strengthen the hypothesis that activation of PI3K $\gamma$ /AKT/nitric oxide signaling pathway by morphine result in the up-regulation of K<sub>ATP</sub> channels we performed a patch-clamp recording of primary nociceptive neurons. Fig. 6a,b shows an representative example of patch-clamp current and analyses of K<sup>+</sup> current in small diameter neurons (< 25 $\mu$ m) revealing that there is a population of these neurons ( $\cong$ 40%) in which morphine induced an increase (almost 20% of increase) in total K<sup>+</sup> current (Fig. 6a,b). All neurons in which morphine increase K<sup>+</sup> conductance were responsive to capsaicin (data not shown). Moreover, this increase in K<sup>+</sup> conductance was selectively prevented by glibenclamide, suggesting that it might be due to modulation of K<sub>ATP</sub> channels (Fig. 6a,b). Furthermore, the increase in activation of K<sub>ATP</sub> channels induced by morphine was also prevented by treating cells with naloxone (Fig. 6c), L-NMMA (Fig. 6d) as well as with selective inhibitors of PI3K $\gamma$  (Fig. 6d) and AKT (Fig. 6d). It is noteworthy that in these conditions those inhibitors alone did not alter the K<sup>+</sup> conductance.

### **PI3K $\gamma$ /AKT pathway mediates antinociception produced by peripheral activation of $\mu$ -opioid receptors**



There is evidence in the literature showing that peripheral antinociceptive action of morphine depends on  $\mu$ -opioid receptor activation (Stein et al., 1989; Han et al., 2008). Therefore, in the present investigation it was also tested whether a selective agonist of  $\mu$ -opioid receptors produces peripheral antinociceptive activity through stimulation of PI3K $\gamma$ /AKT signaling pathway. As observed for PI3K $\gamma$ , rat DRG neurons that express  $\mu$ -opioid receptors are also positive for TRPV1 ( $65 \pm 2,5\%$ ; Fig. 7a) and are IB<sub>4</sub>-labeled neurons ( $46 \pm 1\%$ ; Fig. 7a). The peripheral antinociceptive effect of DAMGO (selective  $\mu$ -opioid receptor agonist) in rats was also prevented by treatment with wortmannin, AS605240 (PI3K $\gamma$  selective inhibitor) as well as a selective AKT inhibitor (Fig. 4b). It is noteworthy that this dose of DAMGO produced only a local antinociception in rats without any systemic effect (data not shown).

The mechanism involved in the peripheral antinociception produced by DAMGO was also evaluated in mice. Firstly, it was observed that, as in rats, DAMGO produced a dose-dependent antinociceptive effect in mice when administrated locally (paw; supplementary Fig. 2a). The dose of 3  $\mu$ g per paw of DAMGO also produced a systemic effect (supplementary Fig. 2b). Therefore, we decided to use the dose of 1  $\mu$ g per paw for further experiments. In accordance with the results obtained in rats, the peripheral antinociceptive effect of DAMGO was not observed in PI3K $\gamma$  null mice (Fig. 7c). Furthermore, incubation of DRG cultured neurons with DAMGO induced an increase in the activation of AKT, which was prevented by naloxone and by a selective inhibitor of PI3K $\gamma$  (Fig. 7d  $P < \dots$ ).

## **DISCUSSION**

Although opioid receptors are constitutively expressed in primary nociceptive neurons, cutaneous administration of opioid agonists, for instance in rat paw, did not produce effect on behavioral nociceptive threshold in normal animals (Stein et al., 1989). Conversely, there are

a great number of evidences suggesting that during an inflammatory process, peripheral administration of opioids brings back the reduced nociceptive threshold to control levels (Ferreira et al., 1979; Levine and Taiwo, 1989; Stein et al., 1989). This selective effect of opioids has been attributed to an increase in opioid receptor expression in primary sensory neurons during inflammation (Hassan et al., 1993; Stein, 2003). However, considering the time necessary for changing protein synthesis in DRG and subsequent axonal transportation to peripheral axonal terminals, it is reasonable to assume that the direct effect of morphine on ongoing PGE<sub>2</sub>-induced hypernociception results from other local peripheral mechanisms. One possible explanation for these findings is that morphine activates peripheral opioid receptors present mainly in mechanical high-threshold nociceptive neurons, which are not important for mechanical baseline threshold but that are sensitized during inflammation (ie. by PGE<sub>2</sub>) and accounts for the increase in the nociception. This suggestion is reinforced by recent findings of Wenk et al., 2005, which provided electrophysiological (in single fiber recording) evidence that peripheral opioid receptor activation by morphine decreased the excitability of cutaneous nociceptors innervating inflamed tissues but not those from normal tissues. Furthermore, authors suggested that the receptors activated by morphine may reside on mechanical high-threshold nociceptors, and sensitization of these afferent fibers may underlie the increased efficacy of morphine observed under inflammatory conditions (Wenk et al., 2005).

In the present study it is presented an extensive analysis of the molecular mechanism involved in this peripheral effect of morphine. Based on behavioural (in rats and mice), biochemical and electrophysiological evidences we are proposing that activation of peripheral opiate receptors by morphine in primary nociceptive neurons triggers a cascade of intracellular signalling events initiated by PI3K $\gamma$ /AKT which culminates in the stimulation of neuronal nitric oxide synthase/nitric oxide/K<sub>ATP</sub> channels pathway. These events take place mainly in non-peptidergic TRPV1-positive neurons and are responsible for the restoration of the

activation threshold of nociceptive neurons which was reduced by the action of inflammatory mediators.

The first evidence supporting this hypothesis is related with PI3K $\gamma$  expression. Immunostaining of rat DRGs sections revealed that PI3K $\gamma$  is constitutively and selectively expressed by a large percentage of non-peptidergic neurons which also express TRPV1. Although, PI3K $\gamma$  mRNA has been previously detected in rat DRG (Bartlett et al., 1999), this is the first demonstration that PI3K $\gamma$  is selectively expressed by nociceptive neurons at protein level. In functional terms, the selective expression PI3K $\gamma$  in IB4-labeled neurons is in line with the evidence that this class of nociceptors is sensitized during inflammatory process and can be modulated by morphine (Breese et al., 2005; Hucho et al., 2005). Moreover, the PI3K $\gamma$  expression in TRPV1 corroborates with the idea that capsaicin-sensitive neurons mediate increased morphine antinociception during rat paw inflammation and also that activation of opioid receptor inhibits TRPV1-mediated total currents in a high number of primary nociceptive neurons (Bartho et al., 1990; Endres-Becker et al., 2007). Further supporting our hypothesis it was shown that both pharmacological and genetic inhibition of PI3K $\gamma$  prevent the antinociception produced by peripheral morphine in rats and mice. Therefore, our data indicate that PI3K $\gamma$  expressed by nociceptors accounts for the antinociception produced by morphine through a peripheral action.

The role of PI3K $\gamma$  on the peripheral antinociceptive effect of morphine occurs probably via activation of AKT. Indeed, AKT is the main downstream signaling activated by PI3K $\gamma$  (Coffer, et al., 1998). In agreement, selective pharmacological inhibition of AKT also prevented the peripheral effect of morphine. Furthermore, morphine was able to induce activation of AKT in cultures of nociceptive neurons from rats and mice via PI3K $\gamma$  activation. Although the present results clearly demonstrated an antinociceptive role for the PI3K $\gamma$ /AKT signaling pathway, there is also data suggesting a pro-nociceptive action for this intracellular

pathway (Zhuang et al., 2004; Sun et al., 2006). For instance, thermal and mechanical hypernociception induced by NGF and capsaicin seems to be dependent on this pathway (Zhuang et al., 2004; Sun et al., 2006). These discrepancies probably are due to different PI3K isoforms involved in each model. It is likely that, NGF activates a tyrosine kinase receptor, which is probably coupled to a PI3K different of  $\gamma$  isoform.

While studying the contribution of PI3K $\gamma$ /AKT signaling pathway as a molecular mechanism for the peripheral antinociceptive action of morphine, this study also addressed a number of other important remained questions about this effect. It was presented a conclusive demonstration for the role of nitric oxide as an analgesic mediator in the periphery, at least in the subcutaneous tissue. Firstly, it was described the absence of morphine antinociceptive effect on neuronal nitric oxide synthase null mice and secondly was made the first direct biochemical demonstration that morphine induces nitric oxide production in primary nociceptive neurons (DRG). Third, it was also demonstrated that activation of neuronal nitric oxide synthase/nitric oxide antinociceptive pathway is extensively dependent on the initial stimulation of PI3K $\gamma$ /AKT. It is noteworthy that the role of nitric oxide in the nociceptive system is very controversial. Actually, depending on the nociceptive system level and the amount of nitric oxide, it could have antinociceptive as wells as pro-nociceptive. For instance, in the spinal cord, low and high concentrations of nitric oxide cause antinociception and nociception, respectively (Sousa and Prado, 2001). Furthermore, even in the periphery (in the rat paw), the stimulation of the nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in the epidermis and dermis causes mechanical hyper and antinociception respectively (Aley et al., 1998; Vivancos et al., 2003). One simple explanation for this last contradiction may lay in the differential effect that NO has in the intradermal and subcutaneous nociceptors. The differences between the intradermal and subcutaneous nociceptors could result from the fact that both tissues are predominantly innervated by different subsets of primary nociceptive neurons.

The  $K_{ATP}$  channels have been described to be the key channel modulated by morphine during its peripheral (Rodrigues and Duarte, 2000) and central antinociceptive effect (Ocana et al., 1990). In the periphery, but not in central nervous system, morphine stimulation of  $K_{ATP}$  channels has been attributed to activation of the nitric oxide synthase/nitric oxide/cGMP pathway (Soares et al., 2000). Corroborating these behavioral evidences, it was shown that DRG neurons express all subunits of  $K_{ATP}$  (Chi et al., 2007). Moreover, using patch-clamp electrophysiological recordings, it was also demonstrated by the same authors that activation of these channels by cGMP can reverse the sensitization of primary nociceptive neurons caused by  $PGE_2$  and that this effect is associated with a hyperpolarization of resting membrane potential (Chi et al., 2007). Herein, the analyses of  $K^+$  currents using whole cell patch-clamp, it was observed that morphine up-regulates  $K_{ATP}$  channels in capsaicin sensitive primary nociceptive neurons, through the  $PI3K\gamma/AKT/nitric\ oxide$  pathway. The up-regulation of  $K_{ATP}$  channels might contribute to membrane hyperpolarization which could reduce the neuronal excitability. In agreement with this suggestion the incubation of primary nociceptive neurons from rat trigeminal ganglion with opioids also produced a hyperpolarization of resting membrane potential (Takeda et al., 2004). Therefore, these evidences together suggest that morphine, through  $PI3K\gamma/AKT/nitric\ oxide/K_{ATP}$  channels activation, block ongoing  $PGE_2$  hypernociception directly by restore the membrane potential of nociceptive neurons that was altered by this inflammatory mediator.

In summary, our results showed that the direct blockade of ongoing inflammatory hypernociception by morphine acting on peripheral nociceptive system depends on initial activation of  $PI3K\gamma/AKT$  signaling pathway, which is ultimately responsible for the stimulation of neuronal nitric oxide synthase/nitric oxide/cGMP/ $PKG/K_{ATP}$  channels pathway. Thus, this study presents a better understanding of the molecular mechanism of peripheral antinociceptive action of morphine and strengthens this site of action for the development of new peripheral analgesic drugs.

## Legends

**Figure 1- Expression of PI3K $\gamma$  in rat primary nociceptive neurons.** Confocal images of typical examples of anti-PI3K $\gamma$  immunoreactivity in subpopulations of DRG neurons from rats labeled using binding to IB4 or using antibodies to TRPV1, substance P (SP) and neurofilament (NF) 200. Scale bars, 50  $\mu$ m.

**Figure 2- Role of PI3K $\gamma$  in peripheral antinociceptive action of morphine in rats. (a-d)** Mechanical hypernociception in rats was induced by ipl. injection of PGE<sub>2</sub> (100 ng/paw). The antinociceptive effect of local injection of morphine (6  $\mu$ g/paw, 2 h after PGE<sub>2</sub> injection) upon PGE<sub>2</sub>-induced hypernociception was prevented by treatment of rat paw with non-selective inhibitors of PI3Ks (30 min before morphine injection), **(a)** wortmannin (1-10  $\mu$ g/paw; n=6 for each dose,  $P < 0.0001$ ) and **(b)** LY294002 (3-30  $\mu$ g/paw; n=6 for each dose  $P < 0.0001$ ) or selective inhibition of PI3K $\gamma$  by **(c)** AS605240 (10-90  $\mu$ g/paw; n=6 or 7 for each dose,  $P < 0.0001$ ) \* statistically different compared with vehicle treatment ( $P < 0.0001$  Two-way ANOVA). # statistically different compared with morphine treatment.

**Figure 3- Peripheral antinociceptive action of morphine in mice: role of PI3K $\gamma$ .** Mechanical hypernociception was induced by the injection of PGE<sub>2</sub> (30 ng/paw) in the mice paw. After 30 min morphine (indicated arrow) was injected in the **(a)** ipsilateral (1-30  $\mu$ g/paw; n=6 for each dose, P) or **(b)** contralateral paws (10-30  $\mu$ g/paw; n=6 for each dose, P) **(c)** Morphine (10  $\mu$ g/paw) peripheral effect was also tested in PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice (n=6) \* statistically different compared with vehicle treatment (Two-way ANOVA). # statistically different compared with morphine treatment. \*\* statistically different compared with PI3K<sup>-/-</sup> group treated with morphine.

**Figure 4 – Participation of AKT in peripheral antinociceptive effect of morphine (a)** The antinociceptive effect of morphine upon PGE<sub>2</sub>-induced hypernociception was prevented by

the treatment of rat paw with AKT selective inhibitor IV (AKTi) (n=10) **(b)** *In vitro* stimulation of DRG primary culture neurons from rats with morphine (10  $\mu$ M) increase the phosphorylation of AKT analyzed by western blot **(c)** Naloxone (NLX-1  $\mu$ M) pre-incubation (10 min before) prevented AKT phosphorylation induced by morphine. **(d)** Pre-incubation with wortmannin (100 nM) and AS605240 (100 nM) also reduced morphine-induced AKT phosphorylation. **(e)** Incubation of morphine in DRG culture neurons from wild type (WT) mice also increase AKT phosphorylation which is not observed in neurons from PI3K<sup>-/-</sup> mice. \* statistically different compared with vehicle treatment (P<0.0001 Two-way ANOVA). # statistically different compared with morphine treatment.

**Figure 5- Morphine activates neuronal nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in primary nociceptive neurons: role of PI3K $\gamma$ /AKT signaling pathway.** **(a)** Mechanical hypernociception was induced by the injection of PGE<sub>2</sub> (30 ng/paw) in the mice paw. After 30 min morphine was injected. At the same time of morphine treatment different groups of animals were treated with of L-NMMA (3-30 mg/kg s.c; n=6 for each dose, P) **(b)** Morphine (10  $\mu$ g/paw) was also administrated in neuronal nitric oxide synthase deficient mice (nNOS<sup>-/-</sup>). Hypernociception was evaluated 1h after morphine injection using the electronic von Frey test (n=6; P) **(c)** Effect of a paw administration of nitric oxide donor (SNAP, 30 min after PGE<sub>2</sub> injection) upon PGE<sub>2</sub>-induced hypernociception. Hypernociception was evaluated 30 min after SNAP injection (n=6, P). **(d)** Representative images of DRG slices after *ex vivo* incubation with morphine (10  $\mu$ M) in the presence or absence of L-NMMA (10  $\mu$ M); AS605240 (PI3K $\gamma$ i, 100 nM) and AKT inhibitor (100 nM). DAF-FM fluorescence (green) indicates nitric oxide production **(e)** Quantitative analysis of percentage of DRG neurons that increased their DAF-FM fluorescence intensity. **(f)** Antinociceptive effect of paw administration of nitric oxide donor (SNAP, 3 $\mu$ g/paw) on PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice (n=5) is not different from wild type mice (n=5; P=0.104). SNAP was administrated 30 min after PGE<sub>2</sub> injection

and hypernociception was determined 1 h after PGE<sub>2</sub> injection. \* statistically different compared with vehicle treatment (P<0.0001). # statistically different compared with morphine treatment.

**Figure 6- Effect of morphine on K<sub>ATP</sub> channels currents in primary nociceptive neurons: role of nitric oxide/PI3K $\gamma$ /AKT pathway. (a,b)** Under voltage clamp condition incubation of DRG neurons with morphine (10  $\mu$ M) elicited sustained increases in total K<sup>+</sup> current which is not observed in the presence of glibenclamide (10  $\mu$ M) (c,d). The effect of morphine was not observed when the cells were incubated in the presence of naloxone (1  $\mu$ M), L-NMMA (10  $\mu$ M), PI3K $\gamma$  selective inhibitor (AS605240; 100 nM) and AKT inhibitor (100 nM). \* statistically different compared with vehicle treatment (P<0.0001 Two-way ANOVA). # statistically different compared with morphine treatment.

**Figure 7- Participation of PI3K $\gamma$ /AKT pathway on the antinociceptive effect produced by a selective  $\mu$  opioid receptor agonist. (a)** Confocal images of anti- $\mu$  opioid receptor immunoreactivity in subpopulations of DRG neurons from rats labeled using binding to IB4 or using antibodies to TRPV1. **(b)** Mechanical hypernociception in rats was induced by ipl. injection of PGE<sub>2</sub>, the antinociception of DAMGO upon PGE<sub>2</sub>-induced hypernociception was prevented by treatment of rat paw with non-selective inhibitor of PI3K, wortmannin (3 $\mu$ g/paw; n=6, P= ), selective inhibition of PI3K $\gamma$  (AS605240; 30  $\mu$ g/paw, n=6) or by selective inhibitor of AKT (AKTi, 10  $\mu$ g/paw, n=6) **(c)** Lack of peripheral antinociceptive effect of DAMGO in PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice (n=6) compared with wild type mice (n=6) (P<0.0001 Two-way ANOVA). **(d)** Western blot analyses of phosphorylated-AKT 5 min after DAMGO (1  $\mu$ M) incubation. \* statistically different compared with vehicle treatment (P<0.0001 Two-way ANOVA). # statistically different compared with morphine treatment.

**Supplementary figure 1- mRNA expression of PI3K $\gamma$  (p110 $\gamma$  catalytic subunit) in the DRG neurons of wild type and PI3K $\gamma$  null mice.** DRGs (6 from each mice; L4, L5 and L7



both sides) from wild type and PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice were removed and the mRNA were extracted. After the reverse transcriptase reaction the cDNA was amplified as described in the method section.

**Supplementary figure 2- Peripheric activation of  $\mu$ -opioid receptor produced antinociception in mice: role of nitric oxide** (a) Mechanical hypernociception was induced by the injection of PGE<sub>2</sub> (30 ng/paw) in the mice paw. After 30 min DAMGO (0.1-3  $\mu$ g/paw; indicated arrow) was injected in the (a) ipsilateral or (b) contralateral paws (c) One group of animals was treated with L-NMMA (30 mg/kg s.c) at the same time of DAMGO treatment. Hypernociception was evaluated at indicated time after PGE<sub>2</sub> injection using the electronic von Frey test \* statistically different compared with vehicle treatment (P<0.0001 Two-way ANOVA). # statistically different compared with morphine treatment

## METHODS

### *Animals*

The experiments were performed in Wistar male rats (180-200g), C57BL/6 male (20-30g), PI3K $\gamma$  deficient mice (PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>) and neuronal nitric oxide synthase deficient mice housed in the animal care facility of the School of Medicine of Ribeirão Preto-University of Sao Paulo. Animals were taken to the testing room at least 1 h before experiments and were used only once. Food and water were available *ad libitum*. Animal care and handling procedures were in accordance with the International Association for the Study of Pain guidelines (Zimmerman, 1983) on the use of animals in pain research and they were approved by the Committee for Ethics in Animal Research of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto-USP.

***Mechanical hypernociceptive tests.***

The term hypernociception rather than hyperalgesia or allodynia is used to define the decrease of nociceptive withdrawal threshold. It was assessed using two different methods: the constant pressure rat paw and the electronic pressure-meter tests for mice. A different investigator performed each test, as was the solution preparation and the subcutaneous injections in the hind paw of rats and mice. Multiple paw treatments with saline did not alter basal reaction time, which was similar to that observed in non-injected paws.

***The constant pressure rat paw test.***

Mechanical hyperalgesia was tested in rats as previously described (Ferreira et al., 1978). In this method, a constant pressure of 20 mmHg (measured using a sphygmomanometer) is applied (via a syringe piston moved by compressed air) to a 15-mm<sup>2</sup> area on the dorsal surface of the hindpaw, and discontinued when the rat presents a typical “freezing reaction”. This reaction is comprised of brief apnea, concomitant with retraction of the head and forepaws and reduction in the escape movements that animals normally make to free themselves from the position imposed by the experimental situation. Usually, the apnea is associated with successive waves of muscular tremor. For each animal, the latency to the onset of the “freezing reaction” is measured before administration (zero time) and at different times after administration of the hyperalgesic agents. The intensity of mechanical hyperalgesia is quantified as the reduction in the reaction time, calculated by subtracting the value of the second measurement from the first. Reaction time was  $31.9 \pm 0.2$  s (mean  $\pm$  s.e.m.; n = 36) before injection of the hyperalgesic agents.

### **The Electronic pressure-meter test**

Mechanical hypernociception was tested in mice as previously reported (Cunha et al., 2004). In a quiet room, mice were placed in acrylic cages (12×10×17cm) with wire grid floors, 15-30 min before the start of testing. The test consisted of evoking a hindpaw flexion reflex with a hand-held force transducer (electronic anesthesiometer; IITC Life Science, Woodland Hills, CA) adapted with a 0.5-mm<sup>2</sup> polypropylene tip. The investigator was trained to apply the tip perpendicularly to the central area of the hindpaw with a gradual increase in pressure. The end point was characterized by the removal of the paw followed by clear flinching movements. After the paw withdrawal the intensity of the pressure was automatically recorded, and the final value for the response was obtained by averaging three measurements. The animals were tested before and after treatments. The results are expressed by the delta ( $\Delta$ ) withdrawal threshold (in g) calculated by subtracting the zero-time mean measurements from the time interval mean measurements. Withdrawal threshold was  $9.1 \pm 0.2$  g (mean  $\pm$  SEM.; n=30) before injection of the hypernociceptive agents.

### ***Primary DRG neurons culture***

Male Wistar rats weighing 100–150 g were killed by decapitation under anaesthesia. Dorsal root ganglia were collected (18–20 ganglia per rat) and transferred to a sterile Hank's balanced salt solution (Sigma, USA) containing HEPES 10 mM (HBSS/HEPES). Isolated ganglia were incubated with collagenase III (0.28 U/mL) for 75 min and trypsin (0.25% w/v) for 12 min in HBSS/HEPES. Ganglia were washed and resuspended in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, Sigma, USA) containing 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin 1000 U/mL. Cells were dissociated by triturating the ganglia with a fire polished pipette and plated in glass bottom Petri dishes (MatTek, USA) coated with Matrigel (BD, USA). Cell

cultures were maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, and experiments were performed within 24–48 h.

### ***Western blot analysis***

After indicated stimulation DRG cells were homogenized in a lysis buffer containing a mixture of proteinase inhibitors and phosphatase inhibitors (Sigma). The protein concentrations of the lysate were determined using a BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL), and 30 µg of protein was loaded for each lane. Protein samples were separated on SDS-PAGE gel (10% gradient gel; Bio-Rad, Hercules, CA) and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). The filters were blocked with 5% dry milk and incubated overnight at 4°C with primary antibody, phosphorylated (p) AKT (1:100; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) for 1 hr at room temperature (RT) with HRP-conjugated secondary antibody (1: 20000; Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL). The blots were visualized in ECL solution (Amersham Biosciences;) for 2 min and exposed onto hyperfilms (Amersham Biosciences) for 1-30 min. Nonphosphorylated AKT antibody were used as loading controls.

### ***DRG immunohistochemistry***

Animals were terminally anesthetized with urethane and perfused through the ascending aorta with saline, followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (4°C). After the perfusion, DRGs were removed and postfixed in the same fixative for 2 hr and then replaced with 20% saccharose overnight. All of the DRGs were embedded in OCT, and DRG sections (14 µm) were cut in a cryostat and processed for immunofluorescence. All of the sections were blocked with 2% BSA in 0.3% Triton X-100 for 1 hr at room temperature T

and incubated 2 h at 4°C with a mixture of polyclonal rabbit anti-PI3K $\gamma$  (1:200 SantaCruz), polyclonal goat anti-TRPV1 (1:400, SantaCruz) polyclonal guinea-pig anti-SP (1:500, Millipore) antibodies, followed by a mixture of AlexaFluo-488 and AlexaFluo-594 conjugated secondary antibodies for 1 hr at room temperature. For the examination of IB4-labeled nonpeptidergic nociceptores, IB4-FITC conjugated (1:100, Sigma) were incubated together with secondary antibodies. The specificity for antibodies was confirmed by loss of staining in the absence of primary antibodies, and single bands in Western blotting.

***Measurement of NO production by DRG neurons with DAF-FM.***

Nitric oxide production by DRG neurons was evaluated as described by Haberberger et al., 2003, with some modifications. Male Wistar rats weighing 80-120 g were killed by decapitation under anaesthesia. Lumbar DRGs were collected and transferred to a sterile Hank's balanced salt solution (Sigma, USA) containing HEPES 10 mM (HBSS/HEPES). The DRGs were incubated in plastic dishes containing HBSS/HEPES in the presence of  $10^{-5}$  M 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA; Molecular Probes, ) for 1 h at 37 °C. After loading with DAF-2DA, the DRGs were transferred into DAF 2DA-free medium and exposed to the following agonists/inhibitors: medium, morphine (10  $\mu$  M), morphine (10  $\mu$  M) plus PI3K $\gamma$  inhibitor (AS605240; 100 nM); morphine (10  $\mu$  M) plus AKT inhibitor IV (100 nM). The inhibitors were incubated 10 min before morphine. In control experiments, NOS was inhibited using the blocker L-NMMA (Sigma) at a concentration of 10  $\mu$  M. After 1 h the DRGs were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min (4 °C) and washed in PBS, pH 7.4, at room temperature. DRGs were cut in slices and they were coverslipped in Fluormont diluted in PBS (2:1). Sections were examined using a confocal laserscanning microscope (Laica SP5) utilizing the 488-nm laser. Fourth to 6 fields from each DRG were evaluated. Furthermore, we used at least 2-4 DRGs for each treatment. Neurons were considered positive for DAF-

fluorescence when their fluorescence was 3 times fold the background. Statistical testing of differences between control and NO formation under application of pharmacological substances was done first by the Kruskal-Wallis test, followed by calculation of critical differences with the Mann-Whitney test and Wilcoxon test (Bortz and Lienert 1998) using SPSS software.

### ***RT-PCR***

The p110 $\gamma$  catalytic subunit of PI3K $\gamma$  mRNA in the DRG neurons was determined by RT-PCR. Briefly, mice were killed by decapitation under anaesthesia and the DRGs (6 from each mice; L4, L5 and L6) were harvested and left in contact with 10 ml of TRIzol reagent (for 10 min). Reverse transcription was performed with 0.5  $\mu$ g of total RNA. The primers used were as follows: p100 $\gamma$  (sense, 5'-TCA GGC TCG GAG ATT AGG TA-3'; antisense, 5'-GCC CAA TCG GTG GTA GAA CT-3') and GAPDH (sense, 5'-GCC ATC AAC GAC CCC TTC ATT G-3'; antisense, 5'-TGC CAG TGA GCT TCC CGT TC-3'). The expression of GAPDH mRNA was used as a control for tissue integrity in all samples. The PCR protocol started with 4 min of incubation at 94°C, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 56°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. The final extension was at 72°C for 10 min.

### ***Electrophysiology***

Whole-cell patch-clamp technique was employed using an HEKA EPC9 amplifier, ITC 1600 interface, and pulse-pulsefit software (all from HEKA Instruments, Germany). DRG neurons (6-12 hours in culture) was place in a recording chamber where the cells were bathed in modified Tyrode solution of following composition (mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2

CaCl<sub>2</sub>, 0,5 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 glucose, 0,1 L-arginine; pH 7.4, adjusted with NaOH. Recording pipettes were pulled from disposable glass tubing (Perfecta, Brazil) and typically had resistances of 1,6-2,0 MΩ when filled with the following solution (mM) 130 KCl, 5 NaCl, 5 EGTA, 5 HEPES, 0,1 L-arginine; pH 7.2, adjusted with KOH. After pH correction  $[K^+]_{\text{internal}}$  145 mM. The whole-cell configuration was established in modified Tyrode solution. Pipette voltage offsets were neutralized prior to the formation of a gigaseal. Series resistance ( $R_s$ ), and cell capacitance ( $C_m$ ) were determined. Capacitance compensation and 60 %  $R_s$  compensation were used. Data were filtered at 2.9 kHz and digitally sampled at 10 kHz. Criteria for cell inclusion in the study were:  $R_s < 10$  MΩ and stable recording with 60 %  $R_s$  compensation throughout the entire experiment. The membrane potential was held at -80 mV and a voltage-step of +50 mV was used to examine the activation of potassium currents. After establishing a stable series of potassium current recordings, the DRG neurons were perfused with modified perfusing Tyrode solution containing morphine alone or morphine in the presence of glibenclamide (a well known  $K_{ATP}$  channel blocker), naloxane, L-NMMA, PI3Kγ inhibitor or AKT inhibitor.

### ***Drugs***

The following materials were obtained from the sources indicated: wortmannin, L-NMMA, Naloxone, LY294002, Glibenclamide, Morphine chlorhidrate and PGE<sub>2</sub> were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and Morphine sulphate from Prodome Química e Farmaceutica (São Paulo, SP, Brazil). AKT inhibitor IV is from Tocris. AS605240 was a gift from Serono Pharmaceuticals.

### ***Data analyses and statistics***

All results are presented as means  $\pm$  s.e.m. The experiments were repeated at least twice. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the groups and doses at all times (curves) when the hypernociceptive responses were measured at different times after the stimulus injection. The factors analyzed were treatments, time and time by treatment interaction. When there was a significant time by treatment interaction, one-way ANOVA followed by Bonferroni's *t* test was performed for each time. Alternatively, when the hypernociceptive responses were measured once after the stimulus injection, the differences between responses were evaluated by one-way ANOVA followed by Bonferroni's *t* test.  $P < 0.05$  was considered significant.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Sergio R. Rosa, Ieda RS Schivo, Fabiola Mestriner and Eleni Tamburus. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Brazil). T.M.C (PhD student) is recipient of fellowships from FAPESP.

### **REFERENCES**

1. ALEY, K.O., MCCARTER, G., LEVINE, J.D. (1998) Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci* **18**, 7008-14.
2. BARTHO, L., STEIN, C., HERZ, A. (1990) Involvement of capsaicin-sensitive neurones in hyperalgesia and enhanced opioid antinociception in inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **342**, 666-70.
3. BARTLETT, S.E., REYNOLDS, A.J., TAN, T., HEYDON, K., HENDRY, I.A. (1999) Differential mRNA expression and subcellular locations of PI3-kinase isoforms in sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci Res* **56**, 44-53.
4. BARTLETT, S.E., REYNOLDS, A.J., TAN, T., HEYDON, K., HENDRY, I.A. (1999) Differential mRNA expression and subcellular locations of PI3-kinase isoforms



- in sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci Res* **56**, 44-53.
5. BILSKY, E.J., WANG, T., LAI, J., PORRECA, F. (1996) Selective blockade of peripheral delta opioid agonist induced antinociception by intrathecal administration of delta receptor antisense oligodeoxynucleotide. *Neurosci Lett* **220**, 155-8.
  6. BREESE, N.M., GEORGE, A.C., PAUERS, L.E., STUCKY, C.L. (2005) Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. *Pain* **115**, 37-49.
  7. CAMPS, M., RUCKLE, T., JI, H., ARDISSONE, V., RINTELEN, F., SHAW, J., FERRANDI, C., CHABERT, C., GILLIERON, C., FRANCON, B., MARTIN, T., GRETENER, D., PERRIN, D., LEROY, D., VITTE, P.A., HIRSCH, E., WYMAN, M.P., CIRILLO, R., SCHWARZ, M.K., ROMMEL, C. (2005) Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med* **11**, 936-43.
  8. CANABAL, D.D., SONG, Z., POTIAN, J.G., BEUVE, A., MCARDLE, J.J., ROUTH, V.H. (2007) Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R1418-28.
  9. CHI, X.X., JIANG, X., NICOL, G.D. (2007) ATP-sensitive potassium currents reduce the PGE2-mediated enhancement of excitability in adult rat sensory neurons. *Brain Res* **1145**, 28-40.
  10. COFFER, P.J., JIN, J., WOODGETT, J.R. (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* **335** ( Pt 1), 1-13.
  11. COLLIER, H.O., ROY, A.C. (1974) Morphine-like drugs inhibit the stimulation of E prostaglandins of cyclic AMP formation by rat brain homogenate. *Nature* **248**, 24-7.
  12. CUNHA, T.M., VERRI, W.A., JR., VIVANCOS, G.G., MOREIRA, I.F., REIS, S., PARADA, C.A., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. (2004) An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* **37**, 401-7.
  13. DIMMELER, S., FLEMING, I., FISSLTHALER, B., HERMANN, C., BUSSE, R., ZEIHNER, A.M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601-5.
  14. ENDRES-BECKER, J., HEPPENSTALL, P.A., MOUSA, S.A., LABUZ, D., OKSCHE, A., SCHAFER, M., STEIN, C., ZOLLNER, C. (2007) Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. *Mol Pharmacol* **71**, 12-8.
  15. FERREIRA, S.H. (1972) Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol* **240**, 200-3.
  16. FERREIRA, S.H., DUARTE, I.D., LORENZETTI, B.B. (1991) The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur J Pharmacol* **201**, 121-2.
  17. FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B., CORREA, F.M. (1978) Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur J Pharmacol* **53**, 39-48.
  18. FERREIRA, S.H., NAKAMURA, M. (1979) II - Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. *Prostaglandins* **18**, 191-200.
  19. FULTON, D., GRATTON, J.P., MCCABE, T.J., FONTANA, J., FUJIO, Y., WALSH, K., FRANKE, T.F., PAPAPETROPOULOS, A., SESSA, W.C. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**, 597-601.
  20. GOLDBERG, N.D., HADDOX, M.K., NICOL, S.E., GLASS, D.B., SANFORD, C.H., KUEHL, F.A., JR., ESTENSEN, R. (1975) Biologic regulation through

- opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP: the Yin Yang hypothesis. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **5**, 307-30.
21. GOLDSTEIN, A., COX, B.M., KLEE, W.A., NIRENBERG, M. (1977) Endorphin from pituitary inhibits cyclic AMP formation in homogenates of neuroblastoma X glioma hybrid cells. *Nature* **265**, 362-3.
  22. HABERBERGER, R.V., HENRICH, M., LIPS, K.S., KUMMER, W. (2003) Nicotinic receptor alpha 7-subunits are coupled to the stimulation of nitric oxide synthase in rat dorsal root ganglion neurons. *Histochem Cell Biol* **120**, 173-81.
  23. HAN, S.R., LEE, M.K., LIM, K.H., YANG, G.Y., JEON, H.J., JU, J.S., YOON, Y.W., KIM, S.K., AHN, D.K. (2008) Intramuscular administration of morphine reduces mustard-oil-induced craniofacial-muscle pain behavior in lightly anesthetized rats. *Eur J Pain* **12**, 361-70.
  24. HASSAN, A.H., ABLEITNER, A., STEIN, C., HERZ, A. (1993) Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience* **55**, 185-95.
  25. HUCHO, T.B., DINA, O.A., LEVINE, J.D. (2005) Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4(+) neuron-specific mechanism. *J Neurosci* **25**, 6119-26.
  26. KHASAR, S.G., GOLD, M.S., DASTMALCHI, S., LEVINE, J.D. (1996) Selective attenuation of mu-opioid receptor-mediated effects in rat sensory neurons by intrathecal administration of antisense oligodeoxynucleotides. *Neurosci Lett* **218**, 17-20.
  27. KNOWLES, R.G., PALACIOS, M., PALMER, R.M., MONCADA, S. (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5159-62.
  28. KOJIMA, H., SAKURAI, K., KIKUCHI, K., KAWAHARA, S., KIRINO, Y., NAGOSHI, H., HIRATA, Y., NAGANO, T. (1998) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **46**, 373-5.
  29. LEVINE, J.D., TAIWO, Y.O. (1989) Involvement of the mu-opiate receptor in peripheral analgesia. *Neuroscience* **32**, 571-5.
  30. LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. (1985) Mode of analgesic action of dipyrrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* **114**, 375-81.
  31. OCANA, M., DEL POZO, E., BARRIOS, M., ROBLES, L.I., BAEYENS, J.M. (1990) An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. *Eur J Pharmacol* **186**, 377-8.
  32. PALMER, R.M., FERRIGE, A.G., MONCADA, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-6.
  33. RODRIGUES, A.R., DUARTE, I.D. (2000) The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. *Br J Pharmacol* **129**, 110-4.
  34. SACHS, D., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. (2004) Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3680-5.
  35. SOARES, A.C., LEITE, R., TATSUO, M.A., DUARTE, I.D. (2000) Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Eur J Pharmacol* **400**, 67-71.
  36. STEFANO, G.B., HARTMAN, A., BILFINGER, T.V., MAGAZINE, H.I., LIU, Y., CASARES, F., GOLIGORSKY, M.S. (1995) Presence of the mu<sub>3</sub> opiate receptor in

- endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation. *J Biol Chem* **270**, 30290-3.
37. STEIN, C. (2003) Opioid receptors on peripheral sensory neurons. *Adv Exp Med Biol* **521**, 69-76.
  38. STEIN, C., MILLAN, M.J., SHIPPENBERG, T.S., PETER, K., HERZ, A. (1989) Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **248**, 1269-75.
  39. SUN, R.Q., TU, Y.J., YAN, J.Y., WILLIS, W.D. (2006) Activation of protein kinase B/Akt signaling pathway contributes to mechanical hypersensitivity induced by capsaicin. *Pain* **120**, 86-96.
  40. TAIWO, Y.O., BJERKNES, L.K., GOETZL, E.J., LEVINE, J.D. (1989) Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience* **32**, 577-80.
  41. TAKEDA, M., TANIMOTO, T., IKEDA, M., KADOI, J., NASU, M., MATSUMOTO, S. (2004) Opioidergic modulation of excitability of rat trigeminal root ganglion neuron projections to the superficial layer of cervical dorsal horn. *Neuroscience* **125**, 995-1008.
  42. VETTER, I., WYSE, B.D., MONTEITH, G.R., ROBERTS-THOMSON, S.J., CABOT, P.J. (2006) The mu opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. *Mol Pain* **2**, 22.
  43. VIVANCOS, G.G., PARADA, C.A., FERREIRA, S.H. (2003) Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues. *Br J Pharmacol* **138**, 1351-7.
  44. WENK, H.N., BREDERSON, J.D., HONDA, C.N. (2006) Morphine directly inhibits nociceptors in inflamed skin. *J Neurophysiol* **95**, 2083-97.
  45. WU, C., HUANG, J. (2007) Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway is essential for neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *J Biol Chem* **282**, 3571-83.
  46. ZHUANG, Z.Y., XU, H., CLAPHAM, D.E., JI, R.R. (2004) Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. *J Neurosci* **24**, 8300-9.

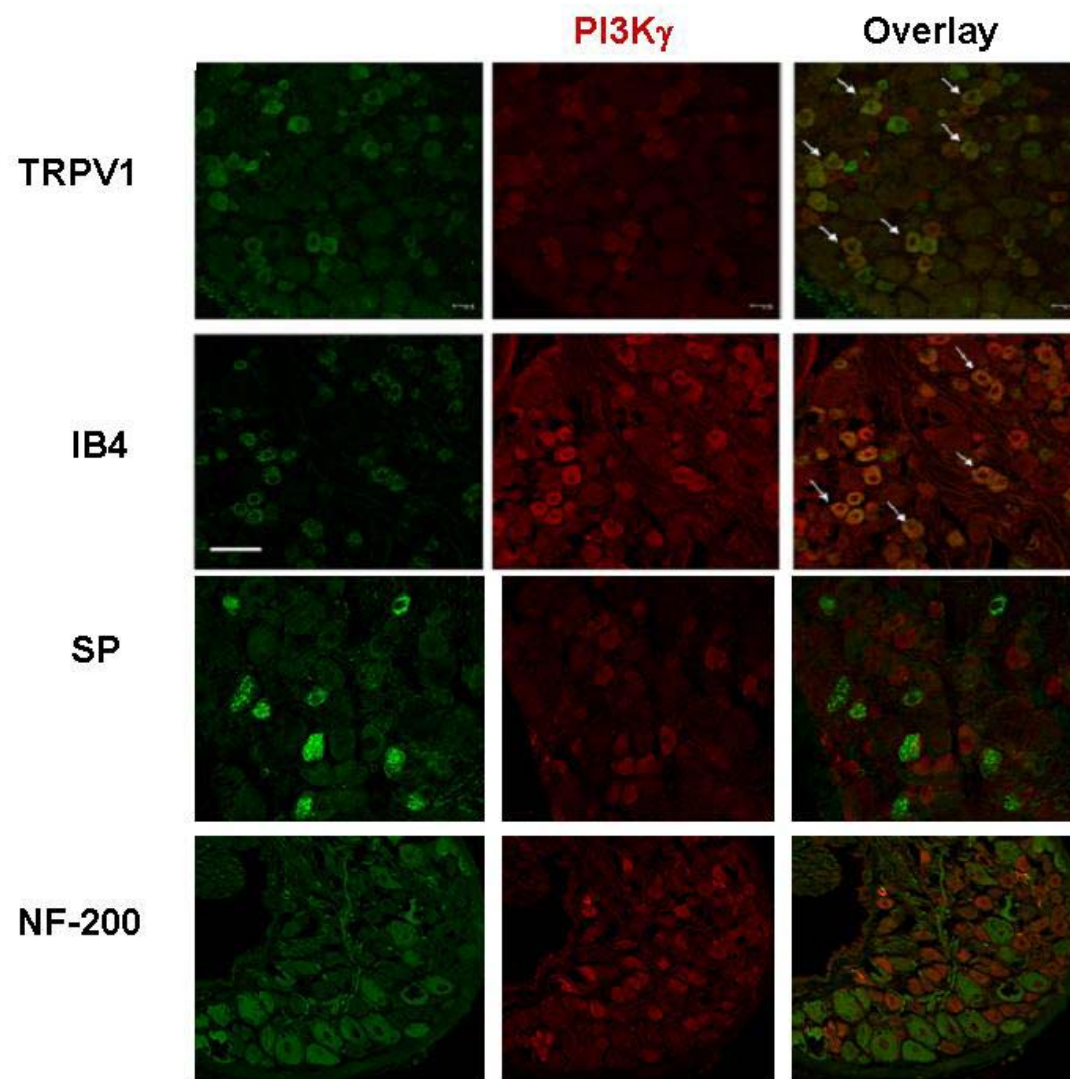


Figure 1

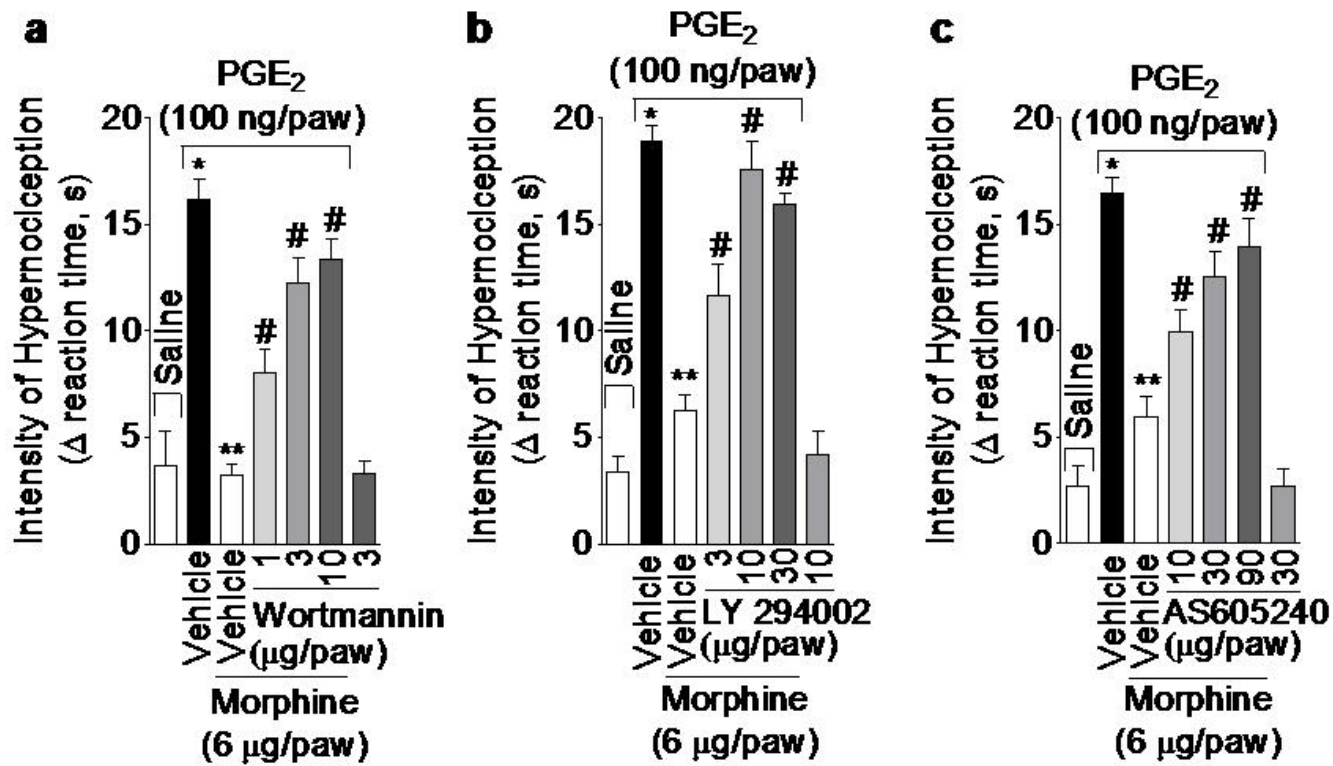


Figure 2

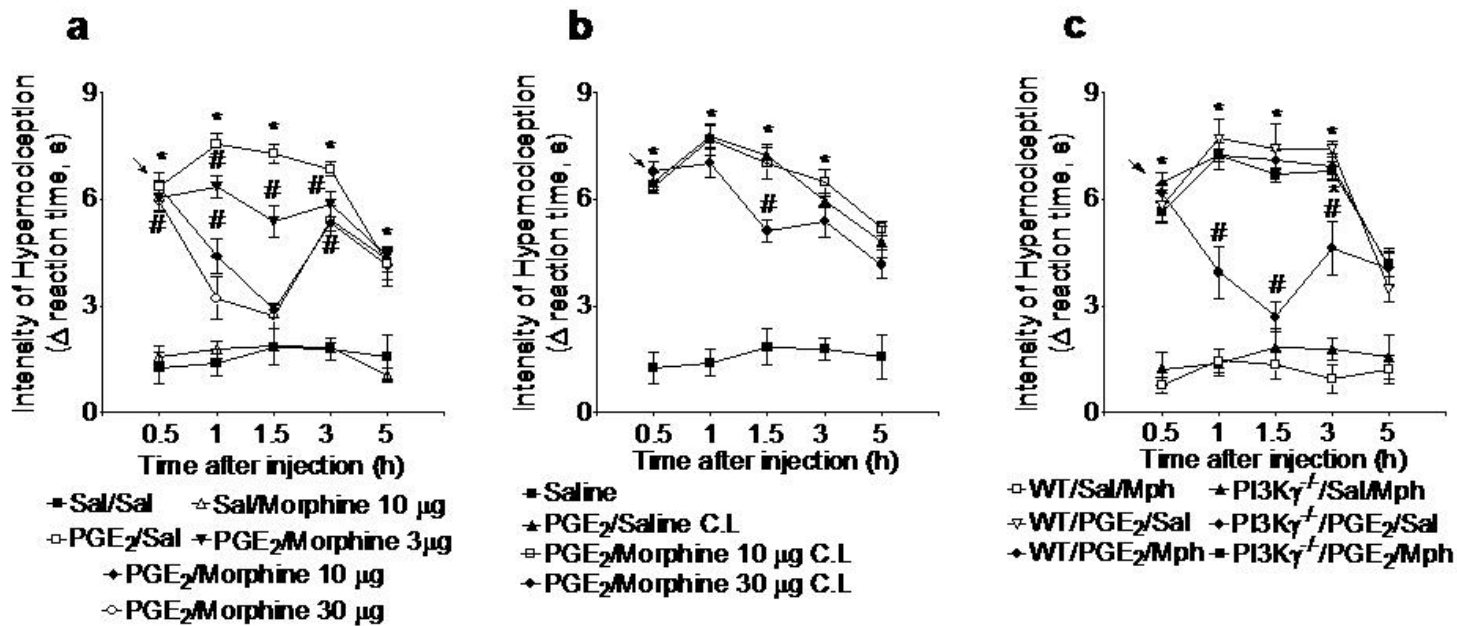
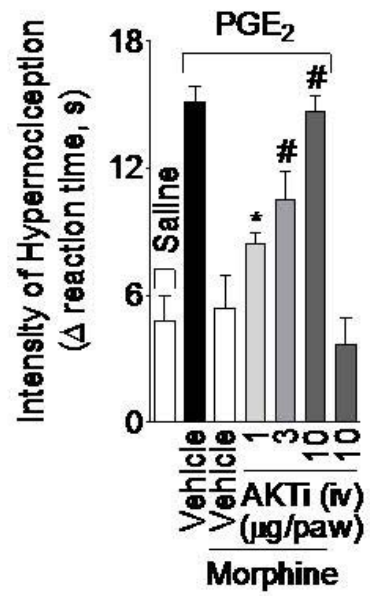
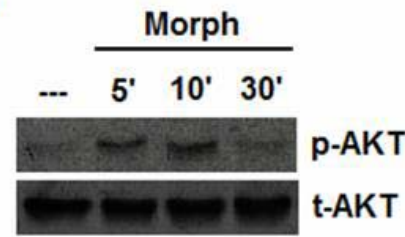
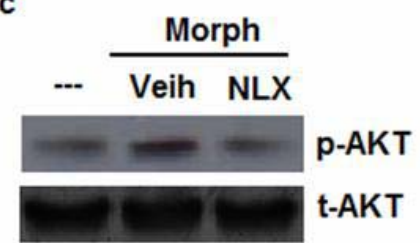
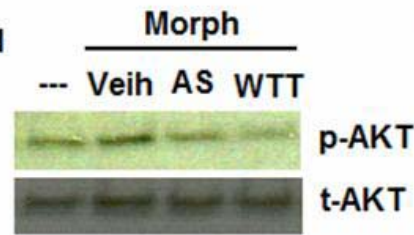
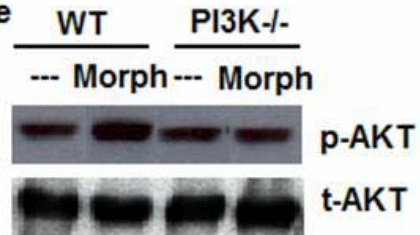
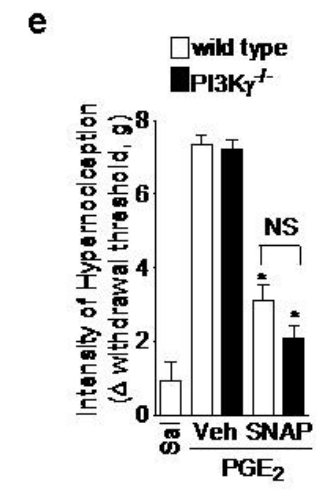
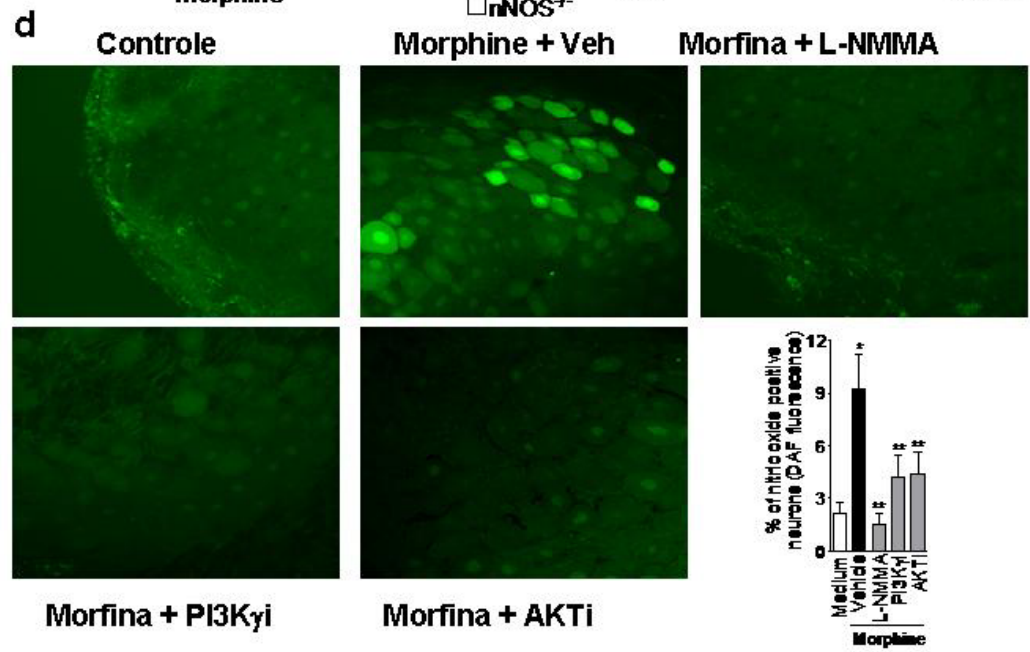
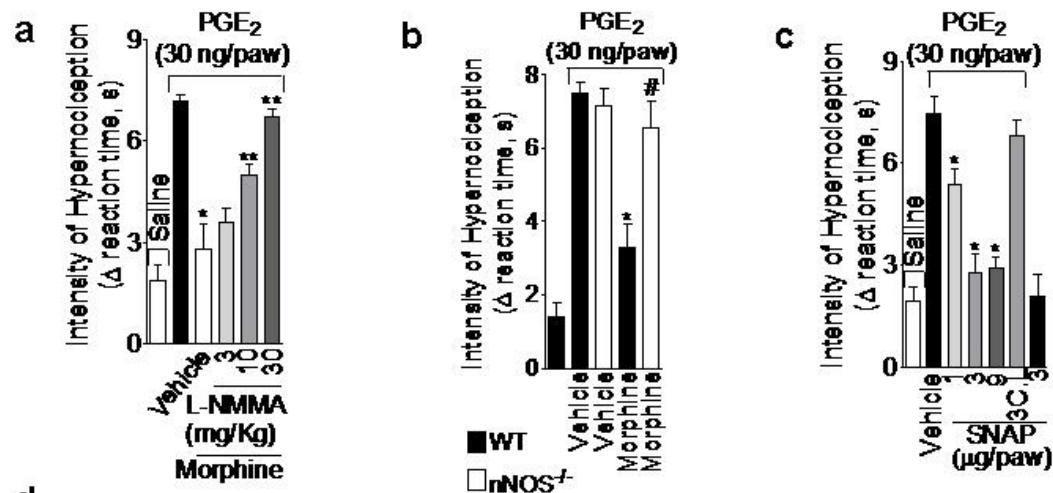


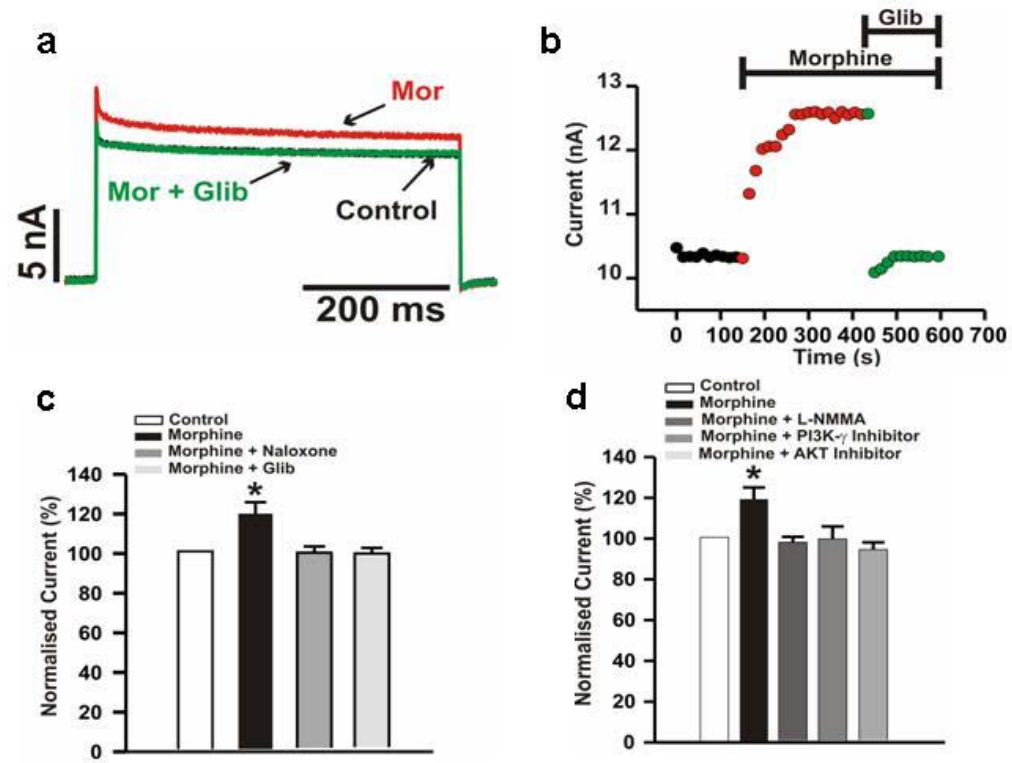
Figure 3

**a****b****c****d****e****Figure 4**

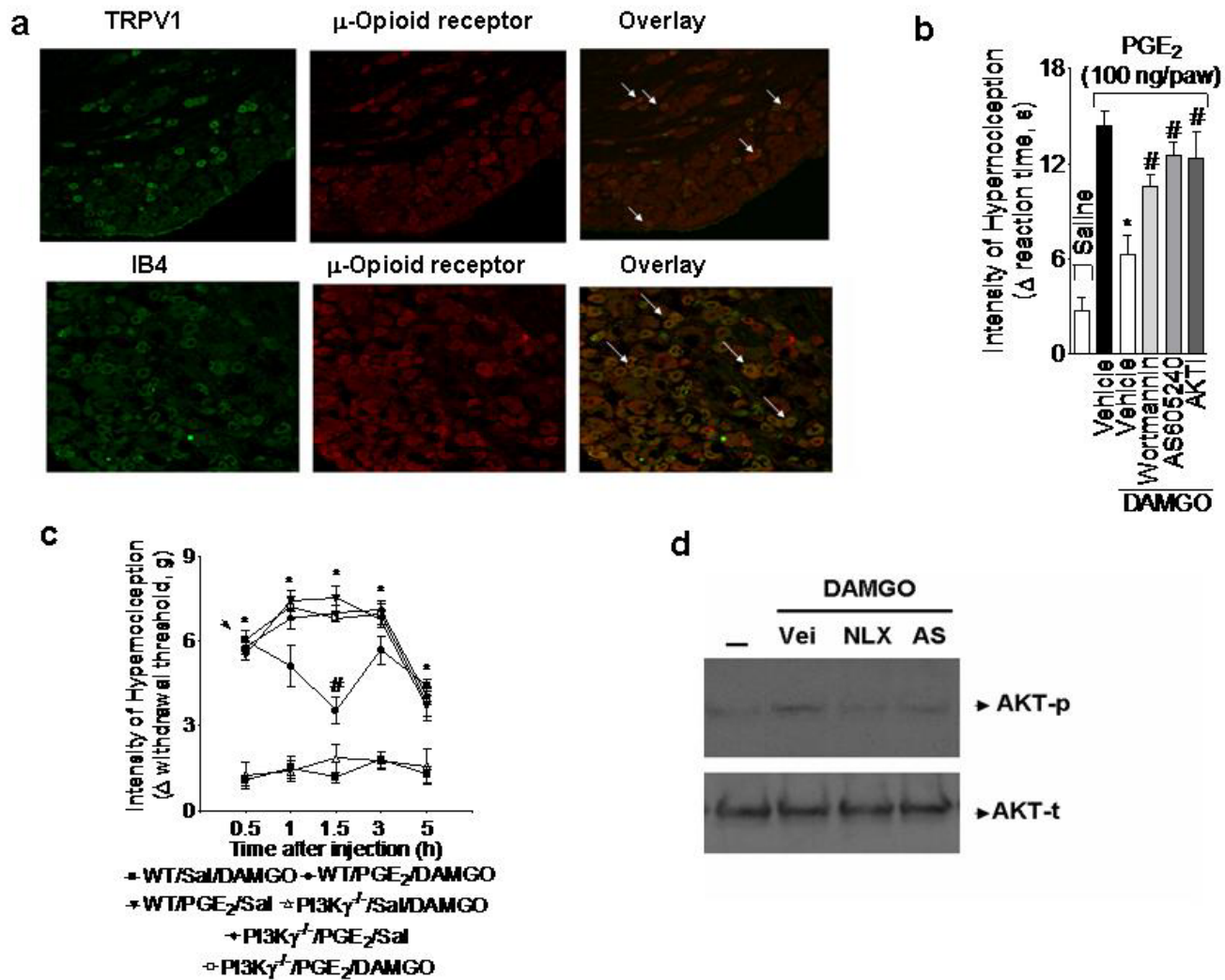


**Figure 5**

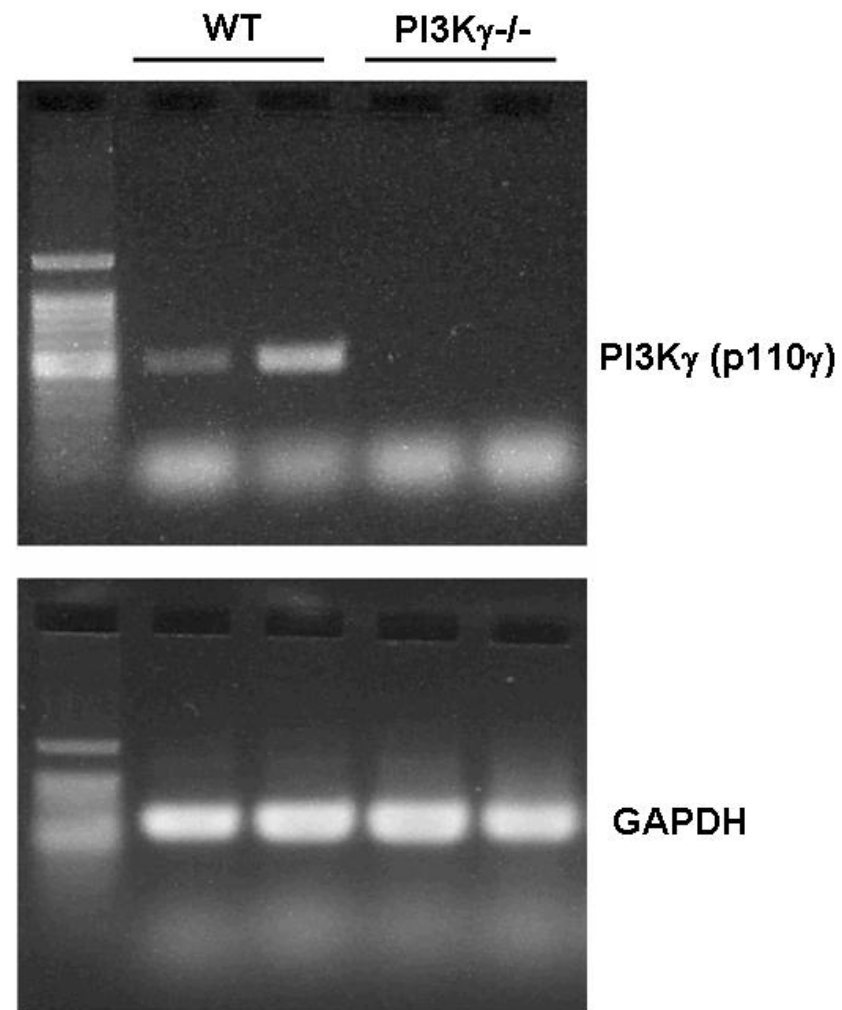




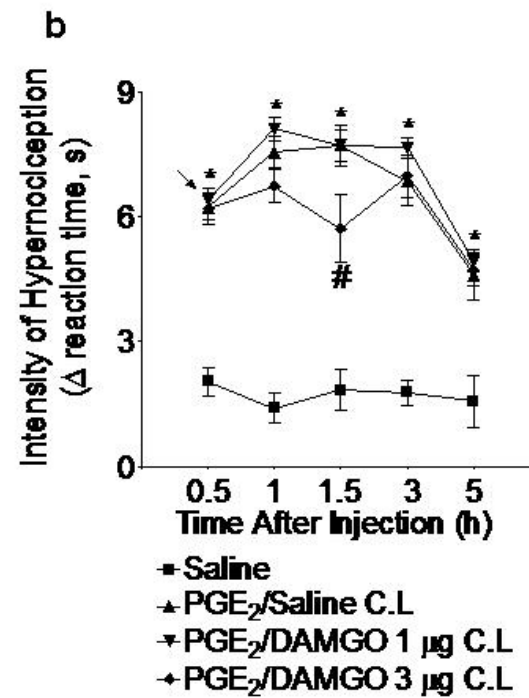
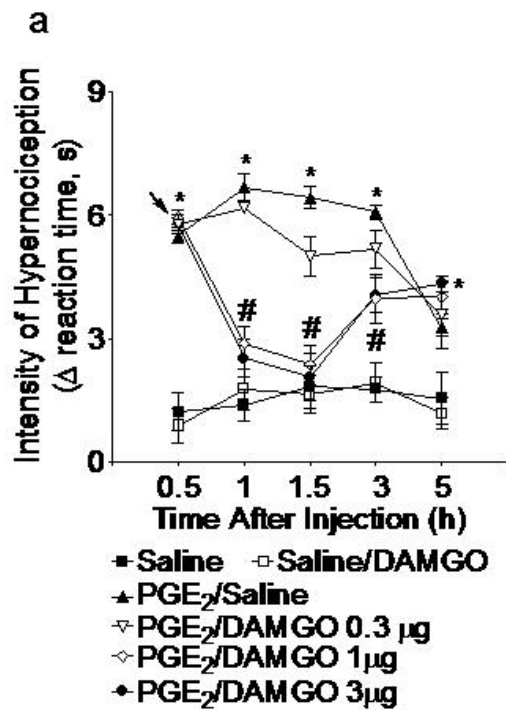
**Figure 6**



**Figure 7**



**Supplementary Figure 1**



**Supplementary Figure 2**

# 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](#)