

MÁRCIA ALAIR DA SILVA PEREIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA
ADENOSINA EM CAMUNDONGOS - ANÁLISE DO
MECANISMO DE AÇÃO**

ITAJAÍ – 2005

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
CENTRO DE EDUCAÇÃO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA
ADENOSINA EM CAMUNDONGOS – ANÁLISE DO
MECANISMO DE AÇÃO

Dissertação submetida à
Universidade do Vale do Itajaí
como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

MÁRCIA ALAIR DA SILVA PEREIRA

Itajaí, Outubro de 2005.

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA
ADENOSINA EM CAMUNDONGOS – ANÁLISE DO
MECANISMO DE AÇÃO**

Márcia Alair da Silva Pereira

‘Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, e aprovada em forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.’

Márcia Maria de Souza, Doutora
Orientadora

Tânia Maria Bellé Bresolin, Doutora
Coordenadora do Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Banca examinadora:

Márcia Maria de Souza, Doutora
Presidente

Rivaldo Niero, Doutor

Carla Denise Bonan, Doutora

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que de alguma forma lutam por uma sociedade mais justa e acreditam em seus ideais, tentando dessa forma traçar sua própria história.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pai e todo poderoso na criação dos céus, da terra e de tudo o que neles há, por ter-me dado forças para não fraquejar diante das dificuldades que se contrapuseram a minha caminhada.

Ao meu esposo Orlando (**in memoriam**) e aos meus filhos Rafael e Raquel, pelo carinho e atenção, pelo entendimento da minha ausência, mas, sobretudo, pelo incentivo em todos os momentos difíceis dessa jornada, pois me forneceram a força necessária para concluir mais essa etapa.

Ao professor Dr. Adair R. S. dos Santos, meu especial agradecimento pelo constante apoio, paciência, confiança e forma espontânea com que transferiu seus conhecimentos, permitindo-me compartilhá-los na realização desse trabalho. Pela oportunidade de trabalharmos juntos, por me *envolver* na pesquisa, pela amizade, e acima de tudo pelo seu caráter profissional, requisitos esses que sempre marcaram sua orientação nesse trabalho.

A professora Dra. Márcia M. de Souza, meu especial agradecimento por ter *abraçado* esta causa, pelo constante incentivo, apoio, compreensão, carinho e principalmente por acreditar na minha capacidade.

A toda a equipe do Mestrado em Ciências Farmacêuticas, especialmente a Dra. Tânia B. Bresolin e a Rosélia Koerich, secretária acadêmica, pela compreensão e atenção a mim dispensadas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências farmacêuticas, pela disponibilidade em retirar minhas dúvidas e pela transmissão de conhecimentos.

Aos colegas da pesquisa, pela amizade, carinho, constante colaboração, entusiasmo, troca de informações e evolução conjunta, tornando a convivência a mais agradável possível, especialmente ao meu grande amigo, Gerson L. de Oliveira.

Aos alunos da Iniciação Científica, em especial ao Helton e ao Gabriel, pela colaboração nessa pesquisa.

Aos funcionários do biotério e do laboratório de Farmacologia, em especial a Andréa O. Pinheiro, pela atenção dispensada e pela amizade que nasceu desse convívio.

Aos colegas da turma de mestrado e aos demais colegas do curso, pela colaboração, amizade e companheirismo.

A comissão interna, Dr. Rivaldo Niero e Dra. Ednéia pelas sugestões.

A banca examinadora, Dra. Carla D. Bonan e Dr. Rivaldo Niero por terem aceito o convite e pelas valiosas sugestões.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, estiveram presentes durante a realização desse trabalho.

Resumo da Dissertação apresentada à UNIVALI como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA ADENOSINA EM CAMUNDONGOS – ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO

Márcia Alair da Silva Pereira

Dezembro/2004

Orientadora: Márcia Maria de Souza, Doutora

Área de Concentração: Farmacologia

Palavras-chave: adenosina, antinocicepção, camundongos

Número de Páginas: 74

A adenosina e adenosina 5'-trifosfato (ATP) exercem um papel modulatório na resposta inflamatória e na transmissão dolorosa. Nesse sentido, vários estudos pré-clínicos e clínicos apontam o uso da adenosina e seus análogos no tratamento da dor, nas doenças inflamatórias, neurológicas e também em cardiopatias. O objetivo deste estudo foi analisar a ação modulatória da adenosina no controle da nocicepção, bem como o(s) possível(is) mecanismo(s) envolvido(s) na ação antinociceptiva desta, através de estudos farmacológicos *in vivo* utilizando diferentes modelos de nocicepção. Para essa finalidade, foram utilizados camundongos *Swiss* machos pesando entre 25 e 35 g, mantidos no Biotério Central da UNIVALI. Os modelos farmacológicos utilizados foram os modelos da formalina, capsaicina, glutamato, placa quente, *open field* e o estudo do mecanismo de ação foi realizado utilizando-se o modelo de dor induzido pela formalina. A adenosina administrada via i.p. (10-300 mg/kg), v.o. (50-500 mg/kg) ou i.pl. (50-500 µg/pata) causou redução de forma dose dependente da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, capsaicina e glutamato em camundongos. Além disso, a adenosina (100 mg/kg, i.p.) também causou significativa atividade antinociceptiva quando analisada no modelo da placa quente. Da mesma forma ela foi efetiva em reduzir a nocicepção induzida pela formalina tanto administrada profilaticamente quando terapêuticamente. Seu efeito antinociceptivo (100 mg/kg, i.p.) foi completamente prevenido pelo pré-tratamento dos animais com cafeína (3 mg/kg, i.p.), DPCPX (5 mg/kg, i.p.), ZM241385 (3 mg/kg, i.p.), ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.), cetanserina (1 mg/kg, i.p.), metilsergida (5 mg/kg, i.p.), L-arginina (600 mg/kg, i.p.), haloperidol (0,2 mg/kg, i.p.), mas não foi afetado pelo pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p.), bicuculina (0,7 mg/kg, i.p.), faclofeno (3 mg/kg, i.p.) ou após adrenalectomia bilateral dos animais. Foi analisado também os possíveis efeitos da adenosina sobre a performance motora dos animais através do modelo do *open field*, sendo que o pré-tratamento dos animais com a mesma não promoveu alterações comportamentais quando comparados com o grupo controle.

Em conjunto, estes resultados demonstram que a adenosina apresenta um importante efeito antinociceptivo, e embora o seu mecanismo de ação não tenha sido totalmente esclarecido, observou-se que ocorre o envolvimento dos receptores adenosinérgicos do tipo A_1 e A_{2A} , da via da L-arginina-óxido nítrico, dos sistemas dopaminérgico, α_2 -adrenérgico e serotoninérgico, mas não do sistema GABAérgico, opióide ou do eixo HPA, na ação antinociceptiva produzida por ela. Finalmente, o presente estudo indica fortemente que a adenosina possui potencialidades terapêuticas no controle da dor e desta forma pode tornar-se útil para o desenvolvimento de novos fármacos com ação analgésica.

Abstract of dissertation presented to UNIVALI as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Pharmaceutical Science.

STUDY OF ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF ADENOSINE IN MICE – ANALYSIS OF MECHANISM OF ACTION

Márcia Alair da Silva Pereira

December/2004

Advisor: Márcia Maria de Souza, Doctor

Area of Concentration: Pharmacology

Keywords: adenosine, antinociception, mice

Number of Pages: 74

Adenosine and adenosine 5'-trifosphate (ATP) exerts a modulatory role in inflammatory response and pain transmission. In this direction, several clinic and preclinic studies point the use of adenosine and its analogs in pain treatment, inflammatory diseases, neurological diseases and cardiopathies. The objective of this study was to analyze the modulatory action of adenosine in nociception control, as well as the possible mechanisms involved in its antinociceptive action, through the use of *in vivo* pharmacological studies using different nociception methods. To this end, we used male *Swiss* mice weighing between 25 and 35g, kept in the central byotherium of UNIVALI. The pharmacologic models used were the formalin, capsaicin, glutamate, hot plate and *open field* models, and the study of the mechanism of action was performed using the model of pain induced by formalin. Adenosine given intraperitoneally (10-300 mg/kg), orally (50-500 mg/kg) or in the paw (50-500 µg/paw) caused dose-dependent reduction of the nociception induced by intraplantar injection of formalin, capsaicin and glutamate in mice. Moreover, adenosine (100 mg/kg, i.p.) also caused significant activity when analyzed in the hot plate model. Adenosine was effective in reducing the nociception induced by formalin when given prophylactically as well as therapeutically. The antinociceptive effect of adenosine (100 mg/kg, i.p.) was completely prevented by animal pre-treatment with caffeine (3 mg/kg, i.p.), DPCPX (5 mg/kg, i.p.), ZM241385 (3 mg/kg, i.p.), iohimbine (0,15 mg/kg, i.p.), ketanserine (1 mg/kg, i.p.), metilsergide (5 mg/kg, i.p.), L-arginine (600 mg/kg, i.p.), and haloperidol (0,2 mg/kg, i.p.), but was not affected by the pre-treatment with naloxone (1 mg/kg, i.p.), bicuculine (0,7 mg/kg, i.p.), faclofen (3 mg/kg, i.p.) or by bilateral adrenalectomy of the animals. The possible effects of adenosine on the motor performance of the animals were analyzed through the *open field* model. The pre-treatment of the animals with adenosine did not promote behavioural alterations when compared to control group.

Taken together, these results show that adenosine presents an important antinociceptive effect and, even though its mechanism is not completely understood yet, it was observed the involvement of adenosinergic receptors A₁ e A_{2A}, L-arginine – nitric oxide pathway, dopaminergic, α-2 adrenergic and serotonergic systems, but no involvement of the gabaergic

or opioid systems or the AHP axis in the antinociceptive action produced by adenosine. Finally, the present study strongly indicates that adenosine has therapeutic potential in pain control and, thus, may become useful for the development of new substances with analgesic action.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1.0 – INTRODUÇÃO	1
2.0 – OBJETIVOS	3
3.0 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Dor	4
3.1.1. Aspectos gerais	4
3.1.2. Classificação dos tipos de dor	6
3.1.3. Vias neuronais envolvidas na percepção da dor	7
3.1.4. Principais neurotransmissores e mecanismos envolvidos na modulação da dor	10
3.2. Adenosina	16
4.0 – MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Animais	24
4.2. Drogas e soluções usadas	24
4.3. Análise farmacológica	25
4.3.1. Atividade antinociceptiva	25
4.3.1.1. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos	25
4.3.1.2. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos	26
4.3.1.3. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos	27
4.3.1.4. Teste da “placa quente”	28
4.3.1.5. Efeito sobre a performance motora no modelo do <i>Open field</i>	28
4.3.2. Análise do mecanismo de ação antinociceptiva da adenosina	29
4.3.2.1. Participação do sistema adenosinérgico	29
4.3.2.2. Participação do sistema opióide	30
4.3.2.3. Participação do via L-arginina-óxido nítrico	30
4.3.2.4. Participação do sistema serotoninérgico	31
4.3.2.5. Participação do sistema dopaminérgico	31

4.3.2.6. Participação do sistema GABAérgico	31
4.3.2.7. Influência do sistema α_2 -adrenérgico	32
4.3.2.8. Influência da adrenalectomia	32
4.4. Análise estatística	33
5.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Atividade antinociceptiva induzida pela adenosina em camundongos	34
5.1.1. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina	34
5.1.2. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina	40
5.1.3. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato	43
5.1.4. Teste da placa quente	45
5.1.5. Efeito da adenosina no modelo do <i>Open Field</i>	46
5.2. Análise do mecanismo de ação antinociceptivo da adenosina	47
5.2.1. Participação do sistema adenosinérgico	47
5.2.2. Participação do sistema opióide	49
5.2.3. Efeito do pré-tratamento com L-arginina	50
5.2.4. Participação do sistema serotoninérgico	52
5.2.5. Participação do sistema α -adrenérgico	54
5.2.6. Participação do sistema dopaminérgico	55
5.2.7. Participação do sistema gabaérgico	56
5.2.8. Efeito da adenosina na adrenalectomia	58
6.0 – CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 01. Controle descendente da dor	14
Figura 02. Estrutura química da adenosina.....	16
Figura 03. Distribuição de receptores de adenosina no SNC	18
Figura 04. Duração do efeito antinociceptivo da adenosina administrada pelas vias i. p. e v. o. na nocicepção causada pela formalina em camundongos	37
Figura 05. Efeito antinociceptivo da adenosina dose-dependente administrada pelas vias i. p., v. o. e i. pl. na nocicepção causada pela formalina em camundongos	38
Figura 06. Efeito antinociceptivo profilático e terapêutico da adenosina administrada pela via i. p. na nocicepção causada pela formalina em camundongos	40
Figura 07. Efeito antinociceptivo da adenosina dose-dependente administrada pela via i. p., v. o. e i. pl. na nocicepção causada pela capsaicina em camundongos	42
Figura 08. Efeito antinociceptivo da adenosina dose-dependente administrada pela via i. p. e i. pl. na nocicepção causada pelo glutamato em camundongos.....	44
Figura 09. Efeito antinociceptivo da adenosina administrada pela via i. p. no teste da "Placa-Quente"	46
Figura 10. Efeito sobre a performance motora dos animais pré-tratados com adenosina via i.p. no modelo do "Open field"	47
Figura 11. Influência do pré-tratamento de camundongos com cafeína sobre a antinocicepção causada pela adenosina no modelo da formalina.....	48
Figura 12. Influência do pré-tratamento de camundongos com DPCPX sobre a antinocicepção causada pela adenosina no modelo da formalina.....	48
Figura 13. Influência do pré-tratamento de camundongos com ZM241385 sobre a antinocicepção causada pela adenosina no modelo da formalina.....	49
Figura 14. Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona sobre a antinocicepção causada pela adenosina e morfina no modelo da formalina	50
Figura 15. Influência do pré-tratamento de camundongos com L-arginina ou D-arginina sobre a antinocicepção causada pela adenosina no modelo da formalina	52

Figura 16. Influência do pré-tratamento de camundongos com metilsergida sobre a antinocicepção causada pela adenosina no modelo da formalina.....	53
Figura 17. Influência do pré-tratamento de camundongos com ioimbina sobre a antinocicepção causada pela adenosina no modelo da formalina.....	55
Figura 18. Influência do pré-tratamento de camundongos com haloperidol sobre a antinocicepção causada pela adenosina no modelo da formalina.....	56
Figura 19. Influência do pré-tratamento de camundongos com antagonistas GABAérgicos sobre a antinocicepção causada pela adenosina no modelo da formalina.....	57
Figura 20. Influência da adrenalectomia em camundongos sobre a antinocicepção causada pela adenosina no modelo da formalina	58
Tabela 01. Valores das DI_{50} para a adenosina, aspirina, acetaminofen e dipirona na nocicepção induzida pela formalina em camundongos	39
Tabela 02. Valores das DI_{50} para a adenosina na nocicepção induzida pela capsaicina em camundongos.....	43
Tabela 03. Valores das DI_{50} para a adenosina na nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAE	Aminoácido excitatório
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosina difosfato
AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
AMP _c	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
β -EP	β -endorfina
B ₁	Receptor das cininas tipo 1
B ₂	Receptor das cininas tipo 2
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
°C	Graus centígrados
Ca ⁺⁺	Cálcio
CB	Canabinóide
CDME	Corno dorsal da medula espinhal
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
DF	Facilitação descendente
DFL	Funículo dorso lateral
DI	Inibição descendente
DPCPX	[1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina]
DYN	Dinorfina
DRG	Gânglio da raiz dorsal
E.P.M.	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
EM	Endomorfina
ENR	Encefalina
FQ	Nociceptina
g	Grama
GLU	Glutamato
GMP _c	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
GRD	Gânglio da raiz dorsal
h	Hora
Hist	Histamina
IASP	Associação internacional do estudo da dor
i.c.v.	Intracerebroventricular
I κ B	Proteína inibitória do fator de transcrição nuclear NF-Kappa B
IL	Interleucina

i.p.	Intraperitoneal
ICAM	Moléculas de adesão intracelular
IP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
kg	Quilograma
mg	Miligrama
ml	Mililitros
min	Minutos
Musc	Muscarínico
NA	Noradrenalina
Nic	Nicotínico
NF-κB	Fator de transcrição nuclear NF-Kappa B
NGF	Fator de crescimento do nervo
NK ₁	Receptor das Taquicininas tipo 1
NK ₂	Receptor das Taquicininas tipo 2
NK ₃	Receptor das Taquicininas tipo 3
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMR	Núcleo magno da rafe
nmol	nanomol
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPVF	Neuropeptídeo VF
NRG	Núcleo reticular gigantocelular
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofina 4/5
NTS	Núcleo do trato solitário
OFQ	Orfanina
PAF	Fibras aferentes primária
PBS	Salina tampão fosfato
PCPA	Cloridrato de p-clorofenilalanina
PEM	Porcentagem de efeito máximo
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PN	Neurônios de projeção
s	segundos
s.c.	subcutâneo
SCP	Substância cinzenta periaquedutal
SGP	Substância gelatinosa

SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
TNF	Fator de necrose tumoral
VCAM	Moléculas de adesão vascular
v.o.	Via oral
VR1	Receptor vanilóide
ZM241385	4-(2-[7-Amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazol[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol
μg	microgramas
μL	microlitros
μmol	micromol

1.0. INTRODUÇÃO

A história do homem parece confundir-se com a história da dor. Desde os tempos mais primórdios, pensadores, filósofos, sacerdotes, médicos, psicólogos e sociólogos dentre outros se curvaram diante deste problema crucial que acomete a raça humana, fazendo parte da sua natureza de forma intrínseca. Até hoje, a dor continua sendo um dos maiores flagelos que acometem a humanidade e a inadequação dos tratamentos atuais disponíveis para essa condição, se deve, em grande parte, à compreensão ainda incompleta dos processos dolorosos.

Apesar disso, na última década, a compreensão dos mecanismos envolvidos na transmissão da dor progrediram muito, devido principalmente, ao entendimento dos mecanismos fisiológicos das fibras aferentes e do processo de neurotransmissão sináptica do gânglio dorsal da medula espinhal para o córtex (MILLAN, 1999, 2002).

Embora diversos mecanismos moleculares envolvidos na sensibilização central tenham sido estabelecidos recentemente, os mecanismos envolvidos na sensibilização periférica não foram completamente elucidados. Entretanto, o conhecimento da biologia molecular dos diversos receptores envolvidos na gênese da nocicepção permitiu um extraordinário progresso no entendimento do mecanismo de ação de diversos neurotransmissores e, conseqüentemente, de drogas que atuam na modulação central e periférica da nocicepção.

Atualmente existem vários estudos pré-clínicos e clínicos demonstrando o importante papel exercido pelas purinas (adenosina e adenosina trifosfato) na transmissão dolorosa tanto periférica quanto centralmente (SAWYNOK, 1998, 1999; SEGERDHAL e SOLLEVI, 1998). Esse interesse deve-se ao fato de que: a) análogos da adenosina produzem efeito antinociceptivo em vários modelos de nocicepção, principalmente em dores neuropáticas, onde a sua gênese ainda não é bem compreendida; b) a liberação de adenosina a nível espinhal contribui para a eficácia das drogas opióides; c) a cafeína, um antagonista dos receptores de adenosina, potencializa a atividade analgésica de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) quando administrados concomitantemente, sendo esse efeito ainda não bem compreendido (SAWYNOK, 1998).

Nesse sentido, a adenosina e seus análogos (substâncias sintetizadas a partir da adenosina) podem representar uma nova e importante ferramenta farmacológica para o controle da dor, principalmente das dores neuropáticas, onde o arsenal terapêutico disponível na clínica é amplo, porém com baixa efetividade. Com relação a este aspecto, os fármacos

utilizados atualmente para o controle dessas dores continuam sendo os AINES (antiinflamatórios não esteroidais) e os derivados da morfina, os quais apresentam inúmeros efeitos adversos. Além destes, outros fármacos também são utilizados, como os antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes, bloqueadores de canal de sódio, neurolépticos e esteróides, sendo que a efetividade desses fármacos é muito variável entre os indivíduos. Assim como outros tratamentos alternativos, muitas vezes ineficazes, como a estimulação elétrica de nervos cutâneos, biofeedback e acupuntura, entre outros (VANE e BOTTING, 1995,1996; MACFARLANE et al., 1997).

Considerando os aspectos acima mencionados, pretendeu-se no presente trabalho estudar as possíveis ações modulatórias da adenosina, avaliando a influência de vários sistemas de neurotransmissores sobre a antinocicepção induzida por ela.

2.0. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- O presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito modulatório da adenosina no controle da nocicepção, através de estudos farmacológicos *in vivo*, utilizando diferentes modelos experimentais de nocicepção em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito antinociceptivo da adenosina, administrada por via sistêmica, em modelos de nocicepção química (modelo da formalina, capsaicina e glutamato) e térmica (modelo da placa quente) em camundongos.

- Investigar, através do emprego de técnicas farmacológicas “*in vivo*”, os possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da adenosina através do emprego de agonistas e antagonistas seletivos de vários receptores, que modulam a nocicepção.

3.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Dor

3.1.1. Aspectos gerais

A dor é uma experiência universal da espécie humana, é uma realidade intrínseca a sua natureza. Todos sabem o que significa, mas não existe uma definição satisfatória para a dor e nenhum ser vivo a ela se adapta. O homem sofre fisicamente desde que existe, estando a dor associada a inúmeras patologias, sendo ainda nos dias de hoje a mais freqüente causa que leva o paciente aos consultórios médicos. No entanto, a proximidade da dor sintomática parece, para o homem, tão certa quanto à ausência de uma explicação satisfatória capaz de dizer-lhe por que sofre. O interesse voltado ao estudo da natureza e do significado da dor física é muito antigo e várias pesquisas vêm ao longo dos anos fornecendo um esclarecimento a esta questão. Devido ao aspecto desagradável da dor, o desconforto que esta causa, muitas vezes até agravando o estado da doença, inúmeros pesquisadores estão envolvidos no estudo dos mecanismos moduladores desta, concentrando seus esforços no sentido de mapear suas vias visando eliminá-la através de meios farmacológicos e ou cirúrgicos (IADAROLA e CAUDLE, 1997; BESSON, 1999).

Um fator importante relacionado à dor física que não deve ser esquecido é que ela é essencial para a sobrevivência do indivíduo, por servir como sinal de alerta da ocorrência de uma lesão a algum tecido ou órgão, tendo a primordial função de proteger e preservar o organismo, alertando sistemas reparadores de que algo está incompatível com o seu funcionamento normal, detectando, localizando e até mesmo identificando o local lesado. Devido a isso, é natural pensarmos que não é ao acaso que possuímos um sistema complexo de percepção e resposta ao estímulo nociceptivo, pois seu papel é imprescindível como sintoma de doença. O risco aparece quando essa dor ao invés de “proteger o organismo”, torna-se prejudicial, como no caso das lesões nervosas, podendo debilitar o paciente (IADAROLA e CAUDLE, 1997; BESSON, 1999; MILLAN, 1999).

Em 1964, MERKSKY definiu a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a danos potenciais ou pré-existentes aos tecidos, sendo esta definição adotada mais tarde pela Associação Internacional para o Estudo da dor (IASP) (MERKSKY e BOGDUK, 1994; MILLAN, 1999). Como a dor é uma experiência única, há uma vasta gama de

sensações dolorosas diferentes, as quais diferem principalmente quanto à intensidade e à distribuição espacial e temporal da mesma (KARLSTEIN e GORDH, 1997). É uma experiência subjetiva para cada paciente afetado. Dessa forma, torna-se difícil a comparação da mesma entre os indivíduos, pois de modo geral, nenhum ser vivo a ela se adapta. A estimativa de testes clínicos para o desenvolvimento de fármacos que reduzam a dor é complicada pelo fato de que vários estados de dor diferem consideravelmente entre indivíduos (LIPMAN, 1996).

A dor apresenta dois componentes importantes: o componente sensorial e o componente emocional/afetivo. O componente sensorial, que corresponde ao mecanismo neurofisiológico, permite, por meio da ativação de receptores, a transmissão e interpretação do estímulo nocivo, que em geral, é forte o suficiente para produzir lesão tecidual. O componente emocional corresponde à percepção do estímulo doloroso pelo indivíduo, que é seguida pela tomada de consciência e pela reação à dor. É uma resposta afetiva à percepção do estímulo doloroso (RAMADABRAN e BANSINATH, 1996). Neste sentido, a dor, além de uma sensação, é uma experiência. Isto é relevante porque as sensações possuem vias neuroanatômicas importantes, com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. Já as experiências incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes. A nocicepção não é uma sensação uniforme, trata-se de um processo neural que envolve vários mediadores e neurotransmissores. A qualidade da dor e o início das respostas protetoras são determinados por muitos fatores na medula espinhal e estruturas cerebrais superiores envolvidas na integração e modificação dos sinais nociceptivos (RUSSO e BROSE, 1998). Existem várias fontes importantes onde mediadores químicos que participam da perpetuação da resposta dolorosa são gerados, das quais se destacam os tecidos lesionados e adjacentes, sistema vascular, células imunes, nervos simpáticos e sensoriais, entre outras. Além disso, existem mecanismos complexos nos quais um transmissor pode agir, via múltiplos receptores que são amplamente distribuídos através dos tecidos periféricos ou centrais (DICKENSON, 1995; SANTOS, 2000).

3.1.2. Classificação dos tipos de dor

A dor pode ser denominada de acordo com o tipo da lesão e/ou dos mediadores envolvidos em “nociceptiva”, “neurogênica”, “neuropática” e “psicogênica”, a qual está associada, respectivamente, com estimulação excessiva dos nociceptores, com lesão ao tecido neural, com a disfunção de um nervo ou com fatores psicológicos. Pode ainda, somando-se a isso, ocorrer manifestações dolorosas decorrentes de algumas desordens comumente apresentadas em pacientes que a experimentam, como a hiperalgesia (sensibilidade exacerbada a um estímulo doloroso), alodínia (dor em resposta a um estímulo não-doloroso) e hiperestesia (sensibilidade anormal a um estímulo sensorial) (BESSON e CHAOUCH, 1987; DRAY, 1994; BESSON, 1999; CARR e GOUDAS, 1999).

Atualmente, o interesse por novas substâncias com atividade analgésica utilizadas principalmente para o controle de vários tipos de dor, inclusive a dor de origem neurogênica, relacionada com a liberação de neuropeptídeos pertencentes à família das taquicininas, entre outros, vem aumentando significativamente. Vários modelos de nocicepção em animais de laboratório podem ser utilizados para a análise da atividade antinociceptiva de diferentes compostos, no entanto, de uma maneira geral, eles possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como simplicidade, reprodutibilidade, e validade dos resultados obtidos e, principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos. Além disso, as drogas analgésicas podem ser divididas em duas categorias: aquelas que agem em sítios de ação periférica, prevenindo a ativação das terminações nociceptivas ou inibindo a transmissão do impulso aferente; e as que agem em sítios centrais, interferindo diretamente com a transferência da informação nociceptiva ou com a percepção ao estímulo doloroso (SANTOS, 2000).

O processo doloroso é classificado de várias formas, mas o critério temporal é o mais utilizado por levar em consideração o tempo de sua atividade. Quanto à duração de ação, a dor pode ser aguda, transitória ou crônica. Quando o episódio doloroso é transitório, ocorre ativação dos nociceptores sem que haja dano tecidual. A dor aguda geralmente está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores no local da lesão, e pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual (CAAR e GOUDAS, 1999). Já a dor crônica ocorre devido a uma lesão ou patologia, podendo ser perpetuada por outros fatores além daqueles que causaram a dor propriamente dita, e pode permanecer por meses ou anos (LOESER e MELZACK, 1999). A dor crônica pode acarretar conseqüências físicas, comportamentais, mentais, psicológicas e psicossociais, além de envolver grave estresse

emocional. A dor crônica difere substancialmente da dor aguda em relação à sua persistência, alterações adaptativas, tais como neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, e dificuldade de tratamento (IADAROLA e CAUDLE, 1997; BESSON, 1999).

3.1.3. Vias neuronais envolvidas na percepção da dor

Normalmente a sensação dolorosa é iniciada com a detecção de um estímulo nocivo, ou potencialmente nocivo, de natureza mecânica, térmica ou química por sensores periféricos chamados nociceptores. Apesar de o termo sugerir uma estrutura especializada, os nociceptores são terminações nervosas livres associadas a fibras aferentes primárias finas não mielinizadas, denominadas fibras C, com baixa capacidade de condução (0,5-2 m/s) ou mielinizadas, as fibras A δ , que conduzem o impulso nervoso com maior facilidade (10-30 m/s), havendo ainda as fibras (A β) que também são mielinizadas e de grande diâmetro sendo capazes de conduzir rapidamente o estímulo doloroso, respondendo a estímulos periféricos semelhantes. A maioria dessas fibras, originárias de neurônios cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios das raízes medulares dorsais, faz sinapses com neurônios secundários do corno medular dorsal, onde os neurotransmissores são sintetizados e liberados (BESSON, 1999; MILLAN, 2002). Por sua vez, esses últimos dão origem às vias ascendentes da dor, que são responsáveis pela transmissão do impulso às estruturas centrais supra-espinhais. A dor pode originar-se de fibras mielinizadas como também de fibras desmielinizadas. As fibras aferentes dos músculos e vísceras também conduzem informações nociceptivas. Os nervos desses tecidos apresentam terminações sensoriais finas que se ramificam nos tecidos periféricos e são ativados por vários estímulos (mecânico; térmico e químico). As fibras aferentes primárias “C” de pequeno calibre e não mielinizadas e as fibras A δ de médio calibre e mielinizadas são responsáveis por enviar esses estímulos nocivos a partir dos tecidos injuriados, transportando informações nociceptivas, principalmente pelas lâminas superficiais (I e II) e profundas (V e VI) e também pela lâmina X do corno dorsal da medula. As fibras A β de grande calibre, mielinizadas e de condução rápida, transmitem informações relacionadas a estímulos mecânicos inócuos para lâminas mais profundas (III-VI) (MILLAN, 2002).

Classicamente, a transmissão da dor se faz por uma via bem estudada e conhecida. Os nociceptores primários fazem uma sinapse no corno dorsal da medula espinhal com neurônios de segunda ordem, predominantemente na lâmina II (SG) da medula espinhal. Os neurônios

de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender o trato espinotalâmico, projetando suas fibras terminais principalmente ao tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatosensor, onde a somatização do estímulo nocivo ocorre, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor (RUSSO e BROSE, 1998). A transmissão da dor descrita acima representa a sua via clássica, mas existem outras vias possíveis, envolvendo estruturas nervosas diferentes (BESSION, 1999; JABBUR e SAADÉ, 1999).

As principais vias ascendentes nociceptivas são as vias espinotalâmicas ventrais e dorsais. As ventrais incluem os tratos neoespinotalâmico e espinocervicotalâmico e o sistema pós-sináptico da coluna dorsal, que terminam em núcleos talâmicos, predominantemente no núcleo ventrocaudal, de onde partem as radiações talâmicas para o córtex somestésico. Tais vias e núcleos estão envolvidos com o aspecto sensitivo-discriminativo da dor. Por outro lado, as vias do grupo espinotalâmico dorsal incluem os tratos paleoespinotalâmico e paleotrigeminotalâmico, que terminam diretamente nos núcleos mediais e intralaminares do tálamo, bem como os tratos espinoreticular e espinomesencefálico e o sistema ascendente multissináptico proprioespinhal. As vias neurais espinotalâmicas dorsais terminam, ainda que indiretamente, nos mesmos núcleos talâmicos inervados pelas vias ventrais, depois de fazerem sinapse na formação reticular do tronco cerebral e na substância cinzenta periaquedutal (SCP). Da SCP ventral partem também as vias reticulotalâmicas, que constituem projeções para diversas regiões do sistema límbico. Por essas razões, acredita-se que as vias espinotalâmicas dorsais, ao inervarem núcleos como o sistema límbico, estariam relacionadas aos aspectos afetivo-motivacionais da dor (MELZACK e WALL, 1965; MILLAN, 2002).

A modulação descendente da dor, a ser explicada posteriormente, depende da via que liga a SCP ao núcleo magno da rafe (NMR), de onde partem fibras serotoninérgicas, que seguem pelo funículo dorso-lateral (DLF) até alcançarem a SG (lâmina II de Rexed) da medula espinhal. Neste local, são ativados os interneurônios inibitórios, que bloqueiam a passagem do impulso doloroso proveniente da periferia através da liberação de encefalinas, peptídeos com atividade opióide (FIELDS e BASBAUM, 1999). Sabe-se atualmente que a injeção local de morfina na SCP também causa um efeito analgésico que é bloqueado por naloxona, o antagonista específico da morfina, ou por lesões do NMR ou das vias descendentes para a medula espinhal. Além disso, antagonistas serotoninérgicos ou inibidores da síntese neuronal deste neurotransmissor, inibem a analgesia obtida da estimulação elétrica da SCP. Em nível de medula espinhal, parece que a modulação da sinapse entre neurônios de primeira e segunda ordem também pode envolver, além das encefalinas, outros

neurotransmissores como a dopamina e o GABA (SORKIN et al., 1992; SORKIN e WALLACE, 1999).

Assim sendo, os mediadores químicos dentro do cérebro podem produzir efeitos lentos e de longa duração, podem agir muito difusamente, distantes do seu local de ação, e produzir efeitos diversos, afetando a condutância iônica das células pós-sinápticas. A transmissão química da dor através das vias sensoriais aferentes depende da liberação de várias substâncias (neurotransmissores algícos), tais como: noradrenalina, serotonina (5-HT), acetilcolina (ACh), aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), aminoácidos inibitórios (GABA [ácido γ - amino butírico] e glicina), histamina, óxido nítrico (NO), prostaglandinas e peptídeos sensoriais (RANG, BEVAN e DRAY, 1994). A modulação da dor através de fibras eferentes também obedece à mesma dinâmica e nesse sentido diversos neurotransmissores contribuem alterando o limiar doloroso, são eles, a noradrenalina, dopamina e 5-HT atuando em vias e receptores específicos, e ainda os opióides endógenos, como as encefalinas e endorfinas entre outros. Desta forma, alguns neurotransmissores desempenham um papel dúbio na intrincada dinâmica que envolve o processo doloroso. O conhecimento da natureza dessas substâncias e dos mecanismos pelos quais estimulam as terminações nervosas sensoriais pode conduzir à descoberta de novos fármacos com propriedades analgésicas distintas das que existem atualmente (MOGIL e GRISEL 1998; GRÜBB, 1998; MILLAN, 2002).

Muitos mecanismos moleculares envolvidos na sensibilização central já foram estabelecidos, mas os mecanismos de sensibilização periférica ainda não foram completamente elucidados. O conhecimento da biologia molecular dos receptores permitiu um extraordinário progresso no entendimento do mecanismo de ação de diversos neurotransmissores e drogas envolvidas na modulação central e periférica da nocicepção. O mecanismo de transdução neuroquímica da dor envolve, geralmente, a interação dos mediadores inflamatórios com um canal iônico da membrana tipo voltagem-dependente (canais de sódio, potássio e cálcio), com canais iônicos operados por receptor (receptor NMDA [N-Metil D-Aspartato], receptor colinérgico nicotínico), com receptores associados à tirosina quinase ou ainda com receptores de membrana que usualmente encontram-se acoplados à proteína G, como é o caso dos receptores das prostaglandinas e bradicinina (LEVINE e TAIWO, 1994; MILLAN, 1999, CALIXTO et al., 2000). Esses mecanismos de transdução nociceptiva normalmente envolvem a ação de mediadores inflamatórios em receptores específicos que se encontram acoplados a sistemas efetores que, quando devidamente ativados, promovem a liberação de uma série de mediadores algícos formados

em cascata, além de segundos mensageiros, como o AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) e GMPc (guanosina 3',5'-monofosfato cíclico), responsáveis pela ativação de proteínas quinases intracelulares, ou de terceiros mensageiros, como o Ca²⁺ (cálcio). Os terceiros mensageiros irão interferir na atividade de outras proteínas celulares e na regulação de canais iônicos. Os principais sistemas efetores dos receptores ativados pelos mediadores inflamatórios são representados pela adenilato ciclase, guanilato ciclase, fosfolipase C (PLC), fosfolipase A₂ (PLA₂), tirosina quinase, proteínas quinase A, C e G e canais iônicos (DRAY e PERKINS, 1997; MILLAN, 2002).

Os receptores das prostaglandinas, bradicinina, histamina, serotonina e adenosina encontram-se acoplados à proteína G, porém a diferentes sistemas efetores. Os mediadores inflamatórios ao interagirem com tais receptores ativam os respectivos sistemas efetores promovendo a regulação funcional dos receptores, que incluem, a depender do estímulo, uma regulação crescente, ou uma regulação decrescente (CHAPMAN e DICKENSON, 1992; MALMBERG e YAKSH, 1994; WOOD e DOCHERTY, 1997; CALIXTO et al., 2000).

3.1.4. Principais neurotransmissores e mecanismos envolvidos na modulação da dor

Além das vias nociceptivas ascendentes necessárias à interpretação da sensação dolorosa, o organismo humano dispõe de sistemas moduladores da dor. Isto significa que o sistema nervoso central (SNC) não serve apenas como um centro receptor destes estímulos, mas que ele também modula a transmissão desta informação e, desta forma, permite-nos selecionar determinadas informações sensoriais como o que ocorre, por exemplo, em circunstâncias de alto estresse para o indivíduo, como é o caso de um acidente de carro. A descoberta destas vias regulatórias da dor iniciou-se em 1965, quando MELZACK e WALL publicaram um importante trabalho, o qual continua sendo revisto até os dias de hoje, onde propuseram a existência de um sistema de controle da dor por comporta, pelo qual a entrada dos impulsos nociceptivos no SNC seria regulada pela atividade de interneurônios inibitórios presentes no corno dorsal da medula espinhal, mais especificamente na área denominada de substância gelatinosa (SG, lâmina II de Rexed). Posteriormente, ocorreram descobertas que demonstraram que a eficácia de comporta também poderia ser regulada por estruturas supraespinhais. Pesquisas subseqüentes comprovaram que a SCP, faz parte de um circuito central que controla a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal (CDME) (FIELDS e BASBAUM, 1999).

Os neuropeptídeos estão presentes em subpopulações de nociceptores aferentes primários em circunstâncias normais. Em tal situação, os neuropeptídeos mais comumente encontrados nos aferentes primários são a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Em condições patológicas, como lesões nervosas e/ou inflamações periféricas, a presença dos peptídeos e seus receptores nos aferentes primários são substancialmente alterados. Outros peptídeos estão normalmente presentes nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal em pequenas quantidades em condições fisiológicas (RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999; FÜRST, 1999).

Os mecanismos modulatórios compreendem vias acessórias ou neurônios especializados capazes de realizar uma mudança no padrão de condução do impulso doloroso, facilitando a chegada do impulso ao local onde este será processado ou sentido. De especial importância para o entendimento destes processos são os conceitos de inibição descendente (ID) e facilitação descendente (FD). A inibição descendente é um mecanismo de regulação responsável por diminuir a transmissão da resposta dolorosa, diminuindo a intensidade de transmissão ou inibindo pontos-chaves da via. Classicamente, a inibição descendente pode ser produzida por dificultar a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica entre dois neurônios da via clássica, inibindo a ativação do neurônio de projeção ou ativando um interneurônio inibitório. Já a facilitação descendente é um mecanismo responsável por aumentar a transmissão da resposta dolorosa, facilitando ativação de neurônios e outros mecanismos que façam o mesmo. A facilitação descendente pode ser produzida por facilitar a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica entre dois neurônios da via clássica, facilitando a ativação do neurônio de projeção ou ativando um interneurônio excitatório. A ativação de interneurônios é considerada uma modulação indireta para ambos os processos. Ambos agem continuamente em todos os processos de transmissão dolorosa; o predomínio de um deles determinará a chegada da resposta. Uma grande quantidade de substâncias está envolvida nestes processos, nem todas neurotransmissores (Figura 1). Algumas destas substâncias possuem efeitos contraditórios, ativando ou inibindo ambos os processos, ou ativando diretamente e inibindo indiretamente o mesmo processo. Esta poderia ser uma das razões pela qual a inibição de uma via não eliminaria todas as respostas implicadas ao funcionamento desta. Comumente, a facilitação e a inibição determinam a chegada ou não da resposta dolorosa, e não a amplitude desta (MILLAN, 2002).

Anatomicamente, alguns neurônios, sinapses ou vias que não as envolvidas na via clássica de transmissão da dor parecem exercer importante efeito na modulação desta. O trato espinotalâmico parece emitir axônios ao mesencéfalo e à ponte rostral, fazendo sinapses em

complexos nucleares, incluindo o núcleo magno da rafe (NMR) e o núcleo reticular gigantocelular (NRG). Ambas as estruturas parecem estar envolvidas na regulação descendente dos neurônios de segunda ordem (DICKENSON, 1995; RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999; FÜRST, 1999; MILLAN, 2002). Todos os neurotransmissores envolvidos no controle inibitório descendente da transmissão da dor (tais como opióides endógenos, serotonina, noradrenalina) parecem inibir a excitação dos neurônios de segunda ordem na presença de estímulo nocivo (BROMM e LORENZ, 1998; FÜRST, 1999).

As fibras aferentes primárias também estimulam diretamente projeções neuronais, as quais retransmitem mensagens ao cérebro ou ainda indiretamente envolvem projeções neuronais via interneurônios excitatórios. Porém essas fibras também podem se relacionar com interneurônios inibitórios, os quais interagem com projeções neuronais, interneurônios excitatórios ou com os próprios terminais de fibras aferentes primárias, o que pode funcionar como um freio das ações anteriormente mencionadas. A via descendente pode modular a nocicepção por interações com várias estruturas neuronais no corno dorsal da medula; sendo elas: os terminais de fibras aferentes primárias, as projeções neuronais, os interneurônios excitatórios inibitórios intrínsecos e os terminais de outras vias descendentes (MILLAN, 2002).

Atualmente vem se demonstrando que um único transmissor pode interagir com múltiplos receptores e desta forma modificar a atividade neuronal podendo facilitar ou inibir a transmissão nociceptiva. Um exemplo disso é o controle descendente exercido pela serotonina, a qual já possui quinze subtipos de receptores clonados. Desses, alguns são excitatórios e outros inibitórios, o que pode explicar a influência bi-direcional facilitatória e supressiva da serotonina sobre o processamento nociceptivo no corno dorsal da medula. Esse papel contrastante dos diferentes tipos de receptores de serotonina ilustra a complexidade na elucidação e do entendimento do controle exercido pela via descendente na transmissão nociceptiva. Além disso, essa observação indica também que a atribuição de um papel específico para um transmissor ou classe de transmissores para a via descendente pode ser errôneo e ainda que ligantes pudessem apropriadamente ativar ou bloquear tipos individuais de receptores ou combinações selecionadas de receptores, oferecendo a possibilidade da descoberta de novos agentes analgésicos altamente efetivos e bem tolerados. Desta forma, estudos recentes têm indicado então, a ocorrência de certos transmissores tanto no controle descendente como em neurônios intrínsecos do corno dorsal e ou terminais de fibras aferentes primárias, complicando ainda mais a tarefa de desvendar seus respectivos papéis. Neste sentido, torna-se necessário, portanto um conhecimento preciso à cerca da arquitetura

neuronal dentro do corno dorsal bem como sobre a identidade de neurotransmissores individuais liberados pela via descendente. A influência desses neurotransmissores na atividade neuronal por receptores múltiplos e heterogêneos é essencial para um completo entendimento e efetivo atrelamento clínico, de mecanismos de inibição e facilitação descendentes (MILLAN, 1997; RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999; FÜRST, 1999; MILLAN, 2002).

A figura 1 nos fornece uma visão geral da multiplicidade de mecanismos envolvidos na modulação da atividade de vias que participam do controle de inibição descendente, comparados à facilitação descendente. Nos painéis à direita e à esquerda, são indicados mecanismos que modulam a inibição descendente (ID) e a facilitação descendente (FD), respectivamente. Alguns destes agem diretamente e outros indiretamente, via neurônios interventores. Os mecanismos que modulam a inibição descendente, em muitos casos, envolvem ações em células *OFF* na medula rostroventromedial e em neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos, contudo, mecanismos adicionais estão certamente implicados neste controle. Os mecanismos que modulam a facilitação descendente envolvem ações em células *ON* na medula rostroventromedial e em vias descendentes liberadoras de serotonina e adrenalina estão também envolvidos nesta ativação, mas permanecem mal definidas. Ao nível do corno dorsal, pode-se observar que vias inibitórias e facilitatórias descendentes exercem padrões de influência opostos sobre fibras aferentes primárias (FAP), neurônios de projeção (PN), interneurônios excitatórios (INEX) e interneurônios inibitórios (ININ).

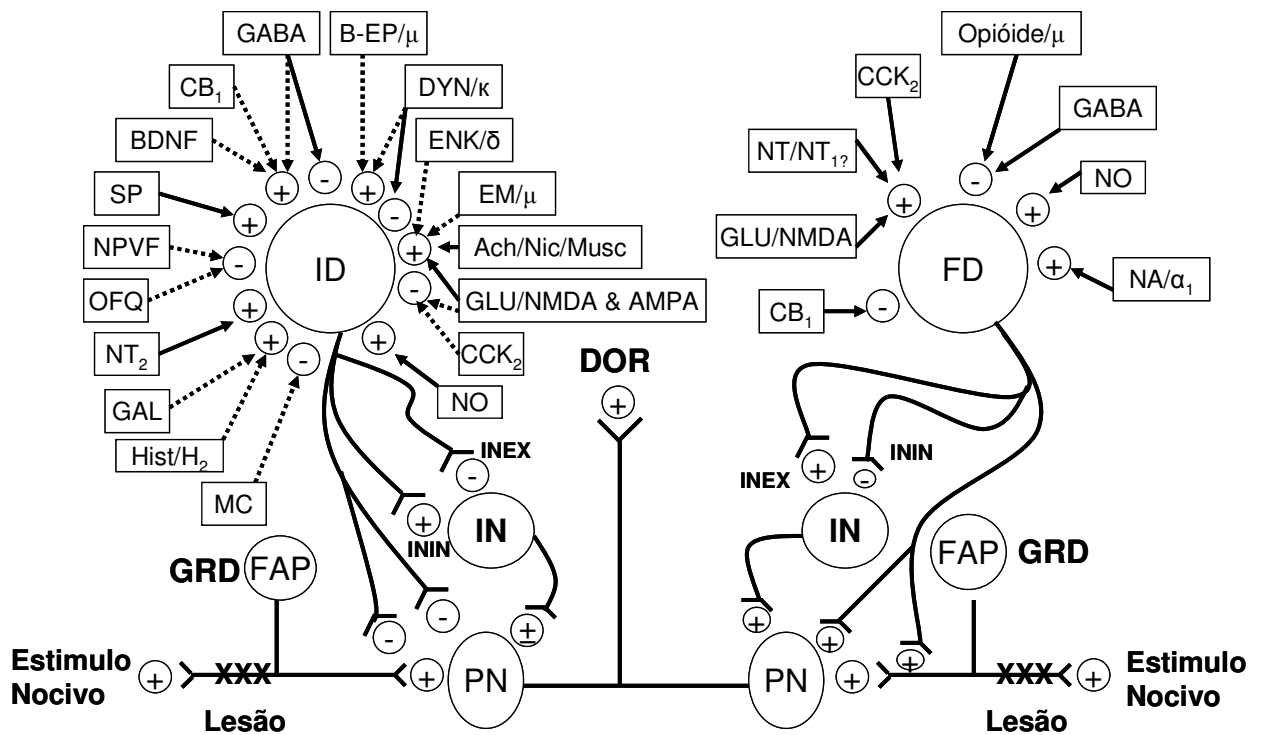


Figura 01: Controle descendente da dor. Multiplicidade de mecanismos envolvidos na modulação da atividade de vias mediando à inibição descendente, comparados à facilitação descendente. FONTE: MILLAN, M. J. *Descending control of pain. Prog. Neurobiol.*, 569: 1-120, 2002.

As abreviações são as seguintes: DRG, gânglio da raiz dorsal; NO, óxido nítrico; CCK, colecistocinina; NT, neurotensina; GLU, glutamato; NMDA, N-metil-d-aspartato; ACh, acetilcolina; Musc., muscarínico; Nic., nicotínico; DYN, dinorfina; ENK, encefalina; β -EP, β -endorfina; EM, endomorfina; GABA, ácido γ -hidroxi-butírico, Hist., histamina; CB, canabinóide; NA, noradrenalina; SP, substância P; NPVF, neuropeptídeo VF e OFQ, orfanina FQ (nociceptina). + (ativação) e - (inibição). Setas contínuas (efeito direto) e setas interrompidas (efeito indireto).

Além das inter-relações entre a via descendente e outros neurônios, é importante ressaltar as interações dessa via com unidades não neuronais no corno dorsal, tais como as células gliais residentes (astrócitos, oligodendrócitos, microglias imunocompetentes) e células T imigrantes. As células T podem infiltrar-se no corno dorsal depois de ocorridos danos à medula espinhal, às fibras aferentes primárias ou a tecidos periféricos, eventos esses que provocam uma perda da integridade da barreira hematoencefálica. O status funcional das células gliais está sujeito à modulação por glutamato, acetilcolina, substância P, GABA, serotonina, noradrenalina, adenosina e outros transmissores originados na via descendente, fibras aferentes primárias e neurônios intrínsecos do corno dorsal. Particularmente notável é

o acúmulo de glutamato, GABA e glicina pelas células gliais, indicando a presença de transmissores excitatórios e inibitórios envolvidos no processo nociceptivo no corno dorsal. Tem sido demonstrado que as células gliais podem regular a transmissão colinérgica e glutamatérgica neuronal via secreção de uma proteína ligante de acetilcolina e modificação da composição da subunidade de receptores NMDA, respectivamente (MILLAN, 2002). Além disso, é importante mencionar que as células gliais e células imunocompetentes geram uma série de fatores, os quais podem influenciar o processo nociceptivo no corno dorsal. Entre esses fatores destacam-se as interleucinas, neurotrofinas e TNF- α (fator de necrose tumoral α) óxido nítrico, prostaglandinas, histamina, ATP, glicina e glutamato. Somando-se a isto tem sido observado que doenças neurológicas ou danos nas fibras aferentes primárias induzem um *up regulation* da atividade das células gliais no corno dorsal que parecem ter importante contribuição na expressão da facilitação descendente e na indução da dor. Desta forma, é provável que essas interações entre a via descendente e unidades não neuronais no corno dorsal, tenham ampla importância no processo nociceptivo espinhal (MILLAN, 2002).

Considerando-se a multiplicidade de mecanismos, conhecidos e desconhecidos, envolvidos na modulação do processo doloroso, a ocorrência na literatura de muitos compostos que possam direta ou indiretamente modular sua transmissão não é surpreendente. Porém, poucos são os que possuem suficiente seletividade de ação e que possam se tornar de interesse clínico. Diante disso, justifica-se a procura pela descoberta de novos fármacos analgésicos, podendo produzir seus efeitos, facilitando a liberação de moduladores analgésicos endógenos ou inibindo a liberação de mediadores algícos através de mecanismos pré ou pós-sinápticos, a nível central e periférico (BESSON, 1999; FURST, 1999).

3.2. Adenosina

A adenosina é uma purina, classificada como neuromodulador endógeno e agonista purinérgico, formada no organismo através do mecanismo bioquímico que envolve a união da base púrica adenina com uma D-ribose (fig.2), originando um dos maiores ribonucleotídeos do organismo (SAWYNOK , 1999).

A adenosina é formada intracelularmente e extracelularmente a partir do ATP via ação das enzimas 5'- endonucleotidase e 5'- ectonucleotidase respectivamente, ela é metabolizada pela adenosina quinase e adenosina deaminase em AMP e inosina, respectivamente (SAWYNOK; DOAK e POON., 1998; SEGHERDAL e SOLLEVI, 1998; SAWYNOK, 1998, 1999). Além disso, a adenosina é transportada bidirecionalmente por transportadores de adenosina na superfície da célula. O efeito modulatório sobre a formação, degradação e o transporte é o que determina os níveis intra e extracelulares de adenosina. A modulação de concentrações de adenosina extracelular por inibidores do metabolismo de adenosina pode produzir efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios dentre outros (SAWYNOK, REID, LIU, 1999; MILLAN, 2002).

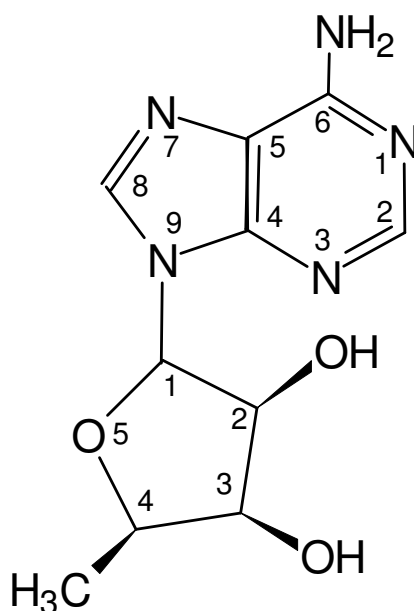


Figura 02: Estrutura química da adenosina

Muitos tecidos produzem adenosina, principalmente como subproduto da degradação do ATP (adenosina trifostato). Entretanto, a adenosina não é enquadrada como um verdadeiro neurotransmissor, mas sim como um neuromodulador, tendo em vista que não há evidências

de seu armazenamento vesicular, nem de uma liberação cálcio dependente em resposta a estimulação no sistema nervoso central ou periférico (SEGHERDAL e SOLLEVI, 1998; SAWYNOK, 1998, 1999; SAWYNOK, REID, LIU, 1999).

A adenosina é liberada não apenas de neurônios, mas também na glia e em outras células, quando a demanda se torna necessária, possivelmente através da operação de sistemas de transporte da membrana (SAWYNOK e SWEENEY, 1989; SEGHERDAL e SOLLEVI, 1998; SAWYNOK, 1998, 1999). Neste sentido, a adenosina pode ser ambigualmente gerada através do SNC por todas as células neuronais e não neuronais, as quais exploram o ATP como fonte de energia e como NT, sendo que no repouso ocorre a produção e manutenção de níveis basais de adenosina. No corno dorsal da medula um “*pool*” bem definido de adenosina é produzido, e ela está envolvida na modulação do processo nociceptivo, por um mecanismo dependente da ativação dos terminais das fibras aferentes primárias. A maquinaria requisitada para a remoção e degradação da adenosina são também localizadas em várias estruturas supra-espinhais, tais como a SCP e bulbo, envolvidos na modulação de controle descendente da dor (SAWYNOK, 1998, 1999; MILLAN, 2002). Contudo, até o presente não se conhece em detalhes os mecanismos pelos quais a adenosina (o sistema adenosinérgico) modula a transmissão nociceptiva através da ativação da via descendente (SEGHERDAL e SOLLEVI, 1998; SAWYNOK e LIU, 2003).

Até o momento quatro receptores para adenosina foram clonados e identificados como: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (figura 03). Os receptores A₁ estão localizados no SNC e interage via proteína G_{i/o} levando a inibição da adenilato ciclase, o que pode levar a facilitação na abertura de canais de K⁺ e a inibição de correntes de Ca⁺². Por outro lado, os receptores A₃ atuam inibindo a adenilato ciclase via proteína Gi/q, mas o seu papel na modulação do processo nociceptivo não é bem compreendido. Já os receptores A_{2A} e A_{2B} estão acoplados à proteína Gs estimulando a adenilato ciclase. Recentemente, foram detectados receptores A_{2B} na medula espinhal, mas não há dados especificamente relevantes do papel destes receptores no processo nociceptivo. O padrão oposto de acoplamento de sítios de receptores, A₁ e A_{2A} a adenilato ciclase e também a diferença na modificação da excitabilidade celular sugere que eles modificam o processo nociceptivo por mecanismos neuronais distintos (SAWYNOK, 1998; CUNHA, 2001; KLINGER; FREISSMUTH e NANOFF, 2002).

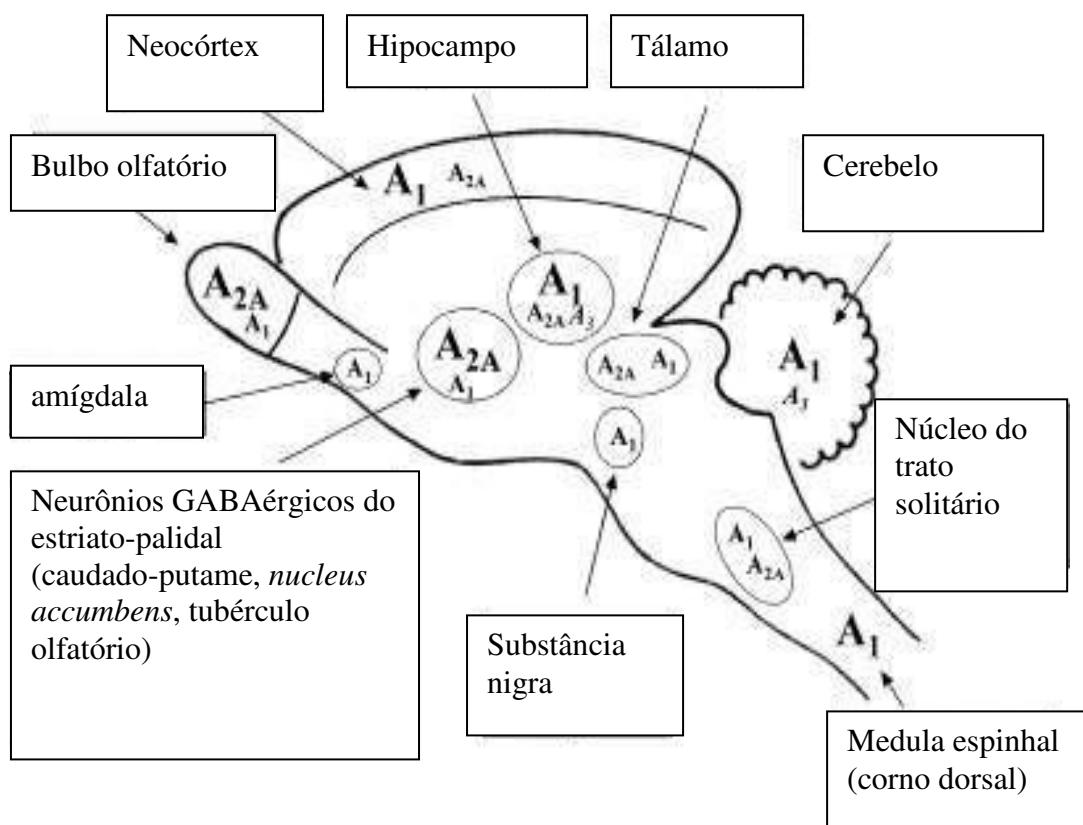


Fig. 03: Distribuição de receptores de adenosina de alta afinidade (A_1 , A_2 e A_3 humano) nas principais regiões do sistema nervoso central aonde a adenosina possivelmente interfere com disfunções cerebrais e doença. Altos níveis de expressão são indicados por letras maiores. Fonte: RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A.M.; MENDONÇA, A. Adenosine receptor in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.*, 68: 337-392, 2003.

Embora estejam presentes em todo o corno dorsal, os receptores A_1 estão concentrados na lâmina superficial, onde eles estão primariamente localizados em neurônios intrínsecos. Além disso, o terminal de fibras aferentes primárias também contém receptores A_1 . A estimulação de receptores A_1 pela administração da adenosina exógena, agonistas A_1 e inibidores da adenosina deaminase e adenosina quinase diminui a transmissão nociceptiva por inibição direta (hiperpolarização) de projeções neuronais e/ou por inibição da liberação de substância P e outros transmissores por fibras aferentes primárias do tipo A δ (SALTER et al, 1993; CARRUTHERS et al, 2001; DEUCHARS; BROOKE e DEUCHARS, 2001).

Têm sido mostrado que a adenosina exerce duas funções primordiais por diferentes vias: Um efeito neuromodulador e um efeito de regulação da homeostase. O efeito de regulação da homeostase da adenosina ocorre através do metabolismo primário, é de ação lenta e duradoura e envolve o controle de correntes iônicas. Já o efeito de neuromodulação é

de ação ultra rápida e envolve a liberação de neurotransmissores. Durante o processo de “stress metabólico” no tecido nervoso (as células gliais ou neurônios entram em sofrimento) ocorre secreção de ATP e degradação de ATP intracelular, em consequência disto aumenta a concentração de AMP, porém em maior quantidade quando comparada à perda do ATP, isso resulta em elevação nos níveis de adenosina. O aumento da concentração de adenosina dentro do meio intracelular faz com que ela seja distribuída para as células circunvizinhas por transportadores bi-direcionais de adenosina não concentração dependente até equilibrar os níveis intra e extracelulares, realizando assim esse controle de regulação do metabolismo. As concentrações basais de adenosina intracelular são de 50 nmol e a extracelular de 0,5 μ mol. A concentração é maior no meio extracelular devido ao mecanismo de produção extracelular para adenosina envolver a enzima ecto 5'-nucleotidase, a qual é mais eficiente do que a 5'-nucleotidase, presente no meio intracelular, onde o ATP secretado para o meio extracelular é convertido a AMP, este por sua vez sofre a ação da enzima ecto 5'-nucleotidase formando adenosina, sendo essa via muito mais eficaz do que a intracelular. O papel da adenosina como metabólito retaliatório (resposta rápida e contrária) significa que a mesma é gerada em resposta ao “stress metabólico” para combater o stress (LINDEN, 2001; CUNHA, 2001).

Os receptores A_1 de adenosina presentes nos axônios estão relacionados à neuroproteção (controle da homeostase) e fazem isso através da inibição da liberação de neurotransmissores, diminuindo a excitabilidade e conseqüente excitotoxicidade. Durante a anóxia ocorre despolarização persistente, mudando o potencial do neurônio, resultando em diferenças no equilíbrio iônico e no equilíbrio elétrico. A presença da função regulatória da adenosina envolvendo receptores A_1 (inibitórios) e A_2 (facilitatórios) foi demonstrada no estriado, hipocampo, núcleo do trato solitário (NTS), colículo superior, íris e vasos deferentes entre outros. Especificamente no hipocampo, no NTS e nos vasos deferentes verificou-se a presença de receptores A_{2A} . A estimulação dos receptores A_{2A} envolve a modulação de diversos neurotransmissores, entre eles a dopamina, noradrenalina, glutamato e serotonina. Além disso, a ativação dos receptores A_{2A} podem estimular a liberação de proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) as quais apresentam efeitos distintos em diferentes sítios cerebrais. Já os receptores A_1 produzem respostas inibitórias nas regiões do tálamo, tronco cerebral, substância nigra, amígdala lateral, núcleo supra óptico hipotalâmico, neurônios da SCP e núcleos arqueado e supraquiasmático (SAWYNOK, 1999; LAO et al., 2001; CUNHA, 2001; OKADA et al, 2001).

A região dorsal do hipocampo contém uma população muito densa de receptores A_1 , e grande quantidade do neuromodulador adenosina. A amígdala, por outro lado, contém um

número muito menor de receptores A₁ de adenosina. Resultados de vários estudos mostraram que a cafeína, um antagonista não seletivo de receptores de adenosina, influencia o aprendizado e a memória em humanos e animais de laboratório (SALTER et al., 1993; GHELARDINI et al, 1997; SAWYNOK et al., 1998; SAWYNOK, REID e ESSER, 1999).

Estudos recentes têm sugerido que o receptor A₂ é fisiologicamente relevante na isquemia cerebral, em distúrbios neurológicos e processos neurovegetativos como a doença de Parkinson. O papel modulador da adenosina no neurotransmissor dopamina e no receptor NMDA indica a possibilidade terapêutica potencial dos receptores de adenosina nas distúrbios do sistema nervoso central, tais como a esquizofrenia, a demência e a depressão. Estudos em humanos com antagonistas seletivos e não-seletivos de receptores A_{2A}, têm indicado que a atividade da estimulação motora dos receptores A_{2A} pode reduzir a hipocinesia e o tremor associado à doença de Parkinson (MOREAU e HUBER, 1999).

Alguns dos efeitos fisiológicos da adenosina são a indução do sono, via receptores A_{2A}, e a diminuição da ansiedade, tendo sido demonstrado um potencial ansiolítico em modelos comportamentais em animais, além de neuroproteção na isquemia cerebral, através da inibição do glutamato (A_{2A}); facilitação da memória, tanto com agonistas A₂ como com agonistas A₁ (RIBEIRO, 1999; LAO et al, 2001; RIBEIRO et al., 2003; LUKASHEV, OTHA e SITROVSKY, 2004).

Tem sido sugerido que a antinocicepção espinhal produzida pelo agonista de receptor μ -opióide envolve a liberação de adenosina mediada por um carreador presente nas fibras aferentes primárias nociresponsivas (SALTER et al, 1993). Além disso, foi relatado efeito antinociceptivo sinérgico com agonistas dos receptores A₁ juntamente com os agonistas de receptores opióides do tipo μ , κ e δ (DELANDER e HOPKINS, 1986; SAWYNOK; REID e NANCE, 1991; DELANDER e KEIL, 1994; LAVAND'HOMME e EISENACH, 1999). Por outro lado, têm sido demonstrado que antagonistas de receptores A₁ produzem respostas hiperalgésicas sugerindo que eles podem controlar o processo nociceptivo no corno dorsal, e que a produção de adenosina endógena é aumentada em condições de estado doloroso de longa duração (SAWYNOK e SWEENEY, 1989; POON e SAWYNOK, 1998). A estimulação de receptores NMDA (N-Metil-D-aspartato) pode contribuir para este aumento da geração de adenosina em projeções neuronais e, reflete um mecanismo de feedback negativo, o qual reduz a liberação de glutamato das fibras aferentes interferindo com a sensibilização de projeções neuronais via receptor NMDA (DICKENSON, SUZUKIA e REEVE, 2000; SUZUKI et al, 2001). YANG et al. (1996) também demonstraram que a dopamina parece ter um importante papel na antinocicepção produzida pela adenosina.

Estudos em humanos mostram que infusões de adenosina em baixas doses aumentam o limiar de dor, reduzem a necessidade de analgésicos no pós-operatório e reduzem a dor provocada por danos ao nervo e ou inflamação (SAWYNOK, REID, LIU, 1999; GYLLENHAMMAR e NORDFORS, 2001). Já está bem estabelecido que a adenosina liberada dos tecidos biológicos durante a hipóxia e condições isquêmicas pode reduzir a atividade neuronal e, portanto o consumo de oxigênio, apresentando um efeito neuroprotetor (LIANG e JACOBSON, 1998; RALEVIC e BURNSTOCK, 1998; ZHAO et al, 2000; PATEL et al 2001; PINNOCK e LEE, 2001).

A ativação dos receptores A_1 pode gerar um efeito neuroprotetor indireto, porém similar, através do antagonismo a catecolaminas que atuam sobre os receptores adenilato ciclase dependentes. Tal efeito leva à diminuição do influxo de Ca^{+2} através de canais específicos, o que pode ser responsável pela inibição da liberação de neurotransmissores; outros mecanismos podem também estar envolvidos neste processo (RIBEIRO et al, 2003). Além disso, tem sido proposto que o receptor A_1 coexiste com receptores opióides e adrenérgicos do tipo μ e α_2 , respectivamente (ALEY e LEVINE, 1997).

Vários estudos demonstram que a administração de agonistas dos receptores A_1 de adenosina, na pata de ratos, produz efeito antinociceptivo, quando testado na hiperalgesia mecânica, bem como no modelo de nocicepção causada pela formalina (TAIWO e LEVINE, 1991; LAVAND'HOMME e EISENACH, 1999). Esse receptor foi implicado na modulação da nocicepção na medula espinhal e na periferia. Isto pode envolver a inibição da liberação de neurotransmissores sensoriais, porque receptores A_1 mostraram mediar à inibição da liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina de neurônios sensoriais sensíveis a capsaicina na medula espinhal e na periferia, assim como inibir correntes de GABA em neurônios ganglionares dorsais (DEUCHARS, BROOKE e DEUCHARS, 1997; RALEVIC e BURNSTOCK, 1998; MAUBORGNE et al, 2002). Contudo, a administração local de agonistas dos receptores A_2 pode estimular a resposta nociceptiva nesses modelos, ação esta relacionada a ativação dos receptores A_{2A} (TAIWO e LEVINE, 1991; DOAK e SAWYNOK, 1995; ZHAO et al, 1999). Entretanto, recentemente tem sido demonstrado que a ativação de receptores adenosinérgicos do tipo A_{2A} também é responsável por diminuir a resposta nociceptiva em animais (KHANDWALA, ZHANG e LOOMIS, 1998; BORGHI et al, 2002; LI et al, 2002).

Além disso, a aplicação local de agonista dos receptores A_3 também produz atividade nociceptiva intrínseca semelhante aquela causada pela formalina, bem como amplifica a resposta dolorosa causada por baixa concentração de formalina (SAWYNOK, 1999).

WU et al. (2002) demonstraram que a inibição de receptores A₃ resulta em redução do processo inflamatório mas não a sua abolição. A ativação desses receptores facilita a liberação da histamina de mastócitos, o que contribui para o processo inflamatório. Ao que tudo indica esses receptores não têm papel na modulação da nocicepção e não estão envolvidos no efeito antinociceptivo espinhal (SAWYNOK , REID e LIU, 1999; WU et al, 2002).

Estudos têm demonstrado a participação de receptores de adenosina influenciando processos funcionais como o sono, a cognição e a memória, como também maturação neuronal. Além disso, a adenosina participa de um grande número de processos fisiológicos, como vasomotricidade, resposta imunológica, resposta inflamatória, lipólise e processos de dor central e periférica (PORKKA-HEISKANEN et al., 2002; RIBEIRO, SEBASTIÃO e MENDONÇA, 2003; HASKÓ e CRONSTEIN, 2004)

Outros estudos vêm demonstrando que os inibidores de degradação da adenosina apresentam importante efeito antinociceptivo em vários modelos de nocicepção (carragenina, formalina). Desta forma, além da utilização de agonistas seletivos dos receptores de adenosina para o controle da transmissão dolorosa e da inflamação, existe uma outra alternativa que é a utilização de drogas que inibem a adenosina deaminase responsável pela metabolização da adenosina (NAGY e DADDONA, 1985; SAWYNOK, DOAK e POON, 1998; POON e SAWYNOK, 1998; RIBEIRO, 1999; LIU, WITHE e SAWYNOK, 2000).

Atualmente a aplicação terapêutica da adenosina na clínica se restringe a algumas patologias cardíacas específicas. Em alguns países há estudos demonstrando o potencial terapêutico dela sendo testado em processos dolorosos pós cirúrgicos em humanos (POON e SAWYNOK, 1995; FUKUNAGA, ALEXANDER e STARK, 2003).

Como demonstrado acima, a adenosina está envolvida na modulação de funções biológicas fundamentais. Tanto ela própria quanto seus análogos, pode representar uma nova e importante ferramenta farmacológica para o controle da dor, principalmente da neuropática, onde o arsenal terapêutico disponível na clínica para o tratamento desse tipo de dor é ainda muito controverso. Considerando que ainda falta estabelecer a relação entre a adenosina e as regiões envolvidas no processo doloroso, bem como esclarecer o mecanismo de ação pelo qual essa interação ocorre, o presente estudo analisou, através de métodos farmacológicos, alguns dos mecanismos responsáveis pela ação antinociceptiva da adenosina, visando ampliar os atuais conhecimentos sobre a participação da adenosina no processo doloroso.

4.0. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos "Swiss" machos (6-10 animais por grupo de experimento), entre 2 a 3 meses de idade, pesando entre 25 e 35 g, mantidos no Biotério Central da UNIVALI. Os animais foram mantidos à temperatura controlada (20 ± 3 °C), em ciclo claro/escuro de 12 h e tratados com água e ração *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório por um período de adaptação de pelo menos 1 h antes da realização dos experimentos, os quais foram conduzidos entre 8 e 17 h à temperatura de 20 ± 3 °C. Os experimentos foram realizados de acordo com orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

4.2. Drogas e reagentes usados

No presente estudo foram utilizados as seguintes substâncias e soluções: formaldeído, cloridrato de morfina (Merck AG, Darmstadt, Alemanha), N^G-nitro-L-arginina (L-NOARG), L-arginina, D-arginina, glutamato, haloperidol, apomorfina, ioimbina, clonidina, cetanserina, capsaicina, cafeína, adenosina, naloxona, (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, EUA), dimaleato de metilsergida (Sandoz AG, Baesel, Suíça), baclofeno, faclofeno, muscimol, bicuculina, DPCPX [1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina], ZM241385 4-(2-[7-Amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazol[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol, (Tocris, Balwin, MO, EUA), solução tampão de fosfato (PBS) (Merck do Brasil), solução salina (NaCl 0,9%). Os demais sais e reagentes utilizados foram de alto grau de pureza analítica e procedência Merck. As diluições foram realizadas em NaCl estéril (0,9%) ou PBS (exceto as que necessitem de Tween 80 ou DMSO [dimetilsulfóxido]) à temperatura ambiente. A metilsergida, o haloperidol e a apomorfina foram solubilizados em solução salina contendo Tween 80, a capsaicina e o DPCPX foram diluídos em etanol absoluto e o ZM241385 em DMSO. A concentração final de etanol, Tween 80 e DMSO não excedeu a 5%, de modo a não influenciar nos efeitos causados pelas drogas. As demais drogas foram solubilizadas em NaCl estéril (0,9%) ou PBS.

4.3. Análise Farmacológica

4.3.1. Atividade antinociceptiva

4.3.1.1. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

Inicialmente foi verificado o efeito antinociceptivo da adenosina no teste da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. Esse modelo é muito específico, permitindo avaliar dois tipos de dor: a dor de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a dor inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). O procedimento utilizado foi similar ao descrito anteriormente (HUNSKAAR, FASMER e HOLE, 1985, HUNSKAAR, BERGE e HOLE, 1986; MURRAY, PORRECA e COWAN, 1988; CORRÊA e CALIXTO, 1993). Os animais receberam 20 µl de formalina 2,5% (0,92% de formaldeído) na região intraplantar da pata posterior direita. Logo após a injeção da formalina, os animais foram colocados, individualmente, sob funil de vidro invertido, ao lado de um espelho para facilitar a observação. Após foi cronometrado durante 30 min o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina, sendo esse período considerado como indicativo de dor. A dor neurogênica (primeira fase), ocorre nos primeiros 5 min após a injeção da formalina e a dor inflamatória (segunda fase), entre 15 a 30 min., representando a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR e HOLE, 1987; ROSLAND, 1991).

Grupos distintos de animais foram tratados com a adenosina por via intraperitoneal (10-300 mg/kg) ou oral, por gavagem (50-500 mg/kg), 0,5 e 1 h antes da injeção da formalina, respectivamente. Os animais controle receberam igual volume de veículo (PBS, 10 ml/kg) utilizado para diluir a adenosina.

Com o objetivo de verificar o possível efeito antinociceptivo periférico da adenosina, grupos de animais foram tratados pela via intraplantar com adenosina (50-500 µg/pata, co-administrada com a formalina) e em seguida observou-se a resposta nociceptiva causada pela formalina. O grupo controle recebeu o mesmo volume de veículo utilizado para diluir a adenosina (PBS, 20 µl/pata).

A fim de investigar a duração do efeito antinociceptivo da adenosina, grupos distintos de animais foram pré-tratados pela via intraperitoneal (100 mg/kg) ou pela via oral (250

mg/kg) com adenosina, 0,5 a 12 h antes da injeção intraplantar de formalina. Os animais controle receberam igual volume de veículo (PBS, 10 ml/kg) utilizado para diluir a adenosina.

Em outra série de experimentos, também foi investigado o possível efeito antinociceptivo da adenosina administrada após a primeira fase da resposta nociceptiva causada pela injeção de formalina. A finalidade desse experimento foi demonstrar que a atividade antinociceptiva da adenosina não é apenas profilática, já que na maioria dos experimentos as drogas são administradas antes da sensibilização dolorosa. Nesse sentido, grupos de camundongos foram tratados intraplantarmente com formalina e após 5 min receberam o tratamento com adenosina (100 mg/kg) ou veículo (PBS, 10 ml/kg) administrados por via i.p. e foram avaliados em relação à segunda fase da nocicepção causada pela injeção de formalina.

4.3.1.2. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.

Esse modelo foi proposto por SAKURADA et al. (1992) para o estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurogênica. A injeção de capsaicina induz estimulação direta dos neurônios nociceptivos e causa a liberação de vários neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa, incluindo principalmente as taquicininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B) (SAKURADA et al., 1992; 1993). Assim, esse teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação da adenosina com esses neuropeptídeos.

Os animais foram colocados, individualmente, sob funil de vidro transparente por um período de adaptação de, no mínimo, 20 min. Após, cada animal recebeu intraplantarmente 20 µl de solução de capsaicina (1,6 µg/pata) na pata posterior direita, sendo que o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com capsaicina foi cronometrado por um período de 5 min e considerado como indicativo de nocicepção (SAKURADA et al., 1992; 1993). Grupos distintos de animais foram tratados com a adenosina, por via intraperitoneal (10-300 mg/kg) ou por via oral (50-500 mg/kg) 0,5 e 1 h antes da injeção da capsaicina, respectivamente. Os animais controle receberam igual volume do veículo (PBS, 10 ml/kg) utilizado para diluir a adenosina.

Em outra série de experimentos verificou-se o possível efeito antinociceptivo periférico da adenosina na dor neurogênica causada pela capsaicina, para isso grupos distintos de animais foram pré-tratados pela via intraplantar com adenosina (10-300 µg/pata, co-administrada com capsaicina) e em seguida observou-se a resposta nociceptiva causada pela

capsaicina, conforme descrito anteriormente. O grupo controle recebeu o mesmo volume de veículo utilizado para diluir a adenosina (PBS, 20 µl/pata).

4.3.1.3. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.

Este modelo foi proposto recentemente por BEIRITH et al. (1998) e se presta para o estudo de drogas que atuam sobre o sistema glutamatérgico envolvido na transmissão nociceptiva. A injeção de glutamato induz estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando a liberação de vários mediadores inflamatórios e neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa (BEIRITH, SANTOS, CALIXTO, 2002). Assim, esse teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação da adenosina com o sistema glutamatérgico.

Os animais receberam 20 µl de solução de glutamato (10 µmol/pata) na região intraplantar da pata posterior direita. Logo após a injeção do glutamato, os animais foram colocados, individualmente, sob funil de vidro invertido, ao lado de um espelho para facilitar a observação. Após, foi cronometrado durante 15 min o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com glutamato, sendo esse período considerado como indicativo de nocicepção (BEIRITH, SANTOS, CALIXTO, 2002). Grupos distintos de animais foram tratados com adenosina, por via intraperitoneal (30-300 mg/kg, 0,5 h antes da injeção de glutamato) ou intraplantarmente (50-300 µg/pata, co-administrada com glutamato), respectivamente. Os animais controle receberam igual volume do veículo (PBS, 10 ml/kg ou 20 µl/pata) utilizado para diluir a adenosina.

4.3.1.4. Teste da "Placa-Quente"

A atividade antinociceptiva da adenosina foi também analisada no teste da placa quente, que é um modelo de dor muito sensível para fármacos que atuam centralmente como a morfina e seus derivados. Para isso, os animais foram colocados dentro de um cilindro de acrílico sobre uma superfície metálica previamente aquecida a 50 ± 1 °C, utilizando-se um aparelho de banho maria. O tempo em segundos que o animal levou para lambe, morder ou levantar as patas dianteiras sobre a placa previamente aquecida, foi cronometrado e considerado como indicativo de efeito nociceptivo conforme descrito anteriormente (EDDY e LEIMBACK, 1953). Cada animal foi selecionado conforme sua reatividade ao modelo, sendo desprezados aqueles que permaneceram acima de 15 s na placa aquecida sem reagir ao estímulo térmico. O tempo máximo permitido de permanência dos animais no aparelho foi de 30 s para lhes evitar danos teciduais.

Os animais foram pré-tratados 0,5 h antes do experimento com a adenosina (100 mg/kg, i.p.) ou com morfina (10 mg/kg, s.c.) utilizada para comparar com o efeito da adenosina. Os animais controle receberam igual volume do veículo (10 ml/kg) utilizado para diluir a adenosina e a morfina. O tempo de permanência dos animais na placa quente foi convertido em dados percentuais, sendo utilizada a seguinte fórmula: percentagem de efeito máximo (PEM) = $\frac{TF - TI}{30 - TI}$ (tempo final) – TI (tempo inicial) / 30 – TI (tempo inicial) (adaptada de AANONSEN e WILCOX, 1987).

4.3.1.5. Efeito sobre a performance motora no modelo do *Open field*.

A atividade locomotora dos animais foi observada no *Open field* para excluir a possibilidade de que o efeito antinociceptivo da adenosina fosse decorrente de uma possível ação depressora sobre o sistema nervoso central ou periférico. A atividade exploratória dos animais foi analisada pelo modelo do campo aberto (*Open field*). Este modelo foi utilizado para observar como o animal se comporta em amplo ambiente, medindo o seu estado emocional (CRUZ et al, 1977) e determinar o efeito de fármacos sobre a performance motora dos animais, independente de atuarem em nível do sistema nervoso central ou periférico. O aparelho consiste em um campo aberto (caixa de madeira) com a superfície inferior (assoalho) de cor preta (30x30x15cm), dividido em 09 quadrantes de igual área, com um dos lados da caixa de vidro, que permitindo visualizar o comportamento dos animais durante os 5 minutos

do teste), cujas dimensões podem variar de acordo com o tamanho do animal estudado (CRUZ et al, 1977). O teste é simples de ser realizado, consiste na colocação do animal em estudo no referido aparelho e observação do tipo de movimento, distância percorrida, tempo dispendido, tentativas de levantar-se (*rearing*), tentativas de fuga, número de cruzamentos, tempo de imobilização e de latência. Outros parâmetros podem ainda ser avaliados, tais como, a área visitada do campo, interação com estímulos, número de vezes de autolimpeza (*grooming*), ato de cheirar, coçar, escavar, ranger os dentes, vocalização e exploração visual, defecação e tempo de digestão, frequência cardíaca e respiratória (CRUZ et al, 1977; SOUZA, 2003).

Os parâmetros avaliados nesse experimento foram o número de *rearing* (levantamento do corpo sob as patas traseiras para exploração do ambiente) e o número de *crossing* (cruzamento dos quadrantes), utilizados para avaliar a atividade locomotora. Grupos distintos de animais foram pré-tratados pela via i.p. com veículo (grupo controle) ou com adenosina (100 mg/kg). Após 30 minutos, os animais foram submetidos ao teste do *open-field* (campo aberto).

4.3.2. Análise do possível mecanismo de ação antinociceptiva da adenosina.

Nesta etapa do trabalho, procurou-se analisar o(s) possível(eis) mecanismos de ação envolvido(s) na atividade antinociceptiva causada pela adenosina. O modelo escolhido para a realização deste ensaio farmacológico foi o modelo da formalina, já descrito anteriormente no item 4.3.1.1. (SANTOS et al, 1999). Para tal, foram realizados diferentes ensaios farmacológicos *in vivo* utilizando-se vários agonistas e antagonistas específicos, que serão discutidos a seguir.

4.3.2.1. Participação do sistema adenosinérgico.

Para avaliar a participação dos receptores A_1 e A_{2A} na atividade antinociceptiva produzida pela adenosina na nocicepção induzida pela formalina, grupos distintos de animais foram pré-tratados com os antagonistas seletivos dos adenoceptores A_1 , DPCPX (5 mg/kg, i.p.), e A_{2A} (ZM241385, 3 mg/kg, i.p.) e com cafeína (antagonista não seletivo dos adenoceptores, 3 mg/kg, i.p.), 15 min antes da administração da adenosina (100 mg/kg, i.p.). Decorridos 30 min após a administração da adenosina, foi avaliado o efeito desse tratamento

em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Os grupos utilizados como controle foram tratados com a adenosina (100 mg/kg, i.p.), DPCPX (5 mg/kg, i.p.), ZM241385 (3 mg/kg, i.p.), cafeína (3 mg/kg, i.p.) ou com o veículo (10 ml/kg, i.p.) utilizado para diluir a adenosina, 30 min antes da injeção da formalina.

4.3.2.2. Participação do sistema opióide.

Com o objetivo de investigar a participação do sistema opióide sobre o efeito antinociceptivo da adenosina, grupos distintos de animais foram pré-tratados com antagonista opióide não seletivo, naloxona (1 mg/kg, i.p.) 15 min antes da administração da adenosina (100 mg/kg, i.p.) ou de morfina (5 mg/kg, s.c., utilizada como controle positivo). Decorridos 30 min após a administração da adenosina ou morfina, foi avaliado o efeito desse tratamento em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Os grupos utilizados como controle foram tratados com a adenosina (100 mg/kg, i.p.), morfina (5 mg/kg, s.c.), naloxona (1 mg/kg, i.p.) ou com o veículo (10 ml/kg, i.p.) utilizado para diluir a adenosina, 30 min antes da injeção da formalina.

4.3.2.3. Participação da via L-arginina-óxido nítrico.

Em outra série de experimentos, investigou-se a participação da via da L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo causado pela adenosina. Os animais foram pré-tratados com a precursora do óxido nítrico, a L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou com a D-arginina (600 mg/kg, i.p.; isômero inativo da L-arginina), e após 15 min receberam a adenosina (100 mg/kg, i.p.) ou NG-nitro-L-arginina (L-NOARG, 75 mg/kg, i.p., inibidor da sintase de óxido nítrico) (VAZ et al., 1996; BEIRITH et al., 1998). Decorridos 30 min após o tratamento, os animais foram analisados na nocicepção induzida pela injeção de formalina. Os animais controles foram tratados com a adenosina (100 mg/kg, i.p.), L-NOARG (75 mg/kg, i.p.) ou com o veículo (10 ml/kg, i.p.), 30 min antes da injeção da formalina.

4.3.2.4. Participação do sistema serotoninérgico.

Visando investigar a possível participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo causado pela adenosina, os camundongos foram pré-tratados com metilsergida (5 mg/kg, i.p., antagonista serotoninérgico não seletivo), cetanserina (1 mg/kg, i.p., antagonista 5-HT_{2A}) ou somente com o veículo (10 ml/kg, i.p.). Decorridos 15 min, os animais foram tratados com a adenosina (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) e após 30 min foram analisados em relação a ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina.

4.3.2.5. Participação do sistema dopaminérgico.

Para avaliar a possível participação dos receptores dopaminérgicos no efeito antinociceptivo da adenosina, os camundongos foram pré-tratados com haloperidol (0,2 mg/kg, i.p., antagonista não-seletivo dos receptores dopaminérgicos) e, após 15 min, os animais receberam a adenosina (100 mg/kg, i.p.), apomorfina (1 mg/kg, i.p., agonista dopaminérgico) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). Decorridos 30 min, os animais foram analisados em relação a ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina.

4.3.2.6. Participação do sistema GABAérgico.

Com o intuito de investigar a possível participação do sistema gabaérgico (ácido γ -aminobutírico) na atividade antinociceptiva da adenosina, grupos de camundongos foram pré-tratados com bicuculina (0,7 mg/kg, i.p., antagonista seletivo de receptores GABA_A) ou faclofeno (3 mg/kg, i.p., antagonista seletivo de receptores GABA_B), ambos administrados 15 min antes da adenosina (100 mg/kg, i.p.), muscimol (1 mg/kg, i.p., agonista seletivo de receptores GABA_A), baclofeno (1 mg/kg, i.p., agonista seletivo de receptores GABA_B) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) (SHADFIZADEH et al., 1997; MENDES et al., 2000). Decorridos 30 min após os tratamentos, os animais foram analisados em relação a ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina. Os animais controles receberam adenosina (100 mg/kg, i.p.), agonistas gabaérgicos (muscimol e baclofeno, 1 mg/kg, i.p.), antagonista gabaérgicos (bicuculina 0,7 mg/kg, i.p. e faclofeno 3 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), 30 min antes da injeção de formalina.

4.3.2.7. Influência do sistema α_2 -adrenérgico

Com o objetivo de evidenciar a participação do sistema α_2 -adrenérgico sobre a atividade antinociceptiva da adenosina, grupos de animais foram pré-tratados com o antagonista dos adrenoceptores α_2 , ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.), 15 min antes da administração da adenosina (100 mg/kg, i.p.) ou de clonidina (agonista α_2 -adrenérgico, 0,1 mg/kg, i.p.) (controles positivos). Decorridos 30 min após os tratamentos, os animais foram analisados em relação a ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina. Os animais controles receberam adenosina (100 mg/kg, i.p.), clonidina (0,1 mg/kg, i.p.), ioimbina (0.15 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.), 30 min antes da injeção de formalina.

4.3.2.8. Influência da adrenalectomia

Em outra série de experimentos, investigou-se a participação dos glicocorticóides endógenos na atividade antinociceptiva da adenosina, grupos de animais foram anestesiados com hidrato de cloral (0,7 g/kg, i.p.) e após as glândulas adrenais foram retiradas através de uma incisão na região dorsal do animal como descrito anteriormente (SANTOS et al., 1995_{a,b}; VAZ et al., 1996, BEIRITH et al., 1998). Após a cirurgia os animais retornaram para suas caixas moradias, tendo livre acesso à água e comida, sendo que para os animais operados foi substituída a água por solução fisiológica para manter a concentração fisiológica de sódio no plasma. Outros grupos de animais falso-operados tiveram livre acesso à água e comida. Decorridos o período de 7 dias os animais operados e ou falso-operados foram tratados com a adenosina (100 mg/kg, i.p.) e foi analisado a possível reversão do efeito antinociceptivo da adenosina em relação à nocicepção causada pela formalina.

4.4. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média para cada grupo de experimentos, exceto as DI_{50} s (dose da adenosina que reduz a resposta em 50% em relação ao grupo controle), que foram apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança, em nível de 95%.

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de análise da variância seguida pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Dunnett e/ou Newman-Keuls, quando apropriado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados como indicativo de significância. As DI_{50} s foram estimadas a partir de experimentos individuais utilizando-se o método de regressão linear através do programa GraphPad® (Prism).

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisadas as propriedades antinociceptivas da adenosina, demonstrando que esta apresenta efeito significativo quando analisada em vários modelos de dor neurogênica e inflamatória em camundongos. Além disso, foi também investigado os possíveis mecanismos de ação que poderiam estar contribuindo para o efeito antinociceptivo apresentado por esta.

5.1 Atividade antinociceptiva induzida pela adenosina em camundongos.

5.1.1. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina.

È importante observar, no presente estudo, que a adenosina administrada pelas vias oral e intraperitoneal, apresentou significativa ação antinociceptiva, tanto da dor de origem neurogênica (primeira fase) como a dor de origem inflamatória (segunda fase) no modelo da formalina (Figuras 4 e 5), o qual foi descrito inicialmente por DUBUISSON e DENNIS (1977) em gatos e ratos. Atualmente este teste vem sendo amplamente empregado para pesquisa de drogas antinociceptivas em roedores, principalmente ratos e camundongos (para revisão ver TJØLSEN e HOLE, 1997). Esse teste consiste na injeção intraplantar de solução de formaldeído diretamente na pata posterior do animal, sendo conhecido por induzir intensa dor pela estimulação direta dos nociceptores. A dor, causada pela injeção intraplantar de formalina, é caracterizada por vigorosas lambidas, mordidas e batidas na pata injetada com o irritante. Neste modelo, podem ser caracterizadas duas fases distintas de nocicepção, que parecem envolver diferentes mediadores (DUBUISSON e DENNIS, 1977; HUNSKAAR, FASMER e HOLE, 1985; HUNSKAAR e HOLE, 1987; SANTOS e CALIXTO, 1997_{a,b}). A primeira fase (fase inicial) inicia-se imediatamente após a injeção da formalina, estendendo-se pelos primeiros 5 min, o que se acredita dever-se à estimulação química direta dos nociceptores (DUBUISSON e DENNIS, 1977; HUNSKAAR, FASMER e HOLE, 1985, HUNSKAAR, BERGE e HOLE 1986), predominantemente das fibras aferentes do tipo C e, em parte, as do tipo Aδ (HEAPY, JAMIENSON e RUSSEL, 1987). A segunda fase (fase tardia) da nocicepção, observada nesse modelo, ocorre entre 15 - 30 min após a injeção de formalina estando a resposta observada relacionada principalmente com a liberação de vários mediadores químicos pró-inflamatórios (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJØLSEN e HOLE, 1997).

Segundo resultados descritos na literatura a primeira fase está associada com a liberação de vários mediadores químicos, como a substância P, o glutamato e a bradicinina (fase da dor neurogênica), enquanto que na segunda fase os mediadores químicos detectados foram a histamina, serotonina, prostaglandinas e a bradicinina (fase da dor inflamatória), sendo ambas as fases induzidas pelo agente flogístico formalina (HUNSKAAR e HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989; TJØLSEN et al., 1992; CORRÊA e CALIXTO, 1993; TJØLSEN e HOLE, 1997).

Vários estudos disponíveis na literatura mostram que a nocicepção causada pela injeção intraplantar de formalina envolve diferentes mediadores químicos os quais, conseqüentemente, ativam vários receptores e induzem a formação de distintas sinalizações intracelulares (HUNSKAAR, FASMER e HOLE, 1985; HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJØLSEN e HOLE, 1997; SANTOS e CALIXTO, 1997_b). Desta forma, esse modelo representa uma ferramenta farmacológica muito interessante para o estudo de novas drogas antinociceptivas. Por outro lado, a dor induzida pela formalina possui vários aspectos que a tornam de interesse, quando comparada com outros modelos de dor, sendo a mais relevante sua semelhança com a dor clínica (TJØLSEN e HOLE, 1997).

Análogos da adenosina há muito tempo vêm sendo estudados por diferentes grupos de pesquisa (SAWYNOK e SWEENEY 1989, SAWYNOK, 1998, 1999; MILLAN, 1999; BASTIA et al., 2002; BORGHI et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003), sendo a eles atribuídos várias atividades farmacológicas, podendo ser destacadas suas ações benéficas no tratamento da dor pós-operatória, sua ação neuroprotetora durante a hipóxia e condições isquêmicas, e sua ação neuromoduladora (SAWYNOK, 1998, 1999; MILLAN, 2002). Recentemente, a adenosina tem recebido considerável atenção com relação ao seu papel na modulação da nocicepção. Além disso, evidências sugerem que os receptores adenosinérgicos do tipo A₁ e A_{2A} estão envolvidos no controle da transmissão nociceptiva (BORGHI et al., 2002).

O nosso interesse no estudo do papel modulatório da adenosina no controle da dor, deve-se ao fato que na literatura existem poucos estudos que mostram que a adenosina endógena apresenta efeito antinociceptivo (GOMES, et al, 1999; SAWYNOK,1999; BASTIA et al., 2002; BORGHI et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003), aliado ao fato que o seu mecanismo de ação ainda não foi esclarecido. Além disso, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa também revelaram que a adenosina apresenta uma importante ação antiinflamatória, sendo estes resultados obtidos no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, bradicinina e substância P e no modelo de edema de orelha causado pela

capsaicina e óleo de cróton, em camundongos, sendo capaz de inibir tanto os eventos celulares quanto os vasculares presentes no processo inflamatório (LAPA, 2000).

Inicialmente foi verificada a duração do efeito antinociceptivo causado pela adenosina administrada pela via i.p. ou oral, com o objetivo de determinar o tempo ideal de tratamento para a realização dos experimentos subseqüentes, para isto grupos distintos de camundongos receberam adenosina, via i.p. (100 mg/kg) ou oral (250 mg/kg), e foram avaliados no modelo de nocicepção induzida pela formalina até 12 horas após a sua administração. Os resultados apresentados na Figura 4 mostram que a resposta antinociceptiva da adenosina foi observada já a partir de 30 min após sua administração pela via i.p. e 60 min pela via oral, sendo significativo até 6 e 8 horas, respectivamente. Esses dados são interessantes e também relevantes, tendo em vista que mostram claramente que a adenosina apresenta atividade antinociceptiva de longa duração tanto administrada pela via oral quanto pela via intraperitoneal (Figura 4). Os nossos dados além de serem inéditos indicam que a adenosina atua modulando a liberação de vários mediadores químicos que estão envolvidos na nocicepção induzida pela formalina.

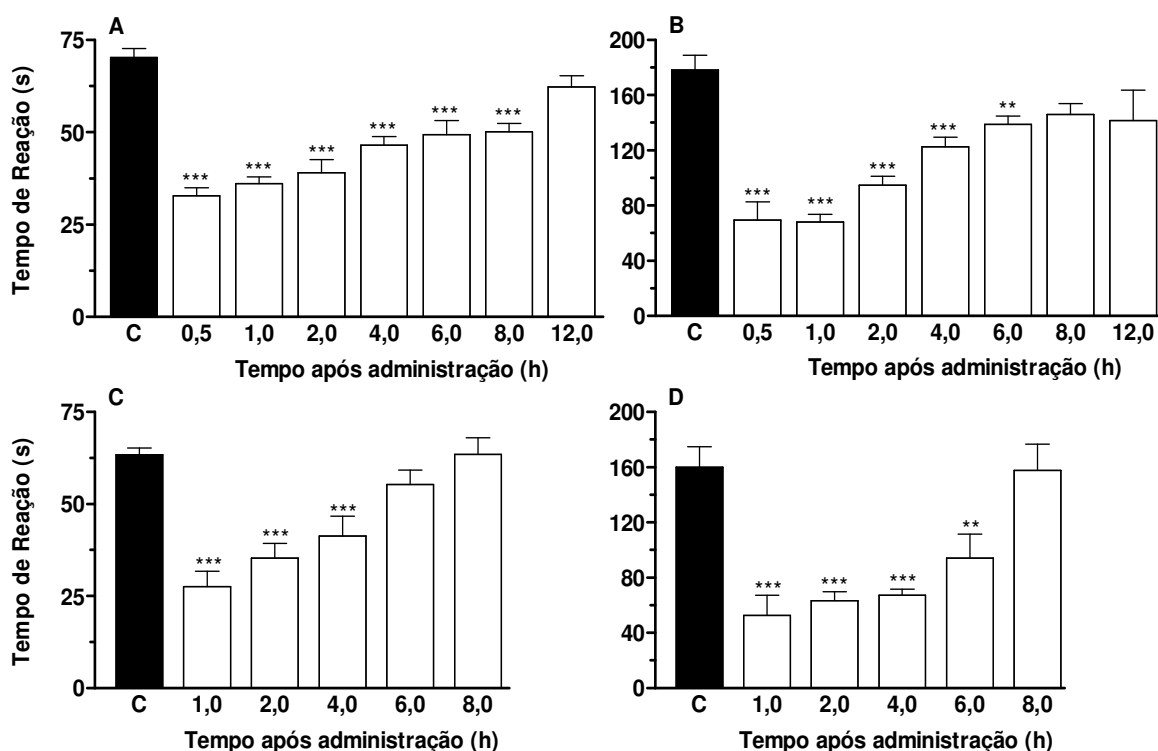


Figura 04: Duração do efeito antinociceptivo da adenosina, administrada pela via i.p. (100 mg/kg, i.p., painéis superiores) ou pela via oral (250 mg/kg, painéis inferiores), em relação à primeira (painéis A e C) e a segunda fase (painéis B e D) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em 20 μ l) em camundongos. As barras fechadas representam os grupos (controle) e as barras abertas os grupos (adenosina). Cada grupo representa a média de 6 – 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Já os resultados apresentados na Figura 5 (A - F) e os dados da Tabela 1 mostram que a adenosina, administrada por via i.p. ou oral (10-500 mg/kg,) ou intraplantar (10-500 μ g/pata) causou significativa inibição de maneira dependente da dose, de ambas as fases da dor induzida pela formalina. As DI_{50} s calculadas tanto para a primeira quanto para a segunda fase da dor induzida pela formalina, bem como os valores de inibição estão apresentados na Tabela 1. Esses resultados mostram pela primeira vez, que a adenosina, administrada por via oral e intraplantar (em co-administração com a formalina), também foi efetiva em reduzir, de forma significativa e dependente da dose, a nocicepção causada pela formalina. Todavia, a adenosina, administrada pela via oral, foi menos efetiva quando comparado com a via i.p. no modelo da formalina. Por outro lado, a adenosina (via i.p.) foi equipotente a dipirona em relação à primeira fase, sendo mais potente e eficaz quando comparada com a aspirina e acetaminofen. Em relação à segunda fase, ela foi cerca de 1,8 vezes mais potente que a dipirona e cerca de 2,2 a 2,7 vezes menos potente que a aspirina e acetaminofen. No entanto, a adenosina foi mais eficaz quando comparada com esses fármacos já utilizados na clínica. Esses resultados iniciais corroboram a hipótese de que a adenosina é dotada de atividade

antinociceptiva, a exemplo do que foi relatado na literatura (DELANDER e HOPKINS, 1987_{a,b}; SAWYNOK, DOAK e POON, 1998; BASTIA et al., 2002).

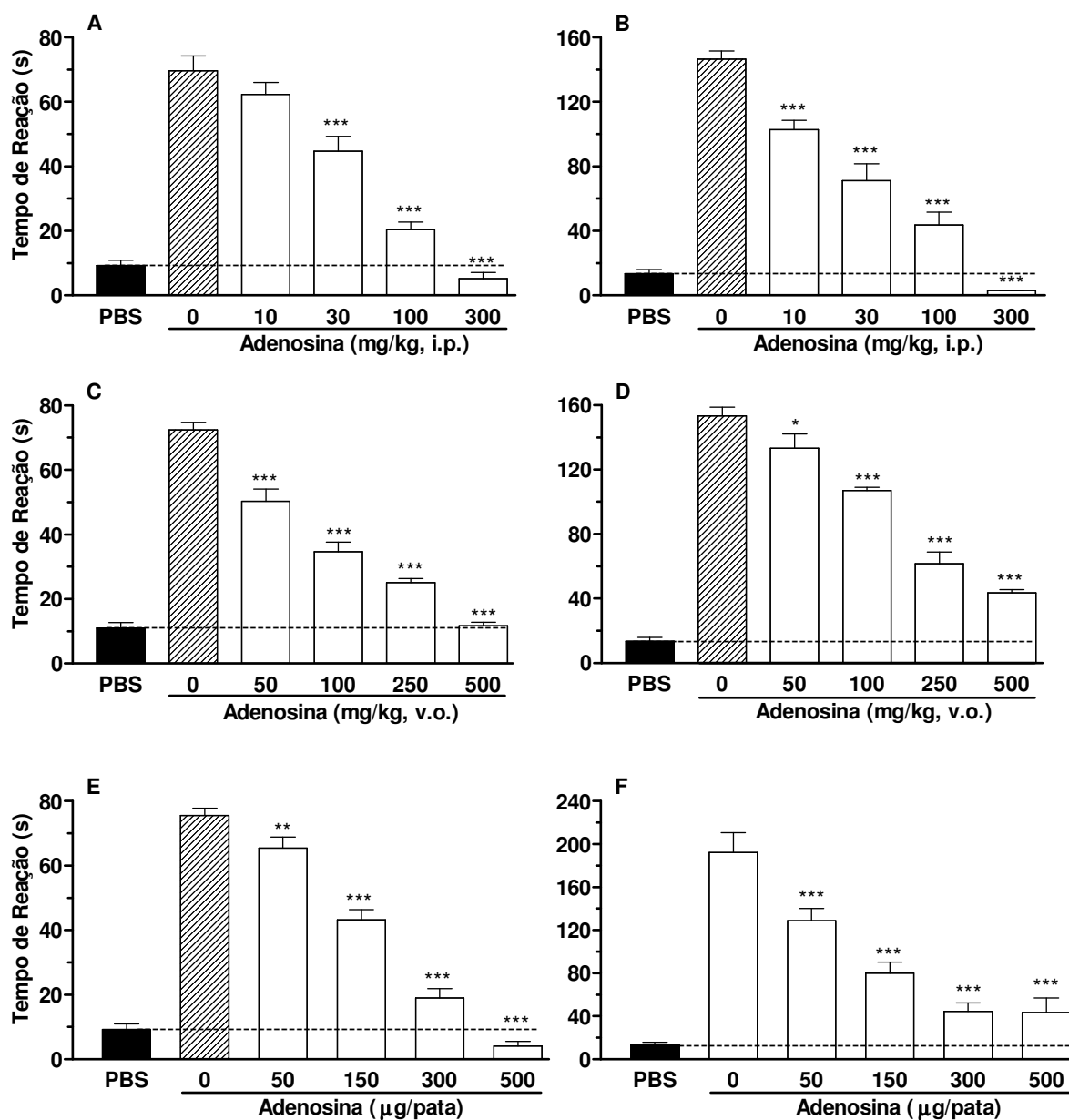


Figura 05: Efeito dose dependente da adenosina administrada por via i.p. (painéis A e B), oral (painéis C e D) ou intraplantar (painéis E e F) em relação à primeira (painéis A, C e E) e segunda (painéis B, D e F) fase da dor induzida pela formalina. As barras hachuradas representam os grupos (controle) e as barras abertas os grupos (adenosina). Cada grupo representa a média de 6 a 12 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (0), * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. As barras cheias representam os animais injetados intraplantarmente com PBS.

Tabela 01: Valores das DI₅₀ e inibição para a adenosina, aspirina, acetaminofen e dipirona na nocicepção induzida pela formalina em camundongos.

Tratamento	Via	Teste da Formalina			
		Primeira Fase DI ₅₀ (mg/kg)	Inibição (%)	Segunda Fase DI ₅₀ (mg/kg)	Inibição (%)
Adenosina	i.p.	63,1 (53,1-75,0)	100	48,8 (42,1-56,6)	100
	v.o.	135,6 (107,9-170,3)	99±1	192,3 (176,8-209,1)	78±1
Aspirina ^a	i.pl.	202,3 (189,7-217,7)	100	150,6 (128,7-176,1)	81±7
	i.p.	Nd	17±3	18.1 (13,6-24,3)	85±4
Acetaminofen ^a	i.p.	Nd	11±4	22.1 (13,8-37,6)	88±3
Dipirona ^b	i.p.	51,3 (33,3-79,6)	74±2	87.9 (78.1-98.9)	91±1

^aDados extraídos de Vaz et al, 1996.

^bDado extraído de Beirith et al, 1998.

Outro aspecto interessante e inédito apresentado no presente trabalho é o fato que a adenosina (100 mg/kg, i.p.) apresenta efeito antinociceptivo tanto profilático, quando administrada 15 min antes da injeção da formalina, quanto terapêutico, quando administrada 10 min após a injeção da formalina, ou seja, a adenosina administrada 30 (pré-tratamento) e 10 (pós-tratamento) min antes da segunda fase da formalina, causou efeito antinociceptivo significativo e semelhante na segunda fase da nocicepção induzida pela formalina (Figura 6). Esses dados indicam que a adenosina apresenta efeito antinociceptivo tanto profilático quanto terapêutico na nocicepção causada pela formalina em camundongos (Figura 6).

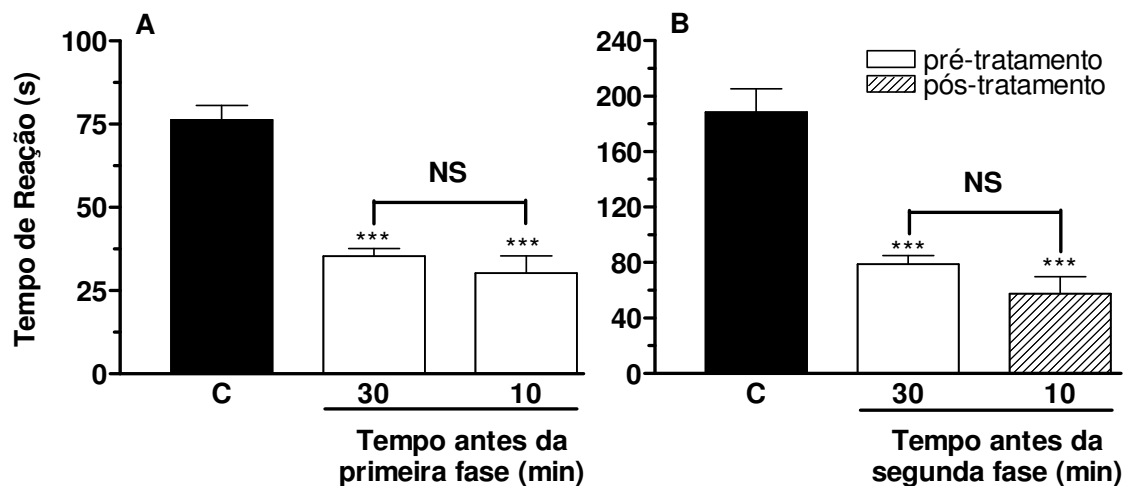


Figura 06: Efeito da administração i.p. da adenosina em relação à primeira (painel A) e segunda (painel B) fase da dor induzida pela formalina. A adenosina foi administrado 30 e 10 min antes da primeira (painel A) e segunda (painel B) fases da dor induzida pela formalina (2,5% em 20 µl) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 – 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, *** $P < 0,001$. NS demonstra que a atividade antinociceptiva causada pela adenosina (100 mg/kg,) não difere quando administrada 30 ou 10 min antes da nocicepção da formalina.

Em conjunto, os resultados obtidos no teste da formalina demonstram que a adenosina administrada pela via i.p., oral e intraplantar (co-administração) produziu significativo efeito antinociceptivo em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina. Diversos pesquisadores têm mostrado que a primeira fase, por ser causada pela estimulação direta dos nociceptores, é normalmente sensível aos opióides, enquanto que a segunda fase desse modelo está associada à resposta inflamatória e envolve a produção de prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios, sendo controlada por drogas antiinflamatórias não esteroidais (HUNSKAAR, FASMER e HOLE, 1985; ABBOTT e FRANKLIN, 1986; HUNSKAAR e HOLE, 1987; MURRAY, PORRECA e COWAN, 1988; CHAPMAN e DICKENSON, 1992; CORRÊA e CALIXTO, 1993; TJØLSEN e HOLE, 1997).

5.1.2. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina.

No presente estudo procurou-se também analisar a possível ação antinociceptiva da adenosina na nocicepção neurogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. SAKURADA et al. (1992), foram os primeiros a demonstrar que a injeção intraplantar de capsaicina, na pata posterior de camundongos, causa vigorosa dor, caracterizada por lambidas e mordidas na pata injetada, sendo esse efeito relacionado com a dor de origem neurogênica. A capsaicina é uma amina neurotóxica extraída de plantas do gênero *Capsicum*

(pimenta vermelha) que, quando aplicada na pele ou injetada em animais, produz irritação caracterizada por reação dolorosa e subsequente dessensibilização para a dor induzida quimicamente (JANCSÓ et al., 1981). Vários mediadores químicos foram evidenciados na dor neurogênica causada pela injeção intraplantar de capsaicina, como as neurocininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B), aminoácidos excitatórios, óxido nítrico, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e somatostatina entre outros (GAMSE et al., 1981; LEMBECK, 1988; SZALLASI e BLUMBERG, 1996, 1999; SANTOS e CALIXTO, 1997_{a,b}; CATERINA et al., 1997,2000). Dessa maneira, uma correlação positiva tem sido observada entre as ações antinociceptivas de várias drogas testadas no modelo da dor neurogênica causada pela formalina (primeira fase), com a dor neurogênica causada pela capsaicina. Estudos já demonstraram que a capsaicina atua através da ativação de receptores específicos, os quais foram denominados de receptores vanilóides do tipo 1 (VR1). A capsaicina ativa uma distinta subpopulação de neurônios primários sensoriais, com corpos celulares na raiz dorsal, gânglios nodoso e trigeminal. Esses neurônios transmitem informações nociceptivas para o SNC (função aferente), ao passo que suas terminações periféricas são sítios de liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios (função eferente). A susceptibilidade a capsaicina distingue estes neurônios de outros neurônios aferentes primários (GAMSE et al., 1981; SZOLCSANYI, 1985; LEMBECK, 1988; OH, HWANG e KIM, 1996; CATERINA et al., 1997, 2000; SANTOS e CALIXTO, 1997_{a,b}).

MALMBERG e YAKSH (1994) demonstraram que a capsaicina, ativando diretamente as fibras nervosas aferentes primárias, pode levar à produção e liberação de prostaglandina E₂ na medula espinhal *in vitro* podendo, além disso, causar a liberação de glutamato e de substância P (SP) na medula espinhal de rato *in vivo* e *in vitro*, respectivamente. SAKURADA e colaboradores (1996_{a,b}), mostraram que a nocicepção induzida pela injeção intraplantar ou intratecal de capsaicina pode ser mediada, pelo menos em parte, pela produção de óxido nítrico, glutamato e aspartato, além dos neuropeptídeos (SP, NKA, NKB e CGRP).

Nesse, observou-se também que a adenosina (administrada pela via i.p., v.o. e intraplantar) foi capaz de inibir, de forma significativa, a nocicepção neurogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos com eficácia semelhante aquela apresentada no modelo de nocicepção induzida pela formalina (Figura 7). As DI_{50s} calculadas e os valores de inibição estão apresentados na Tabela 2. Esses resultados são relevantes, já que a maioria das drogas antiinflamatórias não esteroidais são ineficazes em prevenir a nocicepção neurogênica causada pela capsaicina (SHIBATA et al., 1989; MALMBERG e YARSH, 1992; VAZ, et al., 1996; SANTOS, VEDANA e FREITAS, 1998). Tais resultados indicam que a adenosina pode

ter um mecanismo interessante para sua ação antinociceptiva e apresenta potencialidade para o tratamento da dor de origem neurogênica, cuja complexidade não tem permitido alternativas terapêuticas satisfatórias.

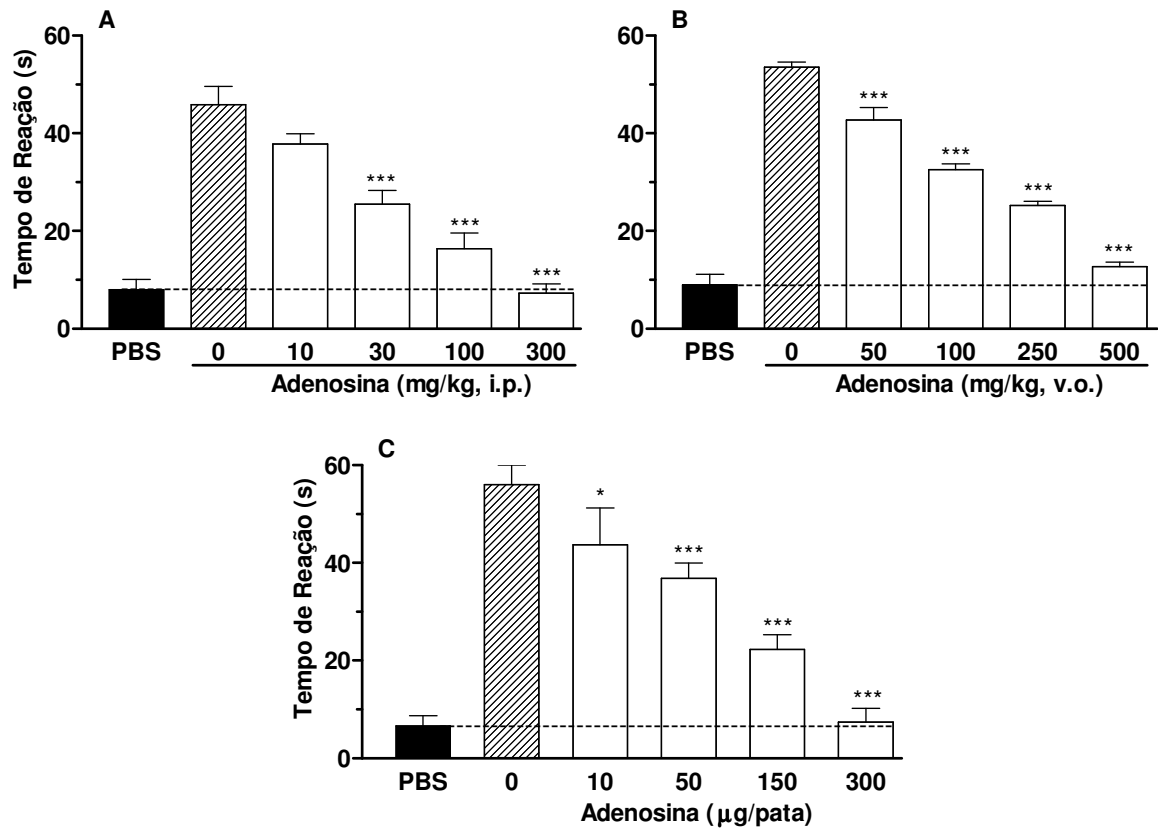


Figura 07: Efeito dose dependente da adenosina administrada por via i.p. (A), oral (B) ou intraplantar (C) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. As barras hachuradas representam os grupos (controle) e as barras abertas os grupos (adenosina). Cada grupo representa a média de 8 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (0), * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. As barras cheias representam os animais injetados intraplantarmente com PBS.

Tabela 2: Valores das DI₅₀s e inibição para a adenosina na nocicepção induzida pela capsaicina em camundongos.

Tratamento	Via	Teste da Capsaicina	
		DI ₅₀ (mg/kg)	Inibição (%)
Adenosina	i.p.	60,3 (48,8-74,4)	94±4
	v.o.	216,4 (203,1-230,5)	87±2
	i.pl.	99,2 (82,3-119,7)	91±4

5.1.3. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato.

Neste modelo foi analisada a possível ação antinociceptiva da adenosina administrada pela via i.p. e também pela via intradérmica associada com o irritante, na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Este modelo foi proposto recentemente por BEIRITH, SANTOS e CALIXTO, (2002), sendo utilizado para o estudo de drogas que atuam sobre o sistema glutamatérgico envolvido na transmissão nociceptiva. Vários trabalhos descritos na literatura demonstram que diversos transmissores químicos, entre eles os aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), apresentam papel relevante no processo de sensibilização do corno dorsal da medula espinhal, uma vez que a estimulação das fibras aferentes primárias induz a liberação de aminoácidos excitatórios e substância P (FERREIRA, DUARTE e LORENZETTI, 1991; SORKIN et al, 1992; MALMBERG e YAKSH, 1995; FERREIRA, SANTOS e CALIXTO, 1999). O glutamato atua sobre receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) no corno dorsal. A ativação do receptor NMDA pode ainda levar a uma hiperatividade central pela estimulação das fibras C. Outro aspecto relevante é que durante a hipóxia ocorre a liberação de vários neurotransmissores, entre eles o GABA, a acetilcolina e o glutamato, via ativação dos receptores metabotrópicos e NMDA. Além disso, estudos recentes demonstram que a ação neuroprotetora da adenosina nesses casos ocorre através da ativação dos receptores A₁. É importante mencionar que o dano neuronal resultante do episódio isquêmico é mediado principalmente pelo aumento do glutamato e pela ativação de receptores NMDA, nesses casos os receptores A₁ fazem neuroproteção de 2 formas: Inibindo a liberação de glutamato de terminais nervosos glutamatérgicos pré-sinápticamente e/ou inibindo

receptores NMDA em neurônios piramidais hipocampais pós-sinápticamente (BORGHI et al., 2002; RIBEIRO, SABASTIÃO e MENDONÇA, 2003). Trabalhos recentes conduzidos em nossos laboratórios demonstraram que a adenosina produz aumento significativo do limiar para a convulsão induzida por pentilenotetrazol, estricnina e ácido kaínico e que, antagonistas dos receptores A₁ revertem esses efeitos (OLIVEIRA e SOUZA, 2004). Desta forma, o efeito da modulação da dor por receptores A₁ na medula pode ser explicado em função da inibição da transmissão excitatória para os neurônios da substância gelatinosa (BORGHI et al., 2002; RIBEIRO, SEBASTIÃO e MENDONÇA, 2003). Esses resultados mostram que o tratamento dos animais com a adenosina pela via i.p. (30-300 mg/kg) ou intraplantar (50-300 µg/pata), causou redução significativa e dependente da dose, da nocicepção causada pela injeção intraplantar de glutamato (10 µmol/pata) (Figura 8). As DI₅₀s calculadas e os valores de inibição estão apresentados na Tabela 3. Estes dados permitem sugerir que pronunciada ação antinociceptiva da adenosina na dor causada pelo glutamato pode ser decorrente do seu papel modulatório sobre o sistema glutamatérgico, provavelmente impedindo a liberação desse aminoácido excitatório envolvido na transmissão do processo doloroso. No entanto, novos estudos para uma investigação mais detalhada devem ser conduzidos para confirmar essa hipótese.

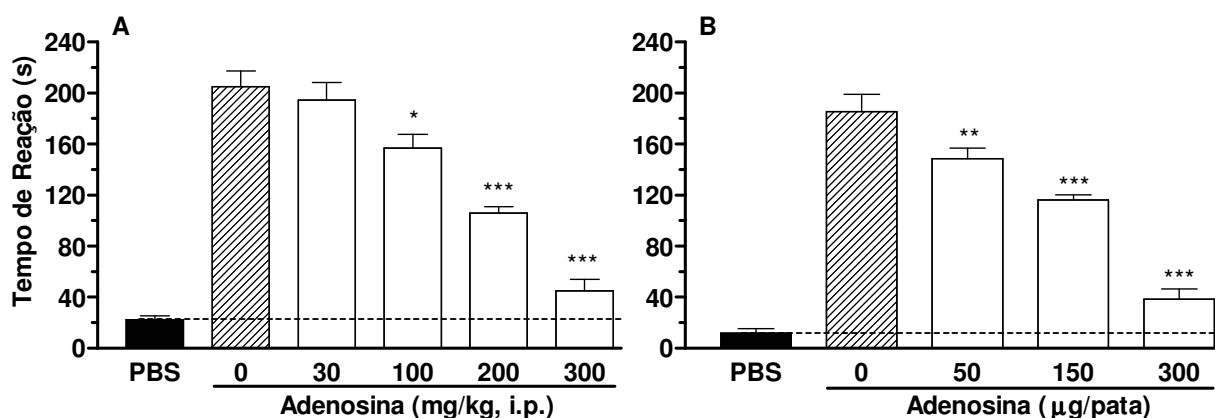


Figura 08: Efeito dose dependente da adenosina administrada por via i.p. (A) ou intraplantar (B) em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos. As barras hachuradas representam os grupos (controle) e as barras abertas os grupos (adenosina). Cada grupo representa a média de 6 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle (0), * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. As barras cheias representam os animais injetados intraplantarmente com PBS.

Tabela 03: Valores das DI_{50} s e inibição para a adenosina na nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos

Tratamento	Via	Teste do Glutamato	
		DI_{50}	Inibição (%)
Adenosina	i.p. (mg/kg)	193,8 (178,8-210,0)	86±4
	i.pl. (µg/pata)	194,7 (182,0-208,3)	81±5

5.1.4. Teste da placa-quente.

O modelo da placa quente foi descrito, inicialmente, por WOOLFE e MACDONALD (1944) e, posteriormente, modificado por EDDY e LEIMBACK (1953), sendo conhecido por ser muito sensível às drogas que atuam em nível central (WOOLFE e MACDONALD, 1944; HWANG e WILCOX, 1987; CARTER, 1991). No teste da placa quente, um estímulo térmico ativa nociceptores que transmitem informação nociceptiva aguda a regiões específicas no SNC, produzindo uma resposta nocifensiva organizada (MOGIL e ADHIKARI, 1999). Por esse motivo a placa quente é um dos métodos mais utilizados no estudo de drogas analgésicas, principalmente àquelas com ação central, como os opióides e os anestésicos gerais (WALKER, FOX, URBAN, 1999). Estudos recentes sugerem a participação de mecanismos periféricos na transmissão da resposta térmica. Assim, além do VR-1 (receptor vanilóide tipo 1), outros receptores como o VLR-1 (receptor relacionado ao VR-1) e o ASIC (canal iônico ativado pelo estiramento) foram clonados e identificados como proteínas termoreceptoras. A ativação destas proteínas causa influxo de íons em neurônios sensoriais, iniciando o processo de condução da informação nociceptiva térmica (REICHLING e LEVINE, 2000).

De maneira interessante, os resultados apresentados na Figura 9 demonstram que tanto os animais tratados com morfina (5 mg/kg, s.c.) quanto os animais tratados com adenosina (100 mg/kg, i.p.) tiveram o seu limiar antinociceptivo aumentado quando analisados no teste da placa quente, mostrando que a adenosina também é efetiva em reduzir a nocicepção mediada por estímulos térmicos. Estes dados estão de acordo com os resultados observados no teste da capsaicina e sugerem em parte que a adenosina interfere seletivamente com a transmissão da informação nociceptiva gerada por fibras que expressam o receptor VR1 e são sensíveis a

capsaicina. Dessa forma, os resultados até aqui apresentados quando comparados em conjunto também mostram que a adenosina, na dose que causa significativa inibição da dor induzida pela formalina, capsaicina e glutamato em camundongos, foi também capaz de causar potente e significativo efeito antinociceptivo quando analisado na nocicepção térmica estudada no modelo da placa quente, como observado para a morfina. Este resultado indica uma possível ação central da adenosina, embora não necessariamente pela via opióide.

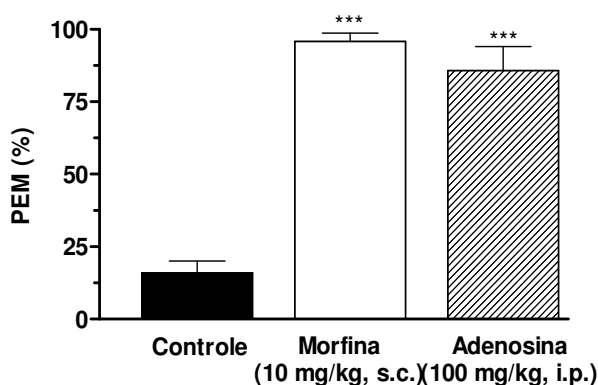


Figura 09: Porcentagem de efeito máximo (PEM) causado pela adenosina administrada por via i.p, e pela morfina administrada por via s.c. no teste da placa quente em camundongos. A barra fechada representa o grupo controle, a barra aberta representa o grupo morfina e a hachurada o grupo adenosina. Cada grupo representa a média de 6 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do controle, *** $P < 0,001$.

5.1.5. Efeito da adenosina no modelo do “Open Field”.

Os resultados obtidos no teste do “open-field” mostram que a atividade antinociceptiva causada pela adenosina, não parece ser secundária a efeitos depressores e/ou inespecíficos do sistema nervoso central, tendo em vista que na dose em que a adenosina foi efetiva, nos outros modelos de dor analisados anteriormente, ela foi destituída de ação incapacitante ou mesmo depressora da atividade locomotora do animal, que são detectáveis no modelo do “open-field” (Figura 10).

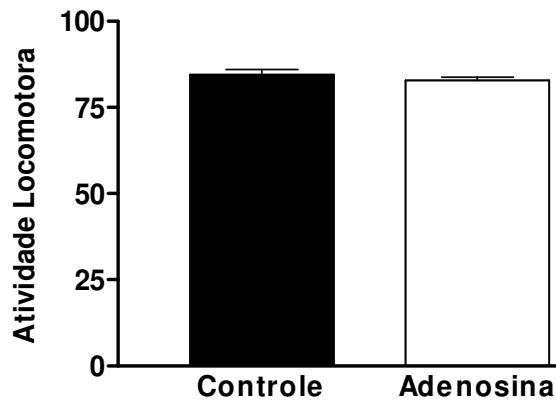


Figura 10: Efeito da adenosina (100 mg/kg, i.p.) sobre a atividade locomotora de camundongos no modelo do Open-Field. Cada grupo representa a média de 6 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M.

5.2. Análise do mecanismo de ação antinociceptivo da adenosina

O segundo objetivo do nosso trabalho foi analisar, através de estudos “*in vivo*”, os possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva causada pela adenosina. Para tal, foram utilizados vários agonistas e antagonistas específicos ou inibidores enzimáticos, sendo verificado a influência destas drogas na antinociceção da adenosina no modelo de nociceção induzido pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.

5.2.1. Participação do sistema adenosinérgico.

Os resultados apresentados na Figura 11, 12 e 13 demonstram que o pré-tratamento dos animais com cafeína (3 mg/kg, i.p., antagonista adenosinérgico não seletivo), DPCPX (5 mg/kg, i.p., antagonista A1 seletivo) ou com ZM241385 (3 mg/kg, i.p., antagonista A2A seletivo) causaram reversão completa do efeito antinociceptivo induzido pela administração de adenosina (100 mg/kg, i.p.) quando analisada em relação à dor induzida pela formalina.

Esses resultados indicam que a adenosina produziu seus efeitos antinociceptivos por causar a ativação dos receptores A1 e A2A, tendo em vista que o pré-tratamento dos animais com cafeína, DPCPX ou ZM241385, reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela adenosina quando analisado em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina.

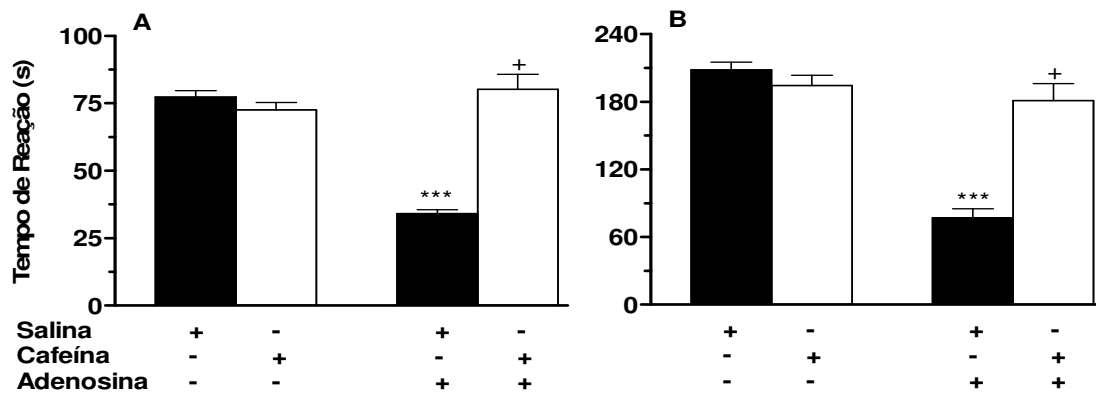


Figura 11: Influência do pré-tratamento de camundongos com cafeína (3 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pela adenosina (100 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo pré-tratado com salina (barras fechadas), *** $P < 0,001$. + $P < 0,001$ quando comparado com o grupo pré-tratado com cafeína mais adenosina.

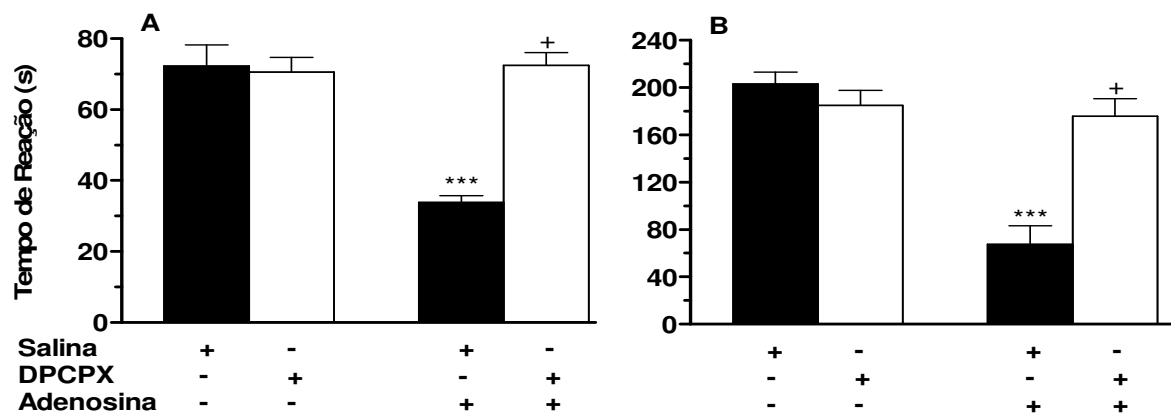


Figura 12: Influência do pré-tratamento de camundongos com DPCPX (5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pela adenosina (100 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo pré-tratado com salina (barras fechadas), *** $P < 0,001$. + $P < 0,001$ quando comparado com o grupo pré-tratado com DPCPX mais adenosina.

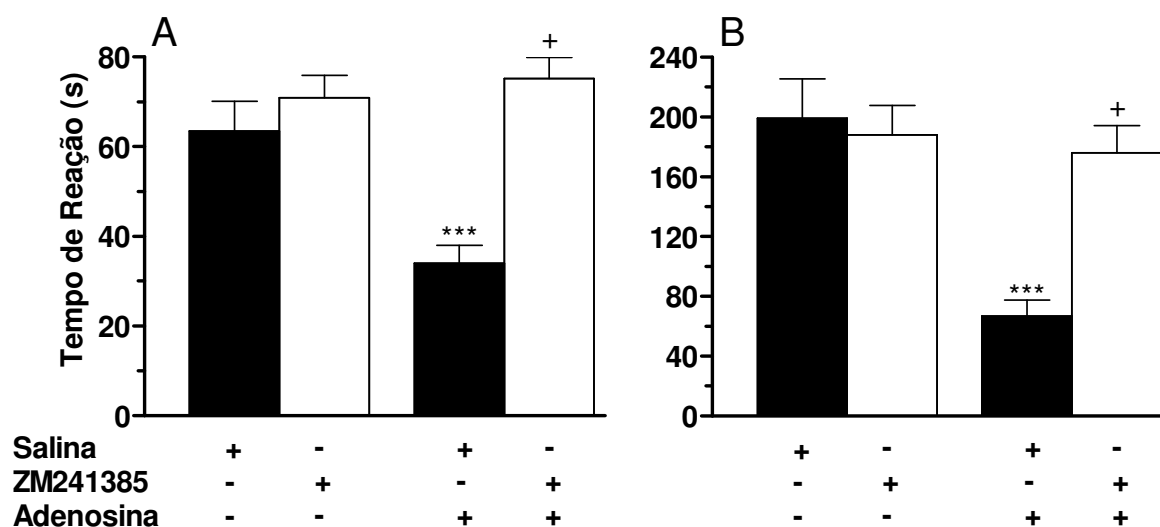


Figura 13: Influência do pré-tratamento de camundongos com ZM241385 (3 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pela adenosina (100 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo pré-tratado com salina (barras fechadas), *** $P < 0,001$. + $P < 0,001$ quando comparado com o grupo pré-tratado com ZM241385 mais adenosina.

5.2.2. Participação do sistema opióide.

Vários estudos têm demonstrado que a morfina e outros agonistas opióides promovem sua atividade antinociceptiva através de receptores específicos (κ), μ (μ) e delta (δ) envolvidos na ação antinociceptiva em sítios localizados a nível espinal e supra espinal (PORRECA et al., 1986; HAYES, SHEEHAN, e TYERS, 1987; CAHILL, WHITE e SAWYNOK, 1995; OSSIPOV et al, 1996, 1997). HAYES, SHEEHAN e TYERS, 1987 (1987) mostraram que a atividade dos agonistas de receptores opióides testados em alguns modelos experimentais térmicos (tail-flick e placa quente), ou químicos (contorções abdominais induzidas pelo ácido acético) ou teste da pressão na pata podem apresentar diferentes efeitos dependendo da espécie animal e do subtipo de receptores (μ , κ e δ), dependendo do modelo utilizado. Nossos resultados indicam claramente que as ações antinociceptiva da adenosina não parecem ter interação com o sistema opióide tendo em vista que o tratamento prévio dos animais com a naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista opióide não seletivo) causou reversão completa do efeito antinociceptivo induzido pela administração de morfina (5 mg/kg, s.c., agonista opióide não seletivo), enquanto que, o mesmo tratamento dos animais com naloxona não alterou a antinocicepção causada pela adenosina (100 mg/kg, i.p.) quando analisada em relação à dor induzida pela formalina (Figura 14). No entanto, tem sido demonstrado através de estudos pré-clínicos e clínicos que a administração intratecal de

morfina produz efeito de antinocicepção em parte pela liberação de adenosina endógena em nível espinal e pela inibição da captação de adenosina (DELANDER e HOPKINS, 1986; PHAM et al., 2003; EISENACH et al., 2004). Neste sentido, os dados do presente estudo corroboram com os descritos na literatura que a adenosina participa na atividade antinociceptiva de agonista opióide, e não que a adenosina libera opióide endógenos. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

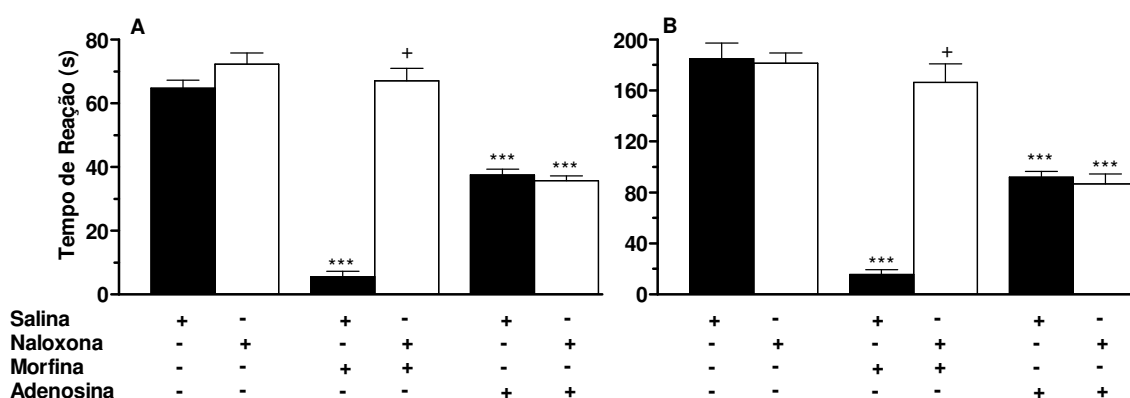


Figura 14: Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona (1 mg/kg) sobre o efeito antinociceptivo causado pela adenosina (100 mg/kg) ou morfina (5 mg/kg) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo pré-tratado com salina (barras fechadas), *** $P < 0,01$. + $P < 0,001$ quando comparado com o grupo pré-tratado com naloxona mais agonistas (adenosina ou morfina).

5.2.3. Efeito do pré-tratamento com L-arginina.

Em outra etapa do protocolo experimental, foi analisado o possível envolvimento da via da L-arginina-óxido nítrico na antinocicepção causada pela adenosina. A ativação da óxido nítrico sintase e a conseqüente produção de óxido nítrico desencadeada pela ativação do receptor NMDA, parece estar envolvida em estados dolorosos (MOORE et al, 1991; DICKENSON, 1995; DRAY, 1995). A adenosina interfere na via L-arginina-óxido nítrico através de suas ações sobre os receptores de NMDA, efeitos esses diferentes e até mesmo antagônicos se compararmos os meios intra e extra celular e situações de excitotoxicidade ou fisiológicas. Em situações de excitotoxicidade (ex: em situações de injúria hipóxica) ocorre

liberação expressiva de glutamato e posterior ativação de receptores de NMDA pós-sinápticos. A ação da adenosina, neste caso, é de inibir a liberação de glutamato pré-sináptico e inibir a ativação de receptores NMDA pós-sinápticos, evitando desta maneira o dano neuronal e a apoptose produzidos por esses dois efeitos. Já em situações fisiológicas, a ativação de receptores sinápticos de NMDA previnem a apoptose por estimularem a expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) via um mecanismo cálcio-dependente, enquanto que a estimulação de receptores de NMDA extra-sinápticos estimulam vias apoptóticas (GORDH, KARLSTEIN e KRISTENSEN, 1995; RIBEIRO, SEBASTIÃO e MENDONÇA 2003). Esta poderia ser uma possível explicação para o fato de, logo após a produção de adenosina intra e extra celular, os níveis de adenosina extra celular serem comparativamente mais elevados. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a administração sistêmica de L-arginina (substrato da óxido nítrico sintase, 600 mg/kg, i.p.), reverteu completamente a ação antinociceptiva causada pela administração de L-NOARG (75 mg/kg, i.p.) e de adenosina (100 mg/kg, i.p.). No entanto, o tratamento dos animais com D-arginina (600 mg/kg, i.p., isômero inativo da L-arginina) não interferiu de maneira significativa na atividade antinociceptiva produzida pela adenosina ou pela L-NOARG, quando analisado em relação à dor induzida pela injeção de formalina (Figura 15). Esses resultados indicam, portanto, que a via da L-arginina-óxido nítrico parece exercer um importante papel na ação antinociceptiva da adenosina.

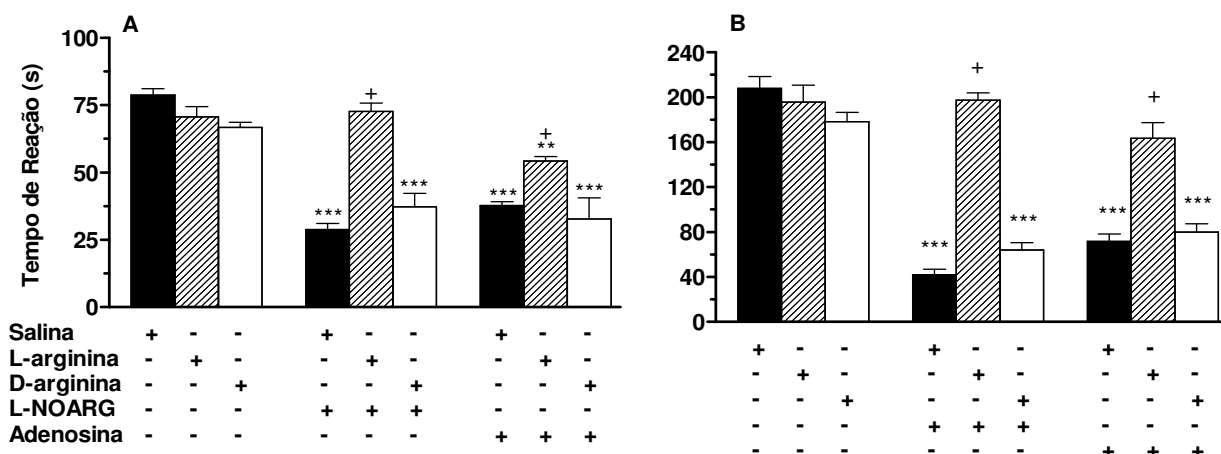


Figura 15: Influência do pré-tratamento de camundongos com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou D-arginina (600 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pela adenosina (100 mg/kg) ou L-NOARG (75 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo pré-tratado com salina (barras fechadas), *** $P < 0,001$. + $P < 0,01$ quando comparado com o grupo pré-tratado com L-arginina mais agonistas (adenosina ou L-NOARG).

5.2.4. Participação do sistema serotoninérgico.

Estudos descritos na literatura demonstraram que o sistema serotoninérgico está intimamente envolvido no mecanismo da regulação da transmissão da informação nociceptiva no sistema nervoso central (BASBAUM e FIELDS, 1984; YAKSH, 1985; FIELDS, HEINRICHER e MASON, 1991; DRAY, 1997; MILLAN, 1997, 1999; BESSON, 1999). Assim, um grande número de drogas vem sendo utilizado para o tratamento de dores crônicas, destacando-se, principalmente, os antidepressivos tricíclicos (WALSH, 1983; VENTAFRIDDA et al., 1990; MILLAN, 1999; BESSON, 1999). Vários estudos sugerem que esse efeito pode estar relacionado com a melhora do humor (WARD, BLOOM e FRIDEL, 1979), enquanto que outros autores sugerem que eles produzem analgesia por mecanismos mais específicos (ANSUATEGUI, NAHARRO e FERIA, 1989; PANERAI et al., 1991; MILLAN, 1999; BESSON, 1999). No entanto, os antidepressivos tricíclicos são tradicionalmente conhecidos por estimular a atividade da serotonina e da noradrenalina pelo bloqueio da captação neuronal (CARLSSON et al., 1969_{a,b}; PAREEK, COPHDE, TAKUR DESAI, 1994). Além disso, eles não parecem agir especificamente nos neurônios monoaminérgicos, mas principalmente em outros sistemas neuroquímicos justificando, portanto, a manifestação da resposta analgésica em pacientes não-deprimidos (SHARAV et al., 1987; LEIJON e BOIVIE, 1989;). É também conhecido que os antidepressivos tricíclicos induzem significativa ação antinociceptiva em

animais (ANSUATEGUI, NAHARRO e FERIA, 1989; ARDID, ESCHALIER e LAVAREMSE, 1991; FIALIP et al., 1992), aparentemente por interação com o sistema opióide endógeno, uma vez que essas drogas potencializam a resposta antinociceptiva induzida por drogas opióides (MALSEED e GOLDSTEIN, 1979; TAIWO et al., 1985; DE FELIPE, DECEBALLOS e FUENTES, 1986; SWEENEY et al, 1988, 1990, 1991).

A figura 16 demonstra que o tratamento dos animais com metilsergida (5 mg/kg, i.p., antagonista serotoninérgico não seletivo) ou com cetanserina (1 mg/kg, i.p., antagonista serotoninérgico 5-HT_{2A}), alteraram significativamente a ação antinociceptiva causada pela adenosina (100 mg/kg, i.p.) em relação a ambas as fases da dor causada pela injeção de formalina (Figura 16). Tais resultados são favoráveis à hipótese de que o efeito antinociceptivo da adenosina parece estar relacionado com a ativação do sistema serotoninérgico, principalmente pela interação direta ou indireta dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{2A}.

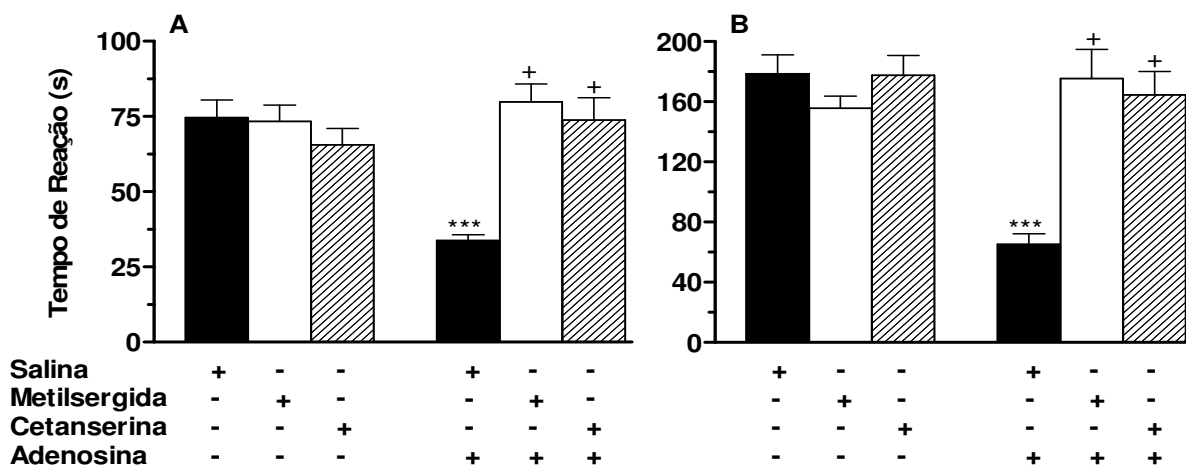


Figura 16: Influência do pré-tratamento de camundongos com metilsergida (5 mg/kg, i.p.) ou cetanserina (1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pela adenosina (100 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo pré-tratado com salina (barras fechadas), *** $P < 0,001$. + $P < 0,001$ quando comparado com o grupo pré-tratado com antagonistas metilsergida e cetanserina) mais adenosina.

5.2.5. Participação do sistema α - adrenérgico.

A ativação da via noradrenérgica através da ativação de adrenoreceptores α_2 , localizados pré-sinápticamente em terminais noradrenérgicos, originando-se no tronco encefálico e mesencéfalo, produz não somente inibição nociceptiva, mas possui efeito sinérgico com agonistas de receptores μ opióides. A possibilidade do uso de agonistas de receptores α_2 como analgésicos depende de avaliações relativas ao aparecimento de efeitos adversos, tais como a sedação, hipotensão e efeitos motores (DRAY, URBAN e DICKENSON, 1994). O papel dos receptores α_1 adrenérgicos na antinocicepção foi investigado por TASKER, CONNEL e YOLE, (1992) no teste da formalina. A fenilefrina e a clonidina (agonistas seletivos dos receptores α_1 e α_2 respectivamente), injetados sistemicamente, produzem antinocicepção, ação essa revertida por antagonistas seletivos dos mesmos receptores (TASKER, CONNEL, YOLE, 1992; BUTELMAN e MOODS, 1993; KAWABATA et al, 1994). Os resultados mostrados na figura 17, corroboram com a participação dos α_2 -adrenoreceptores no mecanismo de controle da nocicepção causada pela formalina em camundongos, tendo em vista que a clonidina (agonista dos α_2 -adrenoreceptores) causou significativa redução da nocicepção neste modelo. Além disso, o efeito antinociceptivo da clonidina foi completamente bloqueado pela ioimbina (antagonista α_2 adrenérgico 0,15 mg/kg, i.p.), que reverteu completamente à ação antinociceptiva causada pela administração de clonidina (agonista α_2 adrenérgico, 0,1 mg/kg, i.p.) e da adenosina (100 mg/kg, i.p.), quando analisado em relação à dor induzida pela injeção de formalina (Figura 17). Desta forma, os nossos dados demonstram claramente que a antinocicepção produzida pela adenosina, envolve, pelo menos em parte, uma interação com os α_2 -adrenoreceptores, uma vez que a ioimbina, na dose que não produz nenhum efeito *per se* e reverteu a antinocicepção da clonidina no teste da formalina, bloqueou completamente o efeito antinociceptivo da adenosina.

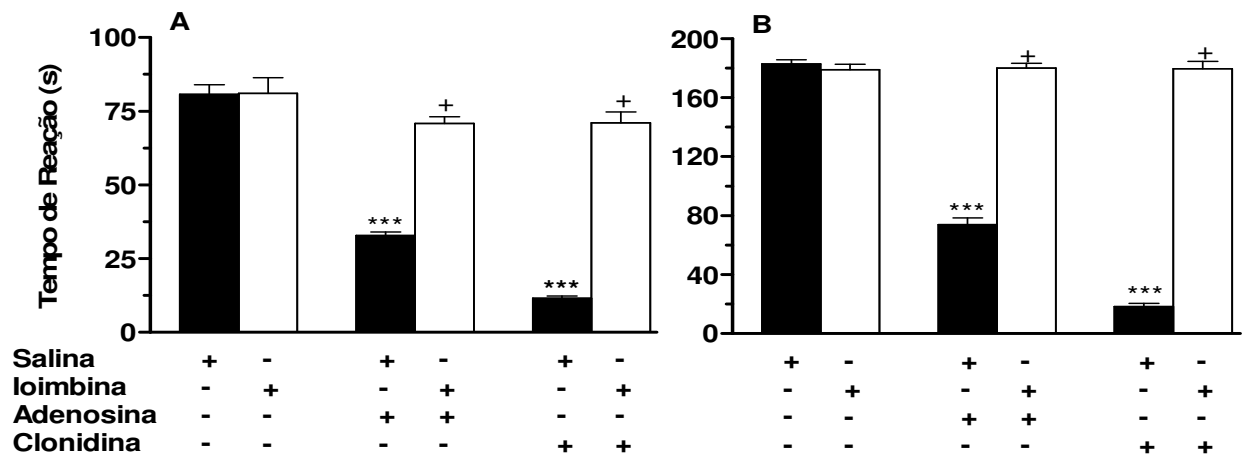


Figura 17: Influência do pré-tratamento de camundongos com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pela adenosina (100 mg/kg) ou clonidina (0,1 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo pré-tratado com salina (barras fechadas), *** $P < 0,001$. + $P < 0,001$ quando comparado com o grupo pré-tratado com ioimbina mais agonistas (adenosina ou clonidina).

5.2.6. Participação do sistema dopaminérgico.

O sistema dopaminérgico é constituído por receptores D₁, D₂, D₃, D₄ e D₅, acoplados à proteína G. Possui vários antagonistas, dentre eles o haloperidol, um antagonista não-seletivo dos receptores dopaminérgicos, considerado um neuroléptico típico. Segundo RANG, BEVAN e DRAY (1994), os fármacos neurolépticos aumentam o ritmo de produção da dopamina nas áreas do cérebro que contém terminações nervosas dopaminérgicas, tais como o corpo estriado e componente do sistema límbico. Isso pode ser identificado devido a um aumento na atividade da enzima tirosina-hidroxilase, bem como a um aumento na concentração dos metabólitos da dopamina, ácido homovanílico e DOPAC (ácido 3,4-diidroxifenilacético).

A relação do sistema dopaminérgico com a modulação da nocicepção é demonstrada pela presença de receptores dopaminérgicos, principalmente do subtipo D₂ e seu respectivo mRNA codificador em áreas do corno dorsal. A presença destes é mais pronunciada em lâminas I, mas também são encontrados em lâminas de II-VI. Estudos de imunohistoquímica mostram que esses receptores estão localizados em terminais centrais de fibras aferentes primárias, estabelecendo a relação entre o sistema dopaminérgico e o controle da dor (VAN DIJKEN, et al., 1996)

Os nossos resultados mostram que o efeito antinociceptivo causado pela adenosina parece ser dependente da ativação dos receptores dopaminérgicos sensíveis ao haloperidol, tendo em vista que o pré-tratamento dos animais com haloperidol (0,2 mg/kg, i.p., antagonista dopaminérgico não seletivo) causou reversão completa do efeito antinociceptivo induzido pela administração de apomorfina (1 mg/kg, i.p., agonista dopaminérgico não seletivo) e pela adenosina (100 mg/kg, i.p.) quando analisada em relação à dor induzida pela formalina (Figura 18).

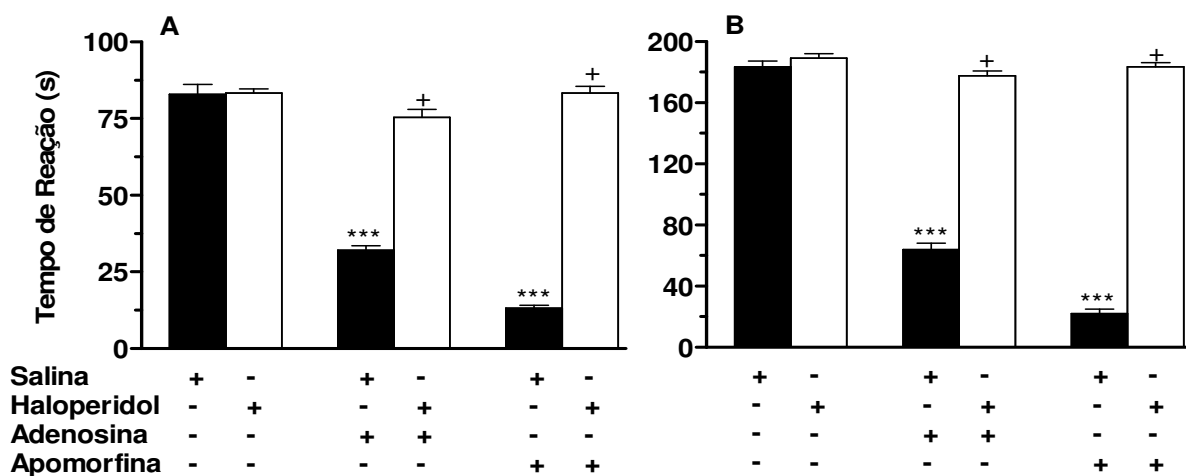


Figura 18: Influência do pré-tratamento de camundongos com haloperidol (0,2 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pela adenosina (100 mg/kg, i.p.) ou apomorfina (5 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo pré-tratado com salina (barras fechadas), *** $P < 0,001$. + $P < 0,001$ quando comparado com o grupo pré-tratado com haloperidol mais agonistas (adenosina ou apomorfina).

5.2.7. Participação do sistema GABAérgico.

Oriundo principalmente dos interneurônios, o ácido γ -aminobutírico (GABA) tem um papel fundamental no controle da dor. Atuando em receptores GABA_A (pós-sinápticos) e GABA_B (pré-sinápticos) modula a transmissão aferente da informação nociceptiva principalmente através de mecanismos pré-sinápticos (HAMMOND, 1997). Há presença de GABA em diversos locais do SNC relacionados com o processo doloroso, tais como, redes supraespinhais, via descendente e neurônios intrínsecos do corno dorsal. O importante papel do GABA na inibição descendente da dor parece não envolver somente o bem-estabelecido papel dos interneurônios inibitórios GABAérgicos. Outros mecanismos propostos são: produção de

GABA por neurônios serotoninérgicos das lâminas superficiais do corno dorsal da medula, ação excitatória da serotonina em interneurônios inibitórios GABAérgicos, inibição GABAérgica direta de neurônios de projeção, e secreção de GABA por neurônios adrenérgicos descendentes e por neurônios histaminérgicos do núcleo túberomamilar (MILLAN, 2002).

A antinocicepção causada pela adenosina não parece envolver a interação com os receptores GABA_A ou GABA_B. Tal afirmativa foi evidenciada através do pré-tratamento dos animais com bicuculina (0,7 mg/kg, i.p.) ou com faclofeno (3 mg/kg, i.p.), antagonistas de receptores GABA_A e GABA_B, respectivamente, que causaram reversão de maneira significativa do efeito antinociceptivo causado pelo muscimol (1 mg/kg, i.p., agonista seletivo dos receptores GABA_A) e pelo baclofeno (1 mg/kg, i.p., agonista seletivo dos receptores GABA_B) (Figura 19). No entanto, o mesmo tratamento dos animais com bicuculina e o faclofeno não alterou significativamente o efeito antinociceptivo causado pela adenosina (100 mg/kg, i.p.), quando analisado em relação à nocicepção causada pela formalina (MALCANGIO et al., 1991; VAZ et al., 1996; SHAFIZADEH et al., 1997 e resultado do presente estudo).

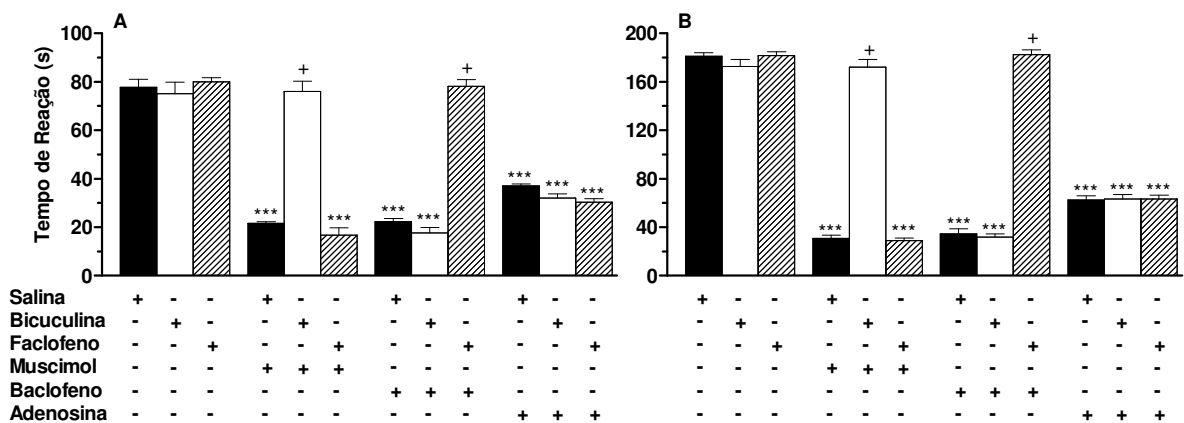


Figura 19: Influência do pré-tratamento de camundongos com bicuculina (0,7 mg/kg) ou faclofeno (3 mg/kg) sobre o efeito antinociceptivo causado pela adenosina (100 mg/kg), muscimol (1 mg/kg) ou baclofeno (1 mg/kg) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo pré-tratado com salina (barras fechadas), bicuculina (barras abertas) e faclofeno (barras hachuradas) ***P<0,001. +P<0,001 quando comparado com o grupo pré-tratado com antagonistas mais agonistas (adenosina, muscimol e baclofeno).

5.2.8. Efeito da adenosina na adrenalectomia.

Muitos estudos demonstram que o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) está envolvido no controle da dor e na inflamação (MILLAN, 1999). FLOWER e ROTHWELL (1986) observaram que a resposta inflamatória induzida pela carragenina é reduzida em ratos adrenalectomizados, em relação aos “falso-operados”, quando compararam a exsudação e a migração celular. A quantidade de eicosanóides, tromboxanos e leucotrienos produzida pela ativação das fosfolipases nos exsudatos inflamatórios também diminuíram significativamente. Os dados apresentados na Figura 20 mostram que a adrenalectomia bilateral dos animais não alterou significativamente o efeito antinociceptivo causado pela adenosina (100 mg/kg, i.p.), quando analisado em relação à nocicepção causada pela formalina. Estes resultados sugerem que os hormônios secretados pelas glândulas supra-renais não participam da antinocicepção causada pela adenosina. Tal observação é corroborada pelo fato de que o mesmo efeito antinociceptivo apresentado pela adenosina foi observado em animais “falso-operados”. Este resultado indica que a ativação do eixo HPA (Hipófise-Pituitária-Adrenal) parece não ser importante para o efeito antinociceptivo da adenosina.

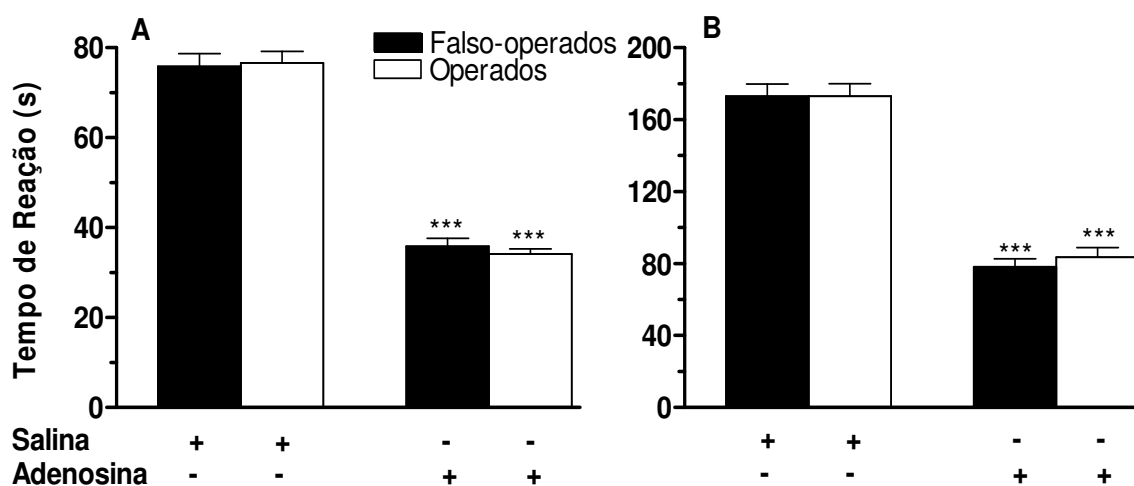


Figura 20: Influência da adrenalectomia bilateral dos animais na antinocicepção causada pela adenosina (100 mg/kg) em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 10 animais, e as linhas verticais, os E.P.M. Difere significativamente do grupo pré-tratado com salina (barras abertas), *** $P < 0,001$.

Em síntese, os resultados apresentados confirmam e estendem os dados descritos na literatura e indicam que a adenosina apresenta importante efeito antinociceptivo na nocicepção química induzida pela formalina, capsaicina e glutamato, em camundongos. Além disso, a adenosina foi efetiva tanto quando administrada por via i.p., v.o. e i.pl., sugerindo que essa substância que é produzida endogenamente possui ação central e periférica. Os resultados também demonstram que a ação antinociceptiva causada pela adenosina é particularmente interessante, tendo em vista que ela parece interagir com os receptores adenosinérgicos do tipo A_1 e A_{2A} e com vários outros sistemas, destacando-se, entre eles, a ativação do sistema serotoninérgico, o dopaminérgico, e o α_2 -adrenoceptores, bem como a via da L-arginina-óxido nítrico. Por outro lado, este estudo mostra que a antinocicepção causada pela adenosina não envolve a interação com o sistema gabaérgico ou opióide e com o eixo HPA. Embora o mecanismo preciso pelo qual a adenosina produz antinocicepção não esteja completamente esclarecido, a atividade antinociceptiva da adenosina parece estar relacionada, pelo menos em parte, a sua capacidade de modular a liberação e/ou ação de algumas monoaminas dentre elas a serotonina, noradrenalina e dopamina. Finalmente, uma interação da adenosina com a via óxido-nítrico também pode colaborar, pelo menos em parte, para sua ação antinociceptiva. Estes resultados, em conjunto, indicam fortemente que a adenosina possui potencialidade para ser utilizada clinicamente como um novo fármaco com atividade analgésica.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo mostram claramente, que:

1. A adenosina apresenta uma importante ação antinociceptiva, tanto administrada sistemicamente ou localmente, em vários modelos de dor em camundongos, especialmente em relação à dor induzida pela formalina, capsaicina e glutamato. Entre seus principais efeitos destacam-se sua marcada e prolongada ação antinociceptiva quando administrada pela via intraperitoneal e oral na dor induzida pela formalina em camundongos.

2. Outro fato de destaque apresentado no presente trabalho é que a atividade antinociceptiva da adenosina também ocorre de forma terapêutica no modelo de dor da formalina. Esse é um dado importante, considerando-se que os fármacos analgésicos utilizados clinicamente são administrados após a instalação dos sintomas dolorosos, e não de forma profilática.

3. A adenosina produz antinocicepção por envolver a ativação dos adenoceptores do tipo A_1 e A_{2A} , a via da L-arginina-óxido nítrico, o sistema serotoninérgico e dopaminérgico, os α_2 -adrenoceptores, mas os sistemas opióide e gabaérgico e os glicocorticóides endógenos não parece estarem envolvidos nesta ação.

4. Além disso, a ação antinociceptiva da adenosina não está associada a eventuais efeitos inespecíficos em nível periférico ou central, através do comprometimento da atividade motora, tendo em vista que não houve interferência com a performance motora dos animais no teste do open-field.

5. Em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que a adenosina apresenta importante efeito antinociceptivo, pelas suas importantes ações evidenciadas nos diversos modelos de nocicepção estudados. Além disso, também foram obtidos avanços significativos a respeito do seu mecanismo de ação, o que torna a adenosina e seus análogos atraentes para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade analgésica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AANONSEN, L.M.; WILCOX, G.L. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and *sigma* agonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 243: 9-19, 1987.
- ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.J. Non competitive antagonism of morphine analgesia by diazepam in the formalin test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 24: 319-321, 1986.
- ALEY, K. O.; LEVINE, J.D. Multiple receptors involved in peripheral α_2 , μ and A_1 antinociception, tolerance and withdrawal. **J. Neurosci.**, 17: 753-744, 1997
- ANSUATEGUI, M. NAHARRO, L.; FERIA, M. Noradrenergic and opioidergic influences on the antinociceptive effect of clomipramine in the formalin test in rats. **Psychopharmacol.**, 98: 93-96, 1989.
- ARDID, D.; ESCHALIER, A.; LAVAREMSE, J. Evidence for a central but not a peripheral analgesic effect of clomipramine in rats. **Pain**, 45: 95-100, 1991.
- BASBAUM, A.L.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathway and endorphin circuitry. **Annu. Rev. Neurosci.**, 7: 309-338, 1984.
- BASTIA, E.; VARANI, K.; MONOPOLI, A.; BERTORELLI, R. Effects of A_1 and A_{2A} adenosine receptor ligands in mouse acute models of pain. **Neurosci. Lett.**, 328: 241-244, 2002.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CALIXTO, J. B. Action of dipyrene in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of supraspinal of the mechanism of action. **Eur. J. Pharmacol.**, 345: 233-245, 1998.
- BEIRITH, A; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.**, 924: 219-228, 2002.
- BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, 353: 1610-1615, 1999.
- BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.**, 67: 67-186, 1987.
- BORGHI, V.; PRZEWLOCKA, B.; LABUZ, D.; MAJ, M.; ILONA, O.; PAVONE, F. Formalin-induced pain and μ -opioid receptor density in brain and spinal cord are modulated by A_1 and A_{2A} agonists in mice. **Brain Res.**, 956: 339-348, 2002.
- BROMM, B.; LORENZ J. Neurophysiological evaluation of pain. **Electroenceph. Clin. Neurophys.**, 107: 227-253, 1998.
- BUTELMAN E. R.; WOODS, J. H. Effects of clonidine, dexmedetomidine and xylazine on thermal antinociception in rhesus monkeys. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 264: 762-769, 1993.

- CAHILL, C.M.; WHITE, T.D.; SAWYNOK, J. Spinal opioid receptors and adenosine release: neurochemical and behavioural characterization of opioid subtypes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 275: 84-93, 1995.
- CALIXTO, J.B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, 87: 1-5, 2000.
- CARLSSON, A.; CORRODI, H.; FUXE, K.; HOKFELT, T. Effects of some antidepressant drugs on the depletion of intraneuronal brain catecholamine stores by 4, 4-dimethyl-meta-tyramine. **Eur. J. Pharmacol.**, 5: 367-373, 1969a.
- CARLSSON, A.; CORRODI, H.; FUXE, K.; HOKFELT, T. Effect of antidepressant drugs on the depletion of intraneuronal brain 5-hydroxytryptamine caused by 4-methoxy- α -ethyl-meta-tyramine. **Eur. J. Pharmacol.**, 5: 357-366, 1969b.
- CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. Acute pain. **Lancet**, 353: 2051-2058, 1999.
- CARRUTHERS, A.M.; SELLERS, L.A.; JENKINS, D.W.; JARVIE, E.M.; FENIUK, W.; HUMPHREY, P.P.A. Adenosine A₁ receptor-mediated inhibition of protein kinase A-induced calcitonin gene-related peptide release from rat trigeminal neurons. **Mol. Pharmacol.**, 59: 1533-1541, 2001.
- CARTER, R.B. Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. **Pain**, 47: 211-220, 1991.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACKER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389: 816-824, 1997.
- CATERINA, M.J.; MALMBERG, A. B.; MARTIN, W. J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K. R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, 288: 306-313, 2000.
- CHAPMAN, V.; DICKENSON, A.H. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 219: 427-433, 1992.
- CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B₁ and B₂ Kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 193-198, 1993.
- CRUZ, A.P.M.; ZANGROSSI-JUNIOR, H.; GRAEFF, F.G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e suas implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, 13: 269-278, 1977.

- CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem.**, **38**: 107-125, 2001.
- DE FELIPE, M.C.; DECEBALLOS, M.L.; FUENTES, J. A. Hypoalgesia induced by antidepressants in mice: a case for opioid and serotonin. **Eur. J. Pharmacol.**, 125: 193-199, 1986.
- DELANDER, G.E.; HOPKINS, C.J. Spinal adenosine modulates descending antinociceptive pathways stimulated by morphine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 239: 88-93, 1986.
- DELANDER, G.E.; HOPKINS, C.J. Interdependence of spinal adenosinergic, serotonergic and noradrenergic systems mediating antinociception. **Neuropharmacol.**, 26: 1791-1794, 1987_a.
- DELANDER, G.E.; HOPKINS, C.J. Involvement of A₂ adenosine receptors in spinal mechanisms of antinociception. **Eur. J. Pharmacol.**, 139: 215-223, 1987_b.
- DELANDER, G.E.; KEIL, G.J. Antinociception induced by intrathecal coadministration of selective adenosine receptor and selective opioid receptor agonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 268: 943-951, 1994.
- DEUCHARS, S.A.; BROOKE, R.E.; DEUCHARS, J. Adenosine A₁ receptors reduce release from excitatory but not inhibitory synaptic inputs onto lateral horn neurons. **J. Neurosci.**, 80: 939-949, 1997.
- DICKENSON, A.; SUZUKI, R.; REEVE, A. Adenosine as a potential analgesic target in inflammatory and neuropathic pains. **CNS Drugs.**, 13: 77-85, 2000.
- DICKENSON, A. H. Central acute pain mechanisms. **Ann. Med.**, 27: 223-227, 1995.
- DOAK, G.J.; SAWYNOK, J. Formalin-induced nociceptive behaviour and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Neurosci.**, 27: 223-227, 1995.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, 75:125-131, 1995.
- DRAY, A. Peripheral mediators of pain. *In*: The pharmacology of pain (ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.), pp. 21-41, Springer, Berlin, 1997.
- DRAY, A; PERKINS, M. Kinins and pain. *In*: FARMER, S.G. **The handbook of immunopharmacology: The kinin system**. Academic Press: London, pp. 157-172, 1997.
- DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol., Sci.**, 15: 190-197, 1994.

- DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, 4: 161-174, 1977.
- EDDY, N.B. e LEIMBACK, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 107: 385-393, 1953.
- EISENACH, J.C.; HOOD, D.D.; CURRY, R.; SAWYNOK, J.; YAKSH, L.T.; LI, X. Intrathecal but not intravenous opioids release adenosine from the spinal cord. **J. of Pain**, 5: 64-68, 2004.
- FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**, 38: 835-842, 1999.
- FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B. The molecular mechanism of action of morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur. J. Pharmacol.**, 201: 121-122, 1991.
- FIALIP, J.; AMAITRE, O.; BOUGEROLLE, A.M.; BERGER, Z.A.; ESCHALIER, A.; MARTY, H. Antinociceptive activity of metopramine in mice. Relationship with its pharmacokinetic properties. **Life Sci.**, 50: 161- 168, 1992.
- FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: **Textbook of pain**. Patrick Wall e Ronald Melzack., 4^a. ed., Churchill Livingstone, Nova York, 1999
- FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu. Rev. Neurosci.**, 14: 219-245, 1991.
- FLOWER, R. J.; ROTHWELL, N.J. A comparison of the acute inflammatory response in adrenalectomised and sham-operated rats. **Br. J. Pharmacol.**, 87: 57-62, 1986.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, 48: 129-141, 1999.
- FUKUNAGA, A. F.; ALEXANDER, G.E.; STARK, C.W. Characterization of the analgesic actions of adenosine: comparison of adenosine and remifentanyl infusions in patients undergoing major surgical procedures. **Pain**, 101: 129-138, 2003.
- GAMSE R.; LACKNER, D.; GAMSE, G.; LEEMAN, S. E. Effect of capsaicin pretreatment on capsaicin-evoked release of immunoreactive somatostatin and substance P from primary afferent neurons. **Naun. Sch. Arch. Pharmacol.**, 316: 38-41, 1981.
- GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; BARTOLINI, A. Caffeine induces central cholinergic analgesia . **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 356: 590-595, 1997.

- GOMES, J. A.; LI, X.; PAN, H.; EISENACH, J. C. Intrathecal adenosine interacts with a spinal noradrenergic system to produce antinociception in nerve-injured rats. **Anesthesiology**, 91: 1072-1079, 1999.
- GORDH, T.; KARLSTEIN, R.; KRISTENSEN, J. Intervention with spinal NMDA, adenosine, an NO systems for pain modulation. **Ann. Med.**, 27: 229-234, 1995.
- GRÜBB, B.D. Peripheral and central mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.**, 81: 8-11, 1998.
- GYLLENHAMMAR, E.; NORDFORS, L.O. Systemic adenosine infusions alleviated neuropathic pain. **Pain**, 94: 121-122, 2001.
- HAMMOND, D.L. Inhibitory neurotransmitters and nociception: role of GABA and glycine. In: **The pharmacol. of pain**, Springer Verlag, Germany, 361-367, 1997.
- HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends in Immun.**, 23: 33-39, 2004.
- HAYES, A.G.; SHEEHAN, M.J.; TYERS, M.B. Differential sensitivity of models of antinociception in the rat, mouse and guinea pig to μ - and κ - opioid receptor agonists. **Br. J. Pharmacol.** 91: 823-832, 1987.
- HEAPY, C.G.; JAMIENSON, A.; RUSSEL, N.J.W. Afferent C-fibre and A delta activity in models of inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, 90: 164p, 1987.
- HUNSKAAR, S.; BERGE, O.G.; HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, 25: 125-132, 1986.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **J. Neurosci. Meth.**, 14: 69-76, 1985.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, 30: 103-114, 1987.
- HWANG, A.S.; WILCOX, G.L. Analgesic properties of intrathecally administered heterocyclic antidepressants. **Pain**, 28: 343-355, 1987.
- IADAROLA, M.J.; CLAUDE, R.M. Good pain, bad pain. **Science**, 278: 239-240, 1997.
- JABBUR, S.J.; SAADÉ, N.E. From electrical wiring to plastic neurons: evolving approaches to the study of pain. **Pain**, 6: S87-S92, 1999.
- JANCSÓ, G.; HOKFELT, T.; LUNDEBERG, J.M.; KIRALY, E.; HALASZ, N.; NILSSON, G.; TERENIUS, L.; REHFELD, J.; STEINBUSCH, H.; VERHOFSTAD, A.; ELDE, E.; SAID, S.; BROWN, M. Immunohistochemical studies on the effects of capsaicin on spinal and medullary peptide and monoamine neurons using antisera to substance P, gastrin CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin and 5-HT. **J. Neurocytol.**, 10: 963-980, 1981.

- KARLSTEN, R; GORDH, T. Drug therapy: How do drugs relieve neurogenic pain? **Drugs e Aging**, 11: 398-412, 1997.
- KAWABATA, A.; KASAMATSU, K.; UMEDA, N.; TAKAGI, H. The noradrenaline precursor L- Threo-3,4-dihydroxyphenylserine exhibits antinociceptive activity via central α -adrenoceptors in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 111: 503-508, 1994.
- KHANDWALAW, H.; ZHANG, Z.; LOOMIS, C. W. Inhibition of strychnine-allodynia is mediated by spinal adenosine A₁- but not A₂- receptors in the rat. **Brain research**, 808: 106-109, 1998.
- KLINGER, M.; FREISSMUTH, M.; NANOFF, C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. **Cell. Sign.**, 14: 99-108, 2002.
- LAO, L.; KUNAMOTO, E.; LUO, C.; FURUE, H.; YOSHIMURA, M. Adenosine inhibits excitatory transmission o substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord through the activation of presynaptic A₁ adenosine receptor. **Pain**, 94: 315-324, 2001.
- LAPA, F. R. Estudo pré-clínico da atividade antiinflamatória da adenosina”in vivo”. Monografia de conclusão de curso. Universidade do Vale do Itajaí- UNIVALI. Curso de farmácia. Itajaí (SC) 54p, 2000.
- LAVAND’HOMME, P. M.; EISENACH, J.C. Exogenous and endogenous adenosine enhance the spinal antiallodynic effects of morphine in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, 80: 31-36, 1999.
- LEIJON, G.; BOIVIE, J. Central post-stroke pain: a controlled trial of amitriptyline and carbamazepine. **Pain**, 36: 27-36, 1989.
- LEMBECK, F. The 1988 Ulf von Euler Lecture. Substance P: from extract to excitement. **Acta Physiol. Scand.**, 133: 435-454, 1988.
- LEVINE, J.D; TAIWO, Y. Inflammatory Pain. In: Wall PD, Melzack R - Textbook of Pain, 3 rd Ed, Edin-burgh, Churchill Livingtone, pp. 45-56, 1994.
- LI, X.; CONKLIN, D.; MA, W.; ZHU, X.; EISENACH, J. C. Spinal noradrenergic activation mediates allodynia reduction from an allosteric adenosine modulator in rat model of neuropathic pain. **Pain**, 97: 117-125, 2002.
- LIANG, B. T; JACOBSON K. A. A physiological role of the adenosine A₃ receptor: sustained cardioprotection. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 95: 6995-6999, 1998.
- LINDEN, J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanism of tissue protection. **Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.**, 41: 775-787, 2001.
- LIPMAN, A. G. Internal Analgesic e Antipyretic products. **In.:** Covington, T. R.; BERARDI, R. R.; YOUNG, L. L. et al. **Handbook of nonprescription drugs**. 11 ed., Washington: American Pharmaceutical Association, p 45-74, 1996.

- LIU, X. J.; WHITE, T.D.; SAWYNOK, J. Potentiation of formalin-evoked adenosine release by an adenosine kinase inhibitor and an adenosine deaminase inhibitor in the rat hind paw: a microdialysis study. **Eur. J. Pharmacol.**, 408: 143-152, 2000.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, 353: 1607-1609, 1999.
- LUKASHEV, D.; OHTA, A.; SITKOVSKY, M. Targeting hypoxia-A_{2A} adenosine receptor-mediated mechanisms of tissue protection. **Research focus**, 9: 403-409, 2004.
- MACFARLANE, B.V.; WRIGHT, A.; O'CALLAGHAN, J.; BENSON, H.A. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacol. Ther.**, 75: 1-19, 1997.
- MALCANGIO, M.; GHELARDINI, C.; GIOTTI, A.; MALMBERG-AIELLO, P.; BARTOLINI, A. CGP 35348, a new GABA_B antagonist, prevents antinociception and muscle-relaxant effect by baclofen. **Br. J. Pharmacol.**, 103: 1303-1308, 1991.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Antinociceptive actions of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 263: 136-146, 1992.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Capsaicin-evoked prostaglandin E₂ release in spinal cord slice: Relative effect of cyclooxygenase inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.**, 271: 293-299, 1994.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E₂ using microdialysis in conscious rats. **Br. J. Pharmacol.**, 114: 1069-1075, 1995.
- MALSEED, R.T.; GOLDSTEIN, J.F. Enhancement of morphine analgesia by tricyclic antidepressants. **Neuropharmacol.**, 18: 827-829, 1979.
- MAUBORGNE, A.; POLIÉNOR, H.; HAMON, M.; CESSÉLIN, F.; BOURGOIN, S. Adenosine receptor-mediated control of in vitro release of pain-related neuropeptides from the rat spinal cord. **Eur. J. Pharmacol.**, 441: 47-55, 2002.
- MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science, Wash.**, 150: 971-979, 1965.
- MENDES, G.L.; SANTOS, A.R.S.; MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 292: 164-172, 2000.
- MERSKY, H. An investigation of pain in psychological illness. [thesis]. Oxford: University of Oxford, 1964.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. IASP Press: Seattle, 1994.

- MILLAN, M.J. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: Focus on receptor multiplicity *In: The pharmacology of pain* (ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.), pp. 385-446, Springer, Berlin, 1997.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, 57: 1-164, 1999.
- MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, 569: 1-120, 2002.
- MOGIL, J.S.; GRISEL, J.E. Transgenic studies of pain. **Pain**, 77: 107-128, 1998.
- MOGIL, J.S.; ADHIKARI, S.M. Hot and cold nociception are genetically correlated. **J. Neurosci.**, 19: RC25, 1999.
- MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; HART, S.L. L-N^G-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 102: 198-202, 1991.
- MOREAU, J.; HUBER, G. Central adenosine A_{2A} receptors: an overview. **Brain Res. Rev.**, 31: 65-82, 1999.
- MURRAY, C.W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. **J. Pharmacol. Meth.**, 20: 175-186, 1988.
- NAGY, J.I.; DADDONA, P.E. Anatomical and cytochemical evidence of adenosine deaminase-containing primary afferent neurons in the rat. **Neuroscience**, 15: 799-813, 1985.
- OH, U.; HWANG, S.W.; KIM, D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. **Neurosci.**, 15: 1659-1667, 1996.
- OKADA, M.; NUTT, D.J.; MURAKAMI, T.; ZHU, G.; KAWATA, A.; KANEKO, S. Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways to hippocampal serotonin release. **J. Neurosci.**, 15: 628-640, 2001.
- OLIVEIRA Jr., J.J.; SOUZA, M.M. Estudo da modulação da adenosina e seus receptores em doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas. **Annais: III Seminário de iniciação científica**, Universidade do Vale do Itajaí, Biguaçu/SC.15: p.36, 2004.
- OSSIPOV, M.H.; KOVELOWSKI, C.J.; WEELER-ACETO, H.; COWAN, A.; HUNTER, J.C.; LAI, J.; MALAN, T.P.; PORRECA, F. Opioid antagonists and antisera to endogenous opioids increase the nociceptive response to formalin: demonstration of an opioid kappa and delta inhibitory tone. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 277: 784-788, 1996.
- OSSIPOV, M.H.; MALAN, Jr, T.P.; LAI, J.; PORRECA, F. Opioid pharmacology of acute and chronic pain. *In: The pharmacology of pain* (ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.), pp. 305-334, Springer, Berlin, 1997.

- PANERAI, A.E; BIANCHI, M.; SACERDOTE, P.; RIPAMONTI, C.; VENTAFRIDDA, V.; DE CONNO, F. Antidepressants in cancer pain. **J. Palliat. Care**, 7: 42-44, 1991.
- PAREEK, S. S.; COPHDE, C. T.; TAKUR DESAI, P. A. Adenosine enhances analgesic effect of tricyclic antidepressants. **Indian. J. Pharmacol.**, 26: 159-161, 1994.
- PATEL, M. K.; PINNOCK, D.; LEE, K. Adenosine exerts multiple effects in dorsal horn neurons of the adult rat spinal cord. **Brain Res.**, 920: 19-26, 2001.
- PHAM, T.; CARREGA, L.; SAUZE, N.; FUND-SAUNIER, O.; DEVAUX, C.; PERAGUT, J.C.; SAADJIAN, A.; GUIEU, R. Supraspinal antinociceptive effects of μ and δ agonists involve modulation adenosine uptake. **Anesth.**, 98: 459-464, 2003.
- POON, A.; SAWYNOK, J. Antinociception by adenosine analogs and an adenosine kinase inhibitor: dependence on formalin concentration. **Eur. J. Pharmacol.**, 286: 177-184, 1995.
- POON, A.; SAWYNOK, J. Antinociception by adenosine analogs and inhibitors of adenosine metabolism in inflammatory thermal hyperalgesia model in rat. **Pain**, 74: 235-245, 1998.
- PORKKA-HEISKANEN, T; ALANCO, L.; KALINCHUCK, A; STENBERG, D. Adenosine and sleep. **Sleep Med. Rev.**, 0: 1-12, 2002.
- PORRECA, F.; MOSBERG, H.I.; OMNAAS, J.R.; BURKS, T.F.; COWAN, F.D. Supraspinal and spinal potency of selective opioid agonists in the mouse writhing test. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 240: 890-894, 1986.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.**, 50: 413-492, 1998.
- RAMADABRAN, K.; BANSINATH, M. A critical analysis of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals. **Pharmac. Res.**, 3: 263-269, 1996.
- RANG, H.P.; BEVAN, S. J.; DRAY, A. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties, In: Wall, P.D., Melzack, R. Textbook of Pain, 3rd Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone, pp. 57-78, 1994.
- REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. In hot pursuit of the elusive heat transducers. **Neuron.**, 26: 555-558, 2000.
- RIBEIRO, J. A. Adenosine A_{2A} receptor interactions with receptors for other neurotransmitters and neuromodulators. **Europ. J. Pharmacol.**, 375: 101-113, 1999.
- RIBEIRO, J. A.; SEBASTIÃO, A.M.; MENDONÇA, A. Adenosine receptor in the nervous system: pathophysiological implications. **Prog. Neurobiol.**, 68: 337-392, 2003.
- ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**, 45: 211-216, 1991.
- RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Ann. Rev. Med.** 49:123-133, 1998.

- SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonist in the spinal cord **Neuropharmacol.**, 31: 1279 - 1285, 1992.
- SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; YOGO, H.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Antinociception induced by CP 96345, a non-peptide NK-1 receptor antagonist, in the formalin and capsaicin tests. **Neurosci. Lett.**, 151: 142-145, 1993.
- SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; HARA, A.; ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem. Int.**, 29: 271-278, 1996a.
- SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TAN-NO, K.; YONEZAWA, A.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Effect of nitric oxide inhibition on capsaicin-induced nociceptive response. **Life Sci.**, 59: 921-930, 1996b.
- SALTER, M.W.; DE KONINCK, Y.; HENRY, J.L. Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn. **Prog. Neurobiol.**, 41: 125-156, 1993.
- SANTOS, A.R.S. Análise dos mecanismos de ação antinociceptiva de princípios ativos isolados de plantas. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, pp. 146, 2000.
- SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, 31: 381-389, 1997a.
- SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neurosci. Lett.**, 235: 73-76, 1997b.
- SANTOS, A.R.S.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Further studies on the antinociceptive action of the hydroalcoholic extracts from plants of the genus *Phyllanthus*. **J. Pharm. Pharmacol.**, 47: 66-71, 1995a.
- SANTOS, A.R.S.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. **Gen. Pharmacol.**, 26: 1499-1506, 1995b.
- SANTOS, A.R.S.; DE CAMPOS, R.O.P.; MIGUEL, O.G.; CECHINEL-FILHO, V.; SIANI, A.C.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8,10-Di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 289: 417-426, 1999.
- SANTOS, A.R.S.; VEDANA, E.M.; DE FREITAS, G.A. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflamm. Res.**, 47: 302-307, 1998.

- SAWYNOK, J. Adenosine receptor activation and nociception. **Eur. J. Pharmacol.**, 347: 1-11, 1998.
- SAWYNOK, J. Purines and pain management. **Ecurr. Opin. Invest. Drug.**, 1: 27-38, 1999.
- SAWYNOK, J.; LIU X. J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain **Progr. in Neurob.**, 69: 313-340, 2003.
- SAWYNOK, J.; SWEENEY, M.I. The role of purines in nociception. **Neurosc.**, 32: 557-569, 1989.
- SAWYNOK, J.; REID, A.; NANCE, D. Spinal antinociception by adenosine analogs and morphine after intrathecal administration of the neurotoxins capsaicin, 6-hydroxydopamine and 5,7-dihydroxytryptamine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 258: 370-379, 1991.
- SAWYNOK, J.; DOAK, G.; POON, A. Adenosine and pain: recent findings with directly and indirectly acting agents. **Drug Dev. Res.**, 45: 304-311, 1998.
- SAWYNOK, J.; REID, A.; LIU, X. J. Acute paw oedema induced by local injection of adenosine A₁, A₂ and A₃ receptor agonists. **Eur. J. Pharmacol.**, 386: 253-261, 1999.
- SAWYNOK, J.; REID, A. R.; ESSER, M. J. Peripheral antinociceptive of amitriptyline in the rat formalin test: involvement of adenosine. **Pain**, 80: 45-55, 1999.
- SEGERDAHL, M.; SOLLEVI, A. Adenosine and pain relief: A clinical overview. **Drug Dev. Res.**, 45: 151-158, 1998.
- SHAFIZADEH, M.; SEMMANIAN, S.; ZARRINDAST, M.R.; HASHEMI, B. Involvement of GABA_B receptors in the antinociception induced by baclofen in the formalin test. **Gen. Pharmacol.**, 28: 611-615, 1997.
- SHARAV, Y.; SINGER, E.; SCHMIDT, E.; DIONNER, A.; DUBNER, R. The analgesic effect of amitriptyline on chronic facial pain. **Pain**, 31: 199-209, 1987.
- SHIBATA, M.; OHKUDO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test characteristic biphasic pain response. **Pain**, 38: 347-352, 1989.
- SORKIN, L. S.; WALLACE, M. S. Acute pain mechanisms. **Surgical Clinics of North America**, 79: 213-229, 1999.
- SORKIN, L. S.; WESTLUND, K.N.; SLUKA, K.A.; DOUGHERTY, P.M.; WILLIS, W.D. Neural changes in acute arthritis in monkeys. IV. Time course of amino acid release into the lumbar dorsal horn. **Brain Res. Rev.**, 17: 39-50, 1992.
- SOUZA, M. M. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos sintéticos e naturais. In: Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos

- fármacos e medicamentos. Bresolin, T. M. B., Cechinel, V. F., UNIVALI Ed, Itajaí, pp. 124-125, 2003.
- SUZUKI, R.; STANFA, L.C.; KOWALUK, E.A.; WILLIAMS, M.; JARVIS, M.E.; DICKENSON, A.H. The effect of ABT-702, a novel adenosine kinase inhibitor, on the responses of spinal neurones following carrageenan inflammation and peripheral nerve injury. **Br. J. Pharmacol.**, 132: 1615-1623, 2001.
- SWEENEY, M. I.; WHITE, T.D.; SAWYNOK, J. 5-hydroxytryptamine releases adenosine from primary afferent nerve terminals in the spinal cord. **Brain Res.**, 462: 346-349, 1988.
- SWEENEY, M. I.; WHITE, T.D.; SAWYNOK, J. 5-hydroxytryptamine releases adenosine and cyclic AMP from primary afferent nerve terminals in the spinal cord in vivo. **Brain Res.**, 528: 55-61, 1990.
- SWEENEY, M. I.; WHITE, T.D.; SAWYNOK, J. Intracerebroventricular morphine releases adenosine and adenosine 3',5'-cyclicmonophosphate from the spinal cord via a serotonergic mechanism. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 259: 1013-1259, 1991.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid receptors: New insights enhance potencial as a therapeutic target. **Pain**, 68:195-208, 1996.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol. Rev.**, 51:159-211, 1999.
- SZOLCSÁNYI, J. Sensory receptors and the antinociceptive effects of capsaicin. In: HAKANSON, R.; SUNDLER, F. (Eds.) Tachykinin Antagonists. Amsterdam : Elsevier, 1985. p. 45-56.
- TAIWO, Y.O.; FABIAN, A.; PAZOLES, C.J.; FIELDS, H.L. Potentiation of morphine antinociception by monoamine reuptake inhibitors in the rat spinal cord. **Pain**, 21: 329-337, 1985.
- TAIWO, Y.O.; LEVINE, J.D. Direct cutaneous hyperalgesia induced by adenosine. **Neurosc.** 44: 131-135, 1991.
- TASKER R. A. R.; CONNELL, B. J.; YOLE, M. J. Systemic injections of alpha-1 adrenergic agonists produce antinociception in the formalin test. **Pain**. 49: 383-391, 1992.
- TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. *In: The pharmacology of pain* (ed. Dickenson, A. and Besson, J.-M.), pp. 1-20, Springer, Berlin, 1997.
- TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51: 5-17, 1992.
- VAN DIJKEN, H.; DIJK, J.; VOOM, P.; HOLSTEGE, J.C. Localization of dopamine D₂ receptor in rat spinal cord identified with immunocytochemistry and in situ hybridization. **Eur. J. Neurosc.** 8: 621-628, 1996.

- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, 44: 1-10, 1995.
- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scand. J. Rheumatol.**, 25: 9-21, 1996.
- VAZ, Z.R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-Bromobenzoyl)-3-Methyl-4,6-Dimethoxy Benzofuran, a novel Xanthoxylone derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 278: 304-312, 1996.
- VENTAFRIDDA, V.; BIANCHI, M.; RIPAMONTI, C.; SACERDOTE, P.; DE CONNO, F.; ZECCA, E.; PARENAI, A.E. Studies on the effects of antidepressant drugs on the antinociceptive action of morphine and on plasma morphine in rats and man. **Pain**, 43: 155-162, 1990.
- WALKER, K.; FOX, A.J.; URBAN, L. A. Animal models for pain research. **Mol. Med. Today**, 5: 319-321, 1999.
- WALSH, T.D. Antidepressants in chronic pain. **Clin. Neuropharmacol.**, 6: 271-295, 1983.
- WARD, N.G.; BLOOM, V.L.; FRIEDEL, R.O. The effectiveness of tricyclic antidepressants in the treatment of coexisting pain and depression. **Pain**, 7: 311-338, 1979.
- WOOD, J.N.; DOCHERTY, R. Chemical activators of sensory neurons. **Ann. Rev. Physiol.**, 59: 457-482, 1997.
- WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 80: 300-307, 1944.
- WU, W. P.; HAO, J.X.; HALLDNER-HENRIKSSON, L.; XU, X.J.; JACOBSON, M.A.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; FREDHOLM, B.B. Decreased inflammatory pain due to reduced carrageenan-induced inflammation in mice lacking adenosine A₃ receptors. **Lett. Neurosci.**, 114: 523-527, 2002.
- YAKSH, T.L. Pharmacology of spinal adrenergic system with modulate spinal nociceptive processing. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 22: 845-858, 1985.
- YANG, S.W.; ZHANG, C.E.; ZHANG, Z.H.; QIAO, J.T.; DAFNY, N. Sequential mediation of norepinephrine- and dopamine- induced antinociception at the spinal level: involvement of different local neuroactive substances. **Brain Res. Bull.**, 41: 105-109, 1996.
- ZHAO, Y.; ZHANG, C.E.; KANG, Y.M.; QIAO, J.T.; DAFNY, N. Endogenous adenosine involved in the mediation of spinal antinociception produced by stimulating locus coeruleus. **Life Sci.**, 65: 67-74, 1999.

ZHAO, T.; XI, L.; CHELLIAH, J.; LEVASSEUR, J.E.; KUKREJA, C. Inducible nitric oxide synthase mediates delayed myocardial protection induced by activation of adenosine A₁ receptors. **Circulation**, 102: 902-907, 2000.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16: 109-110, 1983.

ANEXO



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

Florianópolis, 25 de Outubro de 2004.

Prof. Allan I. Basbaum
Editor-in-Chief
Department of Anatomy and W.M. Keck
Foundation Center for Integrative Neuroscience,
University of California, San Francisco, CA, USA.

Dear Editor,

Please find enclosed a copy of our manuscript “**Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by exogenous adenosine in mice**” to be considered for publication in Pain.

Hoping to hear from you in due course.

Yours sincerely,

Professor Adair Roberto Soares dos Santos
Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas (CCB)
Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS)
Campus Universitário - Trindade
88040-900 - Florianópolis - SC - Brasil.
E-mail: arssantos@ccb.ufsc.br; arssantos@uol.com.br
Fax: (048) 331-9672; Tel: (048) 331-9352/9444

**Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by exogenous adenosine
in mice.**

Márcia Alair da Silva Pereira¹, João B. Calixto² and Adair R. S. Santos³.

¹Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas-NIQFAR/FAQFAR, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, 88303-202, Brazil.

²Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Ferreira Lima 82, Centro, Florianópolis, 88015-420, SC, Brazil.

³Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil.

*Corresponding author: Adair R.S. Santos, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil. Fax: +55 (048) 331-9672; Tel: +55 (048) 331-9352/9444

E-mail: arssantos@ccb.ufsc.br; arssantos@uol.com.br

Abstract

The present study examined the antinociceptive effects of exogenous adenosine in chemical and thermal behavioural models of pain in mice. Adenosine (1-500 mg/kg), given by i.p. or p.o. route, 30 and 60 min earlier respectively, produced dose-dependent inhibition of both phases of formalin-induced pain. Adenosine (10-500 mg/kg, i.p. or p.o.) also caused significant and dose-dependent inhibition of capsaicin- and glutamate-induced pain, respectively. Moreover, adenosine (100 mg/kg, i.p.) also caused marked increase on latency in the hot-plate assay. The antinociception caused by adenosine in the formalin test was significantly attenuated by i.p. treatment of mice with caffeine (non selective A_1 antagonist), DPCPX (a selective A_1 antagonist), ZM241385 (selective A_{2A} antagonist), L-arginine (precursor of nitric oxide), haloperidol (non selective D_2 antagonist), yohimbine (α_2 -adrenoceptor antagonist) or by i.c.v. treatment with pertussis toxin (inhibitor of $G_{i/o}$ protein). In contrast, adenosine antinociception was not affected by i.p. treatment of animals with naloxone (non selective opioid antagonist), bicuculine (selective $GABA_A$ antagonist), phaclofen (selective $GABA_B$ antagonist) or endogenous glucocorticoids. Together, these results indicate that adenosine produces dose-related antinociception in several models of pain through mechanisms that involve an interaction with adenosinergic (i.e., through A_1 and A_{2A} receptors), and nitrenergic systems, as well as an interaction with α_2 -adrenoceptors, dopaminergic D_2 receptors and $G_{i/o}$ protein-sensitive pertussis toxin.

Keywords: Adenosine, Antinociception, Formalin, Mice.

1. Introduction

The pain response appears to have evolved towards a level of complexity that is related to the cognitive capacity of the organism. The realization of pain is a multidimensional process involving physical, emotional and perceptual integration (Blackburn-Munro & Blackburn-Munro, 2001). The primary function of pain is to protect the organism from a potentially tissue-damaging stimulus via activation of spinal reflex withdrawal mechanisms. A more insidious type of pain is that which persists beyond its biological usefulness and compromises the quality of life for the individual (Millan, 1999).

Adenosine is one of a group of substances that behaves as an extracellular signalling molecule influencing synaptic transmission and modulating the activity of the nervous system (Cunha, 2001; Ribeiro et al., 2003). Adenosine is formed within cells as a result of hydrolysis of AMP through an action of 5'-nucleotidase, hence its formation depends upon ATP breakdown and synthesis. In the extracellular compartment, the level of adenosine also depends on the rate of hydrolysis of ATP, which is released from either neurons or glial cells (Fredholm et al., 2001). It is released upon conditions of metabolic stress from most cells including neurons and glia (Cunha, 2001; Ribeiro et al., 2003).

Adenosine is apparently involved in many functions with consequences in the pathology of the nervous system. It functions as a natural sleep-promoting agent, has anxiolytic and antinociceptive activity (Ribeiro et al., 2003) and exhibits protective properties against hypoxia/ischemia, excitotoxicity and trauma (De Mendonça and Ribeiro, 2000). Four subtypes of adenosine receptor, A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3 , have been identified. The A_{2A} and A_{2B} receptors preferably interact with members of Gs family of G proteins and the A_1 and A_3 receptors with $G_{i/o}$ proteins (Ralevic and Burnstock, 1998; Fredholm et al., 2001; Sawynok and Liu, 2003; Ribeiro et al., 2003). A_1 and A_{2A} are high affinity receptors, which are probably of

physiological importance, while A_{2B} and A₃ might be relevant in pathological conditions (Ribeiro et al., 2003).

The neuromodulation exerted by adenosine depends on a balance between inhibitory A₁ and mainly facilitatory A_{2A} receptors (Cunha, 2001). We have recently demonstrated that the administration of adenosine elicits an antidepressant-like effect in the forced swimming test (FST) in mice by a mechanism that involves the interaction with A₁ and A_{2A} receptors (Kaster et al., 2004). Studies have reported that adenosine and its analogs blocks spinal nociceptive reflexes and also prevents inflammation-, spinal cord injury- and nerve injury-induced pain (for review see Sawynok, 1998, Sawynok and Liu, 2003). However, despite the growing amount of experimental data the mechanisms through which adenosine causes systemic antinociception in rodents still remain elusive. Therefore, this study investigated the systemic antinociceptive properties of exogenous adenosine against chemical and thermal models of pain in mice and also used selective antagonists to elucidate some of the mechanisms that may be involved in the antinociceptive action of adenosine.

2. Material and methods

2.1. Animals

Experiments were conducted using non-fasted male Swiss mice (25-35 g), housed at 22 ± 2 °C under a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 06:00) and with access to food and water ad libitum. Animals were acclimatised to the laboratory for at least 1 h before testing and were used only once throughout the experiments. The experiments were performed after approval of the protocol by the Institutional Ethics Committee and were carried out in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983).

The numbers of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

2.2. Formalin-induced nociception

The procedure used was essentially similar to that described previously (Santos and Calixto, 1997a,b; Santos et al., 1999). Animals received 20 μ l of a 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde) made up in saline, injected intraplantarly (i.pl.) in the ventral surface of the right hindpaw of the mouse. Animals were pre-treated with adenosine via intraperitoneal (i.p., 10–300 mg/kg) or oral (p.o., 50-500 mg/kg) routes, 30 and 60 min before formalin injection, respectively (Santos et al., 1999). Control animals received an equal volume of vehicle by i.p. or p.o. (10 ml/kg) routes. After i.pl. injection of formalin, the animals were observed from 0-5 min (neurogenic phase) and 15-30 min (inflammatory phase) and the time spent licking the injected paw was timed with a chronometer and considered as indicative of nociception.

In a separate series of experiments, we also investigated the possible antinociceptive effect of adenosine given after formalin injection. For this purpose, mice were injected i.pl. with formalin, and after 5 min they received adenosine (100 mg/kg) or vehicle (10 ml/kg) given by i.p. route for evaluation against the second phase (inflammatory phase) of the nociception caused by formalin.

2.3. Capsaicin-induced nociception

In an attempt to provide more direct evidence concerning its possible antinociceptive effect on neurogenic nociception, adenosine was investigated in capsaicin-induced licking in the mouse paw. The procedure used was similar to that described previously (Santos and Calixto, 1997a, b). After the adaptation period, 20 μ l of capsaicin (1.6 μ g/paw made in saline solution) was injected i.pl. in the right hindpaw. Animals were observed individually for 5

min following capsaicin injection. The amount of time spent licking the injected paw was timed with a chronometer and was considered as indicative of nociception. Animals were treated with adenosine by i.p. (10-300 mg/kg) or p.o. (50-500 mg/kg) routes, 30 and 60 min before capsaicin injection, respectively. Control animals received a similar volume of vehicle systemically (i.p. or p.o., 10 ml/kg).

2.4. Glutamate-induced nociception

To test further the hypothesis whether or not the antinociceptive actions of adenosine were associated with an interaction with the glutamate systems, the effect of adenosine was assessed in the glutamate-induced licking in the mouse paw. The procedure used was similar to that described previously (Beirith et al., 2002). A volume of 20 μ l of glutamate (10 μ mol/paw made in saline solution) was injected i.pl. in the right hindpaw. Animals were observed individually for 15 min following glutamate injection. The amount of time spent licking the injected paw was timed with a chronometer and was considered as indicative of nociception. Animals were treated with adenosine by i.p. (30-300 mg/kg) route, 30 min before glutamate injection. Control animals received a similar volume of vehicle by i.p. (10 ml/kg).

2.5. Hot-plate test

The hot-plate test was used to measure the response latencies according to the method described by Eddy and Leimback (1953), with minor modifications. In these experiments, the hot-plate (Ugo Basile, model-DS 37) was maintained at 50 ± 1 °C. Animals were placed into a glass cylinder of 24-cm diameter on the heated surface, and the time between placement and shaking or licking of the paws, or jumping, were recorded as the index of response latency. An automatic 30-s cut-off was used to prevent tissue damage. Each animal was tested before administration of drugs in order to obtain the baseline. Animals were treated with adenosine (up to 100 mg/kg, i.p.), morphine (10 mg/kg, s.c.) or with vehicle (10 ml/kg, i.p.) 30 min

before testing. The maximal percentage of the effect (MPE) of adenosine-induced antinociception was calculated as follows: $\%MPE = (\text{postdrug} - \text{predrug}) / (30 - \text{predrug}) \times 100$.

2.6. Evaluation of locomotor activity

The open-field test was used to exclude the possibility that the antinociceptive action of adenosine could be related to non-specific disturbances in the locomotor activity of the animals. The ambulatory behaviour was assessed in an open-field test as described previously (Kaster et al., 2004). The apparatus consisted of a wooden box measuring 40 x 60 x 50 cm. The floor of the arena was divided into 12 equal squares, and the number of squares crossed with all paws (crossing) was counted in a 6-min session. Mice were treated with adenosine (100 mg/kg, i.p.) or with vehicle (10 ml/kg, i.p.) 30 min beforehand.

2.7. Analysis of the possible mechanism of action of adenosine

To address some of the mechanisms by which adenosine causes antinociception in the formalin-induced nociception, animals were treated with different drugs through several routes of administration. The choice of the doses of each drug was based on previous data in the literature or on preliminary experiments carried out in our laboratory (not shown).

To evaluate the involvement of adenosine receptors A_1 and A_{2A} in the antinociceptive action of adenosine, animals were pretreated with caffeine (3 mg/kg, i.p., a non selective adenosine A_1 receptor antagonist), DPCPX (5 mg/kg, i.p., a selective A_1 receptor antagonist), ZM241385 (3 mg/kg, a selective A_{2A} receptor antagonist) or vehicle, and after 20 min they received adenosine (100 mg/kg, i.p.) before being tested in the formalin 30 min later.

To assess the possible participation of the $G_{i/o}$ protein (sensitive to pertussis toxin) in the antinociceptive action of adenosine, mice were pre-treated with pertussis toxin (0.5

µg/site, intracerebroventricular [i.c.v.]), 7 days before the administration of adenosine (100 mg/kg, i.p.), or with morphine (5 mg/kg, s.c.), used as positive control as described previously (Santos et al., 1999). Other groups of animals were treated with saline (5 µl/site, i.c.v.), and 7 days after received adenosine, morphine or vehicle only, 30 min before the formalin injection.

In order to investigate the participation of the opioid system in the antinociceptive effect of adenosine, mice were pre-treated with naloxone (1 mg/kg, i.p., a non-selective opioid receptor antagonist), and after 20 min the animals received an injection of adenosine (100 mg/kg, i.p.), morphine (5 mg/kg, i.p., used as positive control) or vehicle (10 ml/kg, i.p.) as described previously (Santos et al., 1999). Another group of animals was pre-treated with vehicle and after 20 min received adenosine, morphine, or vehicle, 30 min before formalin injection.

To investigate the role played by the nitric oxide-L-arginine pathway in the antinociception caused by adenosine in the formalin test, mice were pre-treated with L-arginine (600 mg/kg, i.p., a nitric oxide precursor) or D-arginine (600 mg/kg, i.p., an inactive isomer of L-arginine) and after 20 min they received adenosine (100 mg/kg, i.p.), N⁰-nitro-L-arginine (L-NOARG, 75 mg/kg, i.p., a nitric oxide inhibitor) or vehicle (10 ml/kg, i.p.) as described previously (Santos et al., 1999). Another group of animals was pre-treated with vehicle (10 ml/kg, i.p.) and after 20 min received adenosine, L-NOARG, or vehicle, 30 min before formalin test.

We next investigated the possible role played by α_2 -adrenoceptors in the antinociceptive effect of adenosine in the formalin test. For this purpose, mice were pre-treated with yohimbine (0.15 mg/kg, i.p., a selective α_2 -adrenoceptor antagonist), and after 20 min the animals received an injection of adenosine (100 mg/kg, i.p.), clonidine (0.1 mg/kg, i.p., an α_2 -adrenoceptor agonist) or vehicle (10 ml/kg, i.p.) (Mendes et al., 2000). Another

group of animals was pre-treated with vehicle (10 ml/kg, i.p.) and after 20 min received adenosine, clonidine, or vehicle, 30 min before formalin injection.

To investigate the possible involvement of the dopaminergic system in the antinociceptive action of adenosine, mice were pre-treated with haloperidol (0.2 mg/kg, i.p., a D₂ receptor antagonist), and after 20 min they received adenosine (100 mg/kg, i.p.) or apomorphine (5 mg/kg, i.p., a selective D₂ agonist, used as positive control) injection, before being subjected to the formalin test 30 min later. Another group of animals was pre-treated with vehicle and after 20 min they received adenosine, apomorphine or vehicle, 30 min before formalin injection.

With the purpose of evaluating the possible contribution of the γ -aminobutyric acid (GABA) system in the antinociceptive action of adenosine, mice were pre-treated with phaclofen (3 mg/kg, i.p., a GABA_B antagonist) or bicuculine (0.7 mg/kg, i.p., a GABA_A antagonist), and after 20 min they received adenosine (100 mg/kg, i.p.), baclofen (1 mg/kg, i.p., a GABA_B agonist), muscimol (1 mg/kg, i.p., a GABA_A agonist) or vehicle injection before being subjected to the formalin test 30 min later (Mendes et al., 2000). Another group of animals was pre-treated with vehicle and after 20 min received adenosine, muscimol, phaclofen or vehicle, 30 min before formalin injection.

Finally, to explore the role of endogenous glucocorticosteroids in the antinociceptive effect of adenosine, animals were anesthetized with chloral hydrate 7% (10 ml/kg, i.p.) and both adrenal glands were removed through dorsal incision, as described previously by Mendes et al. (2000). After surgery, animals adrenalectomized (ADX) were returned to their cages, with free access to food and liquid, but water was replaced by saline (0.9 % NaCl solution) to maintain physiological sodium plasma concentration. Another group of animals was sham-operated (SHO) and allowed free access to water and food. After one week, the

animals received adenosine (100 mg/kg, i.p.) or vehicle (10 ml/kg, i.p.) 30 min before formalin injection. The SHO animals were used as control.

2.8. *Drugs*

The following substances were used: formalin, morphine hydrochloride (Merck, Darmstadt, Germany), adenosine, caffeine, L-arginine, L-NOARG, yohimbine, clonidine, bicuculine, haloperidol, apomorphine, glutamate, and capsaicin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), naloxone hydrochloride (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA), baclofen, phaclofen, muscimol, DPCPX, (Tocris, Ballwin, MO), ethanol and dimethyl sulfoxide (LabSynth, São Paulo, Brazil), chloral hydrate (Vetec, São Paulo, Brazil). Drugs were dissolved in 0.9% of NaCl solution, with the exception of capsaicin and DPCPX, which were dissolved in absolute ethanol and dimethyl sulfoxide, respectively. All drugs were prepared just before use in 0.9% w/v of NaCl solution. The final concentration of ethanol and dimethyl sulfoxide did not exceed 5% and did not cause any effect "per se".

2.9. *Statistical analysis*

The results are presented as mean + S.E.M., except the ID50 values (i.e., the dose of adenosine reducing the nociceptive response by 50% relative to the control value), which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. The ID50 value was determined by linear regression from individual experiments using linear regression GraphPad software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). The statistical significance of differences between groups was detected by ANOVA followed by Newman-Keuls' test. P-values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as indicative of significance.

3. Results

3.1. Formalin-induced nociception

The results depicted in Fig. 1 (A and B) show that adenosine, given by i.p. or p.o. routes, produced dose-related inhibition of the early (0 to 5 min) and the late phase (15 to 30 min) of the formalin-induced licking. The calculated mean ID₅₀ values shown in table 1 reveal that adenosine given orally was 2.1- to 3.9-fold less potent than when it was given by i.p. route. A time-course analysis of the antinociceptive effect of adenosine was performed. As shown in Fig. 1 (C and D) adenosine showed their maximum effect after 0.5 and 1 h when given by i.p. or p.o. routes, respectively, remaining significant until 6 to 8 h after administration (Fig. 1 C and C). The time point from maximum effects of adenosine, given by i.p. route, was chosen for all further studies with independent groups of animals.

Adenosine (100 mg/kg, i.p.), administered either 10 min prior to or 5 min after the formalin injection, produced a significant inhibitory effect against the second (inflammatory nociception) phase of the formalin-induced pain. The therapeutic treatment (post-administered adenosine) produced an inhibition of 70±6% of the nociception elicited by formalin, whereas the prophylactic treatment (pre-administered adenosine) caused an inhibition of 59±5% (Fig. 2 A and B).

3.2. Capsaicin-induced nociception

The results in Fig. 3 (A) show that adenosine, given by i.p. or p.o. routes, produced dose-related inhibition of the capsaicin-induced neurogenic nociception. The calculated mean ID₅₀ values and the inhibitions (%) for these effects are presented in Table 1.

3.3. Glutamate-induced nociception

The results in Fig. 3 (B) show that adenosine, given by i.p. route; dose dependently inhibited the peripheral nociception induced by i.pl. injection of glutamate nociception. The calculated mean ID₅₀ values and the inhibitions (%) for these effects are presented in Table 1.

3.4. Hot-plate test

Adenosine (100 mg/kg) given by i.p. route, at similar doses to those at which it was active in other models of pain, significantly increases the latency response in the hot-plate assay (Fig. 4). Under similar conditions, morphine (10 mg/kg, s.c.) also caused a significant increase in the latency response on the hot-plate test (Fig. 4).

3.5. Open field test

To evaluate possible effects of adenosine on locomotor activity, we used the open field test. Adenosine (100 mg/kg) given by i.p. route, at similar doses to those at which it was active in other models of pain, did not significantly affect the locomotor activity of animals. The control response in the open field test was 84.5±1.5 versus 82.9±1.0 in the presence of adenosine ($n=8$).

3.6. Analysis of the antinociceptive mechanism of action of adenosine

The results depicted in Figs. 5, 6 and 7 (A and B) and the data summarized in table 2 show that the pre-treatment of animals with caffeine, DPCPX, or ZM241385 before injection of adenosine largely reverted the antinociception caused by adenosine against both phases of the formalin test.

The i.c.v. administration of pertussis toxin, an inactivator of G_{i/o} protein, produced significant inhibition of morphine-induced antinociception when assessed against both phases

of formalin-induced pain (Fig. 8 A and B). Under the same conditions, pertussis toxin treatment significantly antagonized the antinociceptive action of the adenosine in the early and late phases of the formalin test (Fig. 8 A and B).

The previous systemic treatment of the animals with naloxone, given 20 min beforehand, did not significantly reverse the antinociception caused by systemic adenosine against either of the phases of formalin-induced nociception (data not shown and table 2). However, the antinociception produced by morphine was significantly reversed (results not shown).

The results presented in Fig. 9 (A and B) show that the pre-treatment of mice with the nitric oxide precursor L-arginine (600 mg/kg, i.p.), given 20 min earlier, but not D-arginine (600 mg/kg, i.p.), significantly reversed the antinociception caused by adenosine (100 mg/kg, i.p.) or L-NOARG (75 mg/kg, i.p.), when analysed against both phases of the formalin test. The previous treatment of mice with yohimbine (0.15 mg/kg, i.p.), given 20 min beforehand, significantly reversed the antinociception caused by clonidine (0.1 mg/kg, i.p.) or adenosine (100 mg/kg, i.p.) against either of the phases of formalin-induced nociception (Fig. 10 A and B and Table 2).

Figure 11 (A and B) show that the pre-treatment of animals with haloperidol, given 20 min beforehand, significantly reversed the antinociception caused by apomorphine (1 mg/kg, i.p.) or adenosine (100 mg/kg, i.p.) against either of the phases of formalin-induced nociception..

Previous treatment of animals with phaclofen (3 mg/kg, i.p.) or bicuculine (0.7 mg/kg, i.p.), given 20 min beforehand, significantly reversed the antinociception caused by baclofen or muscimol, but had no effect on the antinociceptive action caused by adenosine when analyzed against both phases of the formalin test (data not shown and table 2). In addition, bilateral adrenalectomy of the animals, performed 1 week before experiments, did not

significantly affect the antinociceptive effect caused by adenosine in this same model (data not shown and table 2).

4. Discussion

The present study extends and confirms that systemic (i.p. or p.o.) administration of adenosine, an endogenous compound, resulted in pronounced and long-lasting antinociceptive action without causing any important motor dysfunction or any detectable side effect in mice. The most relevant additional findings of the work are that, (i) i.p. or p.o. administration of adenosine causes significant inhibition against both neurogenic and inflammatory pain responses to the intraplantar injection of formalin, and against the neurogenic pain caused by activation of vanilloid receptors by capsaicin in the mouse paw; (ii) adenosine produces both prophylactic and therapeutic antinociception against the inflammatory pain response caused by formalin; (iii) the algescic response caused by intraplantar injection of glutamate was also significantly inhibited by adenosine; (iv) the antinociceptive action of adenosine in the formalin test was significantly reversed by i.p. treatment of animals with caffeine, DPCPX, ZM241385, L-arginine, yohimbine, haloperidol or by i.c.v. treatment with pertussis toxin, but not by naloxone, bicuculine, phaclofen, and by the adrenalectomy of animals.

A considerable number of studies have suggested that adenosine, which is neither stored nor released as a classical neurotransmitter, is part of group of substance that act as modulators in the nervous system (Sebastião and Ribeiro, 2000; Ribeiro et al., 2003; Sawynok and Liu, 2003). Adenosine is released by most cells, including neurons and glial cells, and modulates the activity of the nervous system by acting presynaptically (inhibiting or facilitating transmitter release), postsynaptically and/or non-synaptically (Sebastião and Ribeiro, 2000). Adenosine mediates its effects through activation of physiologically relevant high-affinity adenosine receptors (A_1 and A_{2A}) and lower-affinity receptors (A_{2B} and A_3) that

might be involved in pathological conditions (Klotz, 2000; Sebastião and Ribeiro, 2000; Ribeiro et al., 2003; Sawynok and Liu, 2003). In addition, adenosine receptor activation affects nerve cells directly and influences the action of neurotransmitters and other neuromodulators indirectly, behaving as a modulator of modulators; because adenosine uses very subtle ways to participate in these actions (Sebastião and Ribeiro, 2000). Furthermore, adenosine functions as a fine-tuner and in this way contributes to a very sophisticated interplay between its own receptors and the receptors for other neurotransmitters, neuromodulators or both. Thus, fine-tuning emerges as a concept that helps to explain how synapses are controlled while using their available mediators (e.g. neuropeptides) to communicate (Sebastião and Ribeiro, 2000).

Adenosine is apparently involved in many functions with consequences in the pathology of the nervous system, such as regulation of sleep and the level of arousal, anxiety, cognition and memory, neuroprotection (e.g. neuronal damage and degeneration, as well as neuronal maturation), pain, etc. (Ribeiro et al., 2003). It is recognized that adenosine and its analogs play a multifaceted and a complex, but significant role in the perception of pain at both central and peripheral sites in a variety of pain models in human and animals, including acute, neuropathic and inflammatory pain (see review Sawynok, 1998; Segerdahl and Sollevi, 1998; Sawynok and Liu, 2003). However, in spite of the considerable amount of data regarding the analgesic effects of adenosine and its analogs the precise mechanism underlying with the adenosine itself antinociceptive activity when given systemically remains to be fully understood.

In the present study, we attempted to characterise further some of the mechanisms through which adenosine itself, administered exogenously, exerts its antinociceptive action in chemical and thermal models of nociception in mice. The results reported here indicate, to our knowledge for the first time, that i.p. or oral administration of adenosine, at doses that did not

produce any important motor dysfunction or any detectable side effect, produced marked and dose-related antinociception when assessed in both neurogenic (early phase) and inflammatory (late phase) pain responses caused by formalin injection in mice. Adenosine's antinociceptive effects given both intraperitoneally or orally install rapidly and last for at least 6- to 8-h. However, adenosine given orally being about 2.1 to 3.9-fold less potent at the ID₅₀ level than when it was given by i.p. route. These observations are important and show, for the first time, that adenosine is active when given by p.o. route and produced long-lasting antinociceptive action in the formalin-induced nociception. Also of interest are the results showing that adenosine has both prophylactic (i.e. producing pre-emptive analgesia when it was pre-administered), as well as therapeutic (i.e. effective when post-administered) properties against late phase of formalin-induced nociception.

The formalin test is widely used as a model of persistent pain involving tissue injury. Injection of formalin produces a biphasic response consisting of an initial phase lasting about 5 min, which is followed, after a short quiescent interphase, by a longer period of sustained activities lasting 30- to 60-min (see review Tjølsen et al., 1992; Tjølsen and Hole, 1997). The first phase results from direct activation of nociceptive nerve terminals, while the second phase is mediated by a combination of peripheral input and spinal cord sensitization (see review Tjølsen et al., 1992). The inflammatory response in the early phase is neurogenic, resulting from neuropeptides released from nociceptive nerve terminals through a local axon reflex, while in the later phase, tissue injury and non-neurogenic inflammation are primarily involved (Hunnskaar and Hole, 1987; Tjølsen et al., 1992; Santos and Calixto, 1997a,b; Tjølsen and Hole, 1997). Recently, Liu et al. (2000) demonstrated that formalin injection into the rat hind paw induces a dose-dependent local peripheral release of adenosine. In addition, increasing endogenous levels of adenosine, by inhibiting enzymes involved in adenosine metabolism, produces both antinociceptive effects in formalin pain model involving both

peripheral and central sites (Gomtsyan et al., 2002; see review Sawynok, 1998; Sawynok and Liu, 2003). More recently, Liu et al. (2001) demonstrated that peripheral origin of adenosine released by formalin in the rat hind paw depends on the formalin concentration; and that small diameter capsaicin-sensitive afferents are involved at a low dose of formalin, while both capsaicin-sensitive primary afferents (during early phase) and sympathetic postganglionic nerve terminals (during late phase) are involved in high dose formalin-evoked adenosine release.

Another finding of note is the demonstration, for the first time, that adenosine, given by i.p. or p.o. routes produced a dose-dependent antinociceptive effect on the capsaicin-induced neurogenic paw licking response, which was very similar to the inhibition of the first phase response of the formalin test. It has been shown that capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), the pungent algescic substance obtained from hot red chilli peppers, is a valuable pharmacological tool for studying a subset of mammalian primary sensory C-fibres and A δ afferent neurones including polymodal nociceptors and warm thermoceptors (for review see Holzer, 1991; Jancso, 1992). In addition, it has been proposed that the capsaicin-induced nociception is brought about by activation of the capsaicin receptor, also known as the vanilloid receptor (VR), termed VR subtype 1 (VR1), a ligand-gated nonselective cation channel in primary sensory neurons (Szallasi and Blumberg, 1993; Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998). Studies have shown that capsaicin evokes the release of neuropeptides, excitatory amino acids (glutamate and aspartate), nitric oxide and pro-inflammatory mediators in the periphery, and transmits nociceptive information to the spinal cord (Szallasi and Blumberg, 1993; Santos and Calixto, 1997a,b; Sakurada et al., 1996, 2003). Furthermore, it has been reported that activation of TRPV1 in the spinal cord and periphery promotes release of adenosine, which produces analgesia by activating A₁ and A_{2A} adenosine receptor on central and peripheral neurons (Puntambekar et al., 2004). In addition, the authors

also showed that adenosine analogs inhibit both TRPV1-mediated Ca^{2+} entry in human embryonic kidney (HEK293) cells stably expressing TRPV1 (HEK/TRPV1) and DRG neurons and inhibited [^3H]RTX binding to affinity-purified TRPV1, indicative of a direct interaction of these ligands with the receptor (Puntambekar et al., 2004). These authors suggest that adenosine could serve as an endogenous inhibitor of TRPV1 activity by directly interacting with the receptor protein. Together these findings strongly suggest that the antinociceptive action of adenosine on capsaicin-induced neurogenic pain could be related with direct interaction with TRPV1 receptor.

Our results also show that i.p. administration of adenosine produced a significant and dose-dependent inhibition of the nociceptive response caused by intraplantar injection of glutamate into the mouse hindpaw. Recently, Beirith et al. (2002) found that the nociceptive response induced by glutamate appears to involve peripheral, spinal and supraspinal sites of action and is greatly mediated by both NMDA and non-NMDA receptors as well as by the release of nitric oxide or by some nitric oxide-related substance. Thus, these previous findings and the present results may indicate that, at least in part, the antinociceptive action of adenosine in the glutamate tests could be due to both the inhibition of NOS and the blockade of NMDA and non-NMDA receptors. Finally, it has been reported that postsynaptic or presynaptic activation of adenosine (via A_1 and A_{2A}) is associated with the inhibition of NMDA and non-NMDA receptor activation (De Mendonça and Ribeiro, 2000; Fredholm et al., 2001; Gerevich et al., 2002; Sawynok and Liu, 2003).

Another interesting result of the current study was the fact that i.p. administration of adenosine, at doses which inhibited the nociception caused by formalin, capsaicin, and glutamate produced a significant antinociception in thermal noxious stimuli, hot-plate test. The hot-plate test produces, at constant temperature, two kinds of behavioral response, which are: paw licking and jumping. Both are considered to be supraspinally-integrated responses

(Chapman et al., 1985). To determine possible locomotor effects of adenosine, which may complicate the interpretation of antinociceptive action of adenosine in the pain models used, we studied locomotor activity after adenosine treatment in the open field test. We found that adenosine at an antinociceptive dose 100 mg/kg did not cause any important motor dysfunction or any detectable side effect in mice. Thus, the antinociceptive action of adenosine can not easily be accounted for by their locomotor effects.

Concerning the mechanism through which adenosine exerts its antinociceptive action the present study shows that the A₁ and A_{2A} receptors is likely involved. This conclusion derives from the fact that pre-treatment of animals with caffeine (a non selective adenosine A₁ receptor antagonist), DPCPX (a selective A₁ receptor antagonist), ZM241385 (a selective A_{2A} receptor antagonist), at doses that did not cause any effect by themselves, significantly reversed the antinociception caused by adenosine in the formalin-induced nociception. It has been demonstrated that adenosine activates both A₁ and A_{2A} receptors, and these two subtypes of adenosine receptors can co-exist in the same nerve terminal (see review Sebastião and Ribeiro, 2000; Ribeiro et al., 2003). These results are consistent with previous findings and offer additional insight that adenosine antinociception is probably mediated by an interaction with A₁ and A_{2A} receptors (see review Sawynok and Liu, 2003). In addition, we have showed that adenosine produces an antidepressant-like effect in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice through a mechanism that appears to involve an interaction with A₁ and A_{2A} receptors (Kaster et al., 2004). Together these findings strongly suggest that the A₁ and A_{2A} receptors could be involved in both the antinociceptive (present study) and the antidepressant-like effects of adenosine (Kaster et al., 2004).

An interesting finding of the present study was that, like morphine, adenosine antinociception was significantly attenuated after i.c.v. treatment of animals with pertussis toxin (0.5 µg/site; 7 days before experiments) at a dose that has been shown previously to

suppress the antinociceptive effect caused by morphine through ADP-ribosylation (Hernandez et al., 1995; Santos et al., 1999; Mendes et al., 2000). These results, therefore, are consistent with the literature data (see review Sawynok and Liu, 2003) by demonstrated that the antinociceptive action of adenosine, similar to that of morphine, is probably coupled to $G_{i/o}$ proteins sensitive to treatment with pertussis toxin. A possible interaction between opioid and purinergic systems was suggested. It has been demonstrated that morphine induces the release of adenosine and this contributes to analgesic action of opioids and it was observed that methylxanthines are able to inhibit morphine-induced analgesia and that adenosine and its analogs potentiate it (see review Sawynok and Liu, 2003; Ribeiro et al., 2003). Our data demonstrate that the activation of the opioid naloxone-sensitive pathway seem unlikely to be involved in the antinociceptive action of adenosine, evident by the fact that naloxone (a non-selective opioid receptor antagonist), a scheme of treatment the previously has been reported as preventing the antinociception caused by morphine, had no significant effect on the adenosine antinociception (Santos et al., 1999; Mendes et al., 2000).

In addition, our results also support the notion that the L-arginine-nitric oxide pathway might account for the antinociceptive effect of adenosine. This view derives from the fact that pre-treatment of animals with the substrate for NOS, L-arginine, but not with the inactive isomer D-arginine, significantly reversed the antinociception caused by both adenosine and L-NOARG (a known nitric oxide inhibitor). These findings extend literature data and show, for the first time, the involvement of the L-arginine/NO pathway in adenosine-induced antinociception. Furthermore, results of the present study provide consistent evidence supporting the involvement of α_2 -adrenoceptors and dopamine D_2 receptors in the antinociception caused by adenosine, evident by the fact that both yohimbine (a α_2 -adrenoceptor antagonist) and haloperidol (a D_2 receptor antagonist), at similar doses known to prevent clonidine (a α_2 -adrenociceptor agonist)- and apomorphine (a D_2 receptor agonist)-

induced antinociception, respectively, consistently attenuated adenosine-induced antinociception in the formalin test. There are also reports the existence of functional adenosine A₁ receptor-dopamine D₁ receptor and adenosine A_{2A} receptor-dopamine D₂ receptor heteromeric complexes in mammalian cell lines (Kim and Palmiter, 2003; Canals et al., 2003). Considering the present data, we can speculate that the antinociceptive action of adenosine is probably linked to an interaction with the both α_2 -adrenoceptor and dopamine D₂ receptor.

Our data demonstrate that the γ -aminobutyric acid (GABA) system seem unlikely to be involved in the antinociceptive action of adenosine. This evident derives from the fact that bicuculline (a GABA_A antagonist) or phaclofen (a GABA_B antagonist), at a dose where its consistently reversed muscimol (a GABA_A agonist)- and baclofen (a GABA_B agonist)-induced antinociception, had no significant effect on the adenosine antinociception. Finally, adenosine antinociceptive action was not modulated by endogenous glucocorticoids hormones because previous bilateral adrenalectomy of animals, carried out 1 week before testing, did not significantly modify its antinociceptive action compared with SHO animals. In summary, the data of the present study show that adenosine itself exerts a rapid onset, relatively long-lasting and pronounced systemic antinociception in chemical (e.g. formalin, glutamate and capsaicin) and thermal (hot-plate test) nociceptive models in mice at a dose that does not interfere with the locomotor activity of animals. In addition, adenosine's antinociceptive effect involves an interaction with adenosinergic (i.e., through A₁ and A_{2A} receptors), and nitrergic systems, as well as an interaction with α_2 -adrenoceptors, dopamine D₂ receptors and G_{i/o} protein-sensitive pertussis toxin. However, opioid and GABA systems, as well as endogenous glucocorticoids are unlikely to participate in antinociception caused by adenosine.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Programa Integrado de Pós Graduação e Graduação (PIPG) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

References

- Beirith A, Santos ARS, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.* 2002; 924: 219-228.
- Blackburn-Munro G, Blackburn-Munro RE. Chronic pain, chronic stress and depression: coincidence or consequence? *J. Neuroendocrinol.* 2001;13:1009-1023.
- Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, Benedetti P, Goldberg SR, Neve K, Fuxe K, Agnati LF, Woods AS, Ferré S, Lluís C, Bouvier M, Franco R. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 46741-46749.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389:816-824.
- Chapman CR, Casey KL, Dubner R, Foley KM, Graceley RH, Reading AE. Pain measurement: an overview. *Pain* 1985; 22:1-31.
- Cunha RA, Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry Int.* 2001; 38:107-125
- de Mendonca A, Ribeiro JA. Long-term potentiation observed upon blockade of adenosine A1 receptors in rat hippocampus is N-methyl-D-aspartate receptor-dependent. *Neurosci Lett.* 2000; 291:81-84.
- Eddy NB, Leimback D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1953; 107:385-393.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53:527-52.

- Gerevich Z, Wirkner K, Illes P. Adenosine A_{2A} receptors inhibit the N-methyl-D-aspartate component of excitatory synaptic currents in rat striatal neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 451:161-4.
- Gomtsyan A, Didomenico S, Lee CH, Matulenko MA, Kim K, Kowaluk EA, Wismer CT, Mikusa J, Yu H, Kohlhaas K, Jarvis MF, Bhagwat SS. Design, synthesis, and structure-activity relationship of 6-alkynylpyrimidines as potent adenosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 2002; 45:3639-3648.
- Hernandez A, Soto-Moyano R, Mestre C, Eschalier A, Pelissier I, Paeile C, Contrenas E. Intrathecal pertussis toxin but not cyclic AMP blocks kappa opioid-induced antinociception in rat. *Int. J. Neurosci.* 1995; 81:193-197.
- Holzer P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1991; 298:3-16.
- Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30, 103-114.
- Jancso G. Pathobiological reactions of C-fibre primary sensory neurones to peripheral nerve injury. *Exp. Physiol.* 1992; 77:405-431.
- Kaster MP, Rosa AO, Rosso MM, Goulart EC, Santos ARS, Rodrigues ALS. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A₁ and A_{2A} receptors. *Neurosci, Lett.* 2004; 355:21-24.
- Kim DS, Palmiter RD. Adenosine receptor blockade reverses hypophagia and enhances locomotor activity of dopamine-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 1346-1351.
- Klotz K-N. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2000; 362:382-391.

- Liu XJ, White TD, Sawynok J. Involvement of primary sensory afferents, postganglionic sympathetic nerves and mast cells in the formalin-evoked peripheral release of adenosine. *Eur. J. Pharmacol.* 2001; 429:147-155.
- Liu XJ, White TD, Sawynok J. Potentiation of formalin-evoked adenosine release by an adenosine kinase inhibitor and an adenosine deaminase inhibitor in the rat hind paw: a microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 408:143-152.
- Mendes GL, Santos ARS, Malheiros A, Filho VC, Yunes RA, Calixto JB. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; 292:164-172.
- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 1999; 57:1-164.
- Puntambekar P, Van Buren J, Raisinghani M, Premkumar LS, Ramkumar V. Direct interaction of adenosine with the TRPV1 channel protein. *J. Neurosci.* 2004; 24:3663-3671.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 1998; 50:415-437.
- Ribeiro JA, Sebastião AM, De Mendonça A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.* 2003; 68: 377-391.
- Sakurada T, Matsumura T, Moriyama T, Sakurada C, Ueno S, Sakurada S. Differential effects of intraplantar capsaizine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003; 75:115-121.
- Sakurada T, Sugiyama A, Sakurada C, Tanno K, Sakurada S, Kisara K, Hara A, Abiko Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. *Neurochem. Int.* 1996; 29:271-278.

- Santos ARS, Calixto JB. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides* 1997a; 31:381-389.
- Santos ARS, Calixto JB. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neurosci. Lett.* 1997b; 235:73-76.
- Santos ARS, Miguel OG, Yunes RA, Calixto JB. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8,10-Di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: Evidence for the mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 289:417-426.
- Sawynok J, Liu XJ. Adenosine in the spinal cord and peripheral: release and regulation of pain. *Prog. Neurobiol.* 2003; 69:313-340.
- Sawynok J. Adenosine receptors activation and nociception. *Eur.J. Pharmacol.* 1998; 317:1-11.
- Sebastião AM, Ribeiro JA. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol. Sci.* 2000; 21: 341-346.
- Segerdahl M, Sollevi A. Adenosine and pain relief: A clinical overview. *Drug Dev. Res.* 1998; 45:151-158.
- Szallasi A, Blumberg PM. Mechanisms and therapeutic potential of vanilloids (capsaicin-like molecules). *Adv. Pharmacol.* 1993; 24:123-155.
- Tjølsen A, Berger OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51:5-17.
- Tjølsen A, Hole K, 1997. Animal Models of Analgesia. In *The Pharmacology of Pain* (Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 30/I). Dickenson, A., Besson, J., -M., editors., Springer: Verlag, Berlin. 1-20.

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998; 21:531-543.

Zimemrmann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16:109-110.

Legends to figures

Figure 1. Effect of i.p. or p.o. treatment of animals with adenosine on formalin-induced nociception in mice. The total time spent licking the hindpaw was measured in the early (0-5 min, panels A and C) and late phase (15-30 min, panels B and D), after intraplantar injection of formalin. Each point represents the mean for 8 to 10 animals and the vertical lines indicate the S.E.M. The point (C) indicates the control values (animals treated with the vehicle) and the asterisks denote significance levels, when compared with control groups, (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test), **P<0.01, ***P<0.001. Insert: Represent the time-course of the antinociceptive effect of adenosine on formalin test. Adenosine was administered 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 and 12 hours before formalin injection. Each point represents the mean of 5 or 6 animals and the error bars indicate the S.E.M. Control value (0) indicates the animals injected with saline and the asterisks denote the significance levels, when compared with control groups (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test) **P<0.01, ***P<0.001. In some cases, the error lines are hidden within the symbols.

Figure 2. Effect of adenosine pre- or post-administered intraperitoneally against formalin-induced licking (first phase, panel A, and second phase, panel B) in mice. Each column represents the mean of 6-8 animals and the error bars indicate the S.E.M. Control values (C) indicate the animals injected with saline and the asterisks denote the significance levels, when compared with control groups (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test) ***P<0.001.

Figure 3. Effect of i.p. or p.o. treatment of animals with adenosine on capsaicin-induced licking (A) or i.p. injection of adenosine against glutamate-induced licking (B) in mice. Each point represents the mean of 6-8 animals and the error bars indicate the S.E.M. Control values (C) indicate the animals injected with saline and the asterisks denote the significance levels, when compared with control groups (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test) ***P<0.001. In some cases, the error lines are hidden within the symbols.

Figure 4. Effect of treatment of animals with adenosine (100 mg/kg, i.p.), morphine (10 mg/kg, s.c.) or vehicle (saline, 10 ml/kg, i.p.) on hot-plate test in mice. Each column represents the mean of 6-8 animals and the error bars indicate the S.E.M. Control values indicate the animals injected with vehicle (saline) and the asterisks denote the significance levels, when compared with control groups (one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test) ***P<0.001.

Fig. 5. Effect of pre-treatment of animals with caffeine (3 mg/kg, i.p., hatched column) or vehicle (saline, 10 ml/kg, i.p., closed column) on the antinociceptive action caused by adenosine (100 mg/kg, i.p.) on formalin-induced nociception in mice. The total time (mean \pm

S.E.M.) spent licking the hindpaw was measured in the first (0 - 5 min, panel A) and second phase (15 - 30 min, panel B) after intraplantar injection of formalin into the hindpaw. Each column represents the mean of 6 to 8 animals and the vertical lines indicate the S.E.M. #P < 0.01 compared with caffeine plus adenosine versus vehicle plus adenosine, ***P < 0.01 compared with corresponding control values (animals injected with vehicle or caffeine alone).

Fig. 6. Effect of pre-treatment of animals with DPCPX (5 mg/kg, i.p., hatched column) or vehicle (saline, 10 ml/kg, i.p., closed column) on the antinociceptive action caused by adenosine (100 mg/kg, i.p.) on formalin-induced nociception in mice. The total time (mean \pm S.E.M.) spent licking the hindpaw was measured in the first (0 - 5 min, panel A) and second phase (15 - 30 min, panel B) after intraplantar injection of formalin into the hindpaw. Each column represents the mean of 6 to 8 animals and the vertical lines indicate the S.E.M. #P < 0.01 compared with DPCPX plus adenosine versus vehicle plus adenosine, ***P < 0.01 compared with corresponding control values (animals injected with vehicle or DPCPX alone).

Fig. 7. Effect of pre-treatment of animals with ZM241385 (3 mg/kg, i.p., hatched column) or vehicle (saline, 10 ml/kg, i.p., closed column) on the antinociceptive action caused by adenosine (100 mg/kg, i.p.) on formalin-induced nociception in mice. The total time (mean \pm S.E.M.) spent licking the hindpaw was measured in the first (0 - 5 min, panel A) and second phase (15 - 30 min, panel B) after intraplantar injection of formalin into the hindpaw. Each column represents the mean of 6 to 8 animals and the vertical lines indicate the S.E.M. #P <

0.01 compared with ZM241385 plus adenosine versus vehicle plus adenosine, ***P < 0.01 compared with corresponding control values (animals injected with vehicle or DPCPX alone).

Fig. 8. Effect of pre-treatment of animals with pertussis toxin (0.5 µg/i.c.v., hatched column) or vehicle (saline, 0.5 µl/i.c.v., closed column) on the antinociceptive action caused by morphine (5 mg/kg. s.c.) or adenosine (100 mg/kg, i.p.) on formalin-induced nociception in mice. The total time (mean ± S.E.M.) spent licking the hindpaw was measured in the first (0 - 5 min, panel A) and second phase (15 - 30 min, panel B) after intraplantar injection of formalin into the hindpaw. Each column represents the mean of 6 to 8 animals and the vertical lines indicate the S.E.M. #P < 0.01 compared with pertussis toxin plus agonist (adenosine or morphine) versus vehicle plus agonist, ***P < 0.001 compared with corresponding control values (animals injected with vehicle or pertussis toxin alone).

Fig. 9. Effect of pre-treatment of animals with L-arginine (600 mg/kg, i.p., hatched column), D-arginine (600 mg/kg, i.p., open column) or vehicle (saline, 10 ml/kg, i.p., closed column) on the antinociceptive action caused by L-NOARG (75 mg/kg, i.p.) or adenosine (100 mg/kg, i.p.) on formalin-induced nociception in mice. The total time (mean ± S.E.M.) spent licking the hindpaw was measured in the first (0 - 5 min, panel A) and second phase (15 - 30 min, panel B) after intraplantar injection of formalin into the hindpaw. Each column represents the mean of 6 to 8 animals and the vertical lines indicate the S.E.M. #P < 0.01 compared with L-arginine plus agonist (adenosine or L-NOARG) versus vehicle plus agonist, ***P < 0.001 compared with corresponding control values (animals injected with vehicle or L-arginine alone).

Fig. 10. Effect of pre-treatment of animals with yohimbine (0.15 mg/kg, i.p., hatched column) or vehicle (saline, 10 ml/kg, i.p., closed column) on the antinociceptive action caused by clonidine (0.1 mg/kg, i.p.) or adenosine (100 mg/kg, i.p.) on formalin-induced nociception in mice. The total time (mean \pm S.E.M.) spent licking the hindpaw was measured in the first (0 - 5 min, panel A) and second phase (15 - 30 min, panel B) after intraplantar injection of formalin into the hindpaw. Each column represents the mean of 6 to 8 animals and the vertical lines indicate the S.E.M. #P < 0.01 compared with yohimbine plus agonist (adenosine or clonidine) versus vehicle plus agonist, ***P < 0.001 compared with corresponding control values (animals injected with vehicle or yohimbine alone).

Fig. 11. Effect of pre-treatment of animals with haloperidol (0.2 mg/kg, i.p., hatched column) or vehicle (saline, 10 ml/kg, i.p., closed column) on the antinociceptive action caused by apomorphine (5 mg/kg, i.p.) or adenosine (100 mg/kg, i.p.) on formalin-induced nociception in mice. The total time (mean \pm S.E.M.) spent licking the hindpaw was measured in the first (0 - 5 min, panel A) and second phase (15 - 30 min, panel B) after intraplantar injection of formalin into the hindpaw. Each column represents the mean of 6 to 8 animals and the vertical lines indicate the S.E.M. #P < 0.01 compared with haloperidol plus agonist (adenosine or apomorphine) versus vehicle plus agonist, ***P < 0.001 compared with corresponding control values (animals injected with vehicle or haloperidol alone).

FIGURE 1

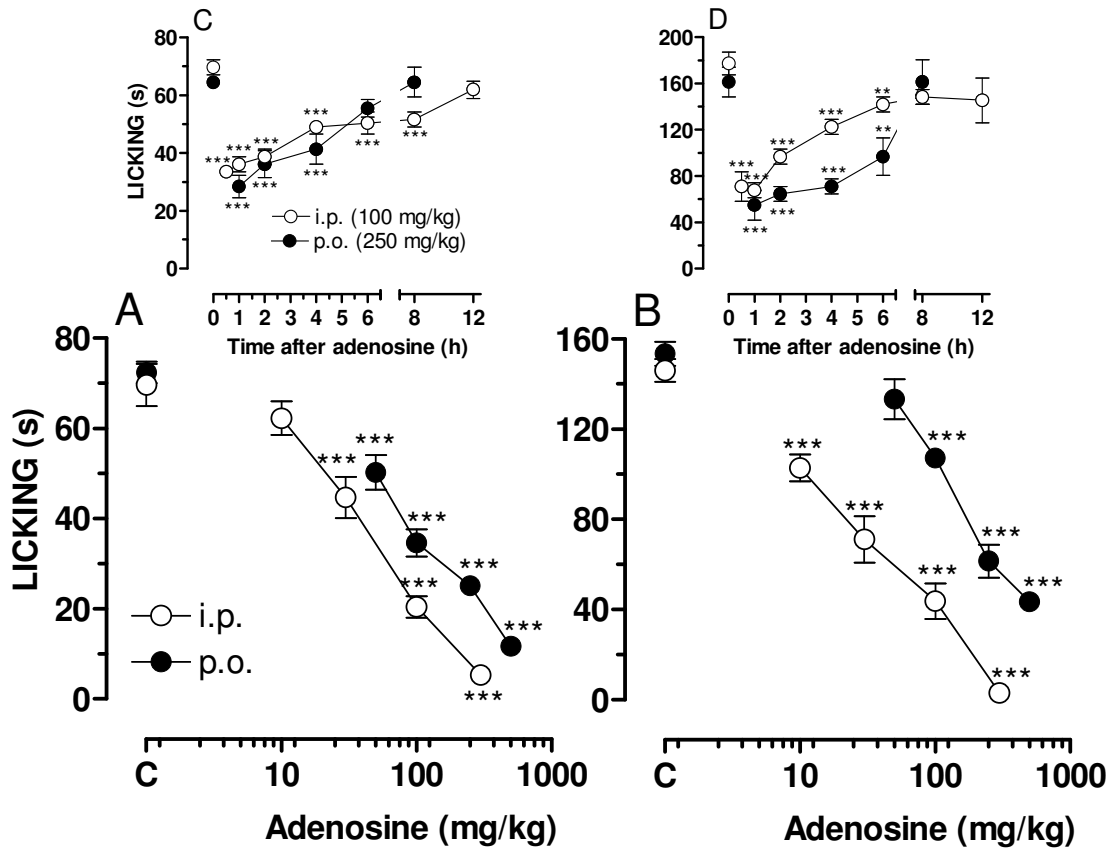


FIGURE 2

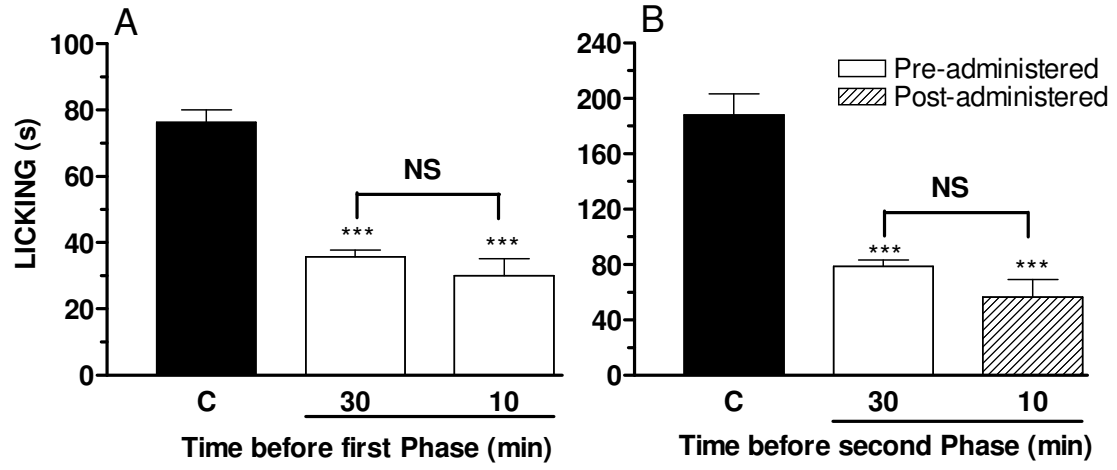


FIGURE 3

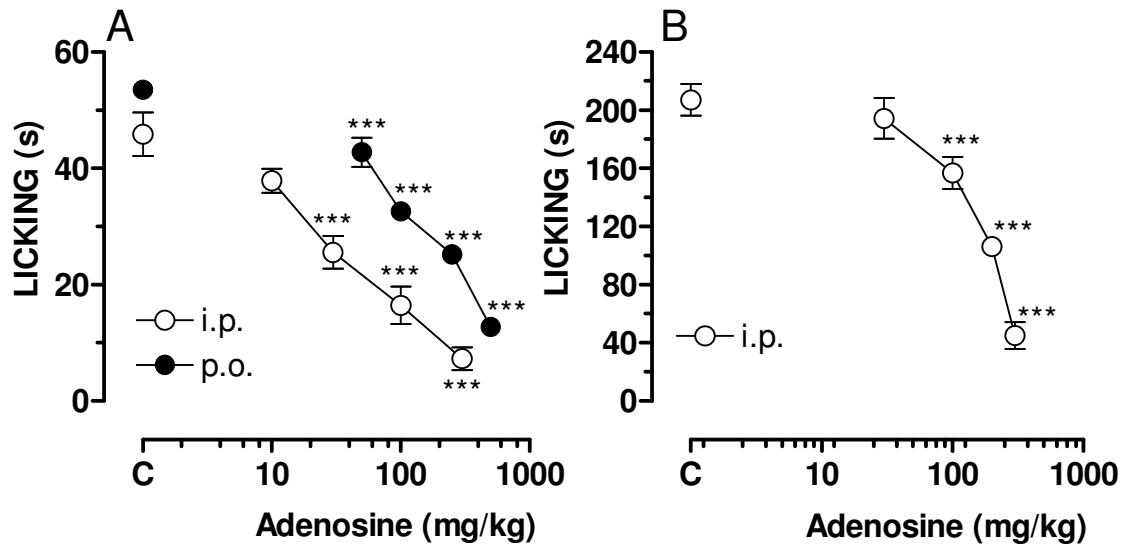


FIGURE 4

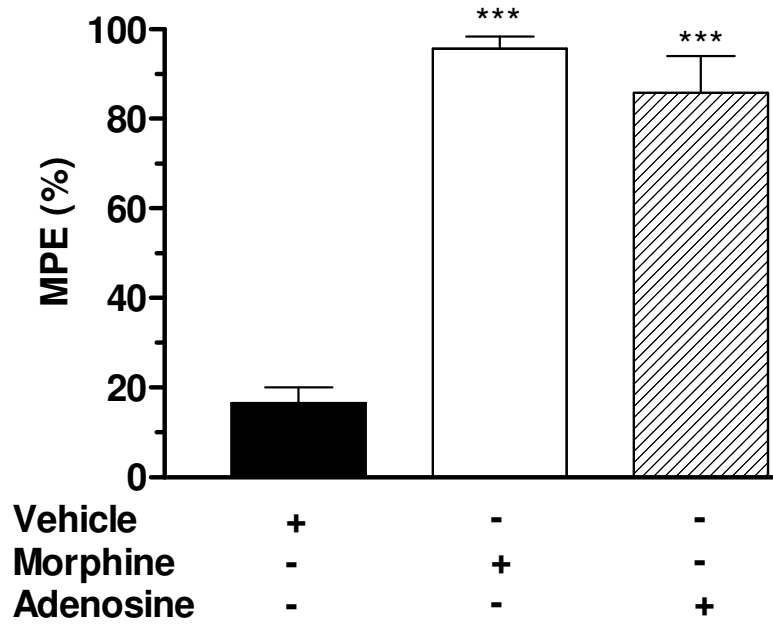


FIGURE 5

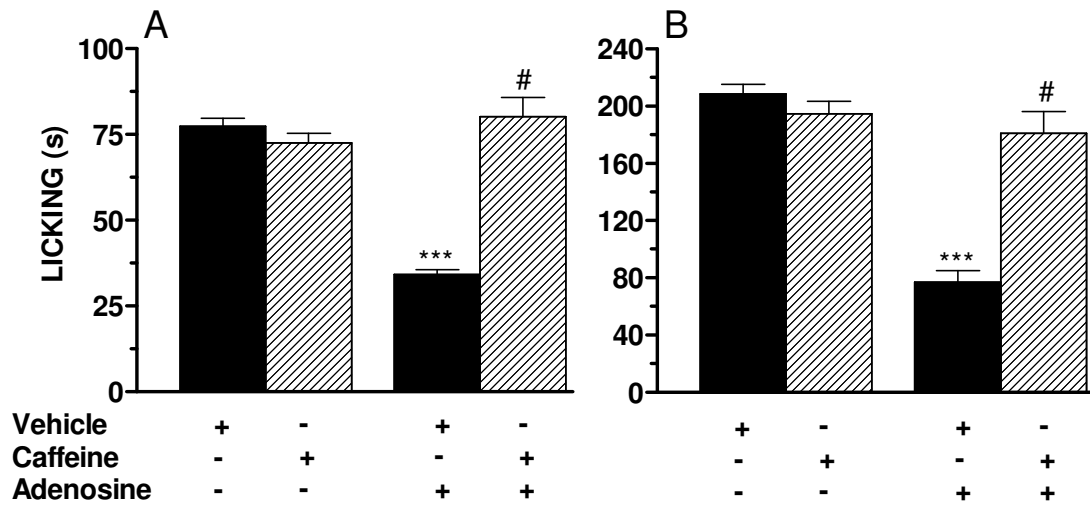


FIGURE 6

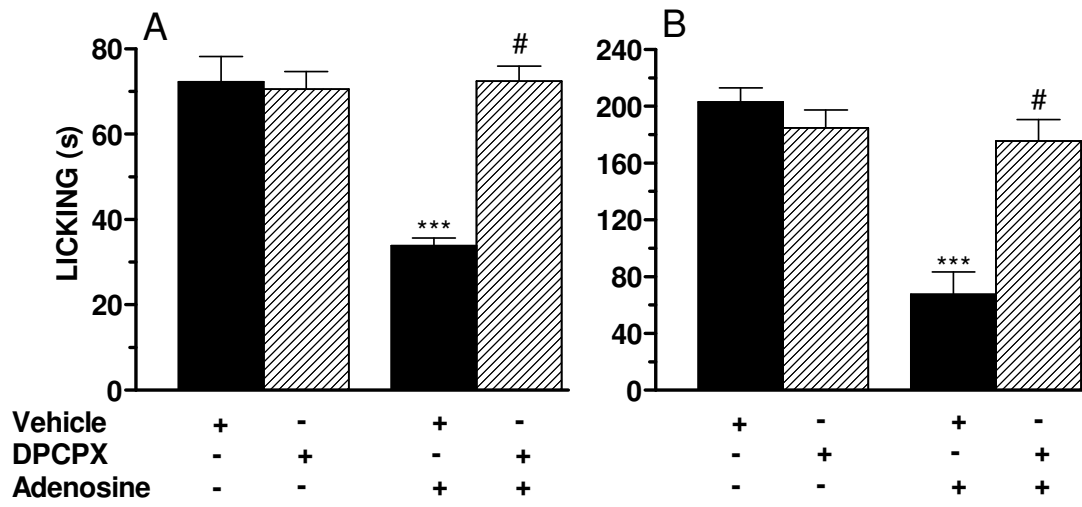


FIGURE 7

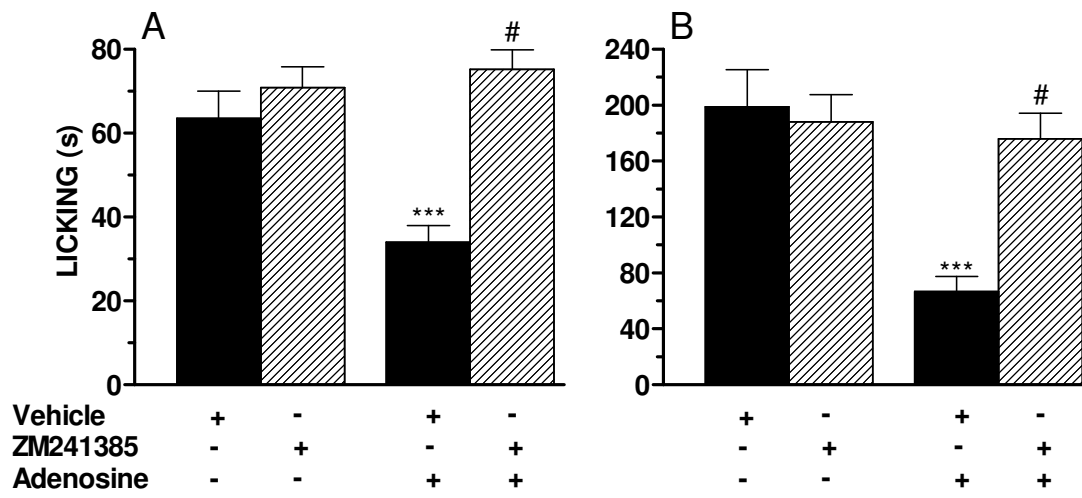


FIGURE 8

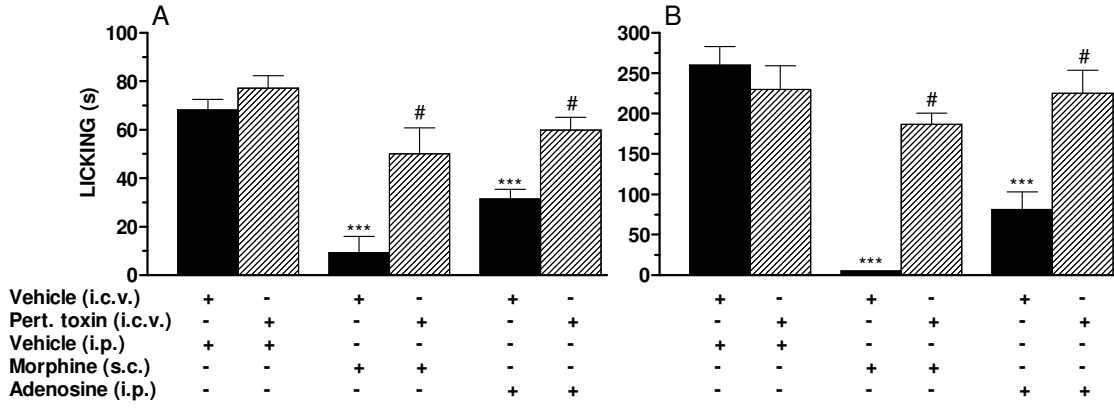


FIGURE 9

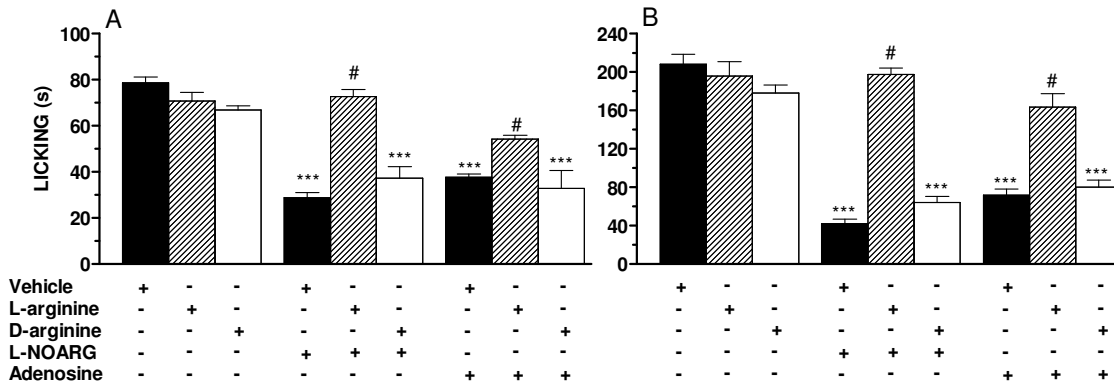


FIGURE 10

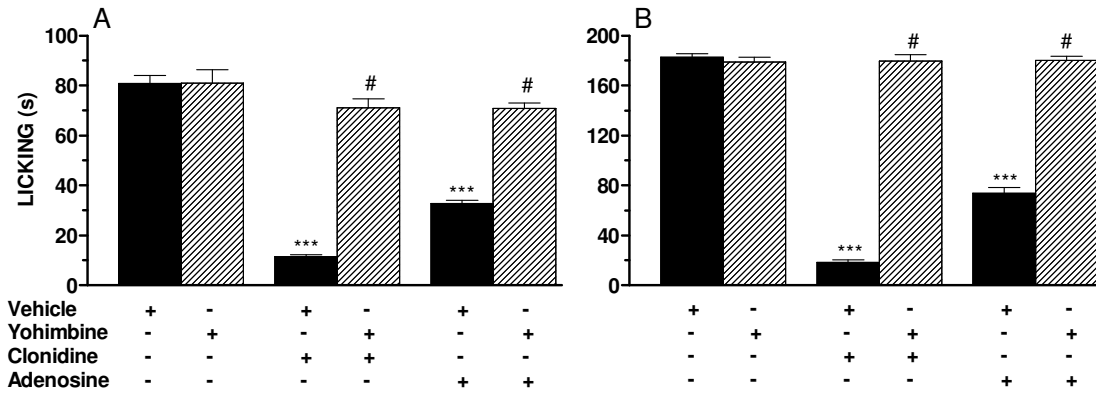


FIGURE 11

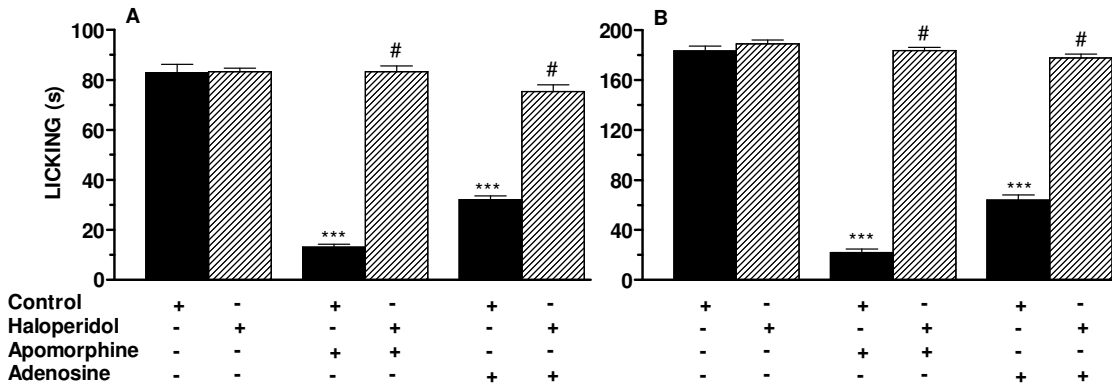


Table 1. The mean ID₅₀ values for the antinociceptive actions of Adenosine in several models of nociception in mice.

Drugs	Route	Formalin test			
		First Phase ID ₅₀ (mg/kg) ^a	Inhibition (%) ^b	Second Phase ID ₅₀ (mg/kg) ^a	Inhibition (%) ^b
Adenosine	i.p.	63,1 (53,1-75,0)	100	48,8(42,1-56,6)	100
	p.o.	135,6 (107,9-170,3)	99±1	192,3 (176,8-209,1)	78±1
Capsaicin test					
Adenosine	i.p.	60,3 (48,8-74,4)	94±4		
	v.o.	216,4 (203,1-230,5)	87±2		
Glutamate test					
Adenosine	i.p.	193,8 (178,8-210,0)	86±4		

Table 2. Summary of the effects of the various drugs on the antinociception caused by adenosine assessed in this formalin test.

Drugs	Route	Adenosine Formalin test	
		First Phase	Second Phase
- Adenosine antagonist			
Caffeine	i.p.	+	+
DCPX	i.p.	+	+
ZM23	i.p.	+	+
Naloxone	i.p.	-	-
Pertussis toxin	i.c.v.	+	+
L-arginine	i.p.	+	+
- GABA antagonist			
Bicuculine	i.p.	-	-
Phaclofen	i.p.	-	-
Yohimbine	i.p.	+	+
Haloperidol	i.p.	+	+

+ Significant blockade; - Lack of significant blockade.

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](#)