

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Psicologia e Educação
Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

**Envolvimento da via heme-oxigenase-monóxido de carbono-guanosina
monofosfato cíclico na nocicepção e na antinocicepção induzida por estresse
agudo em ratos.**

Priscila Gonçalves de Carvalho

Ribeirão Preto

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

PRISCILA GONÇALVES DE CARVALHO

Envolvimento da via heme-oxigenase-monóxido de carbono-guanosina monofosfato cíclico na nocicepção e na antinocicepção induzida por estresse agudo em ratos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite-Panissi

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central da Coordenadoria do Campus de Ribeirão Preto/USP

Carvalho, Priscila Gonçalves.

Envolvimento da via heme-oxigenase-monóxido de carbono-guanosina monofosfato cíclico na nocicepção e na antinocicepção induzida por estresse agudo em ratos. - Ribeirão Preto, 2009.

68 p.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Leite-Panissi, Christie Ramos Andrade.

1. Heme-oxigenase. 2. Monóxido de carbono. 3. Analgesia. 4. Ventrículo lateral. 5. Estresse agudo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Priscila Gonçalves Carvalho

Envolvimento da via heme-oxigenase-monóxido de carbono-guanosina monofosfato cíclico na nocicepção e na antinocicepção induzida por estresse agudo em ratos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Psicobiologia.

Aprovado em: ___/___/2009.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Instituição: FORP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Instituição: FCFAr – UNESP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Luis Guilherme de Siqueira Branco

Instituição: FORP – USP

Assinatura: _____

Aos meus pais, Marina e Donizetti, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, iluminando meus caminhos com afeto e dedicação para que os trilhasse sem medo e cheios de esperanças.

A você Fabiano, meu amor, melhor amigo, maior incentivador e, sobretudo um exemplo para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus*, aquele que nunca vemos ou ouvimos, mas podemos sentir ao nosso lado, sempre zelando por nós, nossa gratidão por ter nos dado o dom da vida e a possibilidade de completarmos mais uma etapa de nossa existência. Agradeço por ter me concedido fé, saúde e perseverança necessárias para que pudesse me erguer diante de cada queda e lutar pelos meus objetivos.

A *Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi*, por quem tenho uma imensa admiração, os meus sinceros agradecimentos não só pela orientação deste trabalho, mas também por ter me ensinado as premissas da Ciência, além da amizade e apoio incondicional em todos os momentos. Um exemplo de pessoa e pesquisadora.

Aos *Professores da Banca, Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza*, pelo acompanhamento do desenvolvimento que resultou no aprimoramento deste trabalho e *Dr. Luis Guilherme de Siqueira Branco* pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

A *Aline Aparecida Ferrarese e Nadir Martins Fernandes*, pela colaboração inestimável neste trabalho, pela solicitude em ensinar-me as técnicas utilizadas em nosso laboratório. Sobretudo agradeço pela amizade.

Aos colegas de laboratório, *Ana Paula, Alberto, Eveline, Glaúcia, Juliana* pela colaboração e amizade e pelo ambiente agradável no laboratório, fator de suma importância para um bom trabalho.

A *Renata B. Vicentini*, secretária do Programa de Pós - Graduação em Psicobiologia da FFCLRP - USP, pelo auxílio competente.

Aos funcionários do Biotério I da FORP, *Sr. Antônio Sérgio Ap. Mesca e Sr. Antônio Massaro*, pelo cuidado e tratamento constante dos animais experimentais.

À *minha família*, pela base sólida que sempre me deu força para encarar a vida de frente. Aos *meus pais*, que se doaram inteiramente e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudéssemos realizar os nossos. Ao *meu irmão, Caio*, pelo incentivo, força e carinho

durante esta caminhada. Aos *meus avôs*, que mesmo sem estudo sempre me incentivaram. Aos *meus tios (as) e primos (as)*, pelo carinho e força que me dão. Ao *meu namorado, Fabiano*, sem o qual não teria encontrado êxito nesta minha trajetória.

A *todos* aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP pelo auxílio financeiro.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre...”.

(Paulo Freire)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Catabolismo do grupamento heme pela enzima heme oxigenase.	19
Figura 2 -	Aparato utilizado para realização da restrição física dos animais experimentais.	28
Figura 3 -	Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo.	34
Figura 4 -	Efeitos da administração ICV de ZnDPBG e de seu respectivo veículo (Na_2CO_3).	36
Figura 5 -	Efeitos da administração ICV de heme-lisinato e de seu respectivo veículo (L-lisina).	36
Figura 6 -	Efeitos da administração ICV do inibidor seletivo da guanilase ciclase (ODQ) ou do veículo (DMSO) seguido pelo tratamento com o heme-lisinato.	37
Figura 7 -	Efeitos da administração ICV do inibidor seletivo da guanilase ciclase (ODQ) ou do veículo (DMSO) seguido pelo tratamento com L-lisina (veículo do heme-lisinato).	37
Figura 8 -	Efeitos do tratamento ICV do ZnDPBG e do heme-lisinato antes do período do estresse agudo por meio de contenção física por 60 minutos em ratos.	40
Figura 9 -	Efeitos do tratamento ICV com heme-lisinato ou veículo (L-lisina), 30 minutos após a administração do ODQ ou veículo (DMSO) em animais submetidos posteriormente a 60 minutos de restrição física.	41
Figura 10 -	Efeitos do tratamento ICV do ZnDPBG e do heme-lisinato antes do período do estresse agudo por meio de contenção física por 120 minutos em ratos.	44
Figura 11 -	Efeitos do tratamento ICV com heme-lisinato ou veículo (L-lisina), 30 minutos após a administração do ODQ ou veículo (DMSO) em animais submetidos posteriormente a 120 minutos de restrição física.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

5- HT	Serotonina
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
BR	Bilirrubina
BV	Biliverdina
BZD	Receptores Benzodiazepínicos
CCK	Colecistocinina
cGMP	Guanosina 3', 5' Monofosfato Cíclico
CO	Monóxido de Carbono
CRF	Fator de Liberação de Corticotropina
DMH	Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
Fe³⁺	Átomo de Ferro
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GH	Hormônio de Crescimento
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
GTP	Guanosina Trifosfato
HO	Heme Oxigenase
HO - 1	Heme Oxigenase 1
HO - 2	Heme Oxigenase 2
HO - 3	Heme Oxigenase 3
HPA	Eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal
IARC	Índice de Antinocicepção de Retirada de Cauda
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
ICV	Intracerebroventricular
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NMgR	Núcleo Magno da Rafe
NO	Óxido Nítrico
ODQ	1h- [1,2,4]Oxadiazolo [4,3-A] Quinoxaline-1-One
ROS	Reativas de Oxigênio
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPD	Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsal
SCPV	Substância Cinzenta Periaquedutal Ventral
GCs	Guanilase Ciclase Solúvel
SNC	Sistema Nervoso Central
ZnDPBG	Zinco-Deuteroporphyrin-2,4-Bis Glicol

RESUMO

CARVALHO, P.G. **Envolvimento da via heme-oxigenase-monóxido de carbono-guanosina monofosfato cíclico na nocicepção e na antinocicepção induzida por estresse agudo em ratos.** 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A exposição de animais a situações ameaçadoras de natureza inata ou aprendida resulta em exibição de um repertório de comportamentos defensivos espécie-específicos, alterações autonômicas e em inibição da dor, sendo esse conjunto de reações de alta relevância para a sobrevivência de uma espécie. Considerando este contexto, um importante componente da resposta do organismo a situações de emergência é a redução da capacidade de perceber a dor. O processamento de estímulos nociceptivos pode ser modulado no prosencéfalo, na medula espinal, no tronco encefálico e no diencéfalo, por mecanismos envolvendo diferentes neurotransmissores e neuromoduladores. Nos últimos anos, evidências têm demonstrado que o monóxido de carbono (CO), produzido a partir da enzima heme-oxigenase estimula a formação de guanosina 3', 5'- monofosfato cíclico (GMPc), participando como neuromodulador de vários processos fisiológicos. Dentro deste contexto, mostrou-se que a via HO-CO-GMPc está envolvida na modulação periférica e espinal da dor inflamatória, bem como na modulação do estresse, porém não há conhecimento da participação desta via na modulação de estímulo doloroso agudo, bem como da antinocicepção induzida pelo estresse. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o envolvimento da via HO-CO-GMPc na nocicepção e na antinocicepção induzida pelo estresse agudo em ratos, avaliada pelo índice de analgesia no teste de retirada da cauda (IARC). Nossos resultados demonstraram que a ativação da via HO-CO-GMPc por meio da administração ICV de heme-lisinato (substrato) tem efeito antinociceptivo, sendo este efeito dependente da atividade GMPc, desde que o pré-tratamento com inibidor da guanilase ciclase solúvel (GCs), ODQ, bloqueou o aumento do IARC. Ainda, esta modulação ocorre de maneira fásica e não tônica, pois o tratamento isolado ICV com o inibidor da HO, ZnDBPG ou com o inibidor da GCs, ODQ, não alterou o IARC. A antinocicepção induzida pelo estresse agudo (restrição física por 120 min) não é dependente da via HO-CO-GMPc, desde que o tratamento com o ZnDBPG, nem com o heme-lisinato alteraram o IARC. No entanto, esta antinocicepção é dependente da atividade do GMPc, pois o pré-tratamento com ODQ bloqueou o aumento do IARC.

Palavras Chaves: Heme-Oxigenase; Monóxido de Carbono; GMPc; Analgesia; Ventrículo Lateral; Estresse Agudo.

ABSTRACT

CARVALHO, P.G. **Involvement of the heme oxygenase - carbon monoxide - cyclic guanosine monophosphate pathway in the nociception and antinociception induced by acute stress in rats.** 2009. 68 f. Thesis (Master) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The exposure of animals to threatening situations of innate or learned nature results in exhibition of a repertoire of species-specific defensive behaviors, autonomic alterations and pain inhibition. This group of reactions has high relevance for the survival of species. In this context, an important component of the response of the organism in the emergency situations is the reduction of the capacity to perceive pain. The processing of nociceptive stimulus can be modulated in forebrain, in spinal, and in midbrain, for mechanisms involving different neurotransmitters and neuromodulators. Recently, evidence has demonstrated that carbon monoxide gas (CO), produced from the enzyme heme oxygenase (HO), stimulate the formation of 3', 5' - cyclic guanosine monophosphate (cGMP), and this molecule has participated as neuromodulator in some physiological processes. In this way, it has shown that the HO-CO-cGMP pathway is involved in the peripheral and spinal modulation of inflammatory pain, as well as in the modulation of the stress. However, the involvement of this pathway in the modulation of acute painful stimulus, as well as in the antinociception induced by stress isn't clarified. Thus, this study evaluated the involvement of the HO-CO-cGMP pathway in nociception and in antinociception induced by acute stress in rats, by means the of analgesia index in the tail flick test (AITF). Our results demonstrated that the activation of the HO-CO-cGMP pathway by means of heme-lysinate ICV administration has antinociceptive effect. Again, the increase of the AITF was dependent of the cGMP activity, since that the pretreatment with inhibitor of soluble guanylate cyclase (sGC), ODQ, blocked the antinociceptive effect. This modulation occurs in fascic and not tonic manner, because *per se* ICV treatment with inhibitor of the HO, ZnDBPG or with inhibitor of the sGC, ODQ did not modify the AITF. The antinociception induced by acute stress (physical restriction during 120 min) is not dependent of the HO-CO-cGMP pathway, since that neither the treatment with the ZnDBPG, nor with the heme-lysinate had modified the AITF. However, this antinociception is dependent of the activity of the cGMP, because the pretreatment with ODQ blocked the increase of the AITF induced by acute stress.

Words Keys: Heme-Oxygenase; Carbon monoxide; cGMP; Analgesia; Lateral cerebral ventricle; Acute stress.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	13
CONCEITOS INICIAIS SOBRE SENSIBILIDADE DOLOROSA	14
MODULAÇÃO DA DOR	16
SISTEMA HEME-OXIGENASE	18
II. OBJETIVOS	23
III. MATERIAIS E MÉTODOS	25
1. ANIMAIS	26
2. IMPLANTE DE CÂNULA-GUIA.....	26
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	27
4. FÁRMACOS E MICROINJEÇÃO.....	27
5. ESTRESSE AGUDO	28
6. TESTE DE RETIRADA DE CAUDA	28
7. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	29
7.1. <i>Avaliação do efeito da via HO-CO-GMPc na nocicepção aguda avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos.....</i>	<i>29</i>
7.2. <i>Avaliação do efeito da via HO-CO-GMPc na antinocicepção induzida pelo estresse agudo avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos.....</i>	<i>30</i>
8. HISTOLOGIA.....	31
9. ANÁLISE DOS RESULTADOS	31
IV. RESULTADOS.....	33
1. <i>AVALIAÇÃO DO EFEITO DA VIA HO-CO-GMPC NA NOCICEPÇÃO AGUDA AVALIADA PELO TESTE DE RETIRADA DE CAUDA EM RATOS.</i>	<i>34</i>
2. <i>AVALIAÇÃO DO EFEITO DA VIA HO-CO-GMPC NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO ESTRESSE AGUDO AVALIADA PELO TESTE DE RETIRADA DE CAUDA EM RATOS.</i>	<i>38</i>
V. DISCUSSÃO	46
VI. CONCLUSÕES	56
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

Conceitos iniciais sobre sensibilidade dolorosa

Compreender a dor é preocupação que acompanha o homem ao longo da história. Dentro deste contexto, Aristóteles interpretou a dor como uma experiência oposta ao prazer, tipicamente desagradável, e sentida pelo coração. A idéia do coração como centro das sensações perdurou por muitos séculos e recebeu apoio de importantes pensadores. Por outro lado, também foi grande o número dos que defenderam a idéia do encéfalo como centro das sensações. Estudos anatômicos e fisiológicos realizados por Descartes (1596-1650) evidenciaram a existência de nervos capazes de receber informações sensoriais desde a periferia e levá-las até o cérebro (Bolles e Fanselow, 1980). Em função da dificuldade de conceituação do fenômeno da dor, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) definiu esta sensibilidade como uma "*experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual, ou ainda descrita em termos que sugere tal dano*" (Merskey, 1994, Prado, 2001).

A sensibilidade à dor pode variar muito em diferentes grupos socioculturais, bem como em função do estado emocional ou das circunstâncias em que ocorre a lesão. Exemplos clássicos incluem soldados que, embora seriamente feridos durante o combate, relatam pouca ou nenhuma dor enquanto estão na batalha, ou ainda, atletas, que frequentemente não detectam injúrias sofridas enquanto estão competindo (Basbaum e Fields, 1978, 1984).

Considerando a definição de dor, distinção entre dor e nocicepção deve ser feita. O termo dor é adequadamente aplicado quando os componentes sensoriais e emocionais estiverem claramente presentes. No caso dos animais, apesar de evidente a existência do componente sensorial ou nociceptivo, em muitas situações não fica clara a existência do componente emocional. Além disso, a ausência de comunicação verbal em animais é, sem dúvida, um obstáculo na avaliação da dor. Sendo assim, dor seria um termo adequado para se referir ao que acontece ao homem, enquanto nocicepção (percepção de estímulos e codificação de sinais para informar ao sistema nervoso central da existência de lesão tissular) seria o termo mais indicado para os modelos animais de experimentação (Melzack e Wall, 1991).

Sherrington, no fim do XIX, postulou a existência de nociceptores na pele, os quais seriam receptores sensoriais capazes de detectar lesão tecidual ou estímulos potencialmente nocivos. Após a detecção do estímulo por estes nociceptores, a informação nociceptiva seria conduzida para o sistema nervoso central (SNC), onde seria interpretada. Posteriormente,

constatou-se que a existência de nociceptores não se restringe apenas a pele, mas também em estruturas viscerais (McMahon e Koltzenburg, 1990). De fato, a dor é uma experiência sensorial e psicológica que possui quatro dimensões principais: sensorial-discriminativa, afetiva-emocional, cognitiva e comportamental. Assim, um estímulo nociceptivo periférico desencadeia uma cascata de eventos fisiológicos que leva à integração da informação codificando as várias facetas da dor (Calvino e Grilo, 2006). Desta maneira, um estímulo nocivo aplicado na pele ou em tecidos subcutâneos como articulações e músculos, pode ativar uma série de terminações nociceptivas (denominados nociceptores ou terminações nervosas livres), que consistem dos prolongamentos periféricos de axônios de neurônios sensoriais, cujos corpos celulares situam-se no gânglio da raiz dorsal ou no gânglio trigeminal. Esses neurônios, denominados neurônios aferentes primários, são células pseudo-unipolares que, além do ramo periférico, possuem um ramo central, o qual realiza sinapse no corno dorsal da medula espinal ou no núcleo espinal do trigêmeo. Os nociceptores são amplamente distribuídos na pele, mucosas, vísceras, músculos, periósteo e articulações, e respondem a estímulos nociceptivos de múltiplas modalidades, como calor, frio, estímulos mecânicos e químicos. As fibras dos neurônios aferentes primários essencialmente podem ser classificadas com base em seu diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução: fibras mielinizadas do tipo A-delta são mais grossas (2 – 6 μm de diâmetro) e rápidas condutoras de sinais nociceptivos (12 – 30 m/s), e fibras do tipo C, amielínicas, mais finas (0,4 – 1,2 μm de diâmetro) e de condução mais lenta (0,5 – 2,0 m/s), distribuem-se em tecidos profundos além da pele, onde são mais abundantes que as fibras A-delta. Enquanto a ativação do primeiro tipo de fibra está associada à sensação de dor descrita como cortante e bem localizada, a ativação de fibras do tipo C promove sensação de queimação e sem localização precisa (Le Bars e cols, 2001).

Atualmente várias vias ascendentes da dor são conhecidas, tratos espinotalâmico, espinomesencefálico, espinorreticular (Willis, 1985), espinolímbico, espinocervical e coluna dorsal pós-sináptica (Willis e Westlund, 1997). Dentre elas, os tratos espinotalâmico, espinorreticular e espinomesencefálico têm sido considerados as vias mais proeminentes na transmissão aferente da informação nociceptiva. Estes tratos terminam em diversos núcleos do tálamo e da formação reticular do tronco encefálico (Willis, 1985). As fibras que participam da constituição dessas vias ascendem pelo funículo lateral da medula espinal e são denominadas coletivamente de sistema ou trato anterolateral.

A transmissão da informação nociceptiva pode ser modulada na periferia, no corno dorsal da medula espinal, e por meio de vias descendentes de centros supra-espinais. Estas

vias descendentes atuam por meio de dois sistemas de controle: facilitatório e inibitório. O balanço entre estes dois sistemas pode determinar o nível total de excitabilidade da rede de neurônios no corno dorsal da medula espinal ou no núcleo espinal do trigêmio que, por sua vez, pode modular a transmissão dos sinais aferentes de dor para estruturas nervosas supra-espinais (Calvino e Grilo, 2006).

Os neurotransmissores envolvidos nas aferências nociceptivas primárias são diversos, particularmente, a substância P, somatostatina, colecistocinina, glutamato, neurocinina-A e neurocinina-B. Estes parecem ser transmissores das aferências primárias ou facilitadores da expressão de estímulos nociceptivos (Furst, 1999, Jessel e Dodd, 1986).

Por mais controverso que pareça, a dor possui indiscutível papel biológico, é um importante fator de adaptação para o indivíduo, uma vez que o permite perceber o dano tissular iminente, podendo assim evitar a ameaça à sua sobrevivência.

Modulação da dor

A exposição de animais a situações ameaçadoras de natureza inata ou aprendida resulta em exibição de um repertório de comportamentos defensivos espécie-específicos, alterações autonômicas e em inibição da dor, sendo esse conjunto de reações de alta relevância para a sobrevivência de uma espécie (Deakin e Graeff, 1991). Considerando este contexto, um importante componente da resposta do organismo a situações de emergência é a redução da capacidade de perceber a dor. Com efeito, uma série de estudos tem mostrado que o sistema antinociceptivo pode ser ativado por uma variedade de estímulos nociceptivos externos ou ambientais, exercendo importante função no controle de comportamentos defensivos e afetivos (Fanselow, 1991, Fardin e cols, 1984). Dentre estes estímulos, o medo, induzido por estímulos aversivos condicionados e incondicionados, inibe respostas comportamentais de dor. Deste modo, a antinocicepção pode ser considerada como parte das reações do sistema defensivo. De fato, sem a existência de um sistema de inibição dos impulsos nociceptivos, os animais, por exemplo, caso sofram injúrias durante um confronto com um predador, poderiam emitir comportamentos recuperativos, induzidos pela percepção dolorosa, em vez de apresentarem uma estratégia defensiva adequada, comprometendo a sua sobrevivência (Fanselow e Bolles, 1979). Assim, alguns estímulos são, portanto, capazes de desencadear respostas antinociceptivas e de defesa. Dentre estes estímulos destacam-se: a presença de predador natural ou mesmo o odor de estresse de co-específico; a restrição física, a pressão de partes do corpo, ou rotação centrífuga; o isolamento e conflito social, bem como

a novidade ou mesmo o ato copulatório; a restrição alimentar, a glicoprivação e a desidratação; estímulo auditivo intenso, natação forçada, choque elétrico (Raja e cols, 1999).

O desencadeamento da analgesia pode ser explicado pela existência de múltiplos mecanismos, cuja ativação depende tanto da natureza do estímulo nociceptivo ou não, quanto de sua intensidade e duração (Curzon e cols, 1997). De fato, é possível demonstrar que o estresse agudo é capaz de desencadear aumento no limiar da dor, ou seja, promover antinocicepção. Em contrapartida, situações de estresse crônico talvez não interfiram na nocicepção pelo fato de ocorrer um processo adaptável ao estímulo estressante ou mesmo, podem promover hipernocicepção (Terman e cols, 1986, Gamaro e cols, 1998). Em adição, a duração da analgesia induzida pelo estresse tem duração variável, de minutos a horas, de acordo com a característica do agente estressante, de sua severidade e dos métodos utilizados para avaliar a analgesia (Dubuisson e Dennis, 1977). Assim, frente a uma realidade de estresse, as respostas nociceptivas (reflexo de retirada, fuga, repouso e outros comportamentos recuperativos) podem ser suprimidas em favor de comportamentos mais adaptativos. Ainda, considerando que as respostas naturais do organismo às situações de emergência incluem também redução à sensibilidade à dor, supõe-se que o sistema analgésico possa participar na mediação do comportamento defensivo (Miczek e cols, 1986). De fato, estudos têm demonstrado claramente a íntima relação entre a modulação das respostas defensivas e nociceptivas (Leite-Panissi e cols, 2003, Baptista e cols, 2009, Cornélio e Nunes-de-Souza, 2009).

Com base em estudos que explicam os mecanismos neuro-humorais da analgesia induzida por estresse observa-se que possivelmente todo agente físico estressante produz aumento nos níveis plasmáticos do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), da corticosterona e da β -endorfina, porém, nem todo agente estressante produz analgesia (Graeff, 2004). Segundo Abbott e cols. (1982), a grande maioria dos eventos que desencadeiam respostas antinociceptivas são considerados aversivos ou estressantes e, ainda com base na literatura, a terminologia *analgesia induzida pelo estresse* é repleta de informações que parecem ser contraditórias ou indicativas dos diferentes mecanismos. Como neurotransmissores, os opióides endógenos e monoaminas são fortes candidatos envolvidos nessa rede neural. Com efeito, há evidências de que o estresse e o medo podem induzir tanto formas opióides como não opióides de antinocicepção (Watkins e Mayer, 1982, Coimbra e Brandão, 1997, Leite-Panissi e cols, 2003). Outros neurotransmissores também estão envolvidos na antinocicepção. Ao lado da serotonina (5-HT), destacam-se a dopamina, a noradrenalina e o GABA. Ainda,

estudos sugerem interação entre os sistemas de neurotransmissores GABAérgico e serotoninérgico na modulação da antinocicepção opióide (Nemmani e Mogil, 2003).

O processamento de estímulos nociceptivos pode ser modulado no prosencéfalo, na medula espinal, no tronco encefálico e no diencéfalo (Casey, 1999). A transmissão nociceptiva da medula espinal é regulada por neurônios descendentes originados de diversas redes neurais encefálicas (Brandão, 2002). Os corpos neuronais das fibras que formam esse sistema de controle inibitório descendente estão localizados em diferentes núcleos, incluindo a substância cinzenta periaquedutal (SCP), o núcleo magno da rafe, a formação reticular mesencefálica, o núcleo dorsal da rafe (Prado e Faganello, 2000), o núcleo reticular paragigantocelular, o lócus coeruleus, o bulbo ventromedial rostral, a amígdala, o hipotálamo, o tálamo, o córtex somatossensorial e vários outros componentes do sistema límbico (Willis e Westlund, 1997). Estes sítios compreendem relevante sistema interconectado anatômica e fisiologicamente que medeia respostas antinociceptivas por meio de interações regionais (Bodnar, 2000).

Sistema heme-oxigenase

Presente nos eritrócitos, a molécula heme está envolvida na síntese de proteínas responsáveis pelo transporte de oxigênio, na respiração mitocondrial, no metabolismo de drogas, na biossíntese de esteróides, nas defesas celulares antioxidantes e em diferentes processos de transdução de estímulos intero e exteroceptivos. O mecanismo de ação do sistema da molécula heme é muito similar àqueles que envolvem as enzimas ativas na formação do óxido nítrico, ou seja, as enzimas óxido nítrico sintase endotelial, neuronal e indutível (Maines, 1992). Em adição, a molécula heme, está presente em diferentes células e tecidos, desempenhando funções essenciais para o organismo. Esta molécula consiste de um anel porfirínico com um átomo de ferro quelado em seu centro pela enzima ferroquelatase, que pode ser denominada ferroprotoporfirina, protoheme, heme b ou simplesmente heme (Maines, 1992, Marks, 1991, Schweitzer e cols, 1997). Os níveis tissulares de heme são regulados por duas enzimas: a δ -aminolevulinato sintase responsável pela sua biossíntese e a heme-oxigenase (HO) enzima responsável pelo catabolismo do grupamento heme (Steiner e cols, 2003). Há alguns anos uma série de estudos tem avaliado o catabolismo do anel heme presente nos eritrócitos, verificando-se o possível vínculo da atividade desta via metabólica na modulação da pressão arterial, da temperatura corporal, bem como seu envolvimento nas respostas nociceptivas moduladas pela medula espinal (Nascimento e Branco, 2007, Raffaini e cols, 2006, Ravanelli e cols, 2007).

Biologicamente a heme-oxigenase (HO) é uma enzima encontrada no retículo endoplasmático de diferentes células e tecidos. Sua principal função é catalisar a reação de quebra do anel da molécula heme na presença de oxigênio molecular e de citocromo P-450 redutase, o qual transfere elétrons de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) para heme (Maines, 1988, 1992, Figura 1).

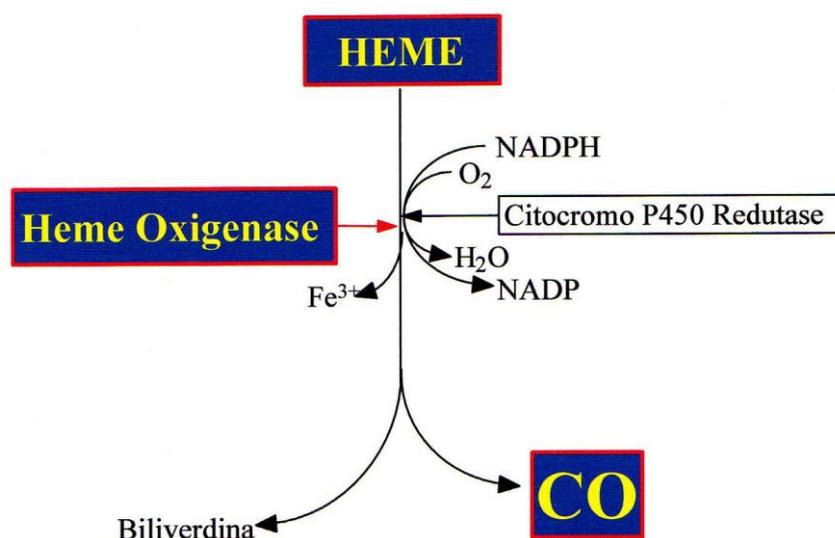


Figura 1: Catabolismo do grupamento heme pela enzima heme oxigenase. (Adaptada de Maines, 1992).

A atividade enzimática da heme-oxigenase gera produtos que são biologicamente ativos:

1. O monóxido de carbono (CO), que tem ação semelhante a do óxido nítrico (NO), uma molécula sinalizadora para a geração da molécula guanosina 3',5' monofosfato cíclico (GMPc) nos sistemas biológicos, a qual possui, entre outras atividades, o relaxamento da musculatura lisa (Rodgers e cols, 1996).
2. A biliverdina, que é reduzida pela biliverdina redutase, formando a bilirrubina, um potente agente oxidante.
3. O ferro, que é reutilizado na formação de uma nova molécula heme (Maines, 1997).

As rotas de síntese e degradação do grupo heme afetam o metabolismo oxidativo, uma vez que estão estreitamente relacionadas com o ciclo celular do ferro. A função determinante na quebra dos grupos heme é desempenhada pela enzima heme-oxigenase 1 (HO-1). Essa enzima tem emergido como componente central na resposta a estresse em

mamíferos, uma vez que o gene que a codifica pode ser induzido tanto por estímulos químicos quanto físicos (Abraham e cols, 1988, Maines, 1992, Schacter, 1988).

Em mamíferos, três enzimas distintas heme-oxigenase (HO) foram identificadas até o momento, a HO-1, a HO-2 e a HO-3. As três enzimas são produtos de diferentes genes, e seus padrões de expressão variam amplamente entre diferentes tipos celulares e tecidos. A HO-1 é altamente indutível em tecidos como o coração, rim, fígado, vasos sanguíneos, baço, pulmão e outros. A indução de HO-1 é considerada como modulador da resposta adaptativa e protetora celular na presença de lesão oxidativa ou inflamatória. Por outro lado, enquanto que a HO-2 exerce o papel de regulador fisiológico da função celular (Watanabe e cols, 2005). A HO-2 é constitutivamente encontrada no endotélio e nas camadas média e adventícia dos vasos sanguíneos, testículos e encéfalo. Por fim, a HO-3 foi recentemente descrita no encéfalo (McCoubrey e cols, 1997 a e b). Enquanto, as duas primeiras isoenzimas apresentam semelhanças quanto à especificidade de substrato e quanto à necessidade de um co-fator para que ocorra a atividade enzimática, a terceira isoenzima foi descrita como sendo de baixa atividade biológica. Ainda, a HO-1 e HO-2, produtos de dois genes distintos, apresentam diferenças mais marcantes (compartilham 43% de homologia genética) no seu mecanismo regulatório (Steiner e Branco, 2001). As três isoformas são altamente conservadas ao longo da árvore filogenética e são expressas em diferentes espécies (bactérias, fungos, plantas e mamíferos), regulando grande variedade de processos celulares (Terry e cols, 2002). A homologia destas enzimas em ratos, camundongos e seres humanos é alta, sendo 80% e 90%, respectivamente para HO-1 e HO-2 (Alam e Den, 1992).

Sobre os mecanismos reguladores da expressão e da atividade da heme-oxigenase, o gene da HO-2 é responsivo somente aos glicocorticóides. Já o gene da HO-1 responde a grande número de estímulos, como por exemplo, os gerados pelo estresse oxidativo e pela hipertermia. No coração, nos rins, no fígado e no encéfalo os níveis de HO-1, após hipertermia, alcançam resposta máxima em uma hora, e seis horas após, os valores tendem a voltar aos seus níveis normais (Cable e cols, 1997). Outros reguladores da HO-1 são: o seu substrato heme, e sais de metais tais como: cromo, manganês, ferro, níquel, cobre, zinco, chumbo, estanho e outros. Alta atividade da HO-1 é encontrada no baço, testículo e no encéfalo. O baço é o único órgão sob condições normais, onde a HO-1 é a forma predominante, presumivelmente porque é o órgão responsável pela destruição das células vermelhas senescentes (Cable e cols, 1997).

As funções biológicas da heme-oxigenase estão associadas com a resposta celular a diferentes tipos de estresse (Stocker, 1990, Willis e cols, 1996). Muitas evidências indicam

envolvimento da HO-1, tanto no crescimento quanto na morte celular, principalmente por meio de sua participação na regulação da apoptose (Tanaka e cols, 2003). Em adição, a HO-1 está envolvida na angiogênese (Deramautd e cols, 1998), reforçando a sua função proliferativa. A HO-1 é amplamente expressa em células tumorais, incluindo adenocarcinoma, hepatoma, sarcoma, glioblastoma e melanoma (Doi e cols, 1999, Goodman e cols, 1997), as quais possuem alta capacidade proliferativa.

A capacidade antioxidante da HO-1 é muito discutida, porém, seu envolvimento em processos inflamatórios já está bem estabelecido na literatura. Dentro deste contexto, podem ser identificadas diferentes funções da molécula heme na inflamação (Marks, 1994). Assim, pequenas concentrações da molécula heme podem agir de forma citoprotetora por meio da regulação positiva da HO-1 (Maines, 1997), ao passo que grande quantidade de heme pode agir de forma deletéria para o tecido por meio de efeitos pró-oxidantes e pró-inflamatórios (Nath e cols, 2001). Tais efeitos deletérios acabam não sendo neutralizados pelas propriedades anti-oxidativas e antiinflamatórias da HO-1, bem como dos produtos da sua reação. Por outro lado, a produção de HO-1 é elevada em células inflamatórias durante a fase de resolução da inflamação. Dentre os produtos originados da quebra do grupamento heme pela HO-1 (CO, Fe²⁺ e biliverdina), o CO possivelmente é o principal fator envolvido nas funções protetoras e antiinflamatórias da enzima HO-1 (Willis e cols, 1996).

Com relação ao monóxido de carbono (CO), cerca de 85% de sua produção em mamíferos vem da atividade da heme-oxigenase, sendo os outros 15% decorrentes de processos como peroxidação de lipídeos (Labbé e cols, 1999). Como mecanismo de atuação, o CO estimula a formação de 3', 5'- monofosfato guanosina cíclica (GMPc) pela ativação da enzima guanilase ciclase solúvel (GCs) (Nascimento e Branco, 2007, Maines, 1997, Morita e cols, 1995), da mesma forma que o óxido nítrico. Considerando sua ação biológica, o CO está envolvido no controle do tônus vascular em diversos tecidos tais como do encéfalo, dos rins (Galbrath, 1999), do fígado (Suematstu e cols, 1996) e do sistema cardiovascular (Johnson e cols, 1999). O CO também participa da regulação do tônus vascular placentário (McLean e cols, 2000) e da liberação de insulina e glucagon pelas células das ilhotas de Langerhans (Labbé e cols, 1999). Ainda, alguns estudos relatam sua participação como neurotransmissor e/ou neuromodulador envolvido no controle cardiovascular central, modulando a transmissão glutamatérgica (Dawson e Synder, 1994, Johnson e cols, 1995, Johnson e cols, 1999). Com base nesta linha de investigação, Ravanelli e cols. (2006) e Raffaini e cols. (2006), relataram que o CO tem importante participação, como neurotransmissor/neuromodulador na regulação da temperatura corporal, tanto na hipotermia como na hipertermia decorrente da

administração de endotoxina (lipopolissacarídeo; LPS). Ainda, estudos sugerem que o CO pode afetar a resposta ventilatória atuando nos corpos carotídeos, bem como no sistema nervoso central (Paro e cols, 2002). Contudo, a atividade da molécula de CO gerado a partir do sistema da enzima HO, tem sido associada a importante molécula biológica funcionando como segundo mensageiro, modulando as atividades de uma variedade de sistemas os quais envolvem a ativação da enzima guanilase ciclase solúvel (GCs), levando ao aumento dos níveis de guanosina monofosfato cíclica (GMPc).

Levando em considerando a resposta de aumento da temperatura corporal em situações de estresse, Steiner e cols. (1999) demonstraram, em ratos, que a hipertermia desencadeada pela contenção física aguda (40 minutos) foi bloqueada pela inibição da enzima heme-oxigenase, via administração intracerebroventricular (ICV) de zinco-deuteroporphyrin-2,4-bis glicol (ZnDPBG), um inibidor não seletivo da HO. Em adição, Steiner e Branco (2001) demonstraram que a injeção intra-plantar do inibidor da HO (ZnDPBG) aumenta, de maneira dose-dependente, a hipersensibilidade mecânica induzida pela administração intra-plantar de carragenina, provavelmente devido a aumento intracelular dos níveis de GMPc no neurônio aferente primário. Posteriormente, o envolvimento periférico da via HO-CO-GMPc na modulação nociceptiva foi demonstrado por Nascimento e Branco (2007) que observaram aumento da resposta nociceptiva no teste da formalina intrapodal, em ratos tratados previamente (no mesmo local) com um inibidor da HO. Considerando que a enzima HO é amplamente distribuída no sistema nervoso central (Ryter e Tyrell, 2000), estudo recente demonstrou que o bloqueio intra-tecal da via HO-CO via administração de ZnDBPG (inibidor da HO) promoveu aumento da resposta nociceptiva no teste da formalina intra-plantar. Em contraste, a administração intra-tecal de heme-lisinato (substrato para a via HO-CO) produziu potente efeito antinociceptivo neste mesmo modelo de dor inflamatória (Nascimento e Branco, 2008). Embora fortes evidências demonstrem o envolvimento do CO como modulador da nocicepção na dor inflamatória (Steiner e cols, 2001, Nascimento e Branco, 2007, 2008), bem como modulador de respostas fisiológicas ao estresse (febre induzida por estresse, Steiner e cols, 1999), não há conhecimento da participação da via HO-CO-GMPc namodulação de estímulo doloroso agudo, bem como da antinocicepção induzida p estresse.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Com base na literatura apresentada, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o envolvimento da via heme-oxigenase-monóxido de carbono-guanosina monofosfato cíclica na nocicepção e na antinocicepção induzida pelo estresse agudo de contenção física em ratos, avaliada pelo teste de retirada da cauda.

Desta maneira, destacam-se os seguintes objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito da administração intracerebroventricular (ICV) de zinco deuteroporphyrin 2,4-bis glicol (ZnDPBG), inibidor não-seletivo da heme-oxigenase, de heme-lisinato (substrato para a via HO-CO-GMPc) e do inibidor da guanilase ciclase solúvel, o 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a]quinoxaline-1-one (ODQ) após a administração de heme-lisinato, na nocicepção avaliada por meio do teste de retirada de cauda em ratos.

2. Avaliar o efeito da administração intracerebroventricular (ICV) de zinco deuteroporphyrin 2,4-bis glicol (ZnDPBG), de heme-lisinato e do ODQ após a administração de heme-lisinato, na antinocicepção desencadeada pelo estresse agudo (restrição física dura 60 ou 120 minutos).

MATERIAIS E MÉTODOS

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (250 a 300 gramas, n = 190), cedidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto. Grupos de 4 animais foram mantidos em caixas de polietileno forradas com maravalha (41 x 34 x 17 cm), em ambiente com temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro se iniciando às 6 horas da manhã), com água e comida *ad libitum*.

Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os regulamentos e cuidados na utilização de animais em laboratórios, conforme a Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, e com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Coordenadoria do Campus de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (Processo nº. 07.1.997.53.4).

2. Implante de Cânula-Guia

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina a 10% (Ketamina, 75mg/kg i.m.) associado a xilazina (Coopazine, 10mg/kg i.m.), e suas cabeças, foram fixadas ao aparelho estereotáxico para pequenos animais (EFF 340, Insight Equipamentos, Brasil), por meio de duas barras auriculares e de um suporte bucal. Foi injetado, subcutaneamente, 0,2 ml de xilocaína a 2% com vasoconstritor (noradrenalina), na região do escalpo a ser aberta, para promover diminuição do sangramento e da percepção do estímulo doloroso. Foi realizada assepsia da pele, após tricotomia, com álcool iodado e após esses procedimentos, realizou-se uma incisão longitudinal na pele da cabeça e no tecido subcutâneo. A calota craniana foi exposta e efetuada nova assepsia da região com água oxigenada 10 vol.

Após a exposição da calota craniana, foram feitos dois orifícios com auxílio de um motor elétrico de baixa rotação e de uma fresa odontológica esférica de aço inoxidável nº 4 (carbide). Em um dos orifícios foi rosqueado um pequeno parafuso com a finalidade de servir de apoio para o capacete de acrílico, confeccionado com resina autopolimerizável (Simplex[®], Dental Fillings). O outro orifício permitiu a introdução da cânula-guia de aço inoxidável (14mm de comprimento e 0,6mm de diâmetro externo) no ventrículo cerebral lateral direito, considerando as seguintes coordenadas, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1998): ântero-posterior: 1,0mm posterior do bregma; 1,6mm lateral à linha média e de 3,2 a 3,7mm abaixo da superfície da calota craniana. O deslocamento do menisco em um manômetro assegurou o correto posicionamento da cânula-guia no ventrículo lateral.

Com a completa polimerização do acrílico, foi removido o suporte de apoio da cânula-guia acoplado à torre do estereotáxico, e colocado na mesma, já fixada, um mandril oclisor de aço inoxidável com 0,2mm de diâmetro e do mesmo comprimento da cânula-guia, para evitar possível obstrução. Em seguida, os animais receberam via administração subcutânea, 0,5ml/kg de Bananine (Schering-Plough SA, RJ) um antiinflamatório, antipirético e analgésico de longa duração e 0,3ml/kg de Pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte (Fort Dodge).

Após a cirurgia, os animais foram mantidos aquecidos sob a iluminação de uma lâmpada elétrica, para a recuperação da anestesia geral. O período de recuperação da cirurgia foi de 6 a 7 dias com livre acesso à água e comida.

3. Procedimento Experimental

Uma semana após a realização da cirurgia para o implante da cânula-guia direcionada para o ventrículo lateral, os animais foram submetidos às medidas da latência basal do teste de retirada da cauda, sendo então subdivididos nos diferentes grupos experimentais de maneira aleatória. Foram realizados dois conjuntos de grupos, um conjunto com animais submetidos à contenção física imediatamente após a medida da latência basal no teste de retirada da cauda e um grupo não estressado.

4. Fármacos e Microinjeção

O inibidor da enzima heme oxigenase, zinco deuteroporphyrin 2,4-bis glicol (ZnDPBG, 50 nmol/L) foi obtido da Porphyrin Products (UT, USA). Este composto foi dissolvido em solução de Na₂CO₃ (50 mmol/L) e estocado no escuro. A hemina foi utilizada para preparar o heme-lisinato (7,6 nmol/L), substrato para a via HO-CO-GMPc, como descrito previamente por Ravanelli e cols (2006). As preparações livres de heme utilizadas nos animais controles (veículo) consistiam em solução de L-lisina (14,2 μmol/mL), etanol (5%), propileno glicol (40%) e água estéril e apirogênica (55%). O inibidor seletivo da guanilase ciclase solúvel, 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3,-a]quinoxaline-1-one (ODQ) foi adquirido da Tocris Cookson (St. Louis, MO) e dissolvido em DMSO (Dimethyl sulfoxide) (1%), em uma solução salina estéril, livre de pirógenos (1,3 nmol/L); DMSO (1%) foi utilizado como controle do veículo. Todas as doses empregadas neste estudo foram fundamentadas em trabalhos anteriores (Steiner e cols, 2003, Paro e cols, 2002, Ravanelli e cols, 2006). O volume administrado de todos os fármacos utilizados foi de 4,0 μl. Vale acrescentar que quanto ao volume utilizado em nossos experimentos, trabalhos anteriores

demonstraram que a injeção ICV de um volume de 10 μ l de corante (*Chicago sky blue*) distribuiu-se em todos os ventrículos cerebrais, mas não alcançam o canal central ou o espaço subaracnóideo da medula espinal (Yu e cols, 1991). Assim, considerando que em nossos experimentos administramos até um volume máximo de 8 μ l, nossas administrações são supra-espinais ou tratamento central e não sistêmico.

Para a administração das drogas em estudo, foi utilizada uma microseringa Hamilton 10,0 μ l (EUA), conectada a uma agulha dental (BD agulha gengival 30G curta), de 0,3 mm de diâmetro externo e 15 mm de comprimento, por meio de um segmento de polietileno PE 10 de aproximadamente 45 cm. Dessa forma, a agulha alcançou o tecido encefálico, ultrapassando em 1 mm a extremidade inferior da cânula-guia. Após a microinjeção a agulha foi mantida por mais 40 segundos na cânula-guia para evitar o refluxo da solução injetada.

5. Estresse Agudo

O estresse agudo foi realizado em laboratório, utilizando um tubo de PVC opaco, de 15 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro. O tubo possui ventilação adequada ao longo do seu comprimento, e as suas extremidades fechadas, não permitindo que o animal se movimente, ficando em situação de restrição física (Figura 2). Para nossos experimentos, o estresse agudo foi realizado durante 60 ou 120 minutos em diferentes grupos experimentais.



Figura 2: Aparato utilizado para realização da restrição física dos animais experimentais.

6. Teste de Retirada de Cauda

Os animais foram contidos manualmente, e tiveram a porção distal (3 a 4 cm) de sua cauda colocada sobre uma resistência, o qual é aquecida por corrente elétrica. Cronometrou-se o tempo em segundos (latência) que o animal levou para emitir o reflexo, ou seja, retirar a cauda do estímulo térmico nocivo. Caso o animal não removesse a cauda da fonte de calor dentro de 6 s, o dispositivo foi desligado para prevenir possíveis danos teciduais. A temperatura final do aparelho foi aproximadamente 80°C. Antes de efetuar qualquer tratamento determinou-se a latência da resposta

em segundos para cada animal, por 3 vezes consecutivas em intervalos aleatórios de 1 a 3 minutos. A média da latência das três respostas foi considerada como valor basal, ou linha de base. Após a medida da latência basal os animais foram divididos nos diferentes grupos experimentais, e depois foram submetidos a novas medidas do tempo de latência na retirada da cauda após a realização dos distintos tratamentos experimentais em intervalos de 15 minutos até o tempo máximo de 120 minutos do início da realização do teste algesimétrico.

7. Protocolos Experimentais

7.1. Avaliação do efeito da via HO-CO-GMPc na nocicepção aguda avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos.

Uma semana após a implantação da cânula-guia, os animais foram avaliados no teste de retirada da cauda para determinação da linha de base, após este procedimento, foram submetidos a diferentes tratamentos, e 15 minutos após foram submetidos ao teste nociceptivo novamente, em intervalos de 15 minutos, durante o tempo total de 120 minutos.

Grupo 1 (n=8): animais receberam administração intracerebroventricular (ICV) do inibidor da heme oxigenase, zinco deuteroporphyrin 2,4-bis glicol (ZnDPBG).

Grupo 2 (n=8): animais receberam administração ICV do Na₂CO₃, veículo utilizado para diluição do ZnDPBG.

Grupo 3 (n=8): animais receberam a administração ICV do substrato da via heme oxigenase, o heme-lisinato.

Grupo 4 (n=8): animais receberam a administração ICV do veículo do heme-lisinato, L-lisina.

Grupo 5 (n=8): animais receberam a administração ICV do inibidor seletivo da guanilase ciclase solúvel, 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3,-a]quinoxaline-1-one (ODQ) e após 30 min receberam o heme-lisinato.

Grupo 6 (n=6): animais receberam a administração ICV do veículo do ODQ, o DMSO 1% e após 30 min receberam o heme-lisinato.

Grupo 7 (n=8): animais receberam a administração ICV do inibidor seletivo da guanilase ciclase solúvel, ODQ e após 30 min receberam o veículo do heme-lisinato (L-lisina).

Grupo 8 (n=8): animais receberam a administração ICV do veículo do ODQ, o DMSO 1% e após 30 min receberam o veículo do heme-lisinato (L-lisina).

7.2. Avaliação do efeito da via HO-CO-GMPc na antinocicepção induzida pelo estresse agudo avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos.

Neste conjunto de experimentos os animais foram submetidos a distintos tratamentos farmacológicos e 30 min após os tratamentos, os animais foram submetidos a restrição física durante 60 ou 120 minutos. Imediatamente após o término do estresse agudo os animais foram submetidos ao teste de retirada de cauda em intervalos de 15 minutos, por um período de 120 minutos. Estes procedimentos foram fundamentados em estudos anteriores de Steiner e Branco (2003), Gamaro e cols., (1998) e Echeverry e cols. (2002).

Grupo 1 (n=8, para cada tempo de estresse agudo): animais receberam administração intracerebroventricular (ICV) do inibidor da heme oxigenase, zinco deuteroporphyrin 2,4-bis glicol (ZnDPBG) e 30 minutos após foram submetidos ao estresse agudo.

Grupo 2 (n=8, para cada tempo de estresse agudo): animais receberam administração ICV do Na₂CO₃, veículo utilizado para diluição do ZnDPBG e 30 minutos após foram submetidos ao estresse agudo.

Grupo 3 (n=8, para cada tempo de estresse agudo): animais receberam a administração ICV do substrato da via heme oxigenase, o heme-lisinato e 30 minutos após foram submetidos ao estresse agudo.

Grupo 4 (n=8, para cada tempo de estresse agudo): animais receberam a administração ICV do veículo do heme-lisinato, L-lisina e 30 minutos após foram submetidos ao estresse agudo.

Grupo 5 (n=8, para cada tempo de estresse agudo): animais receberam a administração ICV do inibidor seletivo da guanilase ciclase solúvel, 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3,-a]quinoxaline-1-one (ODQ) e após 30 min receberam o heme-lisinato, 30 minutos após foram submetidos ao estresse agudo.

Grupo 6 (n=8, para cada tempo de estresse agudo): animais receberam a administração ICV do veículo do ODQ, o DMSO 1% e após 30 min receberam o heme-lisinato, 30 minutos após foram submetidos ao estresse agudo.

Grupo 7 (n=8, para cada tempo de estresse agudo): animais receberam a administração ICV do inibidor seletivo da guanilase ciclase solúvel, ODQ e após 30 min receberam o veículo do heme-lisinato (L-lisina), 30 minutos após foram submetidos ao estresse agudo.

Grupo 8 (n=8, para cada tempo de estresse agudo): animais receberam a administração ICV do veículo do ODQ, o DMSO 1% e após 30 min receberam o veículo do heme-lisinato (L-lisina), 30 minutos após foram submetidos ao estresse agudo por 60 minutos.

8. Histologia

Os sítios de microinjeção foram verificados histologicamente, ao final dos experimentos. Para isto, os ratos foram anestesiados profundamente com hidrato de cloral (10%, 0,35 ml/100 mg de peso corporal, i.p.) sendo realizada a perfusão intracardíaca por meio do ventrículo esquerdo, com solução fisiológica (NaCl, 0,9 %) para a remoção do sangue, seguida de perfusão com formaldeído (10%) para a fixação dos tecidos. A seguir os encéfalos foram retirados e armazenados por 4 a 5 dias em formaldeído (10%). Após este período o material foi colocado em solução de sacarose 10% por 12 horas, e em seguida em sacarose 20% por 48 horas, ou até que o encéfalo migrasse para o fundo do frasco indicando saturação do tecido para crioproteção.

Após os períodos de fixação e crioproteção, os encéfalos foram congelados e cortados em secções transversais na espessura de 40 µm, em criostato (Microm, HM 505E). Em seguida, foi realizada a técnica de Nissl (Cresil) para coloração do tecido. Os cortes foram analisados sob microscopia de luz, e os sítios de microinjeção identificados segundo o Atlas de Paxinos e Watson (1998). Somente os animais que tiveram os sítios de microinjeção localizados no ventrículo lateral foram considerados para análise dos resultados.

9. Análise dos Resultados

Os resultados do teste de retirada da cauda foram normalizados de acordo com a seguinte fórmula:

$$IARC = \frac{\text{tempo de latência} - \text{linha de base}}{6 - \text{linha de base}}$$

Onde, *IARC* representa o Índice de Antinocicepção do teste de Retirada de Cauda; o tempo de latência corresponde ao tempo que o animal leva para emitir a resposta após o tratamento experimental, linha de base é a duração da latência no período controle e o valor 6 corresponde ao tempo de corte do estímulo térmico nocivo em segundos.

Para análise estatística foi utilizada análise de variância multivariada (MANOVA) para medidas repetidas onde as variáveis foram tempo (fator repetido) e tratamento (fator independente), seguida de uma análise de variância (ONE-WAY) e do teste de Tukey. Para os

diferentes grupos experimentais, os valores do IARC foram comparados por meio de tratamento *vs* tempo utilizando TWO-WAY ANOVA para medidas repetidas, seguido pelo teste Student Newman-Keuls. Os dados foram considerados estaticamente significantes quando $P < 0,05$. Os resultados estão apresentados como média do IARC \pm EPM (erro padrão da média).

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

A Figura 3 apresenta uma fotomicrografia do encéfalo de um animal experimental representativo, indicando a localização da cânula-guia no ventrículo lateral direito.

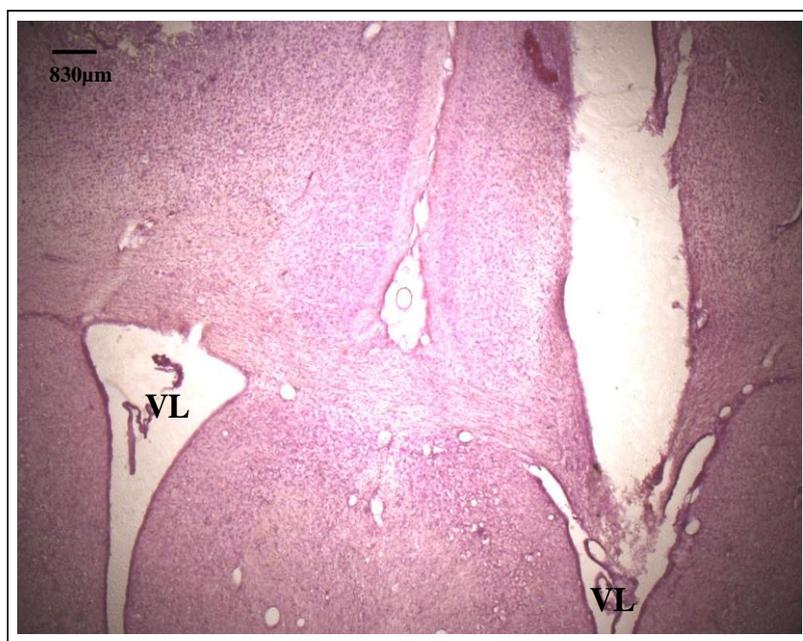


Figura 3: Fotomicrografia de um corte transversal do encéfalo de rato com cânula-guia dirigida para o ventrículo lateral (VL) direito após coloração pela técnica de Nissl (Cresil). Aumento de 10X; Barra = 830 μ m.

1. Avaliação do efeito da via HO-CO-GMPc na nocicepção aguda avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos.

A Figura 4 apresenta os resultados do IARC (média \pm EPM) da administração ICV de ZnDPBG (50 nmol/L), e de seu veículo (Na_2CO_3 , 50 mmol/L), em intervalos de 15 min ao longo de 120 minutos. A análise estatística demonstrou que a administração ICV isolada de ZnDPBG não promoveu alteração significativa do IARC ($F_{7,71}=0,774$; $P=0,627$, ONE-WAY ANOVA) quando comparado com o tempo controle; assim, como a administração ICV de seu veículo, Na_2CO_3 . A aplicação da TWO-WAY ANOVA, mostrou que não há diferença estatística entre os tratamentos (ZnDPBG e Na_2CO_3) ao longo do tempo ($F_{8,143}=0,514$; $P=0,844$, TWO-WAY ANOVA).

Na Figura 5 pode-se observar que a administração do heme-lisinato (7,6 nmol/L) promoveu antinocicepção, evidenciada pelo aumento do IARC ($F_{7,71}=4,723$; $P=0,001$, ONE-WAY ANOVA) quando comparado com o IARC no controle ($P<0,05$, teste de Tukey). Além

disso, o tratamento ICV com veículo do heme-lisinato, a L-lisina (14,2 $\mu\text{mol/mL}$) não promoveu alteração significativa do IARC ($F_{7,71}=1,126$; $P=0,360$, ONE-WAY ANOVA) ao longo do tempo experimental. A aplicação da TWO-WAY ANOVA, evidenciou diferença estatística entre o tratamento (heme-lisinato ou veículo) ao longo do tempo ($F_{8,143}=2,589$; $P=0,012$). O teste de *post hoc* de Student Newman-Keuls mostrou que o efeito antinociceptivo foi observado aos 15 min ($P<0,05$) após a administração do heme-lisinato e perdurou por todo período experimental.

No grupo 5 a administração prévia (30 min) do inibidor seletivo da guanilase ciclase solúvel, ODQ (1,3 nmol/L), bloqueou a antinocicepção induzida pelo tratamento com heme-lisinato (Figura 6). A análise estatística mostrou que não ocorreu alteração significativa do IARC ($F_{7,71}=0,971$; $P=0,468$, ONE-WAY ANOVA) quando comparado com o IARC no controle (latência basal). No grupo 6, a administração do veículo do ODQ, o DMSO 1% seguida pelo heme-lisinato após 30 min, promoveu aumento do IARC ($F_{9,59}=2,63$; $P=0,014$, ONE-WAY ANOVA). O teste *post hoc* de Tukey ($P<0,05$) apontou diferença significativa nos tempos de 30 e 45 min quando comparado com IARC no tempo controle (Figura 6). A aplicação da TWO-WAY ANOVA, evidenciou diferença estatística entre os tratamentos (ODQ + heme-lisinato e DMSO + heme-lisinato) ao longo do tempo ($F_{8,125}=2,147$; $P=0,037$). O teste *post hoc* de Student Newman-Keuls ($P<0,05$), mostrou diferença entre os grupos ODQ + heme-lisinato e DMSO + heme-lisinato já aos 15 min sendo que esta diferença pode ser observada até os 75 min do início do teste de retirada de cauda (Figura 6).

No grupo 7, o tratamento ICV com ODQ seguido pela L-lisina (veículo heme-lisinato) não promoveu alteração significativa do IARC, ($F_{7,71}=0,860$; $P=0,555$, ONE-WAY ANOVA) quando comparado com IARC no tempo controle. Similarmente, no grupo 8, a administração do veículo do ODQ (DMSO 1%), combinado a administração ICV de L-lisina não promoveu alteração significativa do IARC ($F_{7,71}=1,287$; $P=0,269$, ONE-WAY ANOVA, Figura 7). A aplicação da TWO-WAY ANOVA ($F_{8,142}=1,156$; $P=0,331$) mostrou que não há diferença significativa do IARC entre os grupos ODQ + L-lisina e DMSO + L-lisina ao longo do tempo.

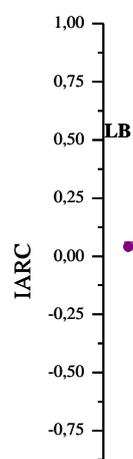


Figura 4: Efeito da administração ICV de ZnDPBG (50 nmol/L, inibidor da via HO-CO-GMPc, N = 8) ou de seu veículo, Na₂CO₃ (50 mmol/L, N = 8, para cada grupo) na nocicepção avaliada pelo índice de analgesia do teste de retirada de cauda em ratos (IARC). Os dados estão apresentados como média ± EPM. LB: Linha de base.

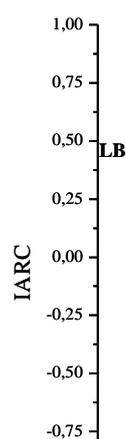


Figura 5: Efeito antinociceptivo do heme-lisinato (7,6 nmol/L, substrato da via HO-CO-GMPc) no índice de analgesia do teste de retirada de cauda em ratos (IARC, N = 8 para cada grupo experimental). ^aP < 0,05 teste Tukey, quando comparado com IARC no tempo controle. ^bP < 0,05 teste de Student Newman-Keuls, quando comparado com o IARC do grupo L-lisina (14,2 µmol/mL, veículo) em cada tempo experimental. Os dados estão apresentados como média ± EPM. LB: Linha de base.

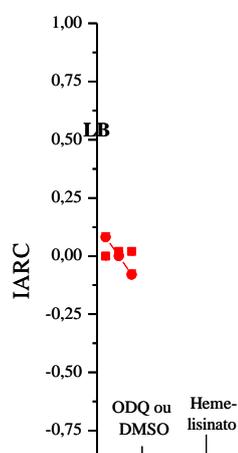


Figura 6: Bloqueio do efeito antinociceptivo do heme-lisinato (7,6 nmol/L) avaliado pelo índice de analgesia do teste de retirada de cauda (IARC) pela pré-administração ICV do inibidor da guanilase ciclase solúvel (1,3 nmol/L, ODQ+Heme, N = 8) ou do veículo DMSO 1% (DMSO+Heme, N = 6). ^aP < 0,05 teste de Tukey, comparado com IARC no tempo controle. ^bP < 0,05 teste de Student Newman-Keuls, comparado com DMSO+Heme em cada tempo. Os dados estão apresentados como média ± EPM. LB: linha de base.

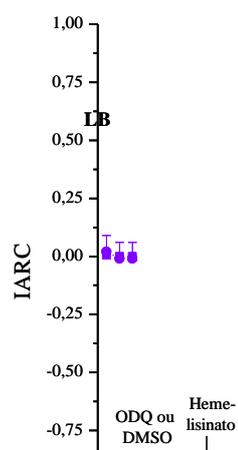


Figura 7: Efeitos da administração ICV do inibidor seletivo da guanilase ciclase (ODQ, 1,3 nmol/L) ou do veículo (DMSO 1%) seguido pelo tratamento com L-lisina (veículo do heme-lisinato, 14,2 µmol/mL) na nocicepção avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos. Os dados estão apresentados como média ± EPM. LB: linha de base.

2. Avaliação do efeito da via HO-CO-GMPc na antinocicepção induzida pelo estresse agudo avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos.

2.1. Avaliação do efeito da via HO-CO-GMPc na antinocicepção induzida pelo estresse agudo de 60 minutos avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos.

Os dados apresentados neste conjunto de grupos experimentais, mostraram que a contenção física por 60 minutos não foi capaz de promover alteração do IARC (Figuras 8 e 9), quando comparados com os valores basais antes do estresse agudo, nos distintos grupos experimentais.

No grupo 1, a análise estatística demonstrou que a administração ICV de ZnDPBG (50 nmol, 4 µl), em animais submetidos ao estresse agudo durante 60 minutos, não promoveu alteração no IARC ($F_{8,71}=0,690$; $P=0,699$, ONE-WAY ANOVA, Figura 8A) quando comparado com o tempo controle. Em relação aos animais que receberam veículo do ZnDPBG ICV (Na_2CO_3) e foram submetidos ao estresse agudo por meio de contenção durante 60 minutos, também não se observou alteração significativa do IARC ($F_{7,71}=1,113$; $P=0,369$, ONE-WAY ANOVA, Figura 8A) quando comparado com o tempo controle. A aplicação da TWO-WAY ANOVA, mostrou que não há diferença estatística entre os tratamentos (ZnDPBG e Na_2CO_3) ao longo do tempo ($F_{8,143}=0,576$; $P=0,796$).

A Figura 8B apresenta os IARC de animais submetidos à restrição física por 60 minutos e que receberam o tratamento ICV com heme-lisinato (7,6 nmol, 4 µl) ou do seu veículo (L-lisina). A análise estatística ONE-WAY ANOVA demonstrou que não ocorreu alteração significativa do IARC ao longo do tempo nos dois grupos experimentais, quando comparados com o IARC no tempo controle ($F_{7,71}=0,617$; $P=0,760$ e $F_{7,71}=0,462$; $P=0,878$, para o heme-lisinato e L-lisina, respectivamente). A aplicação da TWO-WAY ANOVA, mostrou que não há diferença estatística entre os tratamentos (heme-lisinato e L-lisina) ao longo do tempo ($F_{8,143}=0,383$; $P=0,928$).

A Figura 9 mostra os IARC de animais tratados ICV com o inibidor da GCs, ODQ (1,3 nmol, 4 µl), ou com seu veículo, DMSO 1%, combinados ao tratamento ICV com heme-lisinato (7,6 nmol, 4 µl) ou seu veículo L-lisina. A análise dos dados demonstra que o tratamento com o inibidor seletivo da GCs (ODQ) *per se* não promoveu alteração significativa do IARC ao longo do tempo ($F_{7,71}=1,677$; $P=0,124$, ONE-WAY ANOVA) quando comparado com seu respectivo controle (latência basal, Figura 9A). No grupo 8, a administração do veículo do ODQ, o DMSO 1% seguido pela L-lisina também não promoveu alteração significativa do IARC ($F_{8,71}=1,860$; $P=0,082$, ONE-WAY ANOVA). A aplicação da TWO-WAY ANOVA, mostrou que não há diferença estatística entre os tratamentos (ODQ + L-

lisina e DMSO + L-lisina) ao longo do tempo ($F_{8,143}=3,164$; $P=0,003$, Figura 9B). Em adição, a administração ICV do ODQ seguido 30 minutos após pelo tratamento ICV de heme-lisinato, e posteriormente submetidos ao estresse agudo por 60 minutos, não promoveu alteração do IARC ($F_{8,71}=0,853$; $p=0,560$, ONE-WAY ANOVA) quando comparado com o seu respectivo controle. Da mesma forma, a administração ICV do DMSO 1%, seguido pelo heme-lisinato, e posteriormente ao estresse agudo, também não promoveu diferença significativa ($F_{8,71}=0,332$; $P=0,950$, ONE-WAY ANOVA, Figura 9A). A aplicação da TWO-WAY ANOVA, mostrou que não há diferença estatística entre os tratamentos (ODQ + Heme + 60 min estresse e DMSO + Heme + 60 min estresse) ao longo do tempo ($F_{8,143}=0,528$; $P=0,834$).

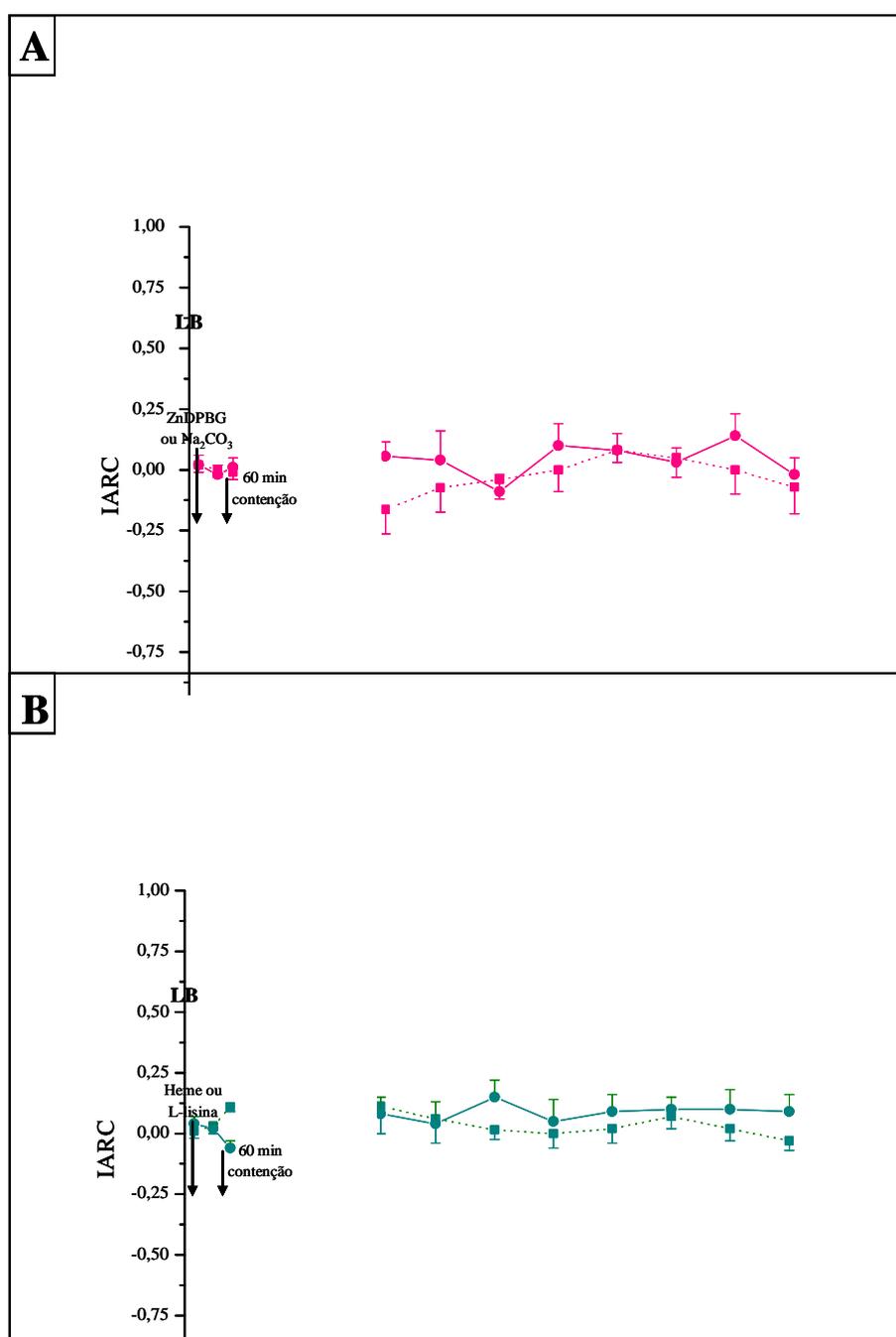


Figura 8: Índice de analgesia do teste de retirada de cauda (IARC) em ratos tratados ICV com o inibidor da enzima heme-oxigenase (ZnDPBG) ou o seu substrato (heme-lisinato) e submetidos a restrição física durante 60 min. **A:** Efeito da microinjeção ICV do ZnDPBG (50 nmol/L) ou de seu veículo (Na₂CO₃, 50 mmol/L) no IARC administrado antes do período de restrição física. **B:** Efeito da microinjeção ICV de heme-lisinato (7,6 nmol/L) ou seu veículo (L-lisina) no IARC administrado antes do período do estresse agudo (N = 8 para cada grupo). Os dados estão apresentados como média ± EPM. LB: linha de base.

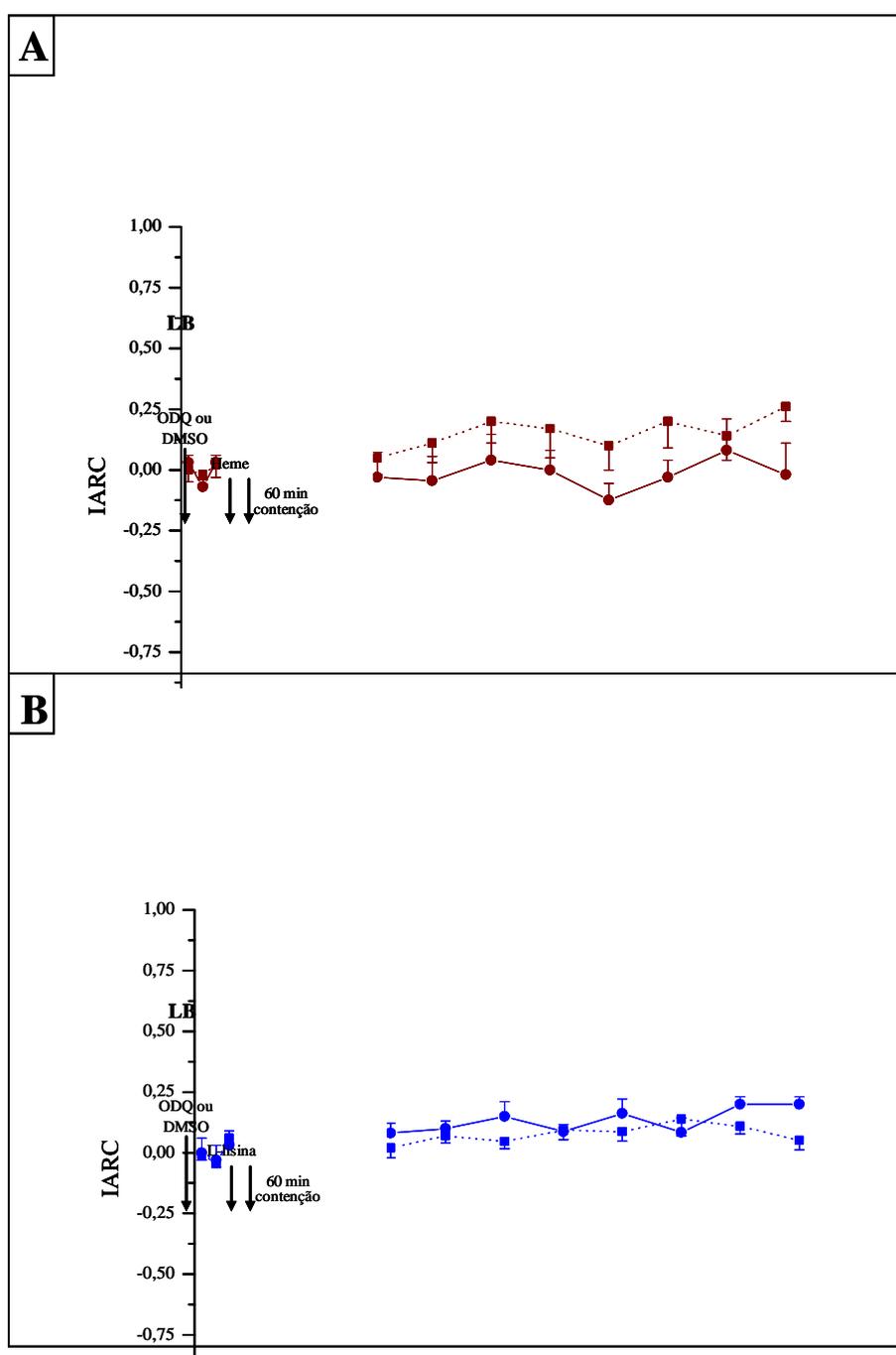


Figura 9: Efeitos da administração ICV do inibidor da guanilase ciclase solúvel (ODQ) seguido pelo tratamento com heme-lisinato ou L-lisina no índice de analgesia do teste de retirada de cauda (IARC) em ratos submetidos à restrição física por 60 min. A: Efeito do tratamento ICV com heme-lisinato (7,6 nmol/L) 30 min após a administração do ODQ (1,3 nmol/L) ou do veículo (DMSO 1%) no IARC administrados antes do período de restrição física. B: Efeito do tratamento ICV com o veículo do heme-lisinato (L-lisina, 14,2 μ mol/mL) 30 min após a administração do ODQ (1,3 nmol/L) ou de DMSO 1% no IARC administrados antes do período de restrição física. Os dados estão apresentados como média \pm EPM (N = 8 para cada grupo experimental). LB: linha de base.

2.2. Avaliação do efeito da via HO-CO-GMPc na antinocicepção induzida pelo estresse agudo de 120 minutos avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos.

Os resultados apresentados na Figura 10A mostram que o estresse de contenção durante 120 minutos promoveu antinocicepção evidenciado pelo aumento do IARC ao longo do tempo, quando comparado com os valores do IARC no período controle. Em adição, nem a inibição da atividade da enzima heme-oxigenase, bem como o pré-tratamento com o substrato para a via HO-CO-GMPc (heme-lisinato) promoveram alteração do IARC quando comparados com seus respectivos controles (Figuras 10A e B). Por outro lado, o pré-tratamento com ODQ, inibidor seletivo da enzima GCs inibiu a antinocicepção desencadeada pelo estresse agudo (Figura 11B).

No grupo onde foi realizado o tratamento ICV com ZnDPBG (50 nmol/L) a análise estatística demonstra diferença significativa do IARC no grupo pré-tratado com ZnDPBG ($F_{7,71}=23,692$; $P < 0,001$, ONE-WAY ANOVA) ao longo do tempo. O teste *post-hoc* de Tukey evidenciou diferença significativa ($P < 0,05$) durante todo o período experimental quando comparado com o controle. Da mesma maneira, a aplicação da ONE-WAY ANOVA ($F_{7,71}=17,940$; $P < 0,001$, Figura 10A) mostrou diferença estatística do IARC ao longo do tempo após o tratamento com o veículo, Na_2CO_3 (50 mmol/L) durante todo o período experimental ($P < 0,05$, Tukey). A aplicação da TWO-WAY ANOVA, mostrou que não há diferença estatística entre os grupos ZnDPBG + 120min estresse e Na_2CO_3 + 120min estresse ao longo do tempo ($F_{8,143}=0,369$; $P=0,935$).

Os resultados apresentados na Figura 10B mostram que o pré-tratamento ICV com heme-lisinato (7,6 nmol/L) ou seu veículo (L-lisina) não promoveram alteração da antinocicepção induzida pelo estresse de contenção durante 120 min, evidenciada pelo aumento do IARC ao longo do tempo. A análise estatística mostrou que ocorreu aumento significativo do IARC no grupo Heme-lisinato + 120 min estresse ($F_{7,71}=7,682$; $P < 0,001$, ONE-WAY ANOVA) quando comparado com o IARC no controle ($P < 0,05$, Tukey) durante todo o tempo experimental (Figura 10B). Similarmente, a aplicação da ONE-WAY ANOVA evidenciou aumento do IARC no grupo L-lisina + 120 min estresse ($F_{7,71}=5,515$; $P<0,001$) desde os 15 minutos ($P < 0,05$, Tukey) do teste até o final dos experimentos (120 minutos, Figura 10B). A aplicação da TWO-WAY ANOVA, mostrou que não há diferença estatística entre os grupos Heme-lisinato + 120 min estresse e L-lisina + 120 min estresse ao longo do tempo ($F_{8,143}=0,341$; $P=0,948$).

Os resultados apresentados na Figura 11 mostram a administração do inibidor da guanilase ciclase solúvel, ODQ, ou com seu veículo DMSO 1%, combinados a administração

ICV de heme-lisinato ou seu veículo, L-lisina, em animais posteriormente submetidos ao estresse agudo por 2 horas de restrição física. Os dados demonstram que o pré-tratamento com ODQ (1,3 nmol/L) seguido (30 min) pelo heme-lisinato (7,6 nmol/L, grupo 5) não foi capaz de promover alteração na antinocicepção induzida pelo estresse agudo. Desta maneira pode-se observar aumento significativo do IARC ($F_{7,71}=7,405$; $P < 0,001$, ONE-WAY ANOVA) quando comparado com o tempo controle em todo o período experimental ($P < 0,05$, Tukey, Figura 11A). Da mesma forma, o tratamento ICV com o veículo do ODQ (DMSO 1%), seguido pelo heme-lisinato não bloqueou o aumento significativo ($F_{7,71}=21,415$; $P < 0,001$, ONE-WAY ANOVA) do IARC induzido pela restrição física (120 min) desde 15 minutos após o término do estresse agudo até o tempo final de 120 min ($P < 0,05$, Tukey, Figura 11A). A aplicação da TWO-WAY ANOVA, mostrou que não há diferença estatística entre o tratamento (ODQ + heme-lisinato e DMSO + heme-lisinato) ao longo do tempo ($F_{8,143}=0,415$; $P=0,910$).

Por outro lado, a administração de ODQ (1,3 nmol/L) seguida pelo veículo do heme-lisinato (L-lisina) impediu o aumento do IARC induzido pelo estresse agudo (120 min), e evidenciado no grupo 8, onde os animais receberam apenas os veículos do ODQ (DMSO 1%) e L-lisina. A aplicação da ONE-WAY ANOVA mostrou diferença estatística no grupo DMSO + L-lisina + 120 min estresse ($F_{7,71}=32,365$; $P < 0,001$) quando comparado com os valores do tempo controle em todo o período experimental ($P < 0,05$, Tukey, Figura 11B). No grupo ODQ + L-lisina + 120 min estresse a aplicação da ONE-WAY ANOVA ($F_{7,71}=1,920$; $P = 0,075$, Figura 11B) não mostrou diferença do tratamento ao longo do período experimental. A aplicação da TWO-WAY ANOVA, mostrou diferença estatística entre os tratamentos (ODQ + L-lisina + 120 min estresse e DMSO + L-lisina + 120 min estresse) ao longo do tempo ($F_{8,143}=10,460$; $P < 0,001$). O teste *post hoc* de Student Newman-Keuls ($P < 0,05$) evidenciou diferença significativa durante todo o período experimental (Figura 11B).

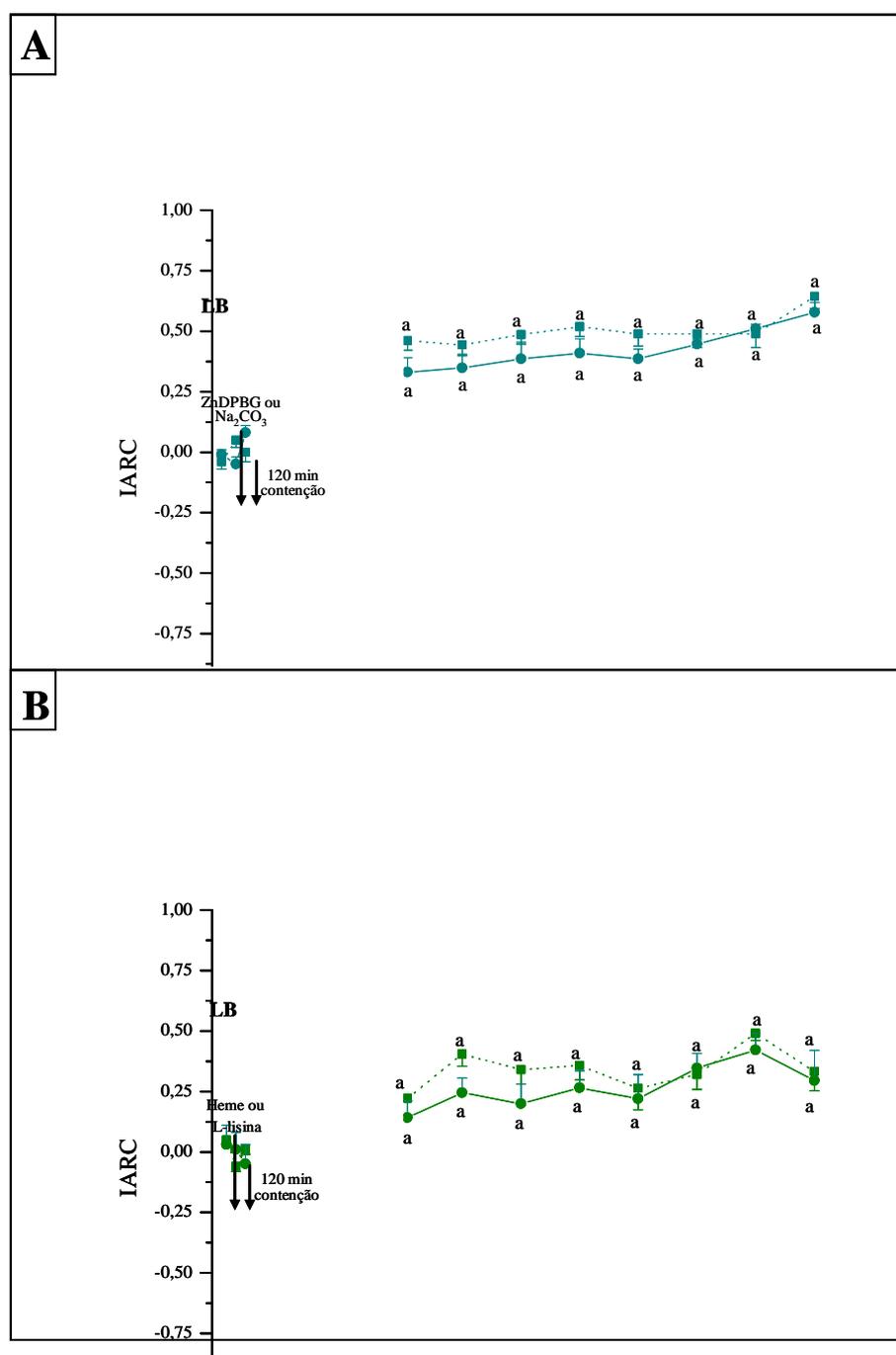


Figura 10: Antinociceção induzida pelo estresse agudo de 120 minutos de restrição física. **A:** Efeito da microinjeção ICV do inibidor da heme oxigenase ZnDPBG (50 nmol/L) ou de seu respectivo veículo (Na_2CO_3 , 50 mmol/L) no índice de analgesia do teste de retirada de cauda (IARC) administrados antes do período do estresse agudo (120 min contenção) em ratos. **B:** Efeito da microinjeção ICV de heme-lisinato (7,6 nmol/L) ou de seu veículo (L-lisina, 14,2 $\mu\text{mol/L}$) no IARC administrado antes do período do estresse agudo. ^a $P < 0,05$ teste de Tukey quando comparado com seus respectivos controles (LB). Os dados estão apresentados como média \pm EPM (N = 8, para cada grupo experimental). LB: linha de base.

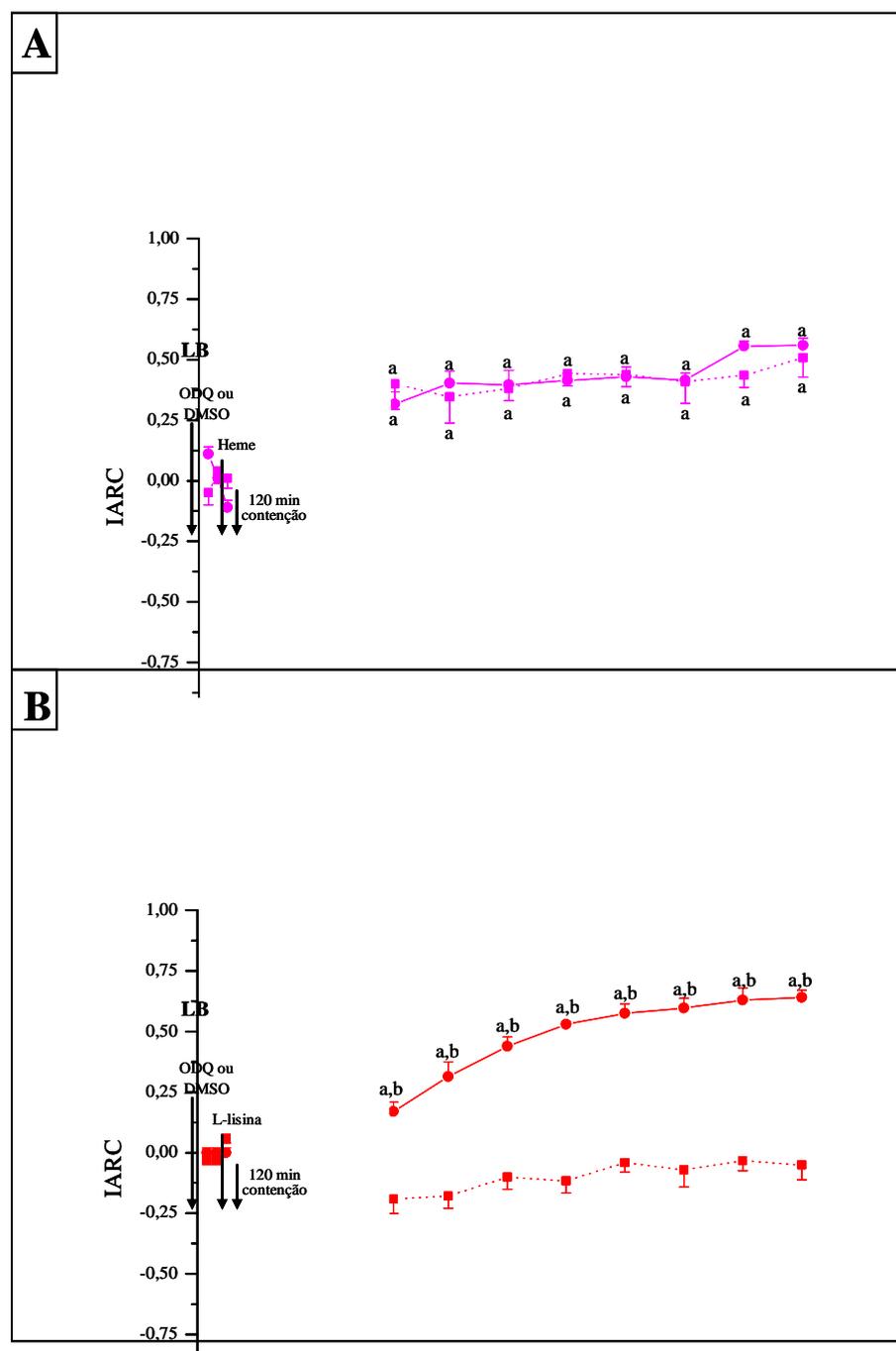


Figura 11: Bloqueio da antinociceção avaliada pelo índice de analgesia do teste de retirada de cauda (IARC) em ratos induzida pelo estresse agudo de 120 min de restrição física pelo pré-tratamento ICV com inibidor da guanilase ciclase solúvel (ODQ). **A:** Efeito da microinjeção ICV do ODQ (1,3 nmol/L) ou seu veículo (DMSO 1%) seguido pelo heme-lisinato (7,6 nmol/L) no IARC administrados antes do período do estresse. **B:** Efeito da microinjeção ICV de ODQ (1,3 nmol/L) ou do veículo (DMSO 1%) no IARC seguidos pela administração de L-lisina (veículo do heme-lisinato) do antes do período do estresse. ^a $P < 0,05$ teste de Tukey comparado com seus controles (tempo 0). ^b $P < 0,05$ teste de Student Neuwman-Keuls comparado com ODQ+L-lisina+120 min estresse nos diferentes tempos. Os dados estão apresentados como média \pm EPM (N = 8, para cada grupo). LB: linha de base.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

Para uma melhor compreensão, a discussão dos resultados obtidos neste estudo será dividida em duas partes.

Avaliação do efeito da via HO-CO-GMPc na nocicepção aguda avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos.

Os resultados apresentados neste estudo evidenciam que a ativação da via HO-CO-GMPc pode modular a nocicepção, como demonstrado pelo aumento do IARC em ratos, induzido pela administração ICV do substrato da enzima heme-oxigenase, o heme-lisinato (Figura 5). Em adição, este efeito antinociceptivo foi bloqueado pelo tratamento prévio com inibidor seletivo da enzima guanilase ciclase solúvel (ODQ, Figura 6) sugerindo que o aumento do IARC foi dependente do aumento dos níveis de GMPc. Em contrapartida, a administração ICV isolada do ZnDBPG, um inibidor da enzima heme-oxigenase, não promoveu qualquer alteração do IARC, sugerindo que o envolvimento da via HO-CO-GMPc na modulação nociceptiva frente a um estímulo nociceptivo agudo de natureza térmica ocorre de maneira fásica e não tônica. Corroborando esta hipótese, nossos resultados também demonstraram que a administração *per se* do inibidor seletivo da guanilase ciclase solúvel (GCs), ODQ, não promoveu alteração significativa do IARC, corroborando a hipótese de que a produção ou os níveis intracelulares de GMPc supra-espinais não modulam tonicamente a percepção de estímulo agudo térmico, como o teste de retirada da cauda utilizado em nossos experimentos.

Em contraste aos nossos achados, estudos têm demonstrado que o bloqueio da enzima heme-oxigenase por meio da administração do ZnDPBG *per se* pode promover efeito hipernociceptivo (Nascimento e Branco, 2007 e 2008) ou hipersensibilidade mecânica (Steiner e Branco, 2001). Nestes trabalhos, a administração de ZnDPBG local (intra-plantar) ou intra-tecal promoveu aumento do comportamento nociceptivo avaliado pelo teste da formalina intrapodal. Em adição, achado recente (Nascimento e Branco, 2009) mostra que a administração conjunta de doses sem efeito de ZnDPBG, intra-tecal e local (intra-plantar) pode promover o mesmo efeito hipernociceptivo, sugerindo sinergismo na modulação nociceptiva inflamatória pela atividade da enzima heme-oxigenase. Com esses resultados fica claro que a ativação da via HO na medula espinal pode modular a nocicepção originada em tecidos periféricos (Nascimento e Branco, 2009).

Contudo, é necessário ressaltar que estes resultados encontrados na literatura foram obtidos por distintas formas de administração dos fármacos em estudo, ou seja, a ativação ou

inibição da via HO-CO-GMPc pode ser periférica, sistêmica, local ou ICV, como no nosso caso. Assim, nos trabalhos citados, a administração foi realizada localmente (Steiner e Branco, 2001; Nascimento e Branco, 2007) ou intra-tecal (Nascimento e Branco, 2008), e no presente trabalho intracerebroventricular (ICV). Tal diferença de efeito do ZnDPBG já foi anteriormente relatada para o controle da resposta febril (Steiner e cols, 1999). Neste trabalho, o tratamento ICV com ZnDPBG bloqueou a resposta febril que acompanha o estresse agudo, enquanto que o mesmo tratamento intra-peritoneal não produziu efeito significativo na temperatura corporal. Outra hipótese plausível a se considerar com relação ao efeito hipernociceptivo do tratamento com ZnDPBG (Nascimento e Branco, 2008), refere-se aos modelos experimentais utilizados, os quais envolviam mecanismos distintos de dor, ambos associados a uma resposta inflamatória (administração de formalina ou carragenina intraplantar). No presente estudo, o modelo experimental avaliou dor aguda promovida por estímulo térmico nocivo, mas não associado a uma resposta inflamatória, e desta maneira a modulação pode se dar de maneira distinta. É importante ressaltar que na maioria dos estudos sobre a dor em roedores utiliza-se o teste de retirada de cauda assumindo que a resposta nociceptiva seja unimodal. Porém, sabe-se que a dor, como fenômeno polimodal, é bem ilustrada pelas respostas sequenciais observadas após lesão, na qual a injúria aguda resulta em dor tipicamente localizada, resultante da ativação das fibras A-delta, enquanto posteriormente a dor profunda, mais intensa e mais difícil de localizar, é resultante da ativação das fibras C. Além disso, algumas observações merecem destaque em relação ao teste de retirada de cauda: em geral, os testes baseados em estimulação térmica são mais seletivos em estimular receptores cutâneos; dessa forma, categorias específicas de receptores e fibras podem ser excitados (de acordo com intensidades crescentes do estímulo, são ativadas fibras A-beta, A-delta e finalmente fibras C). Considerando essas informações, uma fonte de calor radiante de intensidade crescente irá resultar em uma seqüência organizada de ativação de receptores, que consiste primeiramente na ativação de termorreceptores, termorreceptores + nociceptores e então somente nociceptores (Le Bards e cols, 2001). Desta maneira, é necessário cautela na avaliação de resultados experimentais obtidos de diferentes modelos nociceptivos.

Com relação aos dados da administração do substrato para a enzima heme-oxigenase, heme-lisinato, os resultados demonstram claro efeito antinociceptivo evidenciado pelo aumento do IARC (Figura 5). Corroborando nossos achados, Nascimento e Branco (2007 e 2008) têm demonstrado que a administração local ou intra-tecal deste composto promove efeito antinociceptivo, dose-dependente, avaliado pelo teste da formalina intra-podal. Neste trabalho, os autores discutem que o efeito antinociceptivo do heme-lisinato provavelmente

resulta da ação do CO na primeira sinapse da medula espinal e/ou no neurônio aferente de segunda ordem, aumentando os níveis intracelulares da guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Assim, a ação modulatória da via HO-CO-GMPc pode ser não apenas na atividade ou na liberação de mediadores inflamatórios (Steiner e Branco, 2001; Nascimento e Branco, 2007 e 2009), mas também em nociceptores, nas fibras excitáveis e na sensibilização espinal. Possivelmente a modulação nociceptiva pela atividade da via HO-CO-GMPc é devido ao aumento dos níveis intracelulares de GMPc desde que o tratamento intra-tecal com heme-lisinato é bloqueado pela pré-administração no mesmo sítio de azul de metileno (inibidor da GCs). Em adição, evidências demonstram que o GMPc é capaz de modular tonicamente a nocicepção associada a resposta inflamatória, pois a administração do azul de metileno *per se* (150µg) promoveu hipernocicepção no teste de formalina podal (Nascimento e Branco, 2008, 2009).

Um grande número de estudos tem dado suporte às ações fisiológicas do gás composto monóxido de carbono (CO), mostrando este ser uma substância vasoativa e atuando como neurotransmissor e/ou neuromodulador (Dawson e Snyder, 1994). A heme oxigenase (HO) é uma enzima responsável pela biossíntese do CO e parece atuar no sistema nervoso central de várias espécies, incluindo pequenos roedores e seres humanos (Raffaini e cols, 2006). De acordo com a literatura, há evidências de que esta via participe do controle da pressão arterial (Johnson e cols, 1999), da redução da atividade do sistema vasoconstritor durante hipóxia crônica, e na regulação das funções neuroendócrinas (Maines, 1997). Mais recentemente, este neuromodulador tem sido associado à modulação das respostas associadas ao estresse, tal como a resposta febril (Steiner e cols, 2003) e a sensibilidade dolorosa relacionada aos processos inflamatórios (Nascimento e Branco, 2007, 2008). A participação do gás CO na modulação de eventos fisiológicos tem-se mostrado semelhante à ação fisiológica do gás óxido nítrico (NO). Dentro deste contexto, o NO participa de uma série de eventos fisiológicos e fisiopatológicos (Savegnago e cols, 2008), incluindo sua participação na modulação nociceptiva e antinociceptiva (Brito e cols, 2006, Sachs e cols, 2004). Vale ressaltar que tanto o NO quanto o CO atuam, na maioria das vezes, via ativação da GCs, uma hemoproteína citoplasmática, promovendo aumento nos níveis intracelulares do segundo mensageiro GMPc (Liang e Clark, 2004). Porém, dados na literatura demonstram que a ativação da enzima GCs pelo CO aumenta a produção de GMPc em uma ou duas vezes (Burstyn e cols, 1995), aumento relativamente pequeno, em relação ao aumento cerca de cem vezes maior promovido pela interação do NO com a GCs (Schmidt, 1992), o que poderia

explicar as diferenças encontradas entre os efeitos finais de cada um desses neuromoduladores gasosos no sistema nervoso durante a nocicepção.

Nossos dados demonstram também que a administração do inibidor seletivo da GCs (ODQ) previamente à administração do heme-lisinato bloqueou a antinocicepção observada no teste de retirada de cauda em ratos. Estes resultados reforçam a hipótese de que a antinocicepção obtida em nossos experimentos seja decorrente do aumento intracelular de GMPc. Dentro deste contexto, várias evidências tem demonstrado que a modulação nociceptiva pode ocorrer pela alteração da atividade do GMPc intracelular (Meller e Gebhart, 1993, Duarte e Ferreira, 1992, Nascimento e Branco, 2007 e 2008). No entanto, a alteração dos níveis intracelulares de GMPc pode resultar em efeitos pró- ou antinociceptivos, dependendo da magnitude do aumento do GMPc, bem como do local, ou seja, periférico, na medula espinal ou supra-espinal. Desta maneira, tem sido demonstrado que o aumento na medula espinal da atividade do GMPc promove inibição da atividade de neurônios espinhais, principalmente de neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinal (Manjarrez e cols, 2001, Pehl e Schmid, 1997, Hoheisel e cols, 2000). Em contraste, Hoheisel e cols. (2005) demonstraram que o aumento supra-espinal dos níveis de GMPc promoveu excitação em neurônios localizados no corno da medula espinal, sugerindo provável efeito pró-nociceptivo. Dando suporte ao efeito *dual* do GMPc na modulação nociceptiva (Sousa e Prado, 2001), Tegeder e cols. (2002) demonstraram em ratos que baixas doses de 8-Br-GMPc (análogo do GMPc) administrado na medula espinal reduz o comportamento nociceptivo observado no teste de formalina intrapodal, enquanto que altas doses promoveram hiperalgesia. É possível que a antinocicepção seja o efeito primário desde que a mesma é obtida com menor concentração do análogo do GMPc, 8-Br-GMPc.

Vale ressaltar que os níveis de GMPc podem ser alterados por diferentes vias e fatores. Considerando que em nossos experimentos o aumento do GMPc foi promovido pela maior ativação da via HO-CO-GMPc e que a ativação da GCs pelo CO aumenta em pequena proporção (Bustyn e cols, 1995), é possível que também supra-espinal o GMPc possa ter efeito *dual*, ou seja, altos níveis de GMPc tenha efeito pró-nociceptivo, ou aumento da atividade de neurônios nociceptivos espinhais (Hoheisel e cols, 2005), enquanto que alteração de menor magnitude dos níveis de GMPc supra-espinal resulte em efeito antinociceptivo, como evidenciado pelo aumento do IARC após administração do heme-lisinato, sendo tal efeito bloqueado pelo pré-tratamento com ODQ (inibidor seletivo da GCs).

É possível que a modulação da nocicepção pelo aumento do GMPc supra-espinal ocorra em regiões que controlem a atividade de neurônios espinhais via tratos descendentes

(Hoheisel e cols, 2005). Admitindo que as injeções ICV possam atingir todos os ventrículos cerebrais (Yu e cols, 1991), o sítio exato da ação supra-espinal não é conhecido, porém pode-se sugerir o envolvimento de áreas que conhecidamente contribuem para inibição ou ativação nociceptiva descendente, entre elas a substância cinzenta periaquedutal, o bulbo rostroventral, a amígdala e o tálamo ventrobasal (Fields e Basbaum, 1999, Sandkühler, 1996, Millan, 2002). Além disso, a enzima heme-oxigenase, nas suas principais isoformas HO-1 e HO-2 apresentam vasta distribuição no sistema nervoso central (Ewing e Maines, 1992). Dentre as áreas que expressam HO, intensa imunorreatividade pode ser observada no complexo hipocampal, o que inclui neurônios piramidais de CA1-CA3, neurônios da camada granular e alguns neurônios do giro denteado (Ewing e cols, 1993, Maines e cols, 1996). Correlacionando com modulação nociceptiva, trabalho recente (Shih e cols, 2008) utilizando técnicas de mapeamento funcional demonstrou que a nocicepção induzida pela administração de formalina 5% intra-podal em ratos promoveu grande ativação de distintas áreas encefálicas e dentre elas do hipocampo. De fato, o envolvimento do hipocampo na modulação nociceptiva é amplamente descrito (Lico e cols, 1974, Khanna, 2007) e sugere-se que esta estrutura esteja envolvida com o componente afetivo-motivacional da dor (Lico e cols, 1974, Henke, 1982). Em adição, estudos têm correlacionado a atividade do GMPc com funções desempenhadas pelas áreas hipocampais (Bon Garthwaite, 2003, Hopper e Garthwaite, 2006). É possível que em áreas hipocampais devido aos altos níveis de expressão das isoenzimas da HO e a pequena atividade da NO sintase, o CO seja a principal molécula sinalizadora para GCs nesta estrutura (Maines, 1997). Reforçando esta hipótese, a administração do ODQ intra-hipocampal bloqueia a potencialização a longo prazo que ocorre em CA1 necessária para vários tipos de comportamentos aprendidos (Bon e Garthwaite, 2003). Ainda é possível que a atividade do GMPc no hipocampo e em outras áreas encefálicas estejam relacionadas com a ativação de receptores NMDA (Garthwaite e cols, 1995). Funcionalmente, os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA medeiam diferentes funções fisiológicas, e dentre elas a nocicepção (Dubner, 2004, Meller e cols, 1996, Morgan e cols, 2009).

Desta maneira, nossos dados demonstram que a ativação da via HO-CO-GMPc promove antinocicepção avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos, e é possível sugerir que o hipocampo seja um dos sítios envolvidos nesta modulação nociceptiva induzida pelo aumento de GMPc via formação de CO a partir da molécula heme.

Avaliação do efeito da via HO-CO-GMPc na antinocicepção induzida pelo estresse agudo avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos.

Sumariamente, nossos resultados mostraram que o estresse agudo promovido pela restrição física por 120 minutos foi capaz de promover antinocicepção, evidenciada pelo aumento do IARC avaliado pelo teste de retirada de cauda (Figuras 10 e 11). Este efeito não foi alterado pela administração prévia do substrato da via heme-oxigenase, heme-lisinato, nem pelo inibidor da HO, o ZnDBPG (Figura 10). No entanto, o pré-tratamento com ODQ, inibidor da enzima guanilase ciclase bloqueou a antinocicepção induzida pelo estresse agudo (Figura 11) sugerindo envolvimento do GMPc nesta resposta, possivelmente independente da via HO-CO-GMPc. Vale ressaltar que o estresse de contenção durante 60 minutos não promoveu alteração no IARC, em nenhum dos grupos avaliados.

Considerando a situação de estresse realizada em nossos experimentos, várias evidências mostram que em animais ou seres humanos expostos a estímulos potencialmente nocivos (exercício físico intenso, restrição física, glicoprivação, confronto presa/predador ou entre co-específicos, entre outros), ocorrem respostas fisiológicas, visando à manutenção da homeostase, tal como aumento da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), com secreção de hormônios adrenocorticotróficos (ACTH) e correspondente elevação da concentração de glicocorticóides (Pack e cols, 1998). É importante destacar, no entanto, que as respostas neuroendócrinas do organismo podem ser distintas dependendo da natureza do agente estressor. Desta maneira, a glicoprivação promove seletiva ativação adrenomedular e ativação pituitária-adrenocortical (Goldstein e cols, 1992), por outro lado, as manipulações da ingestão de sal produz seletivo efeito sobre a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Krieger e cols, 1990). Nesta perspectiva, vale ressaltar que, embora alguns trabalhos tenham demonstrado que a restrição física com duração de 60 min ou menos seja capaz de promover a alteração da temperatura corporal (Steiner e cols, 1999) e da nocicepção (Gamero e cols., 1998.), outros modelos utilizam a restrição física com duração de 120 minutos para que possam ser observadas alterações efetivas no limiar nociceptivo (Echeverry e cols, 2002 e 2004), bem como nas concentrações plasmáticas de ACTH, um indicador de ativação do eixo HPA (Pacak e cols, 1998). Juntos, estes achados reforçam nossos dados onde a restrição física por 120 minutos desencadeou antinocicepção evidenciada pelo aumento do IARC, embora 60 minutos de contenção não tenha promovido alteração da nocicepção.

Em nossos resultados foi observado, que no grupo experimental não-estressado e tratado ICV com heme-lisinato, ocorreu efeito antinociceptivo (Figura 5). Em adição, o IARC aumenta logo no início dos experimentos (15 minutos) e aos 90 minutos inicia-se a redução

gradativa destes valores, até os 120 minutos do teste algesimétrico. Comparando a escala temporal da administração do heme-lisinato no grupo não-estressado com o grupo estressado durante 60 minutos (Figura 8), o primeiro registro experimental deste último grupo ocorre aproximadamente 105 minutos após o tratamento com heme-lisinato ICV. Desta maneira, é possível que nos grupos submetidos ao estresse por restrição física (60 ou 120 minutos) a antinocicepção promovida pelo tratamento ICV com o substrato da via HO-CO-GMPc não foi observado pois este efeito já estava em declínio quando se iniciou as avaliações do IARC. Em contrapartida, pode-se sugerir também que no grupo submetido ao estresse por 120 minutos e que recebeu pré-tratamento ICV com heme-lisinato, esta manipulação pode ter promovido aumento adicional da atividade da enzima GCs acarretando maior formação do GMPc, o qual não foi bloqueado pela administração de ODQ, e desta maneira, observa-se o efeito antinociceptivo avaliado pelo aumento do IARC.

Entretanto, de maneira geral, a alteração da atividade do eixo HPA é considerada a linha de frente dos mecanismos endócrinos para proteger o organismo contra as respostas ao estresse (Contarteze e cols, 2007), prevenindo reações que ameacem a homeostase. Esta ativação do eixo HPA envolve uma cascata de eventos biológicos iniciado pela liberação do fator de liberação de corticotropina (CRF), por neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (Vale e cols., 1981; Sawchenko e cols., 1993). De fato, estímulos considerados aversivos, ou seja, estressores, promovem aumento da secreção de CRF (Plotsky e Vale, 1984), e este por sua vez estimula receptores para CRF localizados em células corticotróficas da pituitária anterior (Wynn e cols, 1983, Goyal e Anil, 2007) estimulando a síntese e liberação (Bruhn e cols, 1984, Rivier e cols, 1982) da molécula precursora pró-opiomelanocortina, de onde derivam, principalmente, o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e a β -endorfina.

Em adição, vários estudos têm demonstrado que diferentes situações de estresse podem promover antinocicepção (Rodgers e Randall, 1987), tanto de origem opióide, como não-opióide (Lewis e cols, 1980). A analgesia induzida pelo estresse é considerada uma resposta adaptativa que ocorre tanto em laboratórios animais e humanos. Múltiplas vias inibitórias da dor (opióide e não-opióide) parecem ser ativadas por vários estímulos distintos (Watkins e Mayer, 1982). Dentre os métodos para induzir a analgesia em roedores; o modelo de restrição física é um dos mais utilizados (Maier, 1986), sendo um modelo de estresse moderado (Armario e cols, 1990). Desta forma, evidências mostram que o estresse agudo em ratos (machos e fêmeas) promove aumento da latência do teste de retirada de cauda quando

comparados com os animais do grupo controle não estressados, comprovando o efeito antinociceptivo desta manipulação (Gamaro e cols, 1998).

Com relação aos mecanismos envolvidos na analgesia induzida pelo estresse, tem sido relatado tanto mecanismos dependentes de opióides (Rodger e Randall, 1987, Lewis e cols, 1980, Leite-Panissi e cols, 2004), como mecanismos não-opióides, envolvendo a neurotransmissão histaminérgica, colinérgica e/ou serotoninérgica (Tricklebank e Curzon, 1984). De fato, o pré-tratamento com naloxone, antagonista de receptores opióides, bloqueia a antinocicepção induzida por diferentes tipos de estresse, tais como a exposição à água fria (Bodnar e cols, 1978), choques elétricos (Chesher e Chan, 1977), bem como a antinocicepção que acompanha a emissão de comportamentos de defesa (Leite-Panissi e cols, 2004). Com relação ao estresse de restrição, foi demonstrado ainda que a administração intracerebroventricular de antagonista angiotensinérgicos (saralasin) ou de naloxone preveniu a antinocicepção avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos (Haulică e cols, 1986).

Correlacionando o sistema angiotensinérgico, opioidérgico e modulação nociceptiva, Raghavendra e cols. (1999) mostraram que a administração de angiotensina II no ventrículo lateral de ratos aumentou a latência das respostas no teste de retirada de cauda. Este aumento foi revertido pela administração prévia de naloxone, sugerindo que a analgesia induzida pela Ang II é mediada por mecanismos opioidérgicos endógenos. Ainda, a analgesia produzida pela ativação de receptores angiotensinérgicos envolve a ativação da guanilase ciclase solúvel, desde que a administração do ODQ, o inibidor seletivo para a GCs, na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral foi capaz de bloquear a antinocicepção em ratos induzida pelo tratamento com Angiotensina (5-8) (Guethe, 2009; Garthwaite e cols, 1995). Juntos, estes dados corroboram nossos achados onde se observa que o estresse de restrição física por 120 minutos promoveu antinocicepção no teste de retirada de cauda, sendo este efeito bloqueado pelo pré-tratamento com ODQ. Estas evidências sugerem que este efeito foi dependente da ativação do GMPc, no entanto, independente da via HO-CO-GMPc desde que o inibidor seletivo da HO (ZnDBPG) não alterou o aumento do IARC induzido pelo estresse agudo.

Corroborando nossos achados, Echeverry e cols. (2002 e 2004) também demonstraram que o estresse de restrição durante 120 minutos promoveu antinocicepção, avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos. Em adição, este efeito foi bloqueado pelo tratamento com inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), demonstrando que a antinocicepção induzida pelo estresse de restrição é dependente da liberação de óxido nítrico

(NO). Vale ressaltar que semelhante ao mecanismo de ação do CO, o NO atua aumentando a atividade da enzima GCs, resultando em aumento do GMPc (Ignarro e cols, 1984). De fato, evidências têm apontado que o efeito antinociceptivo do NO ocorre por meio da ativação do GMPc (Almeida e Duarte, 2008, Brito e cols, 2006, Sachs e cols, 2004). Dentro deste contexto, Almeida e Duarte (2008) demonstraram a participação da via endógena NO/GMPc na antinocicepção induzida por eletroacupuntura (EA) em ratos. Os resultados desta investigação mostraram que tanto o inibidor específico para a NOS (N-nitro-L-arginine, NOArg) como da GCs (ODQ), pré-administrados subcutaneamente, foram capazes de antagonizar a antinocicepção induzida pela eletroacupuntura, avaliada pelo teste de retirada de cauda em ratos. Ainda, considerando que a analgesia induzida pela acupuntura foi bloqueada ou revertida pelo naloxone, antagonista opióide, (Hwang e cols, 2002; Ceccherelli e cols, 2002) é possível sugerir que há interação entre mecanismos opioidérgicos e a via NO/GMPc na mediação deste efeito (Duarte e cols, 1990; Duarte e Ferreira, 1992; Pacheco e cols, 2005; Chena e cols, 2006).

Investigando o substrato neural que poderia estar envolvido na mediação da antinocicepção induzida pelo estresse agudo, De Oliveira e cols. (2000) mostraram que o estresse de contenção promove aumento da expressão da enzima NOS neuronal no núcleo paraventricular do hipotálamo, no núcleo medial da amígdala e na região dorsal da substância cinzenta periaquedutal. De fato, vários achados apontam estas áreas encefálicas como estruturas intimamente relacionadas com a modulação nociceptiva e antinociceptiva (Basbaum e Fields, 1984, Leite-Panissi e cols, 2004, Oliveira e Prado, 2001). Dentro deste contexto, dados mostram que a administração de morfina (Rodgers, 1978, Leite-Panissi e cols, 2004) na amígdala ou na substância cinzenta periaquedutal (Morgan e cols, 2009) promove intensa antinocicepção avaliada por diferentes testes algesimétricos. Além disso, numerosos estudos têm mostrado que o sistema NO/GMPc participa da antinocicepção e dos efeitos produzidos pelos opióides (Pol, 2007, Pryor e cols, 2005). Juntos, estas evidências sugerem que a antinocicepção observada em nossos experimentos pelo aumento do IARC nos grupos submetidos ao estresse de restrição por 120 minutos tenha envolvimento destas estruturas encefálicas, reforçando a possibilidade de que o aumento da atividade do GMPc promova efeito antinociceptivo, desde que o bloqueio da enzima GCs pelo pré-tratame com ODQ bloqueou o aumento do IARC.

CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

Fundamentado nos resultados obtidos neste trabalho podem ser sumarizadas as seguintes conclusões:

- A ativação da via HO-CO-GMPc por meio da administração ICV de heme-lisinato promove efeito antinociceptivo no teste de retirada de cauda em ratos, sendo este efeito dependente da atividade GMPc, desde que o pré-tratamento com inibidor da guanilase ciclase solúvel, ODQ bloqueou o aumento do IARC.

- A modulação nociceptiva pela via HO-CO-GMPc de um estímulo nociceptivo agudo de origem térmica ocorre de maneira fásica e não tônica, desde que o tratamento isolado ICV com o inibidor da HO, ZnDBPG ou com o inibidor da GCs, ODQ, não alterou o IARC.

- A antinocicepção induzida pelo estresse agudo (restrição física durante 120 min) não é dependente da via HO-CO-GMPc, desde que o tratamento com o inibidor da HO, ZnDBPG, nem com o substrato da via heme-lisinato promoveram alteração do IARC. No entanto, esta antinocicepção é dependente da atividade do GMPc, desde que o tratamento prévio com ODQ, inibidor seletivo da GCs bloqueou o aumento do IARC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F.V.; MELACK, R.; SAMUEL, C. Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests mediated by different neural systems. **Experim. Neurol.**, 75: 644-65, 1982.
- ABRAHAM, N.G.; LIN, J.H.C.; SCWARTZMAN, M.L.; LEVERE, R.D.; SHIBAHARA, S. The physiological significance of heme oxygenase. **Int. J. Biochem.**, 20: 543-558, 1988.
- ALAM, J.; DEN, Z. Distal AP-1 binding sites mediate basal level enhancement and TPA induction of the mouse heme oxygenase-1 gene. **J. Biol. Chem.**, 267: 21894-21900, 1992.
- ALMEIDA, R.T.; DUARTE, I.D.G. Nitric oxide/cGMP pathway mediates orofacial antinociception induced by electroacupuncture at the St36 acupoint. **Brain. Res.**, 1188: 54-60, 2008.
- ARMARIO, A.; MARTI, O.; GAVALDA, A.; JOLIN, T. Blockade of opioid receptors with naltrexone inhibits thyrotropin increase after noise stress but does not prevent the decrease caused by immobilization. **Brain Res. Bull.**, 25: 347-349, 1990.
- BAPTISTA D.; BUSSADORI K.; NUNES-DE-SOUZA RL.; CANTO-DE-SOUZA A. Blockade of fear-induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: Influence of prior test experience. **Brain Res.**, 1294: 29-37, 2009.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Annu. Neurol.**, 4: 451-462, 1978.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu. Rev. Neurosci.**, 7: 309-338, 1984.
- BODNAR, R.J. Supraspinal circuitry mediating opioid antinociception: antagonist and synergy studies in multiple sites. **J. Biomed. Sci.**, 7: 181-94, 2000.
- BODNAR, R.J.; KELLY, D.D.; SPIAGGIA, A.; EHRENBERG, C.; GLUSMAN, M. Dose-dependent reductions by naloxone of analgesia induced by cold water stress. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 8: 667-672, 1978.
- BOLLES, R.C.; FANSELOW, M.S. A perceptual-defensive- recuperative model of fear and pain. **Behav. Brain Sci.**, 3: 291-323, 1980.
- BON C.L.; GARTHWAITE J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **J. Neurosci.**, 23: 1941-1948, 2003.
- BRANDÃO, M. L. **As bases biológicas do comportamento: Introdução à neurociência.** E. P.U. 2002.
- BRITO, G.A.C.; SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; VALE, M.L.; LOTUFO, C.M.C.; FERREIRA, S.H.; RIBEIRO, R. A. Peripheral antinociceptive effect of pertussis toxin: activation of the arginine/NO/cGMP/PKG/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Eur. J. Neurosci.**, 24: 1175-1181, 2006.

- BRUHN T.O.; SUTTON R.E.; RIVIER C.L.; VALE W.W. Corticotropin-releasing factor regulates proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in vivo. **Neuroendocrinology**, 39: 170-175, 1984.
- BURSTYN, J.N.; YU, A.E.; DIERKS, E.A.; HAWKINS, B.K.; DAWSON, J.H. Studies of the heme coordination and ligand binding properties of soluble guanylyl cyclase (sGC): characterization of Fe(II) sGC and Fe(II) sGC(CO) by electronic absorption and magnetic circular dichroism spectroscopies and failure of CO to activate the enzyme. **Biochem.**, 34: 5896-5903, 1995.
- CABLE, E.E.; GILDEMEISTER, O.S.; PEPE, J.A.; LAMBRECHT, R.W.; BONKOVSKY, H.L. Mechanism of induction of heme oxygenase by metalloporphyrins in primary chick embryo liver cells: evidence against a stress-mediated response. **Mol. Cell. Biochem.**, 169: 13-20, 1997.
- CALVINO, B.; GRILO, R.M. Central pain control. **J. Bone Spine.**, 73: 10-16, 2006.
- CASEY, K.L. Forebrain mechanism of nociception and pain: analysis throughes imaging. **Proc. Natl. Sci. U.S.A.**, 96: 7668-74, 1999.
- CECCHERELLI, F.; GAGLIARDI, G.; RUZZANTE, L.; GIRON, G. Acupuncture modulation of capsaicin-induced inflammation: effects of intra-peritoneal and local administration of naloxone in rats. A blinded controlled study. **J. Altern. Complem. Med.**, 8: 341-349, 2002.
- CHENA, L.X.; QIA, Y.M.; WANGB, R.; DUAN, X.; GAO, Y.F.; YANG, D.J. Roles of nitric oxide synthases inhibition on antinociceptive effects of micro-opioid agonist in mice. **Prot. Peptide Letters.**, 13: 993-997, 2006.
- CHESHER, G.B.; CHAN, B. Foot shock induced analgesia in mice: its reversal by naloxone and cross tolerance with morphine. **Life Sci.**, 21: 1569-1574, 1977.
- COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Effect of 5-HT₂ receptor blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. **Behav. Brain Res.**, 87: 97-103, 1997.
- CONCARTEZE, R.V.L.; MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; MELLO, M.A.R. Biomarcadores de estresse em ratos exercitados por natação em intensidade igual e superior à máxima fase estável de lactato. **Rev. Bras. Med. Esp.**, 13: 169-174, 2007.
- CORNÉLIO A.M.; NUNES-DE-SOUZA R.L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: a non-opioid type of pain inhibition? **Physiol. Behav.**, 96: 440-447, 2009.
- CURZON, G.; HUTSON, P.H.; KENNETT, G.A.; MARCOU, M. Characteristic of analgesia induced by brief or prolonged stress. **Annu. NY Acad. Sci.**, 93-101, 1997.
- DAWSON, T.M.; SNYDER, S.H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci.**, 14: 5147-5159, 1994.
- DE OLIVEIRA R.M.; APARECIDA DEL BEL E.; MAMEDE-ROSA M.L.; PADOVAN C.M.; DEAKIN J.F.; GUIMARÃES F.S. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. **Neurosci Lett.**, 289: 123-126, 2000.

- DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanism of defense. **J. Psychopharmacol.**, 5: 305-315, 1991.
- DERAMAUDT, B.M.; BRAUNSTEINS, S.; REMY, P.; ABRAHAM, N.G. Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. **J. Cell. Biochem.**, 68: 121-127, 1998.
- DOI, K.; AKAIAKE, T.; FUJII, S.; TANAKA, S.; IKEBE, N.; BEPPU, T.; SHIBAHARA, S.; OGAWA, M.; MAEDA, H. Induction heme oxygenase-1 by nitric oxide and ischemia in experimental solid tumors and implication for tumors growth. **Brain J. Cancer.**, 80: 1945-1954, 1999.
- DUARTE, I.D.G.; FERREIRA, S.H. The molecular mechanism of central analgesic induced by morphine or carbachol and the L-arginine-oxide-cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, 221:171-174, 1992.
- DUARTE, I.D.G.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide cyclic GMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, 186: 289-293, 1990.
- DUBNER R. The neurobiology of persistent pain and its clinical implications. **Suppl. Clin. Neurophysiol.**, 57: 3-7, 2004
- DUBUISSON, P.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesia effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain.**, 4: 161-174, 1977.
- ECHEVERRY, M.B.; GUIMARÃES, F.S.; DEL BEL, E.A. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. **Neurosc.**, 125:981-993, 2004.
- ECHEVERRY, M.B.; GUIMARÃES, F.S.; OLIVEIRA, M.A.; PRADO, W.A.; DEL BEL, E.A. Delayed stress-induced antinociceptive effect of nitric oxide synthase inhibition in the dentate gyrus of rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 74: 149-156, 2002.
- EWING, J.F.; MAINES, M.D. In situ hybridization and immunohistochemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal rat brain: differential distribution of isozyme 1 and 2. **Mol. Cell. Neurosci.**, 3: 4559-70, 1992.
- EWING, J.F.; WEBER, C.M.; MAINES, M.D. Biliverdin reductase is heat resistant and co-expressed with constitutive and heat shock form of heme oxygenase. **J. Neurochem.**, 61: 1015-23, 1993.
- FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in responsive to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A; BANDLER, R. (Eds.). *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*. New York: Plenum Press, 151-173, 1991.
- FANSELOW, M.S.; BOLLES, R.C. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, 93: 736-44, 1979.
- FARDIN, V.; OLIVEIRAS, J.L.; BESSON, J.M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. **Brain Res.**, 306: 105-123, 1984.

- FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Central nervous systems mechanisms of pain modulation. IN: Wall, P.D., and Melzack, R. (eds.), *Textbook of Pain*, 4th edn., Churchill Livingstone, London, pp. 309–329, 1999.
- FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, 48: 129-41, 1999.
- GALBRAITH, R. Heme oxygenase: Who needs it? **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 222: 299-305, 1999.
- GAMARO, G.D.; XAVIER, M.H.; PILGER, J.A.; ELY, D.R.; DALMAZ, C. The effects of acute and repeated stress on the nociceptive response in rats. **Physiol. Behav.**, 63: 693-697, 1998.
- GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C.L.; NIELSEN, E.B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol.**, 48(2), 184-188, 1995.
- GOLDSTEIN, D.S.; BREIER, A.; WOLKOWITZ, O.M.; PICKAR, D.; LENDERS, J.W.M. Plasma levels of catechols and ACTH during acute glucopenia in humans. **Clin. Auton. Res.**, 2: 359-366, 1992.
- GOODMAN, A.I.; CHOUDHURY, M.; da SILVA, J.L.; SCHWARTZMAN, M.L.; ABRAHAM, N.G. Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 214: 54-61, 1997.
- GOYAL, R.; ANIL, K. Protective effect of alprazolam in acute immobilization stress-induced certain behavioral and biochemical alterations in mice. **Pharmacol. Rep.**, 59: 284-290, 2007.
- GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 28: 239-59, 2004.
- GUETHE, L.M. Papel da angiotensina (5-8) e do seu análogo sintético RI-58 na mediação da nocicepção modulada pela substância cinzenta periaqueductal de rato. Ribeirão Preto, 2009. 84p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- HAULICĂ, I.; NEAMTU, C.; STRATONE, A.; PETRESCU, G.H.; BRANISTEANU, D.; ROSCA, V.; SLATINEANU, S. Evidence for the involvement of cerebral rennin-angiotensin system (RAS) in stress analgesia. **Pain**, 27,237-245, 1986.
- HENKE, P.G. The telencephalic limbic system and experimental gastric pathology: a review. **Neurosci. Biobehav. Review.**, 6: 381-390,1982.
- HOHEISEL, U.; UNGER, T.; MENSE, S. A block of spinal nitric oxide synthesis leads to increased background activity predominantly in nociceptive dorsal horn neurons in the rat. **Pain**, 88: 249-57, 2000.
- HOHEISEL, U.; UNGER, T.; MENSE, S. The possible role of the NO-cGMP pathway in nociception: Different spinal and supraspinal action of enzyme blockers on rat dorsal horn neurons. **Pain**, 117: 358-367, 2005.

- HOPPER R.A.; GARTHWAITE J. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. **J. Neurosci.**, 26: 11513-11521, 2006.
- HWANG, B.G.; MIN, B.; KIM, J.H.; NA, H.S.; PARK, D.S. Effects of electroacupuncture on the mechanical allodynia in the rat model of neuropathic pain. **Neurosci. Lett.**, 320: 49-52, 2002.
- IGNARRO, L.J.; BALLOT, B.; WOOD, K.S. Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins. **Biol. Chem.**, 259: 6201-6207, 1984.
- JESSEL, T.M.; DODD, J. Neurotransmitters and differentiation antigens in subsets of sensory neurons projecting to the spinal dorsal horn. In: *Neuropeptides in Neurologic and Psychiatric Disease*, J.B. MARIN and J.D. BARCHES (eds.). New York: Raven Press, 1986.
- JOHNSON, R.A.; KOZMA, F.; COLOMBARI, E. Carbon monoxide: from toxin to endogenous modulator of cardiovascular functions. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 32: 1-14, 1999.
- JOHNSON, R.A.; LAVESA, M.; ASKARI, B.; ABRAHAM, N.G.; NASJUTTI, A. A heme oxygenase product, presumable carbon monoxide, mediates a vasodepressor function in rats. **Hyperten.**, 25: 166-169, 1995.
- KHANNA, S. Nociceptive processing in the hippocampus and entorhinal cortex: neurophysiology and pharmacology. In: *SCHMIDT, R.F.; WILLIS, W.D. (Eds.), Encyclopedia of Pain*. Springer-Verlag, Berlin, pp.1369-1374, 2007.
- KRIEGER, J.E.; LIARD, J.F.; COWLEY JR.; A.W. Hemodynamics, fluid volume, and hormonal responses to chronic high-salt intake in dogs. **Am. J. Physiol.**, 259: H1629-H1636, 1990.
- LABBÉ, R.F.; UREMAR, H.J.; STEVENSON, D. Zinc Protoporphyrin: A metabolite with a mission. **Clin. Chem.**, 45: 2060-2072, 1999.
- LE BARDS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, 53:597-632, 2001.
- LEITE-PANISSI, C.R.A.; BRENTGANI, M.R.; OLIVEIRA, L.M. Cholinergic-opioidergic interaction in the central amygdala induces antinociception in the guinea pig. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 37: 1571-1579, 2004.
- LEITE-PANISSI, C.R.A.; COIMBRA, N.C.; OLIVEIRA, L. M. The colinergic stimulation of the central amygdala modifying the tonic immobility response and antinociception in guinea pigs depends on the ventrolateral periaqueductal gray. **Brain Res. Bulletin.**, 60: 167-178, 2003.
- LEWIS, J.W.; CANNON, J.F.; LIEBESKIND, J.C. Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. **Science.**, 208: 623-625, 1980.
- LIANG, D.Y.; CLARK, J.D. Modulation of the NO/CO/cGMP signaling cascade during chronic morphine exposure in mice. **Neurosc. Letter.**, 365:73-77, 2004.
- LICO, M.C.; HOFFMANN, A.; COVIAN, M.R. Influence of some limbic structures upon somatic and autonomic manifestations of pain. **Physiol. Behav.**, 12: 805-811, 1974.
- MAIER, S.F. Stressor controllability and stress-induced analgesia. **Annu. N.Y. Acad. Sci.**, 467: 55-72, 1986.

- MAINES, M.D. Heme oxygenase: Clinical Applications and Functions. Florida, CRC Press, 1992.
- MAINES, M.D. Heme oxygenase: Function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. **FASEB J**, 2: 2557-2568, 1988.
- MAINES, M.D. The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 37: 517-54, 1997.
- MAINES, M.D.; EKE, B.C.; ZHAO, X. Corticosterone promotes increased heme oxygenase-2 protein and transcript expression in the newborn rat. **Brain Res.**, 722: 83-94, 1996.
- MANJARREZ, E.; ROCHA, T.; ROJAS-PILONI, G.; MENDEZ, I.; FLORES, A. Nitric oxide modulates spontaneous cord dorsum potentials in the cat spinal cord. **Neurosci. Lett.**, 309: 5-8, 2001.
- MARKS, G.S. Does carbon monoxide have a physiological function? **Trends Pharmacol. Sci.**, 12: 185-188, 1991.
- MARKS, G.S. Heme oxygenase: the physiological role of one of its metabolites, carbon monoxide and interactions with zinc protoporphyrin, cobalt protoporphyrin and other metalloporphyrins. **Cell. Mol. Biol.**, 40: 863-870, 1994.
- MCCOUBREY, W.; HUANG, T.J.; MAINES, M.D. Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. **J. Biol. Chem.**, 272:12568-12574, 1997a.
- MCCOUBREY, W.; HUANG, T.J.; MAINES, M.D. Isolation and characterization of a cDNA from the cat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **Eur. J. Biochem.**, 247: 725-732, 1997b.
- MCLEAN, M.; BOWMAN, M.; CLIFTON, V.; SMITH, R.; GROSSMAN, A.B. Expression of the heme oxygenase – Carbon monoxide signaling system in human placenta. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.**, 85: 2345-2349, 2000.
- MCMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptores: beyond Sherrington. **Trends Neurosci.**, 13: 199-201, 1990.
- MELLER S.T.; DYKSTRA C.; GEBHART G.F. Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of N-methyl-D-aspartate receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. **Neuroscience**, 71: 327-35, 1996.
- MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, 52: 127-36, 1993.
- MELZACK, R.; WALL, P. The challenge of pain. Londres, Penguin Books. 2ª Ed. 1991.
- MERSKEY, H. Logic, truth and language in concepts of pain. **Qual. Life Res.**, 3: S69-S76, 1994.
- MICZEK, K.A.; THOMPSON, M.L.; SCHUTER, L. Analgesia follow defeat in an aggressive encounter: development of tolerance in opioid receptors. **Annu. NY Acad. Sci.**, 467: 14-29, 1986.
- MILLAN, M.L. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, 66: 355-474, 2002.

- MORGAN, M.M.; BOBECK, E.N.; INGRAM S.L. Glutamate modulation of antinociception, but not tolerance, produced by morphine microinjection into the periaqueductal gray of the rat. **Brain Res.**, *in press*, doi.org/10.1016/j.brainres.2009.07.100, 2009.
- MORITA, T.; PERRELLA, M.A.; LEE, M.E.; KOUREMBANAS, S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 92: 1475-1479, 1995.
- NASCIMENTO, C.G.O.; BRANCO, L.G.S. Role of the peripheral heme oxygenase-carbon monoxide pathway on the nociceptive response of rats to the formalin test: Evidence for a cGMP signaling pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, 556: 55-61, 2007.
- NASCIMENTO, C.G.O.; BRANCO, L.G.S. Antinociception synergy between the peripheral and spinal sites of the heme oxygenase-carbon monoxide pathway. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 42: 141-147, 2009.
- NASCIMENTO, C.G.O.; BRANCO, L.G.S. Role of the spinal cord heme oxygenase-carbon monoxide-cGMP pathway in the nociceptive response of rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 581: 71-76, 2008.
- NATH, K.A.; VERCELLOTTI, G.M.; GRANDE, J.P.; MIYOSHI, H.; PAYA, C.V.; MANIVEL, J.C.; HAGGARD, J.J.; CROATT, A.J.; PAYNE, W.D.; ALAM, J. Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. **Kidney Int.**, 59: 106-117, 2001.
- NENMANI, K.V.; MOGIL, J.S. Serotonin GABA interactions in the modulation of mu and kappa-opioid analgesia. **Neuropharmacol.**, 44: 304-10, 2003.
- OLIVEIRA, M.A.; PRADO, W.A. Role of PAG in the antinociception evoked from the medial or central amygdala in rats. **Brain Res. Bull.**, 54: 55-63, 2001.
- PACAK, K.; PALKOVITS, M.; YADID, G.; KVETNANSKY, R.; KOPIN, I. J.; GOLDSTEIN, D.S. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. **Am. J. Physiol.**, 275: R1247-R1255, 1998.
- PACHECO, D.F.; REIS, G.M.L.; FRANCISCHI, J.N.; CASTRO, M.S.A.; PEREZ, A.C.; DUARTE, I.D.G. δ -opioid receptor agonist SNC80 elicits peripheral antinociception via $\delta 1$ and $\delta 2$ receptors and activation of the arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. **Life Sci.**, 78: 54-60, 2005.
- PARO, F.M.; STEINER, A.A.; PAULA, P.M.; BRANCO, L.G.S. Central heme oxygenase-carbon monoxide pathway in the control of breathing under normoxia and hypoxia. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, 130: 151-160, 2002.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Acad. Press, San Diego, USA, 1998.
- PEHL, U.; SCHMID, H.A. Electrophysiological responses of neurons in the rat spinal cord to nitric oxide. **Neurosci.**, 77: 563-73, 1997.

- PLOTSKY, P.M.; VALE, W. Hemorrhage-induced secretion of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity into the rat hypophysial portal circulation and its inhibition by glucocorticoids. **Endocrinology**, 114: 164-169, 1984.
- POL, O. The involvement of the nitric oxide in the effects and expression of opioid receptors during peripheral inflammation. **Curr. Med. Chem.**, 14: 1945-1955, 2007.
- PRADO, W.A. Involvement of calcium in pain and antinociception. **Braz. J. Med. Res.**, 34: 449-61, 2001.
- PRADO, W.A.; FAGANELLO, F.A. The anterior pretectal nucleus participates as a relay station in the glutamate, but not morphine-induced antinociception from the dorsal raphe nucleus in rats. **Pain**, 88: 169-76, 2000.
- PRYOR S.C.; ZHU W.; CADET P.; BIANCHI E.; GUARNA M.; STEFANO GB. Endogenous morphine: opening new doors for the treatment of pain and addiction. **Expert Opin Biol Ther.**, 5: 893-906, 2005.
- RAFFAINI, M.S.; DIAS, M.B.; BRANCO, L.G.S. Central heme oxygenase-carbon monoxide pathway participates in the lipopolysaccharide-induced tolerance in rats. **Brain Res.**, 1111: 83-89, 2006.
- RAGHAVENDRA, V.; CHOPRA, K.; KULKARNI, S.K. Brain rennin angiotensin system (RAS) in stress-induced analgesia and impaired retention. **Peptides**, 20, 335-342, 1999.
- RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanism of nociception. In: WALL, P.D., MELZACK, R. (Eds.). Textbook of pain, 4. Ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 11-57, 1999.
- RAVANELLI, M.I.B.; ALMEIDA, M.C.; BRANCO, L.G.S. Role of the locus coeruleus carbon monoxide pathway in endotoxin fever in rats. **Eur. J. Physiol.**, 453: 471-6, 2006.
- RIVIER C.; RIVIER J.; VALE W. Inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretion in the rat by immunoneutralization of corticotropin-releasing factor. **Science**, 218: 377-9, 1982.
- RODGERS, P.A.; SEIDMAN, D.S.; WEI, P.L.; DENNERG, P.A.; STEVENSON, D.R. Duration of action and tissue distribution of zinc protoporphyrin in neonatal rats. **Pediatr. Res.**, 39:1041-1049, 1996.
- RODGERS, R.J. Influence of intra-amygdaloid opiate injections on shock thresholds, tail-flick latencies and open field behavior in rats. **Brain Res.**, 153: 211-216, 1978.
- RODGERS, R.J.; RANDALL, J.I. Defensive analgesia in rats and mice. **Psychol. Rec.**, 37: 335-347, 1987.
- RYTER, S.W.; TYRELL, R.M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. **Free Radic. Biol. Med.**, 28: 289-309, 2000.
- SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: Activation of arginine/NO/cGMP protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **PNAS.**, 101: 3680-3685, 2004.

- SANDKÜHLER, J. The organization and function of endogenous antinociceptive systems. **Prog. Neurobiol.**, 50: 49-81, 1996.
- SAVEGNAGO, L.; JESSE, C.R.; SANTOS, A.R.S.; ROCHA, J.B.T.; NOGUERIA, C.W. Mechanisms involved in the antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide in the formalin test. **J. Pharmac. Pharmacol.**, 60: 1679-1686, 2008.
- SAWCHENKO, P.E.; IMAKI, T.; POTTER, E.; KOVACS, K.; IMAKI, J.; VALE, W. The functional neuroanatomy of corticotropin-releasing factor, **Ciba Found. Symp.**, 172: 5-9, 1993.
- SCHACTER, R.B. Heme catabolism by heme oxygenase, physiology, regulation, and mechanism of action. **Semin. Hematol.**, 25: 349-369, 1988.
- SCHMIDT, H.H. NO, CO and OH endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. **FEBS Lett.**, 307(1): 102-107, 1992.
- SCHWEITHER, M.H.; MARSHALL, M.; CARRON, K.; BOHLE, D.S.; BUSSE, S.C.; ARNOLD, E.V.; BARNARD, D.; HORNER, J.R.; STARKEY, J.R. Heme compounds in dinosaur trabecular bone. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 94:6291-6296, 1997.
- SHIH, Y.Y.I.; CHIANG, Y.C.; CHEN, J.C.; HUANG, C.H.; CHEN, Y.Y.; LIU, R.S.; CHANG, C.; JAW, F.S. Brain nociceptive imaging in rats using F-fluorodeoxyglucose small-animal positron emission tomography. **Neurosci.**, 155: 1221-1226, 2008.
- SOUSA, A.M.; PRADO, W.A. The dual effect of a nitric donor in nociception. **Brain Res.**, 897: 9-19, 2001.
- STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.S. Carbon monoxide is the heme oxygenase product with a pyretic action: evidence for a cGMP signaling pathway. **J. Physiol.**, 280: R448-R457, 2001.
- STEINER, A.A.; COLOMBARI, E.; BRANCO, L.G.S. Carbon monoxide as a novel mediator of the febrile response in the central nervous system. **Am. J. Physiol.**, 277: R499-R508, 1999.
- STEINER, A.A.; RESTE, G.; BRANCO, L.G.S. Role of the brain heme oxygenase-carbon monoxide pathway in stress fever in rats. **Neurosci. Lett.**, 341, 193-196, 2003.
- STOCKER, R. Induction of heme oxygenase as a defense against oxidative stress. **Free Radic. Res. Commun.**, 9: 101-112, 1990.
- SUEMATSU, M.; GODA, N.; SANO, T.; KASHIWAGI, S.; EGAWA, T.; SHINODA, Y.; ISHIMURA, Y. Toxic waste or hormone? Carbon monoxide as a regulator of sinusoidal tone. **Hepatology.**, 24: 1319-1321, 1996.
- TANAKA, S.; AKAIKE, T.; FANG, J.; BEPPU, T.; OGAMA, M.; TAMURA, F.; MIYAMOTO, Y.; MAEDA, H. Antiapoptotic effect of heme oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumor. **Br. J. Cancer.**, 88: 902-909, 2003.
- TEGEDER, I.; SCHMIDTKO, A.; NIEDERBERGER, E.; RUTH, P.; GEISLINGER, G. Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats. **Neurosci. Lett.**, 332: 146-50, 2002.

- TERMAN, W.; LEWIS, J.W.; LIEBESKIND, J.C. Two opioid forms of stress analgesia: studies of tolerance a cross-tolerance. **Brain Res.**, 368: 101-106, 1986.
- TERRY, M.J.; LINLEY, P.J.; KOHCHI, T. Making light of it the role of plant heme oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. **Bioch. Soc. Trans.**, 30: 604-609, 2002.
- TRICKLEBANK, H.P.H.; CURZON, G. Analgesia induced by brief or more prolonged differs in its dependency on naloxone, 5-hydroxytryptamine and previous testing of analgesia. **Neuropharmacol.**, 23: 417-421, 1984.
- VALE, W.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; RIVIER, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotrophin and beta-endorphin. **Science**, 213: 1394-1397, 1981.
- WATANABE, M.; PINTO, C.F.; DEZOTI, C.; ANDRADE, S.C.; VATTIMO, M.F.F. Acute renal failure: The heme oxigenase system. **J. Bras. Nefrol.**, 4: 179-183, 2005.
- WATKINS, L.R.; MAYER, D.J. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. **Science**, 216: 1185-1192, 1982.
- WILLIS, D.; MOORE, A.R.; FREDERICK, R.; WILLOUGHBY, D.A. Heme oxygenase: A novel target for the modulation of the inflammatory response. **Natl. Med.**, 2: 87-90, 1996.
- WILLIS, W.D. Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. **Philos. Transc. R. Soc. Lond. B. Sci.**, 308: 253-70, 1985.
- WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Neuroanatomy of the pain system of the pathways that modulate pain. **J. Clin. Neurophysiol.**, 14: 2-31, 1997.
- WYNN, P.C., AQUILERA, G., MORELL, J. CATT, K J. Properties and regulation of high-affinity pituitary receptors for corticotropin-releasing factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 110: 602-608, 1983.
- YU, X.M.; HUA, M.; MENSE, S. The effects of intracerebroventricular injection of naloxone, phentolamine and methysergide on the transmission of nociceptive signals in rat dorsal horn neurons with convergent cutaneous-deep input. **Neurosci.**, 44: 715-23, 1991.

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](#)