

ALESSANDRA BEIRITH

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA NOCICEPÇÃO E EDEMA  
CAUSADOS PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE  
GLUTAMATO EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis – SC

Fevereiro/2003

*... por que hay días repletos de soberba  
días que traen mortales enemigos  
y otros que son los compinches de siempre  
días hermanos que nos marcan la vida.*

(Cotidiana 2, Mario Benedetti, México, 1979)

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Calixto, pelos mesmos motivos que agradei na dissertação de mestrado e que não se alteraram ao longo dos últimos quatro anos: *pela rigidez e incentivo constantes e pelo exemplo de determinação, perseverança, e principalmente, de consistência e consciência de pesquisa básica.*

A todos os alunos do grupo do professor Calixto (Daniela, Juliano, Fernanda, Willian, Cândida, Giselle, Michel, Eunice, Valfredo, Nara, Marina, Rubens, Fernando, Rafael, Karen, Mariem, Salésio, Joice, Rodrigo, Betinha e Martha), que compartilharam muitos momentos de alegria e mau humor no laboratório da Rosana.

Ao Adair, pela parceria e estímulo.

À Patrícia, pelo amparo, amizade e principalmente pela paciência. Não é por acaso que ela vai direto ao paraíso.

Aos amigos, que foram presença constante e participam de todas as conquistas e desapontamentos de alguns dos melhores anos da minha vida.

À Ângela Beirith, também pelos mesmos motivos que agradei na dissertação de mestrado, que não se alteraram ao longo desses quatro anos e certamente jamais mudarão: *pela grande amigona que é e pelo auxílio técnico na realização deste trabalho.*

À Andréia Janine de Oliveira Lima, patologista, pelos cortes histológicos.

A todos os professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia, pelo aprendizado (meu) e paciência (deles), especialmente ao professor Jamil, pelos esclarecimentos, conselhos e empréstimo de material.

Aos rapazes do biotério, Pedro e Paulo, por estarem sempre ajudando a manter a estrutura para a realização dos experimentos e ao “seu” Zeri, cujo “bom dia” tornou muitos dias mais agradáveis.

Ao Cassiano, *puente indestructible* ...

Aos meus pais, Maria e Alexandre, pelo apoio e compreensão constantes.

À CAPES pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

RESUMO	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Animais	27
3.2 Nocicepção e edema induzidos pela injeção intraplantar de glutamato	28
3.3 Influência de diversos sistemas sobre a nocicepção e edema de pata induzidos por glutamato	30
Participação dos receptores glutamatérgicos	30
Participação da via L-arginina / óxido nítrico	31
Participação de cininas, taquicininas e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)	32
3.4 Participação de fibras sensíveis a capsaicina	33
3.5 Participação da migração celular	34
3.6 Ativação do fator nuclear <b>κB</b>	35
3.7 Modificações histológicas	37
3.8 Medida do desempenho motor	38
3.9 Análise estatística	38
3.10 Drogas	39
4. RESULTADOS	40
4.1 Nocicepção e edema induzidos pela injeção intraplantar de glutamato	40
4.2 Influência de diversos sistemas sobre a nocicepção e edema de pata induzidos por glutamato	45
Participação dos receptores glutamatérgicos	45
Participação da via L-arginina / óxido nítrico	49
Participação de cininas, taquicininas e do CGRP	53
4.3 Participação de fibras C sensíveis a capsaicina	58
4.4 Participação da migração celular	59
4.5 Ativação do fator nuclear <b>κB</b>	60
4.6 Modificações histológicas	61
4.7 Medida do desempenho motor	63
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES GERAIS	86
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	89

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sumário esquemático mostrando alguns neurotransmissores e seus receptores presentes em terminais periféricos de fibras nervosas nociceptivas aferentes	6
Figura 2 – Diagrama esquemático mostrando a localização das lâminas do corno dorsal da medula espinhal que recebem as informações sensoriais oriundas dos terminais periféricos de fibras nervosas nociceptivas aferentes	8
Figura 3 – Curva da resposta relacionada à dose de glutamato aplicada e ao tempo. Nocicepção relacionada à dose isoladamente, causada pela injeção de glutamato ou veículo, no tempo de 15 min, representada pelo comportamento de lambar a pata	41
Figura 4 – Nocicepção induzida por glutamato, veículo ou solução ácida, representada pelo comportamento de lambar a pata	42
Figura 5 – Edema de pata de camundongo causado pela injeção i.pl. de glutamato ou veículo após 15 min	42
Figura 6 – Extravasamento plasmático avaliado pela medida da concentração do azul de Evans nos tecidos após a injeção i.pl. de glutamato ou veículo, avaliado após 15 min	43
Figura 7 - Efeito do pré-tratamento dos animais com Chicago sky blue 6B sobre a nocicepção e ao edema induzidos pela injeção i.pl. de glutamato em camundongos	44
Figura 8 – Efeito do MK 801, administrado através da via i.pl., sobre a nocicepção e ao edema induzidos por glutamato em camundongos	46
Figura 9 - Efeito do NBQX ou SYM 2206, administrados através da via i.pl., sobre a nocicepção e ao edema induzidos por glutamato em camundongos	47
Figura 10 – Efeito do E4CPG, administrado através da via i.pl., sobre a nocicepção e ao edema induzidos por glutamato em camundongos	48
Figura 11 - Efeito do felbamato, administrado através da via i.pl., sobre a nocicepção e ao edema induzidos por glutamato em camundongos	48
Figura 12 – Efeito da L-NOARG, administrado através da via i.pl., sobre a nocicepção e ao edema induzidos por glutamato em camundongos	50
Figura 13 – Efeito da L-NOARG, administrado através da via i.p., sobre a nocicepção e ao edema induzidos por glutamato em camundongos	50

Figura 14 – Efeito do pré-tratamento dos animais com L- ou D-arginina antes da injeção de L-NOARG sobre a nocicepção e ao edema de pata induzidos pela injeção i.pl. de glutamato em camundongos	51
Figura 15 - Efeito do SNAP, co-injetado intraplantarmente com uma dose sublimiar de glutamato, sobre a nocicepção e o edema de pata induzidos pela injeção i.pl. de glutamato em camundongos	52
Figura 16 – A presença de NO <sub>x</sub> (NO <sub>2</sub> ) no exsudato das patas dos animais tratados intraplantarmente com veículo ou doses crescentes de glutamato.	53
Figura 17 - Efeito do FK 888 ou SR 48968 administrados através da via i.pl. em relação à nocicepção e ao edema induzidos por glutamato em camundongos	55
Figura 18 – Efeito do SR 142801 ou CGRP <sub>8-37</sub> administrados através da via i.pl. em relação à nocicepção e ao edema induzidos por glutamato em camundongos	56
Figura 19 - Efeito da des-Arg <sup>9</sup> -[Leu <sup>8</sup> ]-BK ou HOE 140 administrados através da via i.pl. em relação à nocicepção e ao edema induzidos por glutamato em camundongos	57
Figura 20 - Efeito do tratamento neonatal com capsaicina ou veículo sobre a nocicepção e o edema de pata induzidos pela injeção i.pl. de glutamato ou capsaicina	58
Figura 21 - Efeito do tratamento com fucoidina sobre a nocicepção e o edema de pata induzidos pela injeção i.pl. de glutamato	59
Figura 22 - Atividade da enzima mieloperoxidase, avaliada nos tempos de 15 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h e 24 h após a injeção i.pl. de glutamato	60
Figura 23 - Efeito do tratamento com glutamato ou veículo i.pl. sobre a indução do NF-κB na pata de camundongos	61
Figura 24 – Modificações histológicas induzidas pela injeção i.pl. de glutamato ou veículo após 15 min na pata de camundongos	62
Figura 25 - Possíveis mecanismos envolvidos na nocicepção induzida pela injeção i.pl. glutamato	88

## RESUMO

A injeção intraplantar (i.pl.) de glutamato produz uma resposta nociceptiva de início rápido, proporcional à dose aplicada, que aparentemente não sofre influência do pH e está associada a formação de edema, causado pelo aumento do extravasamento plasmático. O pré-tratamento dos animais com Chicago sky blue 6B (inibidor da captação de glutamato) aumentou significativamente a potência do glutamato para induzir a resposta nociceptiva, sem alterar o edema de pata. O tratamento dos animais com antagonistas seletivos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA (MK 801), cainato (NBQX), AMPA (SYM 2206), metabotrópicos (E4CPG) ou ainda, do sítio de ligação da glicina associado ao receptor NMDA (felbamato), através da via i.pl., inibiu significativamente a nocicepção induzida pelo glutamato. No entanto, somente o antagonista de receptores cainato, NBQX, foi capaz de inibir o edema causado pelo glutamato. O inibidor da óxido nítrico sintase, L-N<sup>ω</sup>-nitro-arginina (L-NOARG), administrado através da via intraperitoneal (i.p.) ou i.pl., preveniu a nocicepção causada pela injeção de glutamato, mas o edema de pata foi diminuído apenas quando o inibidor foi administrado através da via i.p. Essa inibição foi revertida pelo pré-tratamento dos animais com L-arginina, mas não com D-arginina. O S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP), doador de óxido nítrico, administrado i.pl., potencializou a nocicepção e o edema induzidos pela injeção de glutamato. Além disso, a administração i.pl. de doses crescentes de glutamato causou aumento proporcional da quantidade de nitrito no exsudato das patas. A co-injeção i.pl. do antagonista seletivo de receptores de neurocininas (NK) NK2 (SR 48968) e, em menor escala, do receptor NK1 (FK 888) inibiu significativamente a nocicepção induzida pelo glutamato. Ao contrário, o antagonista seletivo de receptores NK3 (SR 142801) ou do receptor para o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP, o CGRP<sub>8-37</sub>) não foi capaz de inibir a nocicepção causada por glutamato. Além disso, o SR 48968, ao contrário do FK 888, SR 142801 ou CGRP<sub>8-37</sub>, inibiu significativamente o edema induzido por glutamato. A co-administração i.pl. do antagonista seletivo de receptores B<sub>1</sub> para cininas, des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK, mas não de receptores B<sub>2</sub>, HOE 140, com glutamato, também inibiu a nocicepção, sem alterar o edema induzido por glutamato. O tratamento neonatal com capsaicina foi

capaz de inibir a nocicepção e, em uma menor proporção, o edema induzidos por glutamato em animais adultos. A nocicepção ou o edema causados pela injeção i.pl. de glutamato não foram alterados pelo tratamento dos animais com fucoidina, um inibidor de selectinas. Após 15 min da injeção i.pl. de glutamato não houve aumento significativo da atividade de mieloperoxidase nem indução do fator nuclear  $\kappa$ B. A análise histológica das patas tratadas com glutamato i.pl. mostra que ocorreu pouca migração celular, edema moderado e congestão vascular nesse tecido.

Conclui-se, portanto, que a nocicepção causada pela injeção i.pl. de glutamato em camundongos envolve a ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos, através de mecanismo que depende da ativação da via L-arginina/óxido nítrico. Além disso, a nocicepção causada pelo glutamato parece ser mediada por fibras sensoriais sensíveis à capsaicina e pela liberação de neurocininas, atuando principalmente em receptores NK<sub>2</sub> e em menor extensão em NK<sub>1</sub>. As cininas atuando em receptores B<sub>1</sub>, mas não B<sub>2</sub>, também participam da resposta nociceptiva induzida pela injeção i.pl. de glutamato em camundongos. Por outro lado, o edema de pata associado com a resposta nociceptiva após injeção i.pl. de glutamato parece ser mediado pela ativação de receptores cainato, com envolvimento das neurocininas atuando em receptores NK<sub>2</sub>, e estimulação de fibras sensoriais sensíveis a capsaicina. Finalmente, o óxido nítrico também participa das ações edematogênicas do glutamato.

**A maioria destes resultados está publicada em:**

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219-228, 2002.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Research**, v. 969, p. 110-116, 2003.

Além destes trabalhos, outros estudos que foram desenvolvidos durante o curso de Doutorado estão em preparação ou publicados:

SEIFRIZ, I.; KONZEN, M.; PAULA, M.M.; GONCALVES, N.S.; SPOGANICKZ, B.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BONETTI, V.R.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J.B.; FRANCO, C.V. Synthesis, characterization, potentiometric titration, and electrochemical investigation of new nitric oxide scavenger *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(dinic)<sub>4</sub>] (dinic = 3,5-pyridinecarboxylic acid). **Journal of Inorganic Biochemistry**, vol. 76, p. 153 - 163, 1999.

CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, vol. 14, p. 401-18, 2000.

CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BONETTI, V.R.; BEIRITH, A.; CKLESS, K.; KONZEN, M.; SEIFRIZ, I.; PAULA, M.S.; FRANCO, C.V.; WILHELM FILHO, D.; CALIXTO, J.B. Complexes *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(nic)<sub>4</sub>] and *trans*-[RuCl<sub>2</sub>(i-nic)<sub>4</sub>] as free radical scavengers. **Journal of Inorganic Biochemistry**, vol. 86, p. 587-594, 2001.

KHUNEN, F.Q.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J.B.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Dipyrone inhibition of nitrogen monoxide production by mouse macrophages. Em preparação.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive action of sericic acid, isolated from *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) in formalin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. Em preparação.

SIEBEL, J.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive effect of dipyrone in glutamate receptor agonists-induced nociception in mice. Em preparação.

## 1. INTRODUÇÃO

“Maíra olhou para sua perna ausente e disse para a mãe: dói ali. Prontamente, dona Regilda pôs-se a massagear os dedos invisíveis da filha, que estavam indo para fora da cama. A perna esquerda de Maíra era assim. Uns dias ela estava curta, com seu pé ocupando o lugar da coxa. Em outros ela se encompridava, toda elástica, e ia para fora da cama. O que não mudava era a dor. Aguda, constante, implacável. Que nem a morfina dera conta. Era a Dor Fantasma. Ela aprendera esse nome com os médicos. E o achou inexato. A perna, amputada, podia ser fantasma. Mas a dor não era não.”<sup>1</sup> (Macca, 2001).

Dentre os diversos sistemas de “vigilância” da homeostase do organismo, a dor tem papel de destaque por despertar nossa atenção imediatamente. Além de despertar, retém nossa atenção até que o ponto sensível tenha sido identificado e o evento que está desencadeando a lesão, ou represente risco, tenha sido afastado (Wall, 1999). À medida que crescemos e nos tornamos mais experientes, as reações clássicas de 1) remover o estímulo lesivo, 2) adotar uma postura que limite novas lesões e otimize a recuperação e 3) buscar segurança, alívio e cura em resposta à dor, tornam-se mais sutis, elaboradas e sofisticadas. Desse modo, a função básica e fundamental da dor é “avisar” que algo está ameaçando nossa sobrevivência e/ou bem estar e, clinicamente, é um sintoma importante para permitir a avaliação do surgimento ou evolução de diversas doenças. Apesar de seu caráter “benéfico”, em alguns casos a dor pode causar mais desconforto que a própria desordem sinalizada por ela. Quando a dor realmente se instala, nossa atenção é completamente monopolizada e nada mais parece existir além dela.

---

<sup>1</sup> Maíra Mortorelli de Mattos teve a perna e metade da bacia amputados em virtude de um sarcoma ósseo, em 2001.

O conceito clássico, definido pelo Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor, é que a dor seria *uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual atual ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão*. O mesmo Comitê considera, atualmente, que a dor é sempre subjetiva. Cada indivíduo aprende a aplicação da palavra através de experiências relacionadas a lesões sofridas durante o crescimento (Merskey, 1991). Do mesmo modo que o descrito para as outras sensações primárias como tato, paladar, visão e audição, a dor não precisa ser aprendida para que possa ocorrer. Entretanto, sua percepção envolve fatores ambientais, culturais, espirituais, psicológicos, sociais, e, principalmente, sua interpretação e significação como sofrimento total serão desenvolvidas por associações positivas, negativas e contextuais de cada experiência individual (Anand e Craig, 1996). Quanto à duração, existem três tipos principais de dor. A “dor transitória”, provocada pela ativação de nociceptores<sup>2</sup> na pele ou outro tecido, mas não acompanhada de lesão, cuja função básica é proteger o homem de lesões físicas que possam ser provocadas por agentes do ambiente ou simplesmente informar sobre deformações de tecidos corporais que poderiam originar uma lesão. Outro tipo é a “dor aguda”, provocada pela estimulação dos nociceptores em resposta à lesão de algum tecido corporal. Se esta persistir durante a recuperação da lesão, o que pode demorar alguns dias ou semanas, já não é mais classificada como aguda, é considerada então “dor crônica”, o terceiro tipo de dor. Do mesmo modo que a aguda, a dor crônica também se origina de lesões ou doenças, e pode permanecer mesmo depois da recuperação do paciente. A lesão também pode

---

<sup>2</sup> Nociceptor: neurônio sensorial primário ativado por um estímulo capaz de causar lesão tecidual (Julius e Basbaum, 2001).

exceder a capacidade de recuperação do corpo, como pela perda de um membro, caso descrito no primeiro parágrafo da introdução, quando há reparo da lesão primária, mas a dor permanece (Loeser e Melzack, 1999).

O tecido que recebe a maior parte dos estímulos nociceptivos é a pele; é ela que fornece a maioria das informações nociceptivas (dolorosas, que são resultantes de lesões ou que poderiam causar lesões) periféricas ao sistema nervoso central. Em 1920, Head publicou o primeiro artigo científico que descrevia dois sistemas de fibras aferentes: um implicado na sensibilidade tátil e na identificação dos estímulos térmicos, e outro envolvido com as sensações resultantes de estimulação nociceptiva (Besson e Chaouch, 1987). De fato, na camada epidermal da pele existem fibras aferentes de pequeno diâmetro responsáveis por conduzir as sensações de pressão intensa, calor nociceptivo ou irritantes químicos ao sistema nervoso central e também outras fibras, de diâmetro maior, responsáveis por conduzir sensações inócuas como toque ou leves variações da temperatura. Seus axônios podem ser mielinizados ou não e são envoltos por células de Schwann, que correspondem periféricamente aos oligodendrócitos e servem para proteção, suporte, fonte de nutrientes, auxílio no reparo, regulação do pH e do balanço iônico nas proximidades dos neurônios sensoriais (Raine, 1994; Miller et al., 2002). As células de Schwann também possuem atividade secretória, podendo liberar citocinas, aminoácidos excitatórios e ATP, que modulam a transmissão de estímulos sensoriais (Jeftinija e Jeftinija, 1998; Irnich et al., 2001). As fibras aferentes primárias cutâneas podem ser classificadas, de acordo com seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução, essencialmente em três tipos: 1) C, finas (0,4 a 1,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro), não mielinizadas e de condução lenta (0,5 a 2,0 m/s); 2) A $\delta$ , médias (2 a 6  $\mu\text{m}$  de

diâmetro), mielinizadas e de condução intermediária (12 a 30 m/s) e 3) A $\beta$ , espessas (mais de 10  $\mu$ m de diâmetro), mielinizadas e de condução rápida (30 a 100 m/s) (Millan, 1999). Na pele, a proporção entre esses três tipos de fibras é de 70, 10 e 20% respectivamente, mas esses valores podem variar de acordo com a espécie e região do corpo analisada. As fibras descritas acima respondem de maneira diferente aos estímulos inócuos e agressivos. Todas têm a capacidade de transmitir informações não relacionadas com dor, ou seja, não nociceptivas, mas somente as fibras C e A $\delta$  transmitem informações exclusivamente nociceptivas em condições normais (na ausência de lesões teciduais ou nervosas). Nas mesmas condições, as fibras A $\beta$  respondem somente ao toque, vibração, pressão e outros tipos de estimulação sensorial que não sejam nociceptivos, como estímulos mecânicos de baixa intensidade (Millan, 1999).

Existem duas classes principais de nociceptores do tipo A $\delta$ , sendo que ambas respondem à estimulação mecânica de alta intensidade e podem ser diferenciadas por sua responsividade ao calor ou pelos efeitos que uma lesão pode causar sobre elas. O tipo I é ativado por estímulos mecânicos de alta intensidade. Dentro da escala nociceptiva, tem condutância rápida e responde fracamente a estímulos térmicos de baixa ou alta intensidade e a estímulos químicos. Entretanto, quando ocorre a sensibilização<sup>3</sup> devido à estimulação térmica repetitiva ou lesão tecidual, esses mecanocceptores começam a responder a estímulos térmicos de alta intensidade, com respostas sustentadas, de longa duração e latência demorada, ao contrário do que ocorre com as fibras do tipo C, que, nesses casos, apresentam uma diminuição da responsividade na pele glabra

---

<sup>3</sup> A sensibilização é caracterizada por uma diminuição no limiar, resposta aumentada a estímulos supralimiais e atividade espontânea contínua (Raja et al., 1999).

(desprovida de pêlos). O tipo II, menos comum e de condutância mais lenta, observado principalmente na pele com pêlos de primatas, tem um limiar menor para estímulos térmicos do que as fibras A $\delta$  do tipo I, além de responder mais rapidamente aos estímulos (Millan, 1999). A maioria dos nociceptores do tipo C é polimodal, isto é, responde tanto a estímulos térmicos quanto a estímulos mecânicos, além de responder a estímulos químicos irritantes, como ácidos ou capsaicina, a substância responsável pela pungência da pimenta. Algumas fibras do tipo C são insensíveis a estímulos mecânicos, mas respondem a estímulos térmicos de alta ou baixa intensidade (Julius e Basbaum, 2001).

Estímulos nociceptivos resultam na liberação local de diversos mediadores químicos, que medeiam, facilitam ou ainda atenuam a transmissão da informação ao sistema nervoso central. Após a lesão tecidual, esses mediadores podem ser liberados pelos neurônios sensoriais e simpáticos e por células não neuronais como plaquetas, células sanguíneas, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células de Schwann, sem considerar um quadro crônico, quando também participam da transmissão nociceptiva mediadores liberados a partir de células inflamatórias (Besson, 1997). Neurotransmissores e neuromoduladores como a substância P (SP), trifosfato de adenosina (ATP), óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs), neuropeptídeo Y, colecistocinina, neurotrofinas (fatores de crescimento neural), bombesina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), opióides, adenosina, somatostatina, acetilcolina, prótons, adenosina, bradicinina, histamina, serotonina, glutamato e outros aminoácidos excitatórios (AAEs) podem ser liberados de diversas fontes após um estímulo capaz de gerar lesão tecidual (figura 1) (Guirimand e Le Bars, 1996; Besson, 1997; Coggeshall e Carlton, 1997; Besson, 1999; Millan, 1999; Raja et al., 1999).

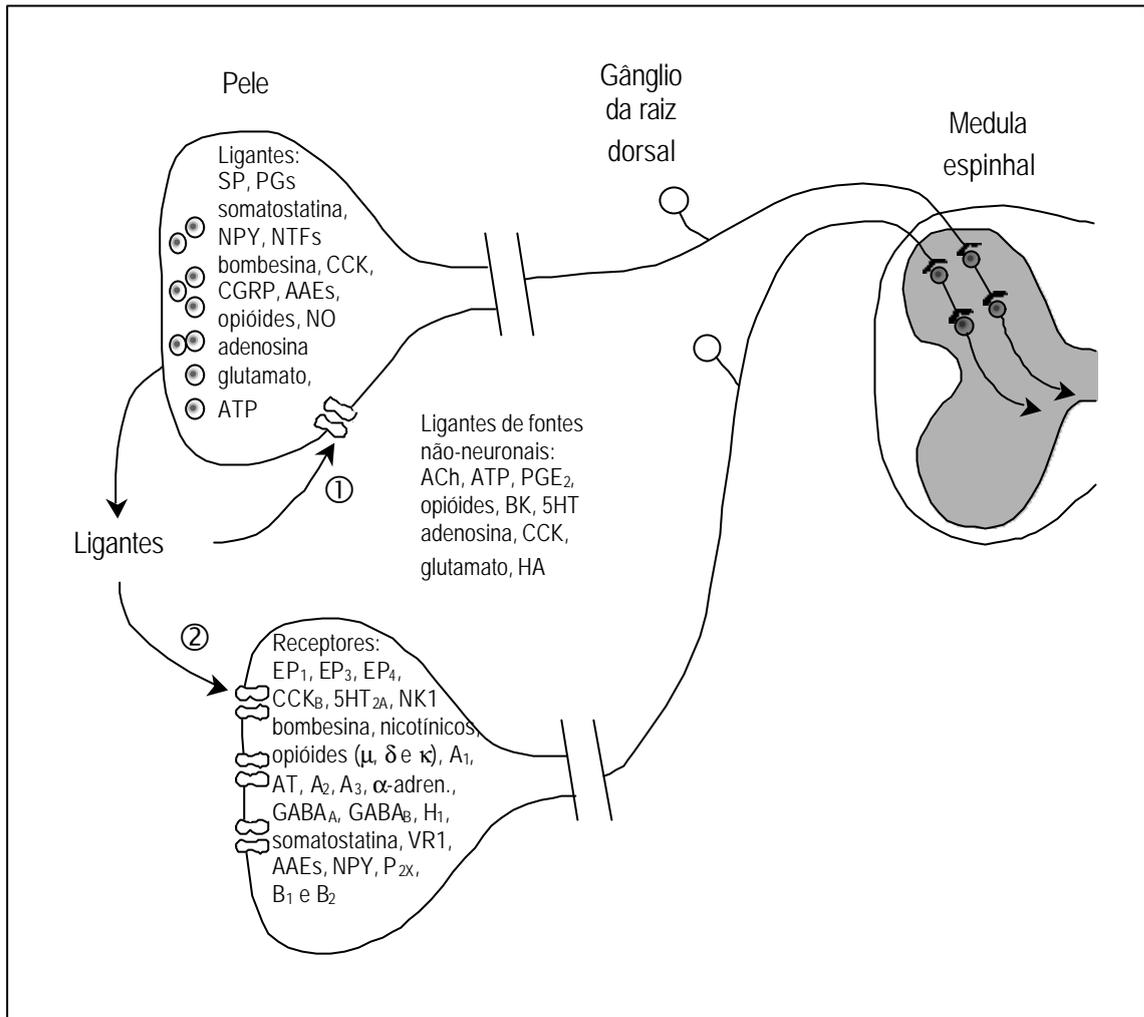


Figura 1 – Sumário esquemático mostrando alguns neurotransmissores e seus receptores presentes em terminais periféricos de fibras nervosas nociceptivas aferentes. Os terminais periféricos cutâneos foram aumentados desproporcionalmente. Evidências da presença de ligantes/receptores nos terminais periféricos foram obtidas a partir de estudos anatômicos, eletrofisiológicos e farmacológicos. Os ligantes podem ser classificados de acordo com a sua origem em a) de fontes não neuronais (exemplos: células da pele, vasos ou inflamatórias) e b) de terminais nervosos. Os receptores nos terminais nervosos periféricos podem ser ativados por ligantes de fontes não neuronais ou por fibras vizinhas, de maneira autócrina (1) ou parácrina (2). SP = substância P; PGs = prostaglandinas; NPY = neuropeptídeo Y; NTFs = neurotrofinas; CCK = colecistocinina; CGRP = peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; AAEs = aminoácidos excitatórios; ATP = trifosfato de adenosina; NO = óxido nítrico; GABA = ácido  $\gamma$ -aminobutírico; ACh = acetilcolina; PGE<sub>2</sub> = prostaglandina E<sub>2</sub>; BK = bradicinina; 5HT = serotonina; H = histamina. Adaptado a partir de Raja, et al., 1999.

Os mediadores químicos liberados após diversos tipos de estímulos nociceptivos fazem com que a informação sensorial seja levada, através das fibras aferentes, ao sistema nervoso central para que este a processe e responda adequadamente em cada situação. Inicialmente, os impulsos nociceptivos são recebidos pela medula espinhal, mais precisamente pelo seu corno dorsal, que é a área primária de recebimento da maioria das informações somatosensoriais (Coggeshall e Carlton, 1997). O corno dorsal da medula espinhal é uma estrutura dividida em lâminas, com base na sua citoarquitetura, sendo que cada lâmina se caracteriza por receber tipos diferentes de informações (figura 2). Nociceptores aferentes primários C e A $\delta$  têm suas terminações principalmente nas lâminas superficiais, mas também em lâminas mais profundas do corno dorsal da medula espinhal, onde liberam diversos neurotransmissores. Vários estudos mostram que a maioria das fibras associadas com a transmissão nociceptiva terminam na lâmina I (zona marginal) e II (substância gelatinosa). Alguns estímulos somatosensoriais provenientes da pele, músculos ou vísceras também são capazes de chegar à medula espinhal através do corno ventral (Besson e Chaouch, 1987). Muitos neurônios do corno dorsal se projetam para o tálamo através de distintas vias como as clássicas - trato espinotalâmico, os diferentes componentes do trato espinoreticular-, o trato espinocervicotalâmico, as fibras pós-sinápticas da coluna dorsal e o trato nociceptivo visceral que se dirige à coluna posterior (Besson, 1999). A partir de diferentes núcleos do tálamo, os sinais são transmitidos para diversas áreas do córtex sensorial somático, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, amígdala e cerebelo, onde a informação do presente contexto é integrada com experiências do passado e

processada para produzir a percepção da dor e/ou provocar a resposta que é enviada à medula espinhal (Guyton, 1992; Craig e Dostrovsky, 1999).

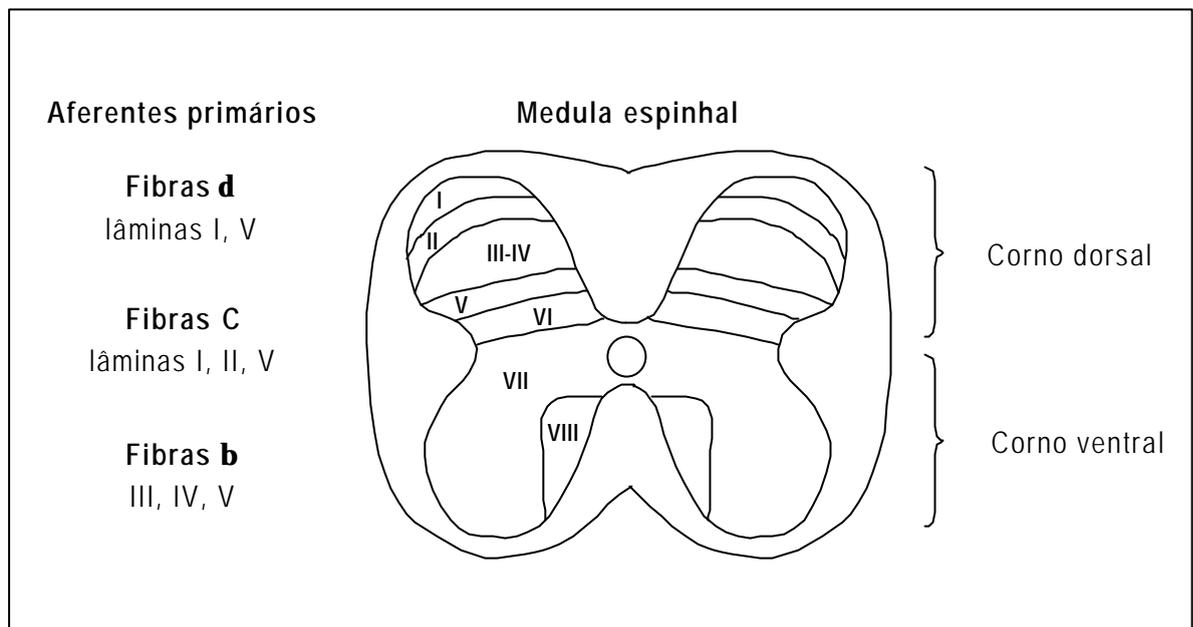


Figura 2 – Diagrama esquemático mostrando a localização das lâminas do corno dorsal da medula espinhal que recebem as informações sensoriais oriundas dos terminais periféricos de fibras nervosas nociceptivas aferentes. Adaptado a partir de Craig e Dostrovsky et al. 1999 e Doubel et al. 1999.

As cininas, bradicinina (BK) e calidina (CAL), são peptídeos formados no plasma e nos tecidos a partir da clivagem proteolítica dos cininogênios de alto e baixo peso molecular, através da ação de serina proteases chamadas calicreínas. Os metabólitos ativos das cininas, des-Arg<sup>9</sup>-BK e des-Arg<sup>10</sup>-CAL, são produto da ação da cininase 1 (carboxipeptidase) sobre a BK e CAL, respectivamente. Atuando nos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, acoplados à proteína G, as cininas estão implicadas em condições fisiopatológicas, especialmente nos processos inflamatórios e na indução da nocicepção (Calixto et al., 2000). Com exceções entre tecidos e espécies, os receptores B<sub>1</sub> não são expressos em condições

normais, enquanto que os receptores B<sub>2</sub> são constitutivos e amplamente presentes em tecidos centrais e periféricos e parecem estar implicados na maioria das ações fisiológicas das cininas. Enquanto a BK e a CAL são os agonistas preferenciais dos receptores B<sub>2</sub>, os metabólitos ativos, des-Arg<sup>9</sup>-BK e des-Arg<sup>10</sup>-CAL, têm maior afinidade pelo receptor B<sub>1</sub> (Couture e Lindsey, 2000). Os receptores B<sub>1</sub> são considerados relevantes no estágio crônico da inflamação e na hiperalgesia<sup>4</sup> (Campos et al., 1998; Calixto et al., 2000) e estão envolvidos nas respostas nociceptivas de origem inflamatória e neurogênica (Corrêa e Calixto, 1993; Pesquero et al., 2000; Ferreira et al., 2001). Os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> foram identificados em terminações periféricas, na medula espinhal e nos gânglios da raiz dorsal de roedores (Steranka et al., 1988; Couture e Lindsey, 2000; Levy e Zochodne, 2000; Ma et al., 2000; Wotherspoon e Winter, 2000). Os receptores cininérgicos, assim como diversos outros encontrados em terminações periféricas tais como NK1 e glutamatérgicos metabotrópicos, são acoplados à proteína G. A ativação da proteína G<sub>s</sub> promove aumento do nível intracelular de AMPc, um importante regulador dos nociceptores. A ativação da proteína G<sub>q</sub> ativa a enzima fosfolipase C (PLC), que gera inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> induz um aumento da concentração de cálcio intracelular e o DAG ativa a proteína quinase C (PKC). A PKC, por sua vez, também promove o aumento da concentração de cálcio intracelular e ativa a fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) citosólica, enzima fundamental para a produção de derivados do ácido araquidônico.

---

<sup>4</sup> A hiperalgesia é definida como um desvio para a esquerda da função estímulo-resposta que relaciona a magnitude da dor à intensidade do estímulo, ou seja, há uma diminuição do limiar para provocar respostas indicativas de nocicepção em animais (Levine et al., 1993; Raja et al., 1999).

As prostaglandinas, produzidas tanto por células não neuronais quanto por neurônios aferentes primários, são substâncias geradas a partir do ácido araquidônico liberado dos fosfolídeos de membrana pela ação da enzima PLA<sub>2</sub>. Uma vez formado, o ácido araquidônico é convertido nos prostanóides: prostaglandinas e tromboxanos pela via da ciclooxigenase, leucotrienos e ácidos hidroieicosatetraenóicos pela via da lipoxigenase ou epóxidos lipídicos e dióis através da via da epoxigenase (Cashman, 1996; Appleton, 1997). Existem, atualmente, três tipos de ciclooxigenases (COX) clonadas e caracterizadas: os tipos 1 e 3, que são expressas constitutivamente, e a do tipo 2, que é expressa constitutivamente apenas em alguns tecidos e pode ter sua expressão aumentada em algumas condições. A COX-1 era considerada, até o último ano, a única isoforma constitutiva da enzima e está presente em praticamente todos os tipos de células, originando prostaglandinas que exercem seus efeitos principalmente em condições fisiológicas. Dentre os processos fisiológicos mais importantes controlados pelos produtos da ciclooxigenase-1 estão: citoproteção gastrointestinal, homeostase vascular e função renal (Needlemann e Isakson, 1997). A COX-2 é a isoforma induzida da enzima, ou seja, somente está presente em condições normais em alguns tecidos como testículos, cérebro e pulmões (Simmons et al., 1991). Contudo, sua expressão pode ser drasticamente aumentada após a exposição de células como fibroblastos, células de músculo liso ou endotélio a fatores de crescimento, ésteres de forbol, citocinas e endotoxinas bacterianas. Recentemente, Chandrasekharan e colaboradores (2002) descreveram a ciclooxigenase do tipo 3 (COX-3), uma enzima derivada da COX-1, que compartilha diversas características estruturais e todas as características catalíticas com as COX do tipo 1 e 2. Assim como as outras duas,

a terceira isoforma descoberta da enzima sintetiza prostaglandinas e desempenha um papel importante na dor e febre, mas parece não ter participação na gênese da dor inflamatória. A COX-3 é sensível a drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINES) que têm pouca ou nenhuma atividade sobre as COX do tipo 1 e 2, como por exemplo o acetaminofen (paracetamol), dipirona, diclofenaco, aspirina e ibuprofen (Chandrasekharan et al., 2002). Subcelularmente, a enzima induzida (COX-2) é encontrada principalmente no núcleo, havendo somente uma pequena quantidade presente no citoplasma; as enzimas constitutivas são encontradas principalmente associadas ao retículo endoplasmático (COX-1) e ligadas à membrana plasmática (COX-3) (Miyamoto et al., 1976; Smith et al., 1994; Chandrasekharan et al., 2002).

Os produtos das ciclooxigenases, principalmente as prostaglandinas ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), provocam comportamento nocifensivo<sup>5</sup> e alodinia<sup>6</sup> quando administradas espinalmente, e quando geradas após o estímulo nociceptivo têm a propriedade de aumentar a sensibilidade dos nociceptores<sup>7</sup> à dor causada por substâncias como histamina ou bradicinina (Minami et al., 1994; Ferreira, 1972). Sua produção aumenta principalmente em estados inflamatórios, quando há aumento da expressão de COX-2. As prostaglandinas causam dilatação do músculo liso vascular, colaborando, dessa forma, para a vasodilatação e a formação do eritema (rubor) característicos destes estados patológicos. A vasodilatação aumenta o fluxo sanguíneo através dos tecidos inflamados e conseqüentemente o extravasamento de fluidos (edema) provocado por outros agentes que aumentam a permeabilidade vascular, como a bradicinina

---

<sup>5</sup> Resposta motora a estimulação nociceptiva.

<sup>6</sup> Dor em resposta a um estímulo não nociceptivo.

e a histamina (Solomon et al., 1968; Williams e Peck, 1977; Vane e Botting, 1995). Dentre as prostaglandinas, a PGE<sub>2</sub> se destaca por ser uma das principais prostaglandinas pró-nociceptivas liberadas periféricamente (Vanegas e Schaible, 2001). Os receptores para PGE<sub>2</sub> são acoplados à proteína G, sendo que os EP<sub>1</sub> estão associados ao aumento da concentração de cálcio, enquanto os subtipos EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub> à ativação da adenilato ciclase e os EP<sub>3</sub> à inibição ou ativação da adenilato ciclase, geração de fosfoinositóis e aumento da concentração intracelular de cálcio, dependendo do tecido onde estão expressos e da quantidade de agonista disponível (Vanegas e Schaible, 2001). Receptores do tipo EP<sub>1</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> já foram caracterizados em neurônios sensoriais aferentes (Millan, 1999), enquanto que os receptores EP<sub>2</sub> estão presentes em neurônios pós-sinápticos do corno dorsal e ventral da medula espinhal (Vanegas e Schaible, 2001). Já foi demonstrado que a PGE<sub>2</sub> é liberada espinhalmente nos primeiros minutos após a injeção intraplantar de formalina em ratos, o que mostra que, além de sensibilizar neurônios, este prostanóide também pode participar do estabelecimento da dor aguda (Malmberg e Yaksh, 1995b). Nesse mesmo estudo, foi ainda demonstrado que, ao mesmo tempo em que a PGE<sub>2</sub> é liberada (0-10 min após a injeção de formalina), ocorre a liberação de diversos aminoácidos excitatórios como glutamato, aspartato, taurina e glicina e um indicador da produção de NO (citrulina) que sabidamente estão envolvidos com a transmissão da nocicepção periférica.

Outro mediador liberado das fibras aferentes primárias e também capaz de modular a nocicepção é o CGRP, um peptídeo constituído de 37 aminoácidos que existe em duas formas, o CGRP- $\alpha$  e o CGRP- $\beta$  (Holzer, 1998; Millan, 1999). O

---

<sup>7</sup> Facilitar a transmissão de informações dolorosas.

CGRP exerce sua ação pró-nociceptiva atuando em dois tipos de receptores, CGRP<sub>1</sub> e CGRP<sub>2</sub>, ambos acoplados positivamente à adenilato ciclase. O CGRP está entre os principais mediadores da inflamação neurogênica, é responsável pela vasodilatação observada após estimulação sensorial e também é considerado um neuropeptídeo importante na formação de edema (Bileviciute et al., 1998). Após a estimulação de fibras nociceptivas aferentes primárias, ocorre a liberação de CGRP, além de taquicininas, que colaboram para a resposta nociceptiva e formação de edema (Maggi, 1995).

Dois genes distintos de preprotaquicininas (PPT) controlam a síntese das taquicininas: o gene PPT-A dá origem à neurocinina A (NKA) e à SP, ao passo que o gene PPT-B dá origem à neurocinina B (NKB). A SP, NKA e NKB apresentam certa seletividade de ação em relação aos receptores taquicininérgicos NK1, NK2 e NK3, respectivamente, todos acoplados à proteína G (Holzer, 1998). A SP e a NKA são expressas em neurônios aferentes primários e liberadas por terminações centrais e periféricas dessas fibras após estimulação nociceptiva (Duggan et al., 1988; Urban et al., 1994; McCauley, 1999; Laird et al., 2001). O receptor NK1 é essencial para o estabelecimento da dor induzida por diversos mediadores, experimentos com animais que não expressam o receptor NK1 (nocautes para o receptor NK1) mostraram que a ausência desse receptor abole as respostas nociceptivas induzidas pela capsaicina e pela segunda fase da dor causada por formalina (De Felipe et al., 1998). Já animais com uma superexpressão de SP (transgênicos), agonista preferencial do receptor NK1, apresentam respostas nociceptivas a estímulos mecânicos e térmicos inócuos (alodinia) e nocicepção aumentada em resposta a estímulos mecânicos (hiperalgesia mecânica). Antagonistas seletivos de receptores NK1 e NMDA

bloqueiam a hiperalgesia e alodinia, sugerindo que estes receptores contribuem para a alteração da transmissão nociceptiva observada nesses animais (McLeod et al., 1999). Além de participar da dor aguda, a SP (administrada intratecalmente), atuando em receptores NK1, também potencializa a hiperalgesia causada por doses sublimiáres de formalina em ratos, efeito que é dependente do aumento da produção de segundos mensageiros como óxido nítrico, ácido araquidônico e proteína quinase C (Coderre e Yashpal, 1994).

Glutamato e aspartato são os aminoácidos excitatórios mais importantes e amplamente distribuídos no sistema nervoso central, onde participam de diversos eventos fisiológicos e patológicos, como aprendizado, desenvolvimento de conexões sinápticas normais no cérebro, epilepsia, lesão cerebral causada por isquemia e outros (Coderre, 1993; Dingledine e McBain, 1994; Lipton e Rosenberg, 1994; Thomas, 1995; Dickenson 1997; Hudspith, 1997). As funções dos aminoácidos excitatórios foram bem descritas inicialmente no sistema nervoso central, mas estes neurotransmissores também exercem um papel importante na sinalização de tecidos como ossos, pele, astrócitos, coração, pâncreas e medula óssea (Skerry e Genever, 2001). O glutamato preenche alguns dos pré-requisitos clássicos para a classificação como neurotransmissor: 1) é armazenado em vesículas na célula pré-sináptica, 2) é liberado após estímulo, 3) é liberado por exocitose, 4) se difunde na fenda sináptica para ligar-se a receptores pós-sinápticos (que iniciam uma série de eventos intracelulares) e 5) é recaptado, através de transportadores específicos, pelo terminal pré-sináptico e células não-neuronais. Além de ser um neurotransmissor importante, o glutamato está envolvido em muitas outras funções como síntese de ácidos graxos, regulação do nível de amônia, controle do balanço osmótico e iônico, faz parte da

constituição de proteínas e é precursor para a síntese do GABA (principal neurotransmissor inibitório) e outros intermediários do ciclo de Krebs (Dingledine e McBain, 1994). Sua síntese é realizada pela ação enzimática da glutaminase, convertendo glutamina em glutamato no compartimento mitocondrial, ou através de transaminação. Após a síntese, o glutamato é armazenado em vesículas em alta concentração (cerca de 20 mM). Para evitar a exposição das células aos seus efeitos tóxicos, existem mecanismos específicos de captação/recaptação do glutamato pela terminação pré-sináptica, por células que estão em volta do terminal periférico e pelas células da glia e de Schwann, depois que este é liberado na fenda sináptica, onde chega a atingir uma concentração de 5  $\mu$ M (Lipton e Rosenberg, 1994). O glutamato captado pela célula da glia ou de Schwann é convertido em glutamina, que por sua vez é transportada de volta para o terminal nervoso, onde é novamente convertida em glutamato para reabastecer os estoques vesiculares do neurotransmissor (Dingledine e McBain, 1994). O sistema transportador de glutamina entre glia e neurônios no sistema nervoso periférico é similar ao existente no sistema nervoso central (proteína SN1 na glia e SAT/ATA nos neurônios) (Miller et al., 2002). Quando comparado a qualquer neurotransmissor, a síntese e metabolismo do glutamato (e aspartato) são os processos mais dependentes da interação entre terminais nervosos, células da glia (sistema nervoso central) e de Schwann que existem (sistema nervoso periférico).

Até os anos 80 acreditava-se que as ações do glutamato eram mediadas exclusivamente pelos receptores ionotrópicos, mas na metade daquela década começaram a surgir evidências de que alguns dos receptores glutamatérgicos promoviam a ativação de segundos mensageiros através de proteínas  $G_s$ , e os

receptores metabotrópicos foram caracterizados (Conn e Pin, 1997). Estudos recentes de farmacologia funcional, eletrofisiologia, biologia molecular e bioquímica permitiram a caracterização de dois grandes grupos bem distintos de receptores glutamatérgicos, chamados "ionotrópicos" (iGluRs) e "metabotrópicos" (mGluRs). Todos os iGluRs são canais iônicos catiônicos<sup>8</sup> ativados por ligante e compostos por combinações homo e/ou heteroméricas de diferentes subunidades integradas (Skerry e Genever, 2001). Essa classe de receptores é subdividida ainda em *N*-metil-D-aspartato (NMDA) e não-NMDA, sendo que os receptores do tipo  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e cainato (KA) fazem parte desta última subdivisão (Mayer et al., 1990; Gasic e Hollmann, 1992; Hollmann e Heinemann, 1994; Nakanishi e Masu, 1994). Quatro subunidades do receptor AMPA (GluR1-4 ou GluRA-D) e cinco subunidades do receptor KA (GluR5-7 ou KA1 e KA2) já foram identificadas. Os receptores NMDA são formados através da associação entre a subunidade essencial NMDA NR1 com uma das outras quatro subunidades NMDA NR2 (A, B, C ou D). Existe ainda a subunidade NMDA R3, expressa principalmente durante o desenvolvimento do cérebro. Uma vez ativados, os iGluRs permitem o influxo de sódio (Na<sup>+</sup>), efluxo de potássio (K<sup>+</sup>), promovem a despolarização da membrana plasmática e/ou o influxo de cálcio (Ca<sup>++</sup>), dependendo da subunidade que compõe o canal (Hansson et al., 2000). Os receptores AMPA e KA conduzem principalmente os íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, e os receptores NMDA são permeáveis principalmente ao Ca<sup>2+</sup>, com menor condutância ao Na<sup>+</sup>. A ativação de receptores AMPA resulta em uma despolarização e dessensibilização rápida, enquanto que a ativação dos receptores KA produz uma resposta de longa duração e que não sofre

---

<sup>8</sup> Permitem a passagem de diversos tipos de íons carregados positivamente.

dessensibilização. A ordem de potência dos agonistas para ativar o receptor AMPA é: AMPA > quisqualato > glutamato > cainato, sendo que aspartato e NMDA são praticamente inativos nesse receptor. Para o KA, a ordem de potência dos agonistas para ativação dos receptores é: cainato  $\geq$  domoato > quisqualato > glutamato > AMPA (Nakanishi e Masu, 1994). O NMDA é o receptor ionotrópico mais finamente regulado, sua ativação depende de cinco fatores diferentes, que consistem de dois sítios de reconhecimento de agonistas diferentes (glutamato e glicina), um sítio regulatório de poliaminas, que promove a ativação, e dois sítios separados de reconhecimento para os íons zinco ( $Zn^{2+}$ ) e magnésio ( $Mg^{2+}$ ), que inibem o fluxo iônico (Dingledine e McBain, 1994). O sítio da glicina associado ao receptor NMDA é insensível à estricnina, ao contrário dos outros receptores glicininérgicos inibitórios, e requer concentrações de glicina cerca de 10 vezes menores para sua ativação. A glicina é um co-agonista necessário para a ativação do receptor NMDA e o  $Mg^{2+}$  exerce uma espécie de bloqueio do canal, que é removido após uma despolarização prévia da membrana plasmática. Do mesmo modo que a glicina, concentrações de  $Mg^{2+}$  bem menores do que as encontradas no líquido extracelular são suficientes para bloquear as respostas induzidas pelo receptor NMDA. A ordem de potência dos agonistas para ativar o receptor NMDA é: NMDA (30 vezes mais potente) > glutamato > L-homocisteato > aspartato > cisteínasulfinato > quinolinato. Os aminoácidos excitatórios também são capazes de estimular receptores metabotrópicos (receptores acoplados à proteína G) e induzir a formação de segundos mensageiros como  $IP_3$ , DAG e nucleotídeos cíclicos (Nakanishi e Masu, 1994; Dickenson, 1995; Hudspith, 1997). Os mGluR, por sua vez, foram subdivididos de acordo com os sistemas efetores intracelulares, nos grupos I, II e III. O grupo I compreende os receptores

chamados mGluR1 e mGluR5, positivamente acoplados à fosfolipase C e a diversos canais de potássio através da proteína  $G_o$  ou  $G_q$ . Sua ativação promove a hidrólise de fosfoinosítídeos e a despolarização da membrana plasmática. O grupo II compreende os receptores chamados mGluR2 e mGluR3, e o grupo III compreende os receptores chamados mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8, todos associados a canais iônicos e inibição da adenilato ciclase. A ordem de potência dos agonistas para ativar os receptores metabotrópicos é: quisqualato > glutamato > ibotenato (Conn e Pin, 1997).

Diversos estudos têm demonstrado que os receptores para aminoácidos excitatórios estão criticamente envolvidos na transmissão nociceptiva aferente primária, tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da resposta nociceptiva (Aanonsen e Wilcox, 1987; 1990; Mao et al., 1992; Coggeshall e Carlton, 1997; Ferreira et al., 1999). Resultados de estudos anatômicos mostram que pelo menos 20% das fibras sensoriais não mielinizadas da pele glabra de ratos têm populações de receptores NMDA, KA e AMPA e que o glutamato também tem a capacidade de excitar e sensibilizar fibras aferentes  $A\delta$  e C, mas não  $A\beta$  (Carlton et al., 1995; Du et al., 2001). Em humanos, os receptores ionotrópicos também já foram localizados na pele com pêlos e em células de Schwann (NMDA e KA) (Kinkelin et al., 2000). Além disso, receptores glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I, II e III já foram localizados em 20-32% dos axônios mielinizados e não-mielinizados de neurônios aferentes primários, e é provável que estejam presentes em subpopulações de fibras  $A\delta$  e C que inervam a pele (Du et al., 2001, Zhou et al., 2001; Neugebauer, 2002). Os três grupos de receptores glutamatérgicos (NMDA, não-NMDA e metabotrópicos) já foram localizados e caracterizados nos gânglios da raiz dorsal (Sato et al.,

1993) e também na pata traseira de ratos (Carlton et al., 1995). Curiosamente, apesar dos receptores AMPA, KA e NMDA serem expressos em axônios sensoriais de fibras mielinizadas de nervos plantares, o glutamato não é capaz de excitar as fibras aferentes do tipo A $\beta$ . Acredita-se que este efeito decorra do fato desses receptores não serem funcionais fisiologicamente, mas tornarem-se funcionais em estados patológicos ou que as correntes geradas nos estudos eletrofisiológicos *in vitro* não tenham sido capazes de induzir potenciais de ação nessas fibras mielinizadas mais espessas (Du et al., 2001).

Existem diversas evidências sugerindo que os aminoácidos excitatórios são liberados na medula espinhal ou na pele em resposta a estímulos nocivos como os causados pela injeção intraplantar de formalina e outros agentes inflamatórios (Sluka e Westlund, 1992; 1993; Malmberg e Yaksh, 1995a; 1995b; Omote et al., 1998; Lawand et al., 2000; para revisão veja Carlton, 2001), capsaicina (Jackson et al., 1993; Sakurada et al., 1996; Teoh et al., 1996), zimosan (Vetter et al., 2001) ou substância P (Juránek e Lembeck, 1997). Além de serem liberados após estímulos nociceptivos, os aminoácidos excitatórios também são capazes de induzir nocicepção, hiperalgesia e alodinia. Agonistas seletivos dos diferentes iGluRs ou glutamato, administrados subcutaneamente na pata traseira de ratos, produzem respostas nociceptivas caracterizadas por alodinia e hiperalgesia mecânica e térmica em ratos, efeito reduzido pelo tratamento com antagonistas seletivos dos iGluRs, indicando que o glutamato provavelmente tem um papel importante tanto na transmissão central quanto periférica da resposta nociceptiva (Carlton et al., 1995; Jackson et al., 1995;

Zhou et al., 1996). Lawand e colaboradores (1997) observaram que combinações<sup>9</sup> de aminoácidos excitatórios, glutamato, aspartato e arginina, quando administrados na cavidade articular do joelho são capazes de causar hiperalgesia térmica e mecânica na pata de ratos. Por causar aumento da atividade nos músculos da mandíbula quando aplicado na junção temporomandibular, Fiorentino e colaboradores (1999) sugeriram que o glutamato também pode causar nocicepção, quando aplicado nesse tecido. Walker e colaboradores (2001b) estabeleceram até uma ordem de potência para a indução de hiperalgesia mecânica por agonistas seletivos de receptores ionotrópicos e metabotrópicos na pata traseira de ratos: L-glutamato > (RS)-2-cloro-5-hidroxifenilglicina (CHPG) = 3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG) > NMDA = AMPA > LY314582 > ácido L-(+)-2-amino-4-fosfonobutírico (L-AP4) (agonistas endógeno, mGlu I, mGluR5, NMDA, AMPA, mGlu II, mGlu III, respectivamente). No entanto, os agonistas seletivos de receptores mGlu II (LY314582) e mGlu III (L-AP4) não causaram hiperalgesia, mesmo nas maiores doses utilizadas no ensaio (Walker et al., 2001b). Tem sido descrito também que o glutamato e o NMDA, administrados intratecalmente (i.t.), causam nocicepção e respostas hiperalgésicas em ratos e camundongos (Aanonsen e Wilcox, 1987; Liu, 1997; Beirith et al., 1998; Ferreira et al., 1999). O agonista seletivo de receptores KA e AMPA, ácido caínico, administrado por via intraperitoneal ou subcutânea em camundongos, induz hiperalgesia térmica e mecânica (Giovenko et al., 1999). A ativação de receptores glutamatérgicos, especialmente os NMDA, pode estimular a atividade de enzimas e a produção de diversos segundos mensageiros intracelulares como o óxido nítrico (NO) que produz hiperalgesia (Meller et al., 1996; Meller e Gebhart, 1993). Tais

---

<sup>9</sup> Mas não injeções individuais de glutamato, aspartato e arginina isoladamente.

descobertas, além de outras evidências, sugerem que todos os subtipos de receptores glutamatérgicos, principalmente os encontrados em fibras sensoriais do tipo C, desempenham um papel importante na transmissão da dor (para revisão veja Haley e Wilcox, 1992; Zhou et al., 1996; Dickenson, 1997; Carlton, 2001).

A injeção intraplantar ou intratecal de agonistas seletivos de mGluR I causa sensibilização a estímulos térmicos e mecânicos, efeitos que são reduzidos com uso de antagonistas seletivos desses receptores (Dolan e Nolan, 2000; Zhou et al., 2001). A dor inflamatória causada por carragenina, adjuvante completo de Freund (CFA) ou formalina (segunda fase), também é significativamente reduzida pelo tratamento com antagonistas de mGluR I e a participação desses receptores é essencial para o estabelecimento e manutenção da hipersensibilidade (Bhave et al., 2001). Por outro lado, a administração de agonistas de mGluR II causa antinocicepção, provavelmente devido ao mecanismo de ação intracelular destes receptores estar associado à diminuição da liberação espinal de glutamato e à inibição da formação de AMPc (Dolan e Nolan, 2000). Os mGluR I aumentam as respostas nociceptivas mediadas pelos iGluR, tanto comportamentais quanto a transmissão de impulsos entre neurônios do corno dorsal da medula espinal. Através da regulação da atividade de diversas quinases (PKA, PKC, ERK/MAP<sup>10</sup>) e tirosina quinases da família Src, os mGluRs I podem mediar a fosforilação dos receptores NMDA, AMPA e KA (Neugebauer, 2002). A ativação dessas quinases (ERK1 e ERK2) pelos mGlu I também é um passo fundamental para o

---

<sup>10</sup> As ERK/MAP são as quinases ativadas por sinal extracelular (ERK)/proteínas quinases ativadas por mitógeno, uma família de enzimas que modula a transcrição de diversas proteínas e está envolvida na sinalização nociceptiva (Karim et al., 2001b).

estabelecimento da dor inflamatória mediada pela ativação dos receptores mGluR1 e mGluR5 em camundongos (Karim et al., 2001b).

Após a estimulação elétrica ou química (com capsaicina) do nervo ciático, ocorre a liberação de aminoácidos excitatórios na pata de ratos, que podem modular a excitabilidade e a sensibilização dos nociceptores (DeGrot et al., 2000). De acordo com esses dados que mostram que os receptores glutamatérgicos podem participar da transmissão nociceptiva em estados inflamatórios, outros estudos mostram que, sob essas condições, existe um aumento na expressão de receptores glutamatérgicos (Carlton e Coggeshall, 1999). Depois de 48 h do tratamento com adjuvante completo de Freund (CFA), por exemplo, a proporção de axônios não-mielinizados onde os receptores NMDA, AMPA e KA são encontrados é de 61%, 43% e 48%, respectivamente, em relação aos 48%, 22% e 27%, respectivamente, encontrados nos mesmos axônios em patas não inflamadas. O mesmo efeito ocorre em axônios mielinizados, que são positivamente marcados para receptores NMDA, AMPA e KA em 61%, 61% e 43%, respectivamente, em relação aos 43%, 42% e 28% em tecidos não inflamados (Carlton e Coggeshall, 1999). Além disso, a hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA na pata de rato parece ser mediada por receptores NMDA (Leem et al., 2001).

Diversos sistemas, como o cardiovascular, o genitourinário, o respiratório e o nervoso, são modulados fisiologicamente pela ação do NO, mas um aumento exagerado da sua produção normalmente está associado a alterações patofisiológicas. O NO é sintetizado pelas enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOS), sendo que três isoformas foram identificadas até o momento e receberam uma nomenclatura de acordo com o tecido no qual foram descritas

inicialmente: 1) NOS endotelial (NOSe), 2) NOS neuronal (NOSn) e 3) NOS induzida (NOSi) (Vallance e Leiper, 2002). A NOSe sintetiza o NO que é importante para manter os vasos relaxados, inibir a agregação de plaquetas e leucócitos e suprimir a replicação de células do músculo liso. O NO sintetizado pela NOSn em nervos periféricos também é importante para o relaxamento do músculo liso vascular e não vascular, causando efeitos como relaxamento de esfíncteres, do intestino, da bexiga, da uretra, do corpo cavernoso, permitindo a ereção, além de alterar a responsividade das vias aéreas. A NOSi normalmente não é expressa em células em condições normais, mas é rapidamente induzida em diversos tecidos após estimulação com endotoxinas bacterianas ou citocinas pró-inflamatórias (Meller e Gebhart, 1993). Porém, alguns tecidos podem expressá-la de forma constitutiva e depender de suas ações fisiológicas, como os osteoclastos, para reabsorção óssea, e o intestino, para cicatrização da mucosa. A quantidade de NO produzida pela NOSi é maior do que a quantidade de NO produzida pelas isoformas constitutivas da enzima, e depende do tipo de célula e tecido onde está sendo expressa (Vallance e Leiper, 2002). Depois de sintetizado, o NO ativa a forma solúvel da guanilato ciclase (GC), tida como seu receptor fisiológico, que por sua vez converte a guanosina-5'-trifosfato em guanosina-3'-5'-monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc, como segundo mensageiro, pode ativar proteínas quinases, canais iônicos e fosfodiesterases. A GC existe sob diversas formas, constituídas de uma subunidade  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  ou  $\alpha_3$ ) e uma subunidade  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ou  $\beta_3$ ), que já foram identificadas em diversos tecidos murinos, humanos e bovinos (Tao e Johns, 2002).

Uma característica marcante do NO é sua dualidade, ou seja, sua capacidade de apresentar efeitos antagônicos em estados patológicos diversos.

Apesar do NO produzido pela NOSi ser importante para a cicatrização da pele e ser considerado, por diversos pesquisadores, fundamental no processo de resolução da inflamação (Vallance e Leiper, 2002), a indução da NOSi é observada em modelos de dor inflamatória e não inflamatória e inibidores da NOSn são indicados como analgésicos. Entretanto, a inibição completa da síntese de NO pode resultar em efeitos prejudiciais ao organismo, como aumento da suscetibilidade a infecções, diminuição da cicatrização, potencialização do dano tecidual em alguns casos (NO sintetizado pela NOSi), alteração da função genitourinária, gastrointestinal, cerebral e dos esfíncteres (NO sintetizado pela NOSn). Por ser uma molécula gasosa pequena, muito reativa e que passa através de membranas celulares facilmente, o NO é considerado um "transmissor retrógrado", isto é, a ativação de algum receptor (NMDA, por exemplo) no neurônio pós-sináptico induz a produção de NO, que se difunde rapidamente e entra no neurônio pré-sináptico, para modular sua atividade. O NO pode ser liberado após a estimulação direta de fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, contribuindo para sua excitabilidade após o estímulo nociceptivo, além de sensibilizar nociceptores (Moore et al., 1991; Haley et al., 1992; Babbedge et al., 1993; Meller e Gebhart, 1993; Yamamoto et al., 1993). Também tem sido sugerido o uso de inibidores da síntese de NO em casos nos quais a dor ou hiperalgesia são mediadas por receptores NMDA, já que o NO é um dos principais mediadores produzidos após o aumento da concentração de cálcio intracelular causada pela ativação desse receptor (Malmberg e Yaksh, 1993; Rivot et al., 1999). Em gânglios da raiz dorsal, neurotransmissores como a SP e o CGRP coexistem com a NADPH diaforase, enzima que produz o co-fator NADPH, necessário para a atividade e que reflete a localização das NOSs em diversos

tecidos, indicando sua importância no processamento de informações sensoriais (Malmberg e Yaksh, 1993; Meller e Gebhart, 1993). O NO também está envolvido na hiperalgesia ou alodinia induzida por outros mediadores que promovem o aumento da concentração de AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA) como PGE<sub>2</sub>, agonistas de receptores de adenosina A<sub>2</sub> e de serotonina 5HT<sub>1A</sub> (Minami et al. 1995; Aley et al. 1998). Contribuindo para a controvérsia sobre a dualidade de efeitos do NO, nos experimentos realizados por Granados-Soto e colaboradores (1997), a ativação da via L-arginina/óxido nítrico induz antinocicepção no modelo da formalina em ratos. Segundo o autor, esse efeito seria resultante de diferenças na intensidade dos estímulos nociceptivos - Malmberg e Yaksh em 1993 utilizaram formalina 5% e Granados-Soto e colaboradores em 1997 utilizaram formalina 5% - e diferentes tipos de neurônios sensoriais envolvidos nas respostas. Em estudos com concentrações diferentes de formalina, como 2,5% ou 4% (Roche et al., 1996; Tao e Johns, 2002, respectivamente), inibidores da síntese de NO (L-NAME e 7-nitroindazol) também exibiram atividade antinociceptiva significativa. A injeção de formalina é capaz, ainda, de provocar um aumento da expressão de NOSn e guanilato ciclase na medula espinhal de ratos, mostrando que o NO também é importante para o estabelecimento da hiperalgesia prolongada que segue a estimulação nociceptiva periférica (Lam et al., 1996; Tao e Johns, 2002). Duarte e colaboradores (1990) também obtiveram evidências de que o nitroprussiato, um doador de NO, possui propriedades antinociceptivas na hiperalgesia mecânica induzida por carragenina ou PGE<sub>2</sub> em ratos, mostrando o envolvimento do NO na antinocicepção periférica. No mesmo modelo de dor, a L-arginina, substrato que as NOS utilizam para a produção de NO, causou antinocicepção na hiperalgesia induzida por carragenina.

Desde a descoberta de que os aminoácidos excitatórios participam ativamente como neurotransmissores no sistema nervoso central, periférico e em tecidos não neuronais, muita atenção tem sido dada para a caracterização dos sistemas que podem ser modulados por esses neurotransmissores. Em diferentes estados e escalas, todos os receptores glutamatérgicos, metabotrópico, NMDA, KA e AMPA participam da indução, modulação ou manutenção da dor (Boxall et al., 1998; Carlton e Coggeshall, 1999; Ferreira et al., 1999). Diversas evidências sugerem que antagonistas de receptores NMDA, não-NMDA e metabotrópicos são capazes de eliminar a propagação da resposta nociceptiva e antagonizar os estímulos dolorosos provocados pela injeção de glutamato ou agonistas seletivos dos iGluRs e mGluRs (Cahusac et al., 1984; Aanonsen e Wilcox, 1987; Haley e Wilcox, 1992; Ren et al., 1992; Fundytus et al., 2002). Com base nos estudos que mostram a expressão periférica dos receptores glutamatérgicos e na dor que sua ativação é capaz de induzir, o presente trabalho se propõe a caracterizar as respostas nociceptiva e edematogênica induzidas pelo glutamato, quando administrado através da via intraplantar, em camundongos.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Caracterizar, com o emprego de antagonistas seletivos, os subtipos de receptores envolvidos na nocicepção e no edema de pata causados pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.
- 2) Caracterizar, com o emprego de antagonistas seletivos, a participação de diversos sistemas na nocicepção e edema de pata induzidos por glutamato.
- 3) Analisar, com o auxílio de técnicas de biologia molecular e ensaios bioquímicos, alguns dos mecanismos através dos quais o glutamato induz nocicepção e formação de edema quando injetado na pata traseira de camundongos.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos suíços machos, pesando entre 25 e 35 g, criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C), ciclo 12 h claro/12 h escuro, tratados com água e ração *ad libitum* e permaneceram no laboratório durante um período de adaptação de pelo menos 1 h antes dos testes farmacológicos, realizados geralmente entre 8 e 17 h, a temperatura de  $22 \pm 2$  °C.

### 3.2 Nociceção e edema induzidos pela injeção intraplantar de glutamato

Um volume de 20  $\mu$ l de glutamato (0,3 - 60,0  $\mu$ mol/pata) ou solução tampão fosfato (PBS, composição mmol/l: NaCl 137, KCl 2,7 e tampão fosfato 10, pH 7.4) foi injetado por via i.pl. e os camundongos foram observados no período de 0 a 40 min. Os 40 min foram divididos em períodos de 5 min para facilitar a visualização da duração e de um possível pico de nociceção durante a observação. Após a injeção i.pl. de glutamato, os animais foram colocados imediatamente e individualmente sob campânulas transparentes (funis de vidro com 20 cm de diâmetro), que serviram como câmaras de observação. O tempo despendido pelos animais para lamber ou morder a pata injetada foi registrado com o auxílio de um cronômetro e considerado como indicativo de nociceção.

Para investigar se a nociceção causada por glutamato (0,1 - 30,0  $\mu$ mol/pata) estava associada à formação de edema, após a observação do comportamento nociceptivo, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tiveram as patas cortadas na junção tíbio-tarsal e pesadas em balança. O edema de pata foi medido pela comparação entre a diferença de peso da pata tratada com glutamato e da pata controle (não tratada).

A solução de glutamato que é administrada nos animais na maioria dos experimentos, por ser preparada com ácido glutâmico, tem pH baixo, em torno de 2.2. Procurando caracterizar a influência do pH na nociceção induzida pelo glutamato, grupos de animais foram tratados com veículo (PBS), glutamato (30

$\mu\text{mol/i.pl.}$ ) e uma solução ácida (pH 2.0). A nocicepção e edema de pata induzidos pelo glutamato foram avaliados conforme o procedimento descrito acima.

A fim de observar o aumento da permeabilidade vascular, um grupo de animais foi tratado com azul de Evans (0,5 %) por via endovenosa e 1 h depois recebeu a injeção i.pl. de glutamato (30  $\mu\text{mol/pata}$ ). Decorridos 15 min da injeção de glutamato, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, a região plantar das patas foi removida, cortada em quatro partes e colocada em solução de formamida, onde permaneceu durante 24 h em banho-maria a 50 °C, para extração do corante. A quantidade de azul de Evans foi medida através da comparação entre a absorbância obtida das amostras e a absorbância obtida da curva padrão, todas lidas em espectrofotômetro a 620 nm.

Com o intuito de verificar a influência do processo de captação de glutamato sobre a nocicepção e edema de pata induzidos por este neurotransmissor, outro grupo de animais foi pré-tratado com um inibidor do transporte de aminoácidos excitatórios, Chicago sky blue 6B (100,0  $\mu\text{g/kg}$ , i.p.), 30 min antes da injeção de glutamato (Roseth et al., 1995). A nocicepção e edema de pata induzidos pelo glutamato foram avaliados como descrito anteriormente.

### 3.3 Influência de diversos sistemas sobre a nocicepção e edema de pata induzidos por glutamato

Para investigar alguns dos mecanismos através dos quais o glutamato induz nocicepção e formação de edema, grupos de animais foram tratados com diferentes drogas através de diversas vias de administração. A escolha das doses de cada droga baseou-se em dados anteriores da literatura ou em experimentos preliminares realizados em nosso laboratório (dados não apresentados).

#### Participação dos receptores glutamatérgicos

Com o objetivo de avaliar o envolvimento de receptores NMDA na nocicepção e edema de pata induzidos pela injeção i.pl. de glutamato, um grupo de animais foi tratado com o antagonista seletivo destes receptores, MK 801, por via i.pl. (0,01-1,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) em co-administração com glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ , i.pl.). Animais do grupo controle receberam um volume similar de veículo i.pl. (20  $\mu\text{l/pata}$ ).

Para investigar o envolvimento de outros receptores glutamatérgicos na nocicepção e edema de pata induzidos por glutamato, outros grupos de animais foram tratados com antagonista competitivo dos receptores KA, NBQX (3,6-36,0  $\mu\text{mol/i.pl.}$ ), antagonista seletivo de receptores AMPA, SYM 2206 (60-180  $\text{nmol/i.pl.}$ ), antagonista seletivo dos receptores metabotrópicos, E4CPG (1,0-10,0  $\mu\text{mol/pata i.pl.}$ ) ou antagonista seletivo de sítio da glicina associado ao receptor NMDA, felbamato (0,1-0,8  $\mu\text{mol/i.pl.}$ ). Animais controle receberam o mesmo volume

de veículo i.pl. (20  $\mu$ l/pata). A nociceção e edema de pata induzidos pelo glutamato foram avaliados de acordo com a descrição anterior.

### Participação da via L-arginina / óxido nítrico

Com o objetivo de verificar o possível envolvimento da via óxido nítrico/L-arginina na nociceção e no edema de pata induzidos por glutamato, um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), L-N<sup>ω</sup>-nitro-arginina (L-NOARG), foi administrado aos animais através das vias i.pl. (0,5-1,4  $\mu$ mol/pata, co-injeção) ou i.p. (0,1-1,1 mmol/kg, 30 min antes) antes ou em associação com glutamato (30,0  $\mu$ mol/pata, i.pl.). Animais do grupo controle receberam um volume similar de veículo i.p. (10 ml/kg) ou i.pl. (20  $\mu$ l/pata). Outros grupos de animais foram pré-tratados com L- ou D-arginina (3,4 mmol/kg, i.p.), 20 min antes de serem tratados com L-NOARG (0,3 mmol/kg, i.p.) e a nociceção e o edema de pata foram avaliados como previamente descrito. Grupos controle receberam veículo, L-NOARG (0,3 mmol/kg, i.p.), L- ou D-arginina (3,4 mmol/kg, i.p.) (Beirith et al., 1998; Ferreira et al., 1999). Em outros grupos de animais, foi co-administrado S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP, um doador de NO, 0,01-1,0  $\mu$ mol/pata) com doses sublimiares de glutamato (0,01 ou 10,0  $\mu$ mol/pata, i.pl.) para avaliar um possível efeito sinérgico entre NO e glutamato na nociceção ou edema provocados pela injeção de glutamato (Ferreira et al., 1999). Animais controle receberam uma injeção i.pl. de um volume similar de veículo, glutamato (0,01 ou 10,0  $\mu$ mol/pata) ou SNAP (0,01-1,0  $\mu$ mol/pata), administrados isoladamente.

Em um grupo separado de animais, as patas tratadas com PBS ou glutamato foram cortadas na junção tíbio-tarsal e o exsudato foi coletado por

centrifugação 15 min após a injeção i.pl. de 20  $\mu$ l de veículo ou doses crescentes de glutamato (0,3-60,0  $\mu$ mol/pata). Inicialmente as amostras foram desproteinizadas com sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub> 10%) em geladeira (4 °C) durante 10 min. Foi adicionado NaOH 2,5 N, as amostras foram agitadas vigorosamente (vortex) e centrifugadas durante 15 min na microcentrífuga. O sobrenadante foi utilizado para a reação de conversão de nitrato (NO<sub>3</sub>) em nitrito (NO<sub>2</sub>) pela bactéria *E. coli*. Para tanto foram acrescentados à amostra fosfato de sódio (0,5 M), formiato de amônio (2,4 M), *E. coli* e a reação foi incubada a 37 °C durante 2 h, sendo depois centrifugada a 10.000 g a 20 °C durante 5 min. O sobrenadante foi transferido para a placa de 96 poços e incubado com o reativo de Griess ( $\alpha$ -naftil-etilenodiamina 0,1% m/v e ácido sulfanílico em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5% v/v). Após 10 min o nível de nitrito (NO<sub>x</sub>) foi monitorado espectrofotometricamente a 540 nm (Granger et al. 1990).

#### Participação de cininas, taquicininas e do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)

Tendo em vista o propósito de avaliar o envolvimento dos receptores de taquicininas na nocicepção e edema de pata induzidos por glutamato, os animais receberam os antagonistas seletivos dos subtipos de receptores NK1, NK2 ou NK3, respectivamente FK 888 (0,25-1,0 nmol/pata), SR 48968 (0,05-0,5 nmol/pata) ou SR 142801 (0,25-1,0 nmol/pata) (Santos e Calixto, 1997), em combinação com glutamato (30,0  $\mu$ mol/pata, i.pl.). Para a análise da participação das cininas na nocicepção e edema de pata induzidos por glutamato, os animais receberam através da via i.pl., o antagonista seletivo de receptores B<sub>1</sub> para as

cininas, des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (0,2-0,8 nmol/pata), ou o antagonista seletivo de receptores B<sub>2</sub>, HOE 140 (1,0-4,0 nmol/pata) (Corrêa e Calixto, 1993), administrados em associação com glutamato (30,0 µmol/pata, i.pl.). Para avaliar o envolvimento do CGRP na nocicepção e no edema de pata induzidos por glutamato, um grupo de animais foi tratado com um antagonista seletivo de receptores para CGRP, o fragmento CGRP<sub>8-37</sub> (1,0 nmol/pata), em associação com glutamato (30,0 µmol/pata) (Ferreira et al., 2000). Os animais controle receberam, através da mesma via, um volume similar (20 µl/pata) de glutamato dissolvido em PBS.

### 3.4 Participação de fibras sensíveis a capsaicina

O possível envolvimento de fibras sensoriais aferentes primárias sensíveis à capsaicina foi examinado através do tratamento de camundongos recém-nascidos com capsaicina (50,0 mg/kg, s.c., no segundo dia de vida). O tratamento foi realizado com o propósito de induzir a degeneração irreversível de neurônios não-mielinizados aferentes, especialmente fibras C (Holzer, 1991). Animais do grupo controle receberam, através da mesma via de administração, um volume similar do veículo utilizado para dissolver a capsaicina (etanol 10%, tween 80 10% e PBS 80%). Dois meses após o tratamento neonatal com capsaicina, os animais receberam uma injeção i.pl. de glutamato (30,0 µmol/pata) e as respostas nociceptiva e edematogênica foram medidas como descrito anteriormente.

### 3.5 Participação da migração celular

Com o objetivo de verificar a possível migração celular para o local da injeção de glutamato, foi realizado um tratamento com fucoidina, um inibidor de selectinas P e E (Teixeira e Hellewell, 1997). No processo de migração dos vasos sanguíneos para o sítio da lesão, os leucócitos utilizam polissacarídeos chamados selectinas para se fixarem nas células endoteliais e iniciarem o processo de rolagem sobre estas células, que culminará na sua saída das vênulas pós-capilares para o tecido. Portanto, a fucoidina inibe indiretamente o acúmulo de células (principalmente neutrófilos) no sítio inflamatório, por inibir as selectinas. Grupos de animais foram tratados com fucoidina (25 mg/kg, e.v.) ou veículo (PBS) durante três dias (Zhang et al., 2001). No último dia do tratamento receberam a injeção de glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) ou veículo (PBS), sendo observadas as respostas nociceptiva e edematogênica.

Com a finalidade de avaliar indiretamente a migração de neutrófilos, foi avaliada a atividade da enzima mieloperoxidase 15 min a 24 h após a injeção de glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) ou veículo (PBS) no tecido retirado da região plantar das patas tratadas. As amostras foram colocadas em tampão fosfato (pH 5.4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, 0,5%), homogeneizadas durante 45 s em uma temperatura de 0 °C e centrifugadas a 11.200 g (4 °C) durante 20 min. Uma alíquota (20  $\mu\text{l}$ ) do sobrenadante dessa centrifugação foi acrescentada a 200  $\mu\text{l}$  de uma solução contendo 100  $\mu\text{l}$  de PBS 80 mM, 85  $\mu\text{l}$  de PBS 0,22 M (pH 5.4) e 15  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,017% em uma placa de 96 poços. A reação foi iniciada com a adição de 20  $\mu\text{l}$  de tetrametilbenzidina (TMB, 18,4 mM, em dimetilformamida aquosa 8%), incubada durante 3 min a 37 °C e, em seguida,

colocada em gelo. O fim da reação foi determinado pelo acréscimo, ao meio de reação, de acetato de sódio (NaOAc, 1,46 M, pH 3.0). O resultado da reação foi observado em espectrofotômetro a 620 nm (Recio et al., 2000).

### 3.6 Ativação do fator nuclear $\kappa$ B

A fim de observar uma possível ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) após o tratamento i.pl. com glutamato, os animais foram sacrificados 15 min após sua injeção e o tecido da região plantar das patas foi removido para a preparação das amostras utilizadas no ensaio de deslocamento em gel (EMSA) (D'Acquisto et al., 2000). Imediatamente após a remoção, os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e depois homogeneizados durante 30 s com um triturador de tecidos em 0,6 ml de uma solução tampão de lise hipotônica gelada (HEPES 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCL 10 mM, PMSF 0,5 mM, inibidor de tripsina de feijão 1,5  $\mu$ g/ml, pepstatina A 7  $\mu$ g/ml, leupeptina 5  $\mu$ g/ml, benzamidina 0,1 mM e DTT 0,5 mM). Os homogenatos das amostras de animais tratados com glutamato (30  $\mu$ mol/pata) ou veículo foram mantidos em gelo durante 15 min e posteriormente agitados durante 15 min na presença de nonidet P-40 10%. A fração nuclear foi precipitada por centrifugação a 1.500 g durante 15 min, o sobrenadante contendo a fração citosólica foi removido e armazenado a -70 °C. O precipitado nuclear foi resuspendido em 0,6 ml de uma solução concentrada de tampão de extração (HEPES 20 mM, pH 7.9, NaCl 420 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, glicerol 25% v/v, PMSF 0,5 mM, inibidor de tripsina de feijão 1,5  $\mu$ g/ml, pepstatina A 7  $\mu$ g/ml, leupeptina 5  $\mu$ g/ml, benzamidina 0,1 mM e DTT 0,5 mM) e incubado sob agitação a 4 °C durante 30 min. O extrato nuclear foi centrifugado durante 15 min a 13.000

g e o sobrenadante foi aliqotado e armazenado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A concentração de proteínas foi determinada conforme as instruções do fabricante do kit de dosagem de proteínas (BioRad®).

O ensaio de deslocamento em gel (EMSA) foi realizado com kit da Promega, de acordo com as determinações do fabricante. A sonda contendo o oligonucleotídeo NF- $\kappa$ B foi marcada (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') (Promega) com [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (DuPont, New England), na presença de T4 quinase (10 min,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Os nucleotídeos não incorporados foram removidos em coluna de Sephadex G-25 (Pharmacia). Um volume de  $10\text{ }\mu\text{l}$  dos extratos nucleares foi incubado em tampão de ligação contendo: Tris-HCl 10 mM, pH 7.5,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, NaCl 50 mM, DTT 0,5 mM, EDTA 0,5 mM, glicerol 4% e  $1\text{ }\mu\text{g}$  de poli (dI:dC), durante 20 min, em temperatura ambiente. Após a adição de 25.000 cpm do oligonucleotídeo NF- $\kappa$ B marcado com fósforo, as amostras foram incubadas durante 30 min e colocadas em gel não-desnaturante (acrilamida:bisacrilamida 6%, em tampão Tris-borato/EDTA), em 150 V, durante 20 min. O gel foi secado a vácuo e exposto em autoradiografia (aproximadamente 16 h).

Para os estudos de competição, os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B ou TFIID (5'-GCAGAGCATATAAGGTGAGGTAGGA-3', fator não relacionado à família NF- $\kappa$ B, responsável pelo recrutamento da RNA polimerase II) foram incubados com a sonda marcada, a fim de detectar interações não específicas. Células HeLa foram utilizadas como controle positivo.

### 3.7 Modificações histológicas

A fim de avaliar alterações teciduais causadas pela injeção intraplantar de glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) ou veículo (PBS) em camundongos, a região plantar das patas foi removida 15 min após a injeção de glutamato e embebida em formol 20%, em frascos escuros, até o início do processamento histológico. As amostras foram submetidas à análise macroscópica preliminar para a seleção do material. Em seguida foram identificadas e colocadas em cápsulas metálicas e, estas, inseridas em cesta de metal do aparelho histotécnico. No aparelho, as amostras foram sucessivamente imersas em 10 cubas com a finalidade de: 1) nas primeiras 4 contendo etanol absoluto, desidratar, 2) nas 4 cubas seguintes contendo xilol, clarear e 3) nas 2 últimas cubas contendo parafina, endurecer. As amostras permaneceram 1 h em cada etapa. As cápsulas, contendo os segmentos desidratados e parafinados, foram então retiradas do aparelho histotécnico e cada fragmento foi envolto num quadrado metálico de Leockart e embebido em parafina líquida. Os blocos foram deixados em geladeira para a completa solidificação e posteriormente cortados em fatias de 3  $\mu\text{m}$  de espessura, com o auxílio de um micrótomo. As fatias foram então desparafinizadas em banho-maria e o material histológico foi delicadamente transferido para lâminas de vidro. As lâminas foram secas em estufa (durante 5 a 10 min), coradas com hematoxilina-eosina e montadas com entelan e lamínula. Foram avaliados: edema intersticial, infiltração celular e congestão vascular.

### 3.8 Medida do desempenho motor

Com o intuito de verificar possíveis efeitos relaxantes musculares não específicos ou sedativos dos antagonistas utilizados sobre o sistema nervoso central, os animais tiveram seu desempenho avaliado no teste do *rota-rod* (Rosland et al., 1990). O aparelho de *rota rod* (Ugo Basile, Modelo 7600) consiste em um cilindro com 2,5 cm de diâmetro, subdividido em seis compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro. O cilindro gira a uma velocidade constante de 22 rotações por minuto. Os camundongos foram selecionados com 24 h de antecedência para eliminar aqueles que não permaneciam sobre a barra durante dois períodos consecutivos de 60 s. No dia do experimento, os animais foram tratados com a dose máxima dos antagonistas utilizada nas curvas dose-resposta ou com os respectivos veículos concomitantemente ou com o mesmo tempo de antecedência antes de serem submetidos ao teste. O resultado foi expresso como tempo (s) que os animais permaneceram sobre o *rota-rod*.

### 3.9 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M., 95%), exceto os valores de DE<sub>50</sub> ou DI<sub>50</sub> (por exemplo: a dose de glutamato capaz de produzir 50% de resposta máxima ou a dose da droga capaz de produzir ou reduzir a resposta, respectivamente, em 50% em relação ao valor máximo do controle), que estão apresentados como as médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança de 95%. Os valores de DI<sub>50</sub> e DE<sub>50</sub> foram determinados através de interpolação gráfica em papel semilogarítmico de experimentos individuais. As percentagens de inibição

representam a média das inibições obtidas para cada experimento individual. A diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi avaliada através de análise de variância seguida pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett ou pelo teste de Newmann Keuls, quando apropriado. Valores de P menores que 0,05 (\*P<0,05 e \*\*P<0,01) foram considerados como indicativos de significância.

### 3.10 Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas: ácido L-glutâmico, L-N<sup>ω</sup>-nitro-arginina (L-NOARG), L-arginina, D-arginina, des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK, fucoidina, capsaicina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina fragmento 8-37 (CGRP<sub>8-37</sub>) (Sigma Chemical Company, St. Louis, U.S.A.), 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[f]quinoxalina-7-sulfonamida dissódio (NBQX), (RS)- $\alpha$ -etil-4-carboxifenilglicina (E4CPG), ácido D- $\gamma$ -glutamilaminometanesulfônico (GAMS), dizocilpina (MK 801), (Research Biochemicals International, Natick, MA, U.S.A.), Chicago sky blue 6B e felbamato (Tocris, U.S.A.). O SNAP foi gentilmente fornecido pelo Dr. Jamil Assreuy, Departamento de Farmacologia, UFSC. O antagonista seletivo de receptores NK1, FK 888 (N2-[(4R)-4-hidroxi-1-(1-metil-1H-indol-3-il)carbonil-L-prolil]-N-metil-N-fenil-metil-3-(2-naftil)-L-alaninamida) foi gentilmente cedido pela Fujisawa Pharmaceutical Co. (Osaka, Japão). Os antagonistas seletivos de receptores NK2 (SR 48968, (S)-N-metil-(N[4-acetilamino-4-fenilpiperidina)-2-(3,4-diclorofenil) butil] benzamida) e NK3 (SR 142801, (S)-(N)-(1-(3-(1-benzoil-3-(3,4-diclorofenil)piperideno-3-il)propil)-4-fenilpiperidina-4-il)-N-metilacetamida) foram gentilmente cedidos pela Sanofi Recheché (Montpellier, França). O antagonista seletivo de receptores B<sub>2</sub>, HOE

140 ([D-Arg-(Hip3,Ti5,D-Tic7,Oic8]bradicinina) foi gentilmente cedido pela Hoechst (Frankfurt, Alemanha). Todas as drogas, com exceção da capsaicina, foram dissolvidas em solução tampão fosfato (PBS) imediatamente antes do uso.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Nocicepção e edema induzidos pela injeção intraplantar de glutamato

A administração i.pl. de glutamato (0,3 - 60,0  $\mu\text{mol}/20 \mu\text{l}$ ) na pata traseira de camundongos causou nocicepção dependente da dose, efeito que foi caracterizado pela resposta comportamental de lambe o membro injetado (figura 3 A e B). A resposta nociceptiva induzida pela injeção i.pl. de glutamato foi evidente até 15 min após a aplicação, diminuindo entre 15 e 30 min, sendo praticamente ausente dos 30 a 40 min (figura 3 A). O valor da  $DE_{50}$  (e limite de confiança 95%) para estes efeitos (calculada entre 0 e 15 min) foi 2,6 (1,6 - 4,3)  $\mu\text{mol}/\text{pata}$  (figura 3 B). A resposta nociceptiva máxima (tempo de lambda:  $84,8 \pm 13,2$  s) foi observada após a aplicação da dose de 30,0  $\mu\text{mol}/\text{pata}$  de glutamato (figura 3 B). A figura 4 demonstra soluções com baixo pH não são capazes de provocar respostas comportamentais espontâneas indicativas de dor, o que poderia ser esperado para a solução de glutamato, que tem um pH em torno de 2.0. Além de causar nocicepção, a injeção i.pl. de glutamato também causou aumento do volume da pata até 40 min após a sua injeção, efeito que também foi

dependente da dose empregada. A formação máxima de edema, assim como a nocicepção, foi observada 15 min após a injeção i.pl. de glutamato (resultados não apresentados). O valor da  $DE_{50}$  para este efeito foi 0,5 (0,4 - 0,7)  $\mu\text{mol/pata}$  (cerca de 5 vezes menor que o valor da  $DE_{50}$  para a nocicepção). A resposta edematogênica máxima ( $77,8 \pm 3,5$  mg) também foi observada 15 min após a aplicação da dose de 10,0  $\mu\text{mol/pata}$  de glutamato (figura 5). Como pode ser observado na figura 6, há um aumento da concentração de azul de Evans nas patas tratadas com glutamato (30,0  $\mu\text{mol/i.pl.}$ ), o que demonstra extravasamento plasmático nesse tecido. Com base nestes experimentos, o tempo de 0 a 15 min foi adotado para a análise do efeito das drogas sobre a nocicepção induzida pelo glutamato.

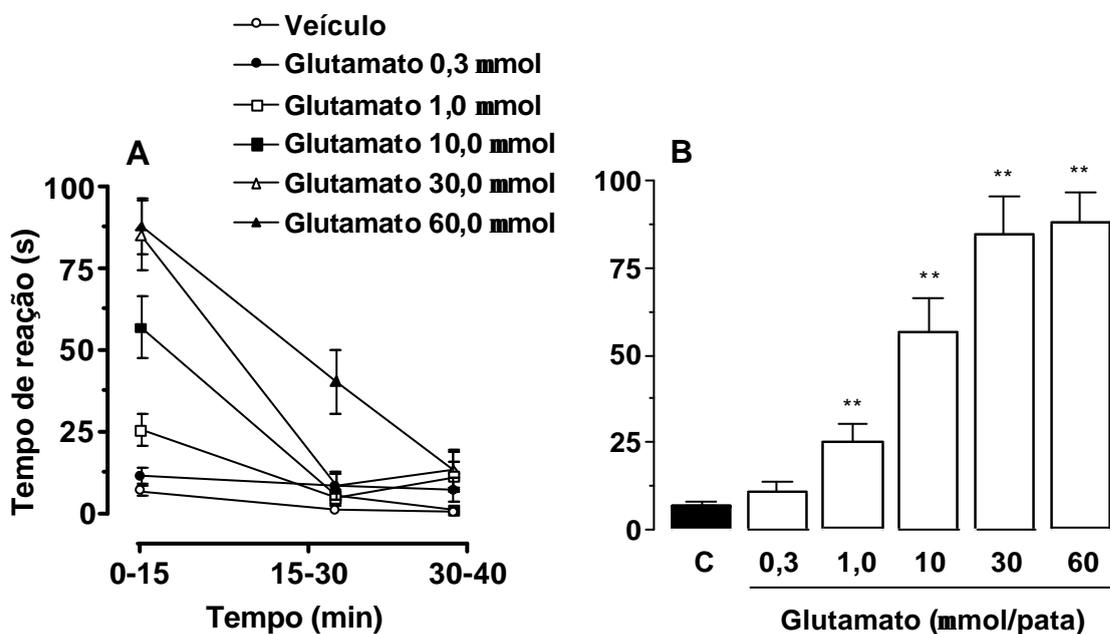


Figura 3 – Curva da resposta relacionada à dose de glutamato aplicada (0,3 - 60,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) e ao tempo de resposta (A). Nocicepção relacionada à dose isoladamente (B), causada pela injeção de glutamato ou veículo (20  $\mu\text{l/i.pl.}$ ), no tempo de 15 min, representada pelo comportamento de lambe a pata. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 12 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação com os grupos controle, \*\* $P < 0,01$ .

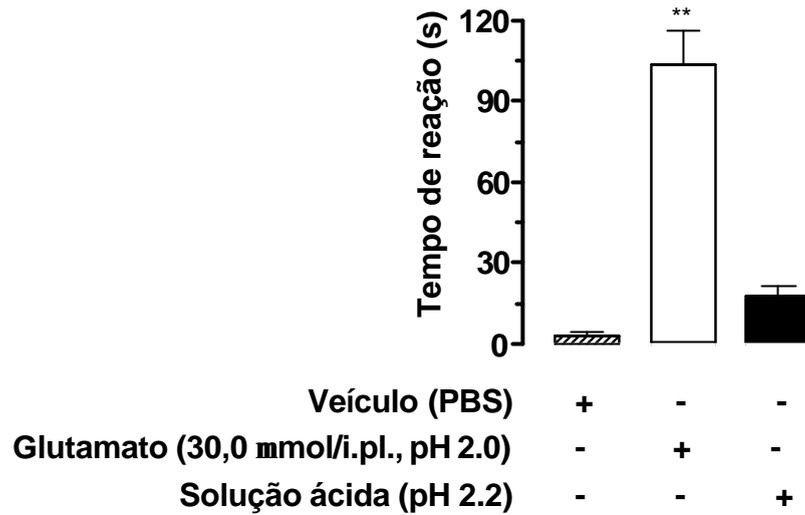


Figura 4 – Nocicepção induzida por glutamato (30  $\mu\text{mol}/\text{i.pl.}$ , pH 2.0), veículo (PBS, 20  $\mu\text{l}/\text{i.pl.}$ ) ou solução ácida (pH 2.2), representada pelo comportamento de lambe a pata. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 12 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação com os grupos controle, \*\* $P < 0,01$ .

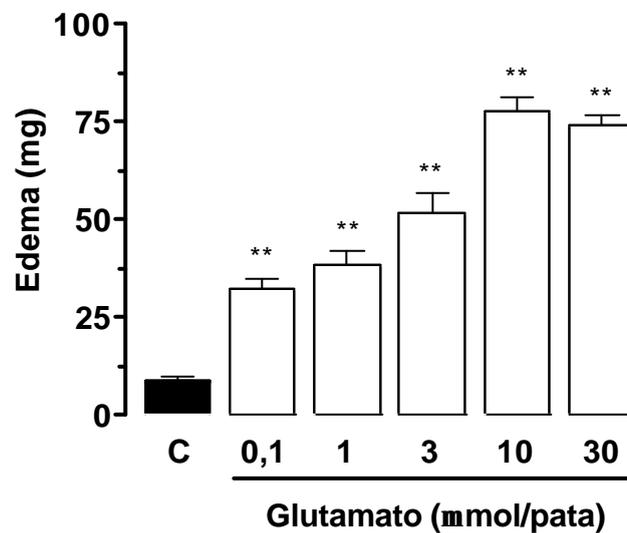


Figura 5 – Edema de pata de camundongo causado injeção i.pl. de glutamato (0,1 - 30,0  $\mu\text{mol}/20 \mu\text{l}$ ) ou veículo (PBS, 20  $\mu\text{l}/\text{i.pl.}$ ) após 15 min. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação com os grupos controle, \*\* $P < 0,01$ .

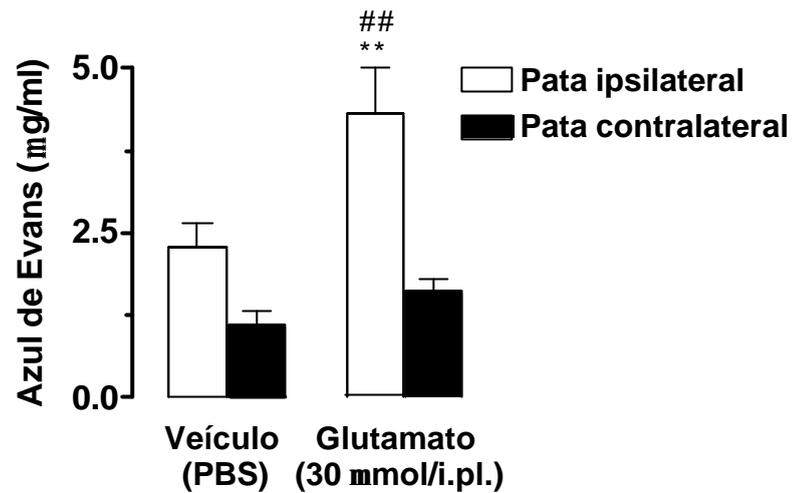


Figura 6 – Extravasamento plasmático avaliado pela medida da concentração de azul de Evans nos tecidos após a injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) ou veículo (PBS, 20  $\mu\text{l/i.pl.}$ ), avaliado após 15 min. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-8 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação com os grupos controle, \*P<0,05 e \*\*P<0,01, ##P<0,01, diferente do tratamento com glutamato

No sistema nervoso central, células da glia têm a capacidade de captar o glutamato para proteger os tecidos de seu efeito tóxico. Portanto, também foi investigado no presente estudo, a possibilidade do glutamato, quando injetado diretamente na pata de camundongos, estar sendo removido por células de Schwann, que correspondem às células da glia no sistema nervoso periférico (Raine, 1994). Para testar esta hipótese, grupos de animais foram pré-tratados com Chicago sky blue 6B (100  $\mu\text{g/kg}$ , i.p., 30 min antes), uma droga que inibe a captação de glutamato (Roseth et al. 1995). Os resultados da figura 7 A demonstram que o Chicago sky blue 6B foi capaz de reduzir significativamente o valor da  $DE_{50}$  para a nocicepção induzida pelo glutamato. O mesmo tratamento com Chicago sky blue 6B (100,0  $\mu\text{g/kg}$ , i.p.) não causou redução do valor da  $DE_{50}$

para o edema de pata induzido por glutamato, ao contrário, causou uma redução significativa da formação de edema nas maiores doses de glutamato utilizadas (1 a 30  $\mu\text{mol/pata}$ ) (figura 7 B).

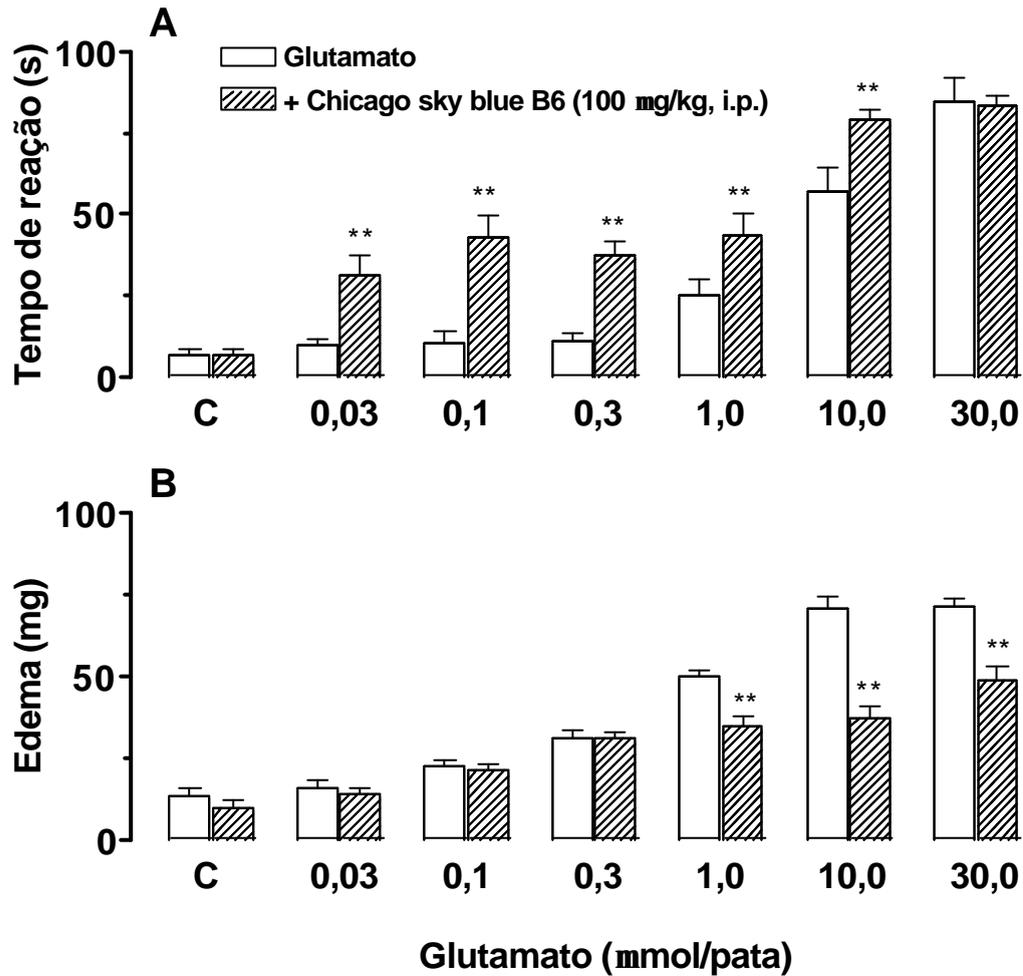


Figura 7 - Efeito do pré-tratamento dos animais com Chicago sky blue 6B (colunas listradas) em relação à nocicepção (A) e ao edema (B) induzidos pela injeção i.pl. de glutamato (0,3 - 30,0  $\mu\text{mol}/20 \mu\text{l}$ ) em camundongos. O tempo total que o animais permaneceram lambendo a pata traseira foi medido durante 15 min após a injeção intraplantar de glutamato. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância quando comparados aos grupos controle, \*\*P<0,01.

## 4.2 Influência de diversos sistemas sobre a nocicepção e edema de pata induzidos por glutamato

### Participação dos receptores glutamatérgicos

O MK 801, quando administrado por via i.pl. (0,01-1,0  $\mu\text{mol/pata}$ ), causou inibição dependente da dose quando avaliado na resposta nociceptiva sem afetar significativamente o edema de pata induzido pelo glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) (figura 8 A e B). A inibição máxima e o valor da  $\text{DI}_{50}$  obtidos para esses efeitos foram  $85 \pm 3\%$  e 56,7 (43,1 – 74,7) nmol/pata. A administração de NBQX (3,6-36,0  $\mu\text{mol/pata}$ ), SYM 2206 (60-180 nmol/pata) (figura 9), E4CPG (1,0 - 10,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) (figura 10) ou felbamato (0,1-0,8  $\mu\text{mol/i.pl.}$ ) (figura 11), inibiram significativamente a nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ ). As inibições máximas para esses efeitos foram:  $29 \pm 11\%$ ,  $31 \pm 11\%$ ,  $31 \pm 3\%$  e  $34 \pm 5\%$ . Além de diminuir a nocicepção, ao contrário do observado para o E4CPG, SYM 2206 ou felbamato, o NBQX também foi capaz de reduzir em  $17 \pm 5\%$  o edema de pata induzido pela injeção i.pl. de glutamato (figura 9 B).

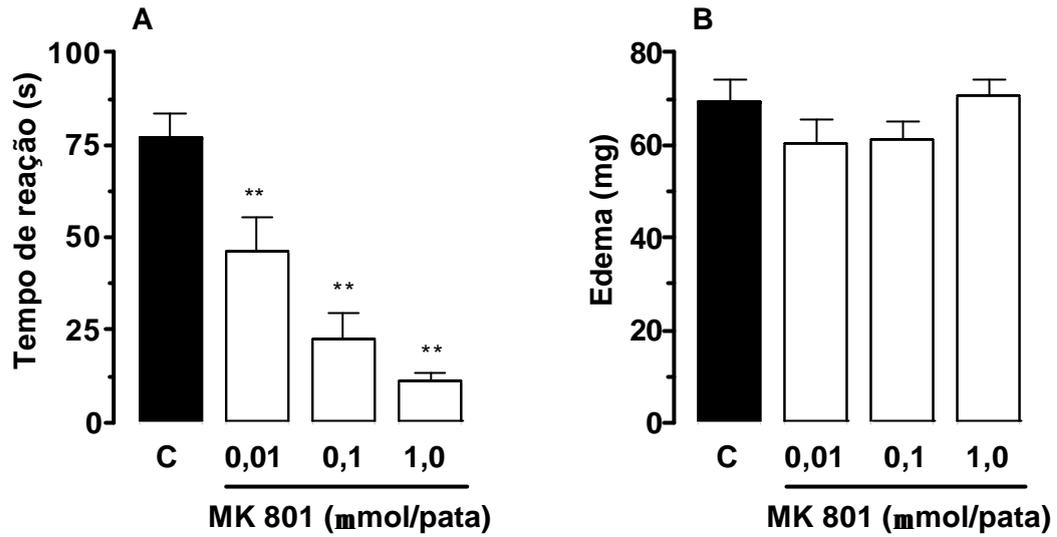


Figura 8 – Efeito do MK 801 administrado através da via i.pl. em relação à nocicepção (A) e ao edema (B) induzidos por glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) em camundongos. O tempo total despendido lambendo a pata traseira foi medido durante 15 min após a injeção intraplantar de glutamato. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-10 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação aos grupos controle, \*\* $P < 0,01$ .

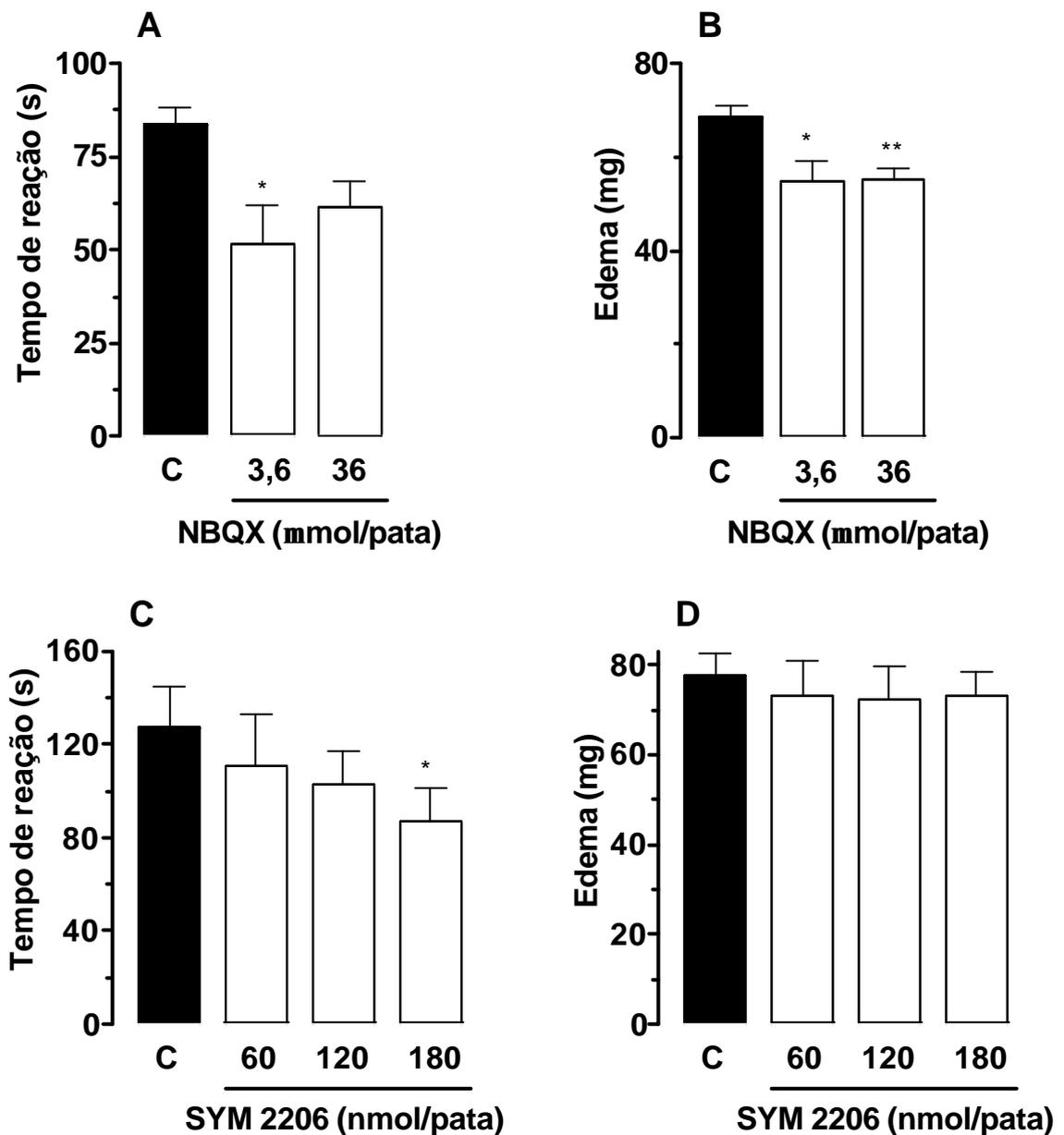


Figura 9 - Efeito do NBQX ou SYM 2206 administrados intraplantarmente em relação à nocicepção (A e C) e ao edema (B e D) induzidos pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) em camundongos. O tempo total despendido lambendo a pata traseira foi medido durante 15 min após a injeção intraplantar de glutamato. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-10 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação aos grupos controle, \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ .

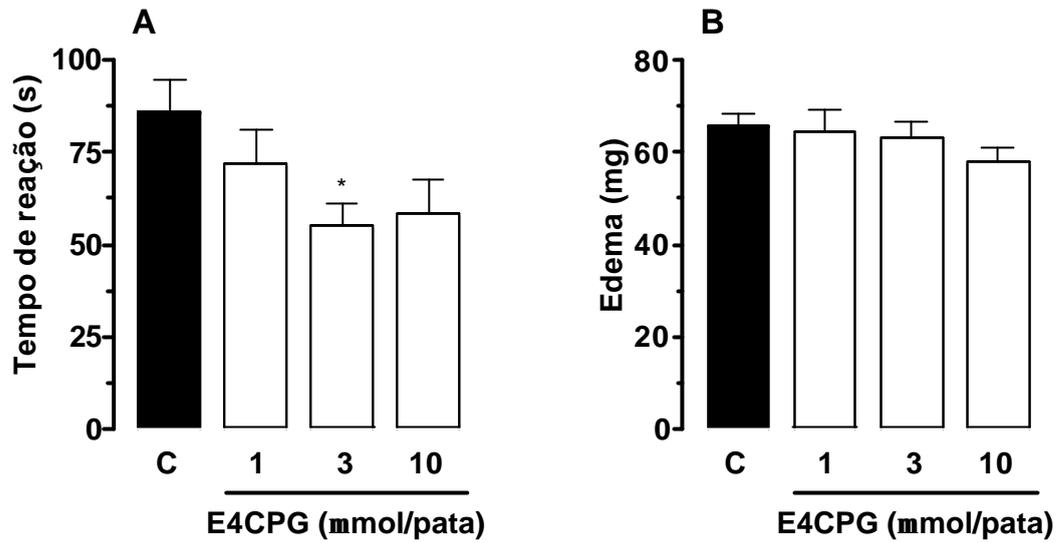


Figura 10 - Efeito do E4CPG administrado intraplantarmente em relação à nocicepção (A) e ao edema (B) induzidos pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu$ mol/pata) em camundongos. O tempo total despendido lambendo a pata traseira foi medido durante 15 min após a injeção intraplantar de glutamato. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-10 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação aos grupos controle, \* $P < 0,05$ .

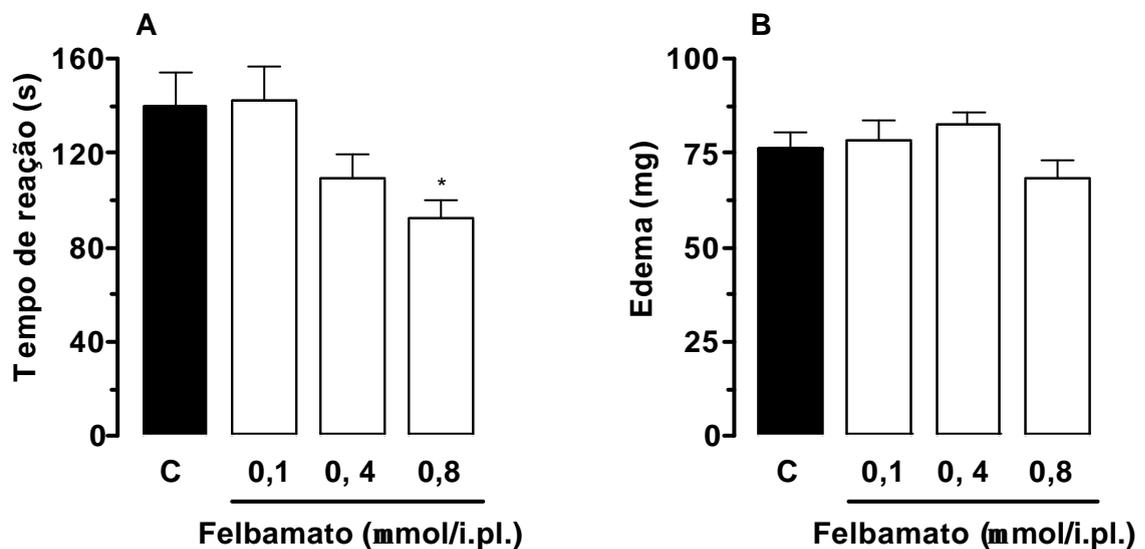


Figura 11 - Efeito do felbamato, administrado intraplantarmente, em relação à nocicepção (A) e ao edema (B) induzidos pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu$ mol/pata) em camundongos. O tempo total despendido lambendo a pata traseira foi medido durante 15 min após a injeção intraplantar de glutamato. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-10 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação aos grupos controle, \* $P < 0,05$ .

### Participação da via L-arginina / óxido nítrico

A participação da via L-arginina/óxido nítrico na nocicepção e no edema de pata induzidos pelo glutamato foi confirmada com o uso de um inibidor da atividade da óxido nítrico sintase, L-NOARG, administrado aos animais através da via i.pl. (0,5 - 1,4  $\mu$ mol/pata) (figura 12) ou i.p. (0,1 - 1,1 mmol/kg) (figura 13). As inibições máximas obtidas para esses efeitos foram  $39 \pm 9\%$  e  $86 \pm 4\%$ , respectivamente. O valor de  $DI_{50}$  obtida para a administração i.p. foi 0,3 (0,2 - 0,4) mmol/kg. Quando administrada através da via i.p., ao contrário da via i.pl., a L-NOARG também causou redução de  $25 \pm 4\%$  no edema de pata induzido pela injeção i.pl. de glutamato (figura 13 B). Os efeitos antinociceptivos e a inibição do edema causados pela L-NOARG (0,3 mmol/kg, i.p.) foram revertidos pelo pré-tratamento dos animais com L- mas não D-arginina (3,4 mmol/kg, i.p.) (figura 14 A e B). A administração de ambas L- e D-arginina (3,4 mmol/kg, i.p.) isoladamente não afetou significativamente a nocicepção e o edema de pata induzidos pelo glutamato. Além disso, a co-administração i.pl. de SNAP (0,01 - 1,0  $\mu$ mol/pata) potencializou significativamente a nocicepção e o edema induzidos por doses submaximamente efetivas de glutamato (0,01 ou 10,0  $\mu$ mol/pata) (figuras 15 A e B, respectivamente).

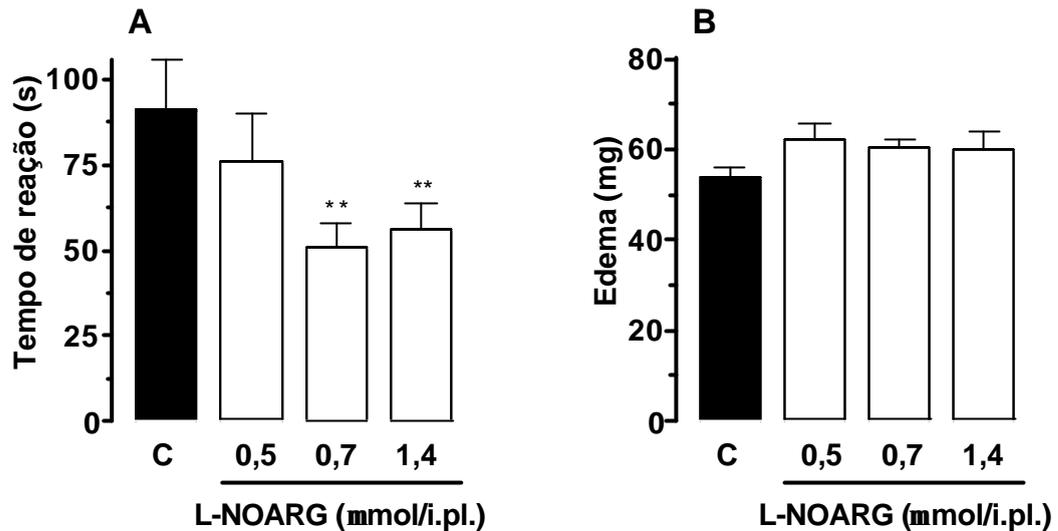


Figura 12 – Efeito da L-NOARG administrada através da via i.pl. em relação à nocicepção (A) e ao edema (B) induzidos pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu$ mol/pata) em camundongos. O tempo total despendido lambendo a pata traseira foi medido durante 15 min após a injeção intraplantar de glutamato. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-10 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação aos grupos controle, \*\* $P < 0,01$ .

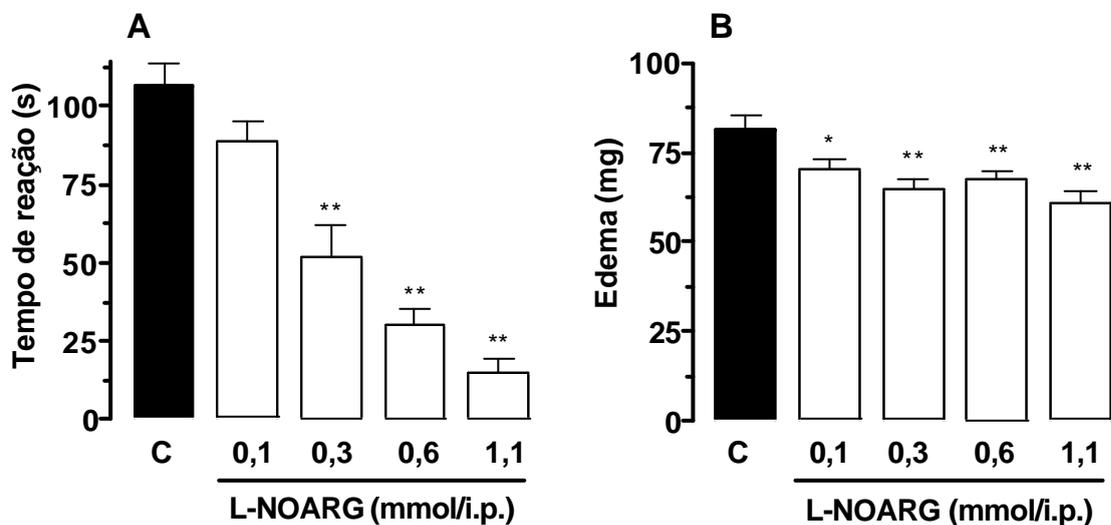


Figura 13 – Efeito da L-NOARG administrada através da via i.p. em relação à nocicepção (A) e ao edema (B) induzidos pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu$ mol/pata) em camundongos. O tempo total despendido lambendo a pata traseira foi medido durante 15 min após a injeção intraplantar de glutamato. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-10 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação aos grupos controle, \* $P < 0,01$  e \*\* $P < 0,01$ .

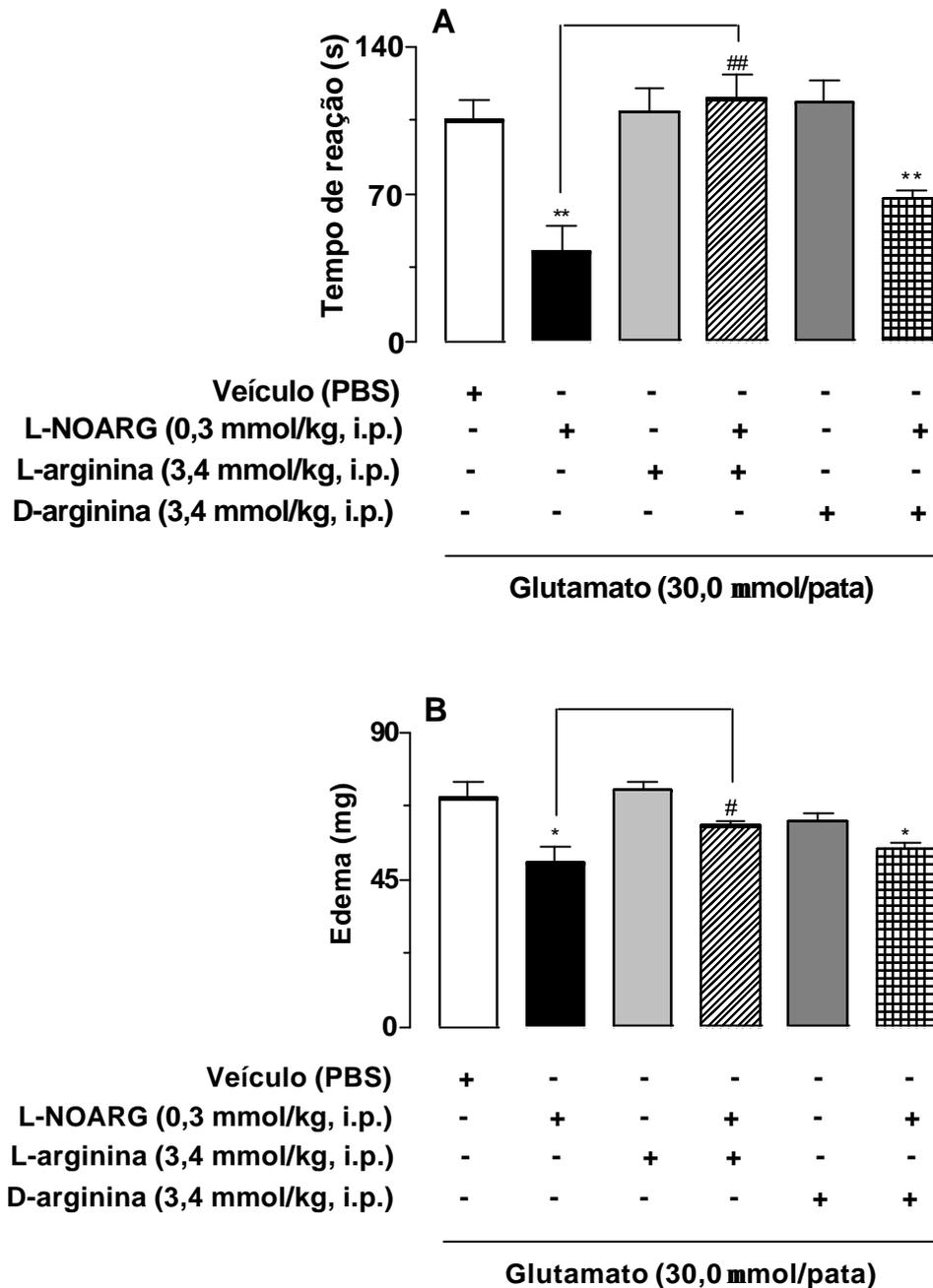


Figura 14 – Efeito do pré-tratamento dos animais com L- ou D-arginina 20 min antes da injeção de L-NOARG em relação à nocicepção (painel A) e ao edema de pata (painel B) induzidos pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu$ mol/pata) em camundongos. O tempo total despendido lambendo a pata traseira foi medido durante 15 min após a injeção intraplantar de glutamato. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-10 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação aos grupos tratados com veículo (controle), \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ . diferente do veículo e # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , diferente do tratamento com glutamato.

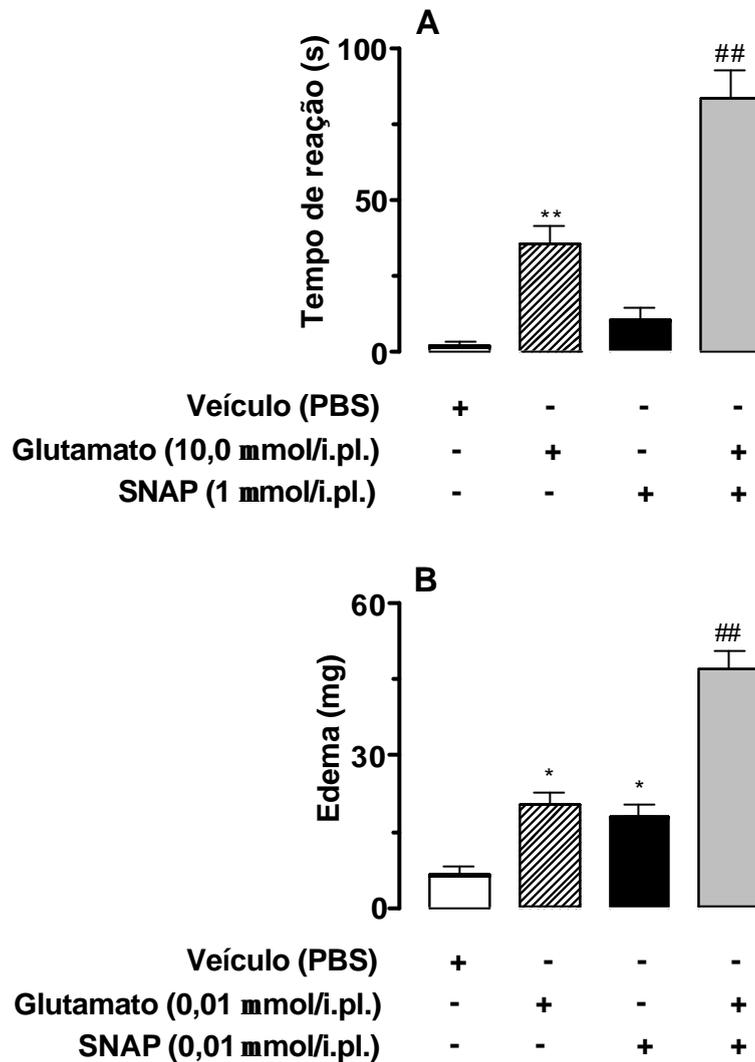


Figura 15 - Efeito do SNAP, co-injetado intraplantarmente com uma dose sublimiar de glutamato, sobre a nocicepção (A) e o edema de pata (B) induzidos pela injeção i.pl. de glutamato (0,01 – 10,0  $\mu$ mol/pata) em camundongos. O tempo total despendido lambendo a pata traseira foi medido durante 15 min após a injeção intraplantar de glutamato. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-10 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação aos grupos controle. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , diferente do veículo e ## $P < 0,01$ , diferente do tratamento com glutamato.

Os dados da figura 16 demonstram que a injeção i.pl. de glutamato (0,3 - 60,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) causou aumento significativo e dependente da dose do nível de nitrito no exsudato coletado das pata.

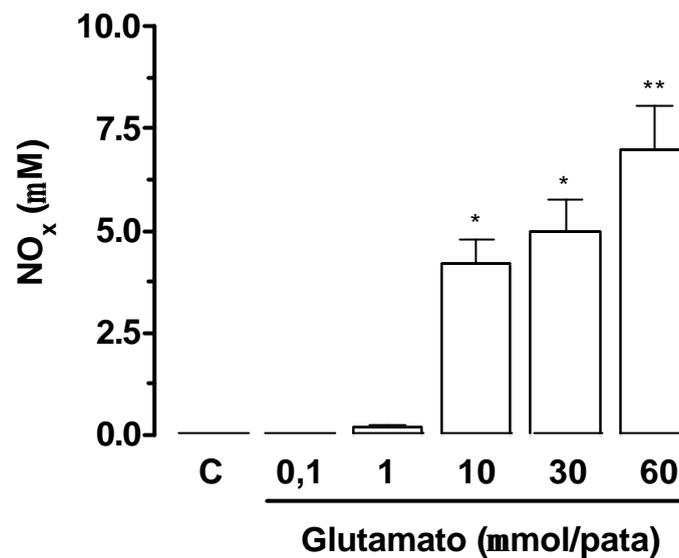


Figura 16 - Presença de NO<sub>x</sub> (NO<sub>2</sub>) no meio de reação, monitorada espectrofotometricamente através do reagente de Griess no exsudato das patas dos animais tratados intraplantarmente com veículo ou doses crescentes de glutamato. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4-6 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação ao grupo tratado com veículo, \*P<0,05 e \*\*P<0,01.

#### Participação de cininas, taquicininas e do CGRP

Quando administrados intraplantarmente, o SR 48968 (0,25-0,5 nmol/pata), e em menor extensão o FK 888 (0,5-1,0 nmol/pata), antagonistas de receptores NK<sub>2</sub> e NK<sub>1</sub>, respectivamente, causaram inibição significativa da nocicepção causada pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ ), sendo que as inibições

máximas obtidas foram:  $83 \pm 6\%$  e  $37 \pm 7\%$ , respectivamente (figura 17). O valor calculado da  $DI_{50}$  para a inibição da nocicepção causada pelo SR 48968 foi de 0,17 (0,13-0,24) nmol/pata. Ao contrário, o antagonista seletivo de receptores  $NK_3$ , SR 14801 (0,25-1,0 nmol/pata) não interferiu significativamente com a nocicepção induzida pelo glutamato (figura 18). Somente o antagonista seletivo de receptores  $NK_2$ , SR 48968, causou inibição significativa da formação de edema de pata após injeção i.pl. de glutamato ( $36 \pm 10\%$ ) (figura 17 D). O antagonista seletivo de receptores para o CGRP,  $CGRP_{8-37}$  (1,0 nmol/pata), co-injetado com glutamato (30,0  $\mu$ mol/pata), não afetou a nocicepção ou o edema induzidos pelo glutamato (figura 18). Na mesma dose, a injeção i.pl. de  $CGRP_{8-37}$  inibiu  $43 \pm 6\%$  o edema induzido pelo agonista  $B_1$ , des-Arg<sup>9</sup>-BK em ratos previamente tratados com LPS (resultados não apresentados).

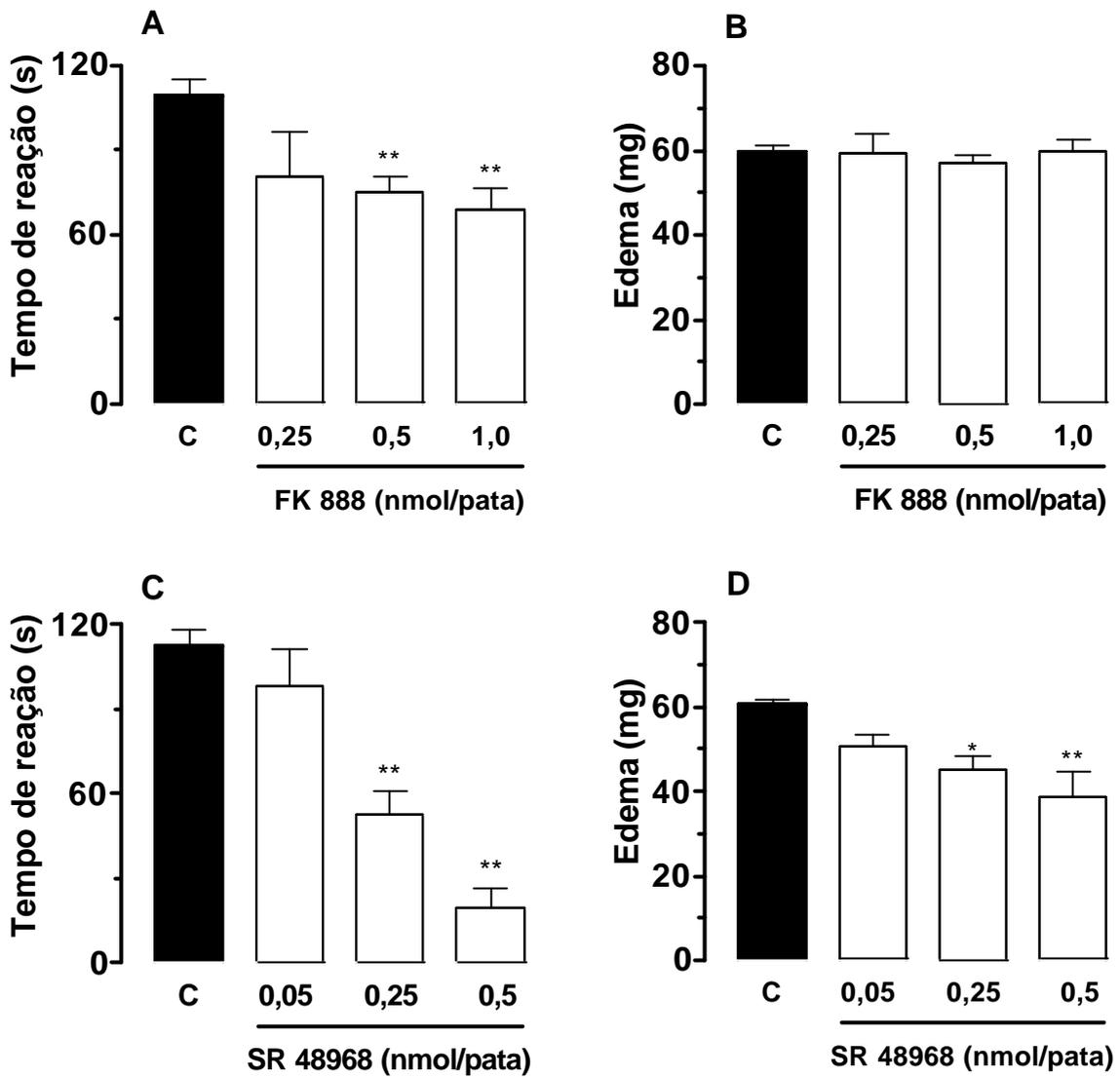


Figura 17 - Efeito do FK 888 ou SR 48968 co-injetados intraplantarmente em associação com glutamato sobre a nocicepção (A e C) e o edema (B e D) induzidos pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu$ mol/pata) em camundongos. O tempo total despendido lambendo a pata traseira foi medido durante 15 min após a injeção intraplantar de glutamato. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-10 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação aos grupos controle, \*\*P<0,01.

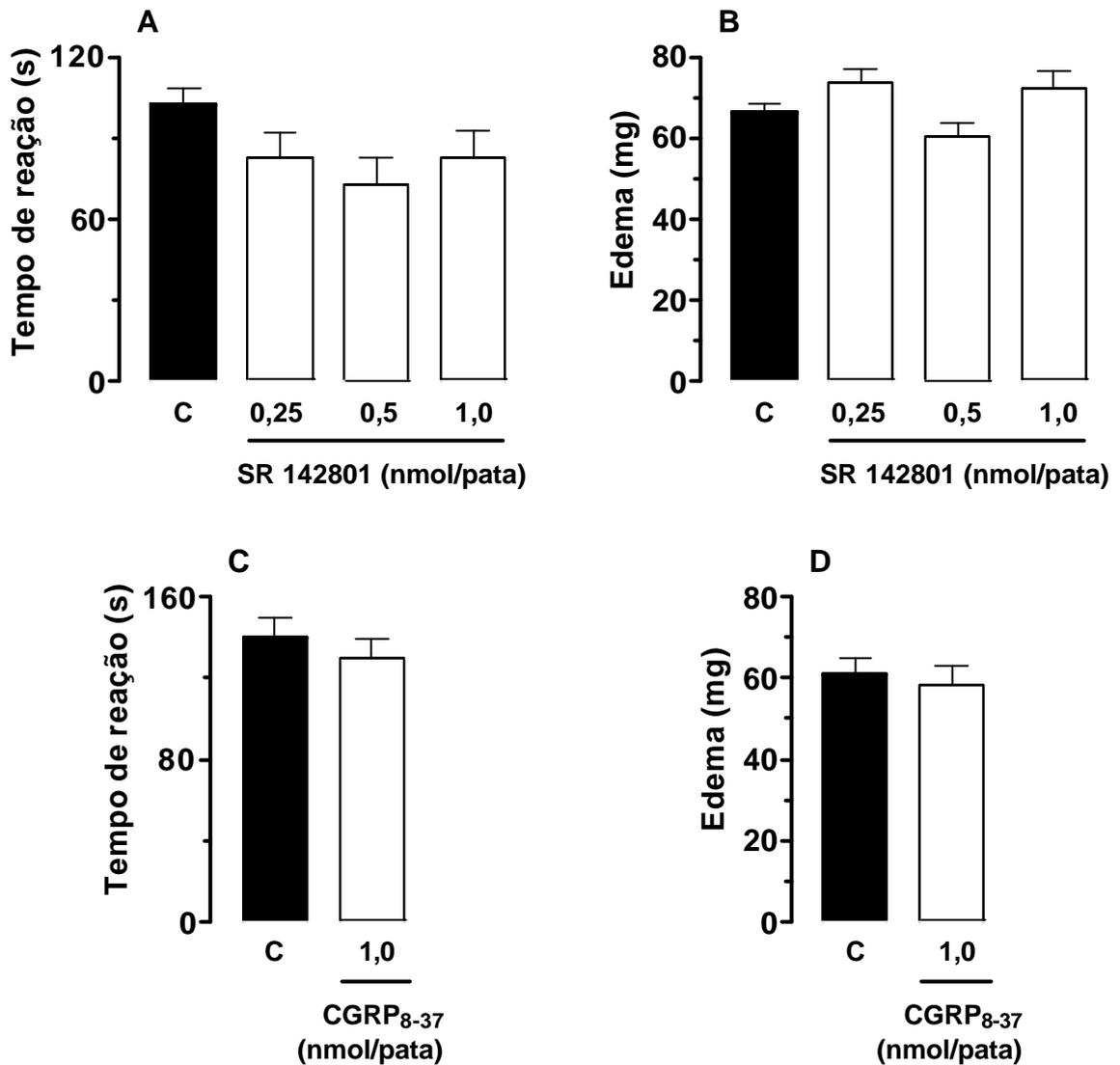


Figura 18 - Efeito do SR 142801 ou CGRP<sub>8-37</sub> co-injetados intraplantarmente em associação com glutamato sobre a nociceção (A e C) e o edema (B e D) induzidos pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu$ mol/pata) em camundongos. O tempo total despendido lambendo a pata traseira foi medido durante 15 min após a injeção intraplantar de glutamato. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-10 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação aos grupos controle, \*\*P<0,01.

A injeção local do antagonista seletivo de receptores B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK (0,4-0,8 nmol/pata), mas não do antagonista seletivo de receptores B<sub>2</sub>, HOE 140 (1,0-4,0 nmol/pata), quando co-administrado com glutamato (30,0  $\mu$ mol/pata),

inibiu significativamente a nocicepção (inibição máxima de  $53 \pm 6\%$ ), sem contudo interferir com o edema de pata induzido pela injeção i.pl. de glutamato (figura 19). O valor calculado da  $DI_{50}$  para o efeito antinociceptivo da des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK foi 0,4 (0,3-0,6) nmol/pata.

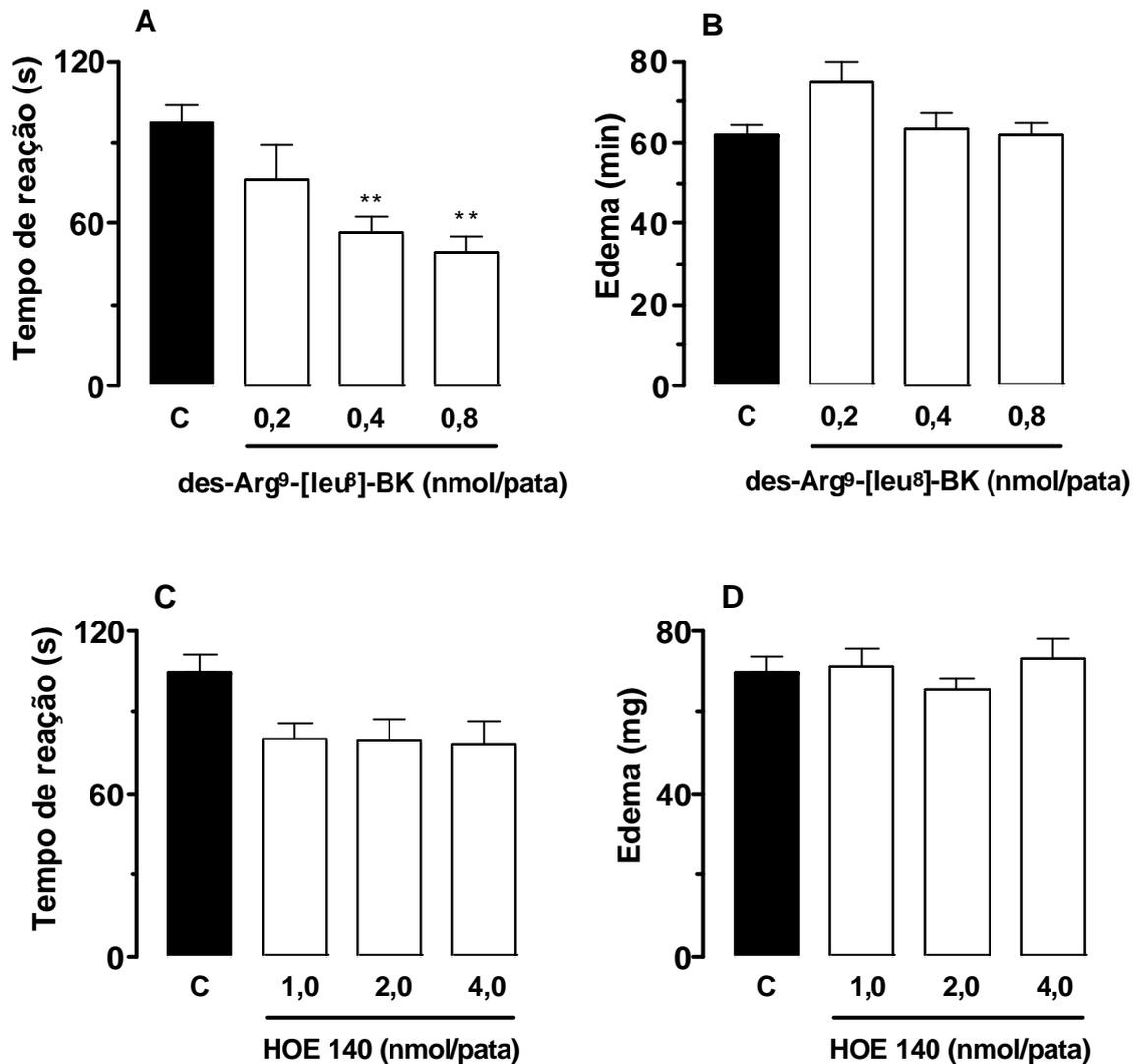


Figura 19 - Efeito da des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK ou HOE 140 co-injetados em associação com glutamato sobre a nocicepção (A e C) e o edema (B e D) induzidos pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu$ mol/pata) em camundongos. O tempo total despendido lambendo a pata traseira foi medido durante 15 min após a injeção intraplantar de glutamato. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-10 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação aos grupos controle, \*\*P<0,01.

### 4.3 Participação de fibras C sensíveis a capsaicina

O tratamento neonatal dos animais com capsaicina (50,0 mg/kg, s.c.) inibiu  $69 \pm 9\%$  da nocicepção e  $30 \pm 3\%$  do edema de pata causados pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) (figuras 20 A e B). O tratamento dos animais com capsaicina também causou inibição  $80 \pm 5\%$  da nocicepção e  $41 \pm 5\%$  do edema de pata induzidos pela injeção i.pl. de capsaicina (1,6  $\mu\text{g/pata}$ ). O tratamento neonatal com o veículo utilizado para dissolver a capsaicina não causou efeito significativo sobre a nocicepção e edema de pata induzidos por glutamato.

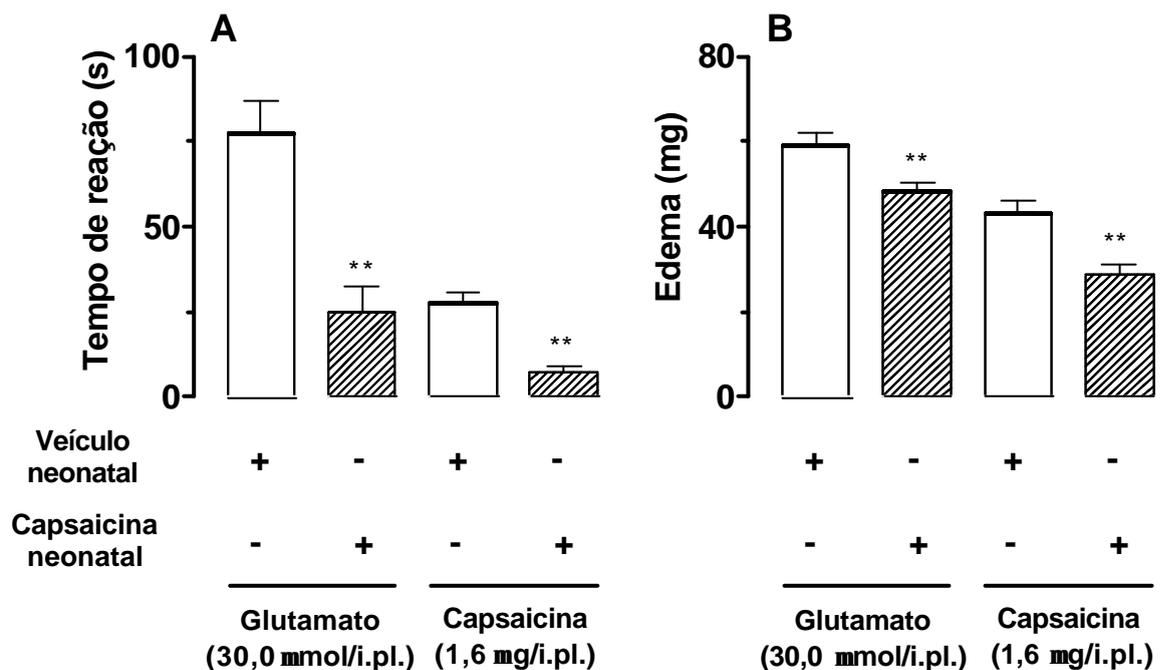


Figura 20 - Efeito do tratamento neonatal com capsaicina (50,0 mg/kg, s.c.) ou veículo (PBS, 10 ml/kg) sobre a nocicepção (A) e o edema de pata (B) induzidos pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) ou capsaicina (1,6  $\mu\text{g/pata}$ ). Cada coluna representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4-8 animais. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação aos grupos controle, \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.4 Participação da migração celular

O tratamento dos animais com fucoidina (25 mg/kg, e.v., uma vez ao dia, durante três dias) não causou alteração significativa da nocicepção ou edema de pata induzidos por glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ ) (figura 21 A e B).

Os resultados apresentados na figura 22 indicam que não houve alteração significativa da atividade da mieloperoxidase 15 min após o tratamento com glutamato (30,0  $\mu\text{mol/i.pl.}$ ), o aumento da sua atividade só aparece depois de 4 h e perdura até 24 h.

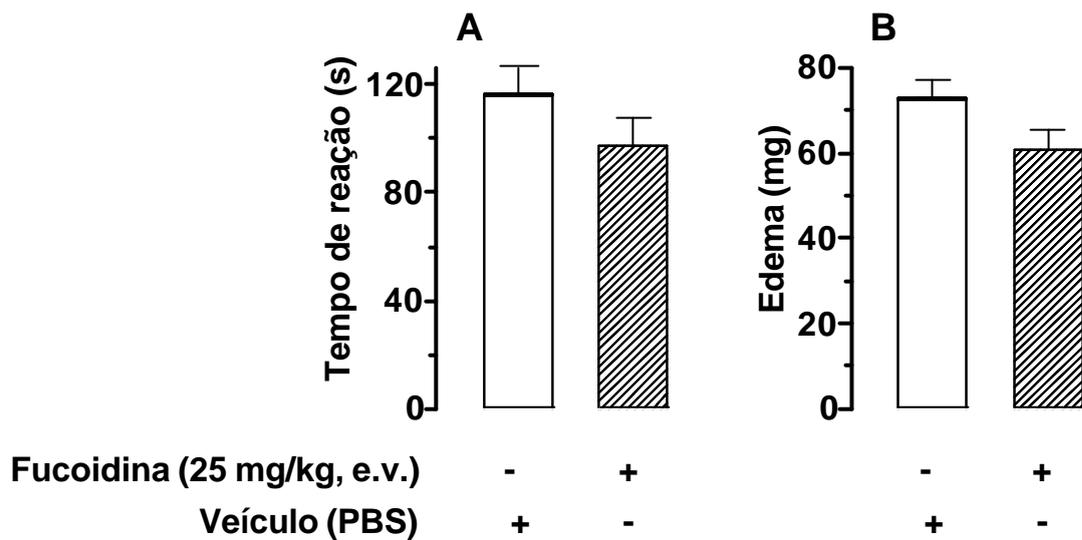


Figura 21 - Efeito do tratamento com fucoidina (25 mg/kg, e.v., uma vez ao dia, durante três dias) sobre a nocicepção (A) e o edema de pata (B) induzidos pela injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ ). Cada coluna representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-8 animais.

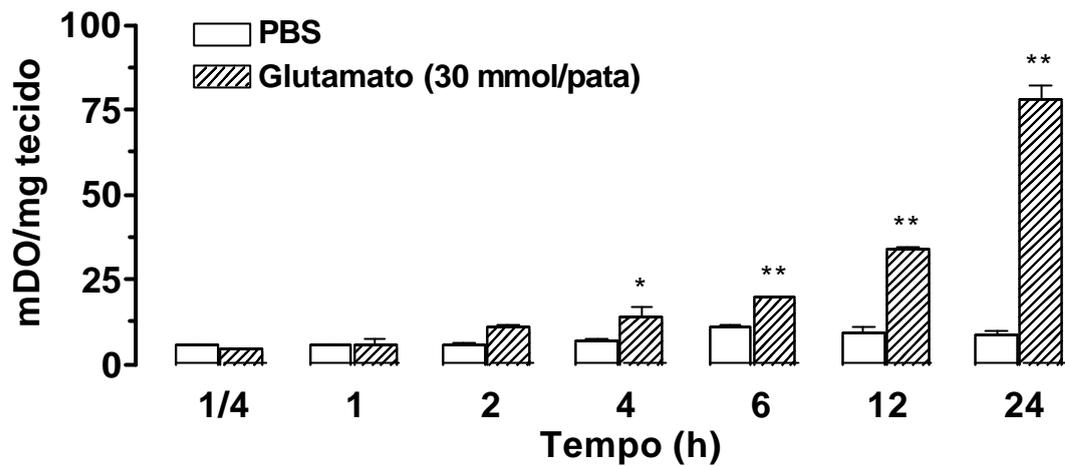


Figura 22 – Atividade da enzima mieloperoxidase, avaliada nos tempos de 15 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h e 24 h após a injeção i.pl. de glutamato (30,0  $\mu$ mol/pata). Cada coluna representa a média  $\pm$  E.P.M. de 3 animais e os experimentos foram realizados em duplicata. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação aos grupos controle, \*P<0,05 e \*\*P<0,01.

#### 4.5 Ativação do fator nuclear $\kappa$ B

O resultado do ensaio de deslocamento em gel (EMSA) demonstrou que a injeção i.pl. de glutamato (30  $\mu$ mol/pata) ou veículo (PBS), pelo menos após 15 min, não promove a indução da ativação do NF- $\kappa$ B na pata de camundongos (figura 23).

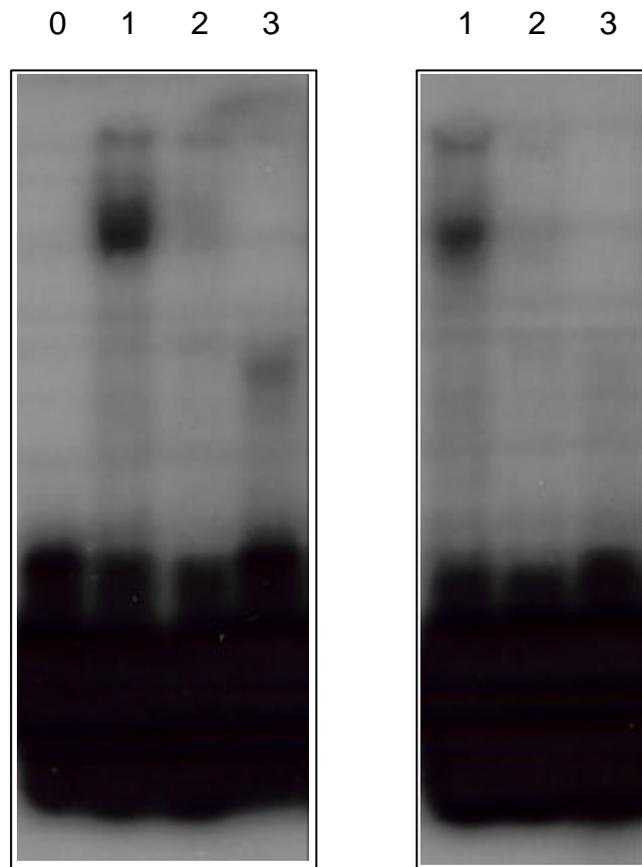


Figura 23 - Efeito do tratamento com glutamato ( $30,0 \mu\text{mol/pata}$ ) ou veículo (PBS) sobre a indução do NF- $\kappa$ B na pata de camundongos. Os resultados estão expressos qualitativamente e não quantitativamente por serem oriundos de um único experimento com duas amostras diferentes. 0. sonda; 1. pulmões de camundongos tratados com LPS; 2. patas tratadas com PBS; 3. patas tratadas com glutamato ( $30 \mu\text{mol/i.pl.}$ ).

#### 4.6 Modificações histológicas

As alterações morfológicas observadas 15 min após a injeção intraplantar de glutamato incluem congestão vascular e edema dérmico moderado (figura 24 C), além de linfócitos esparsos (figura 24 D).

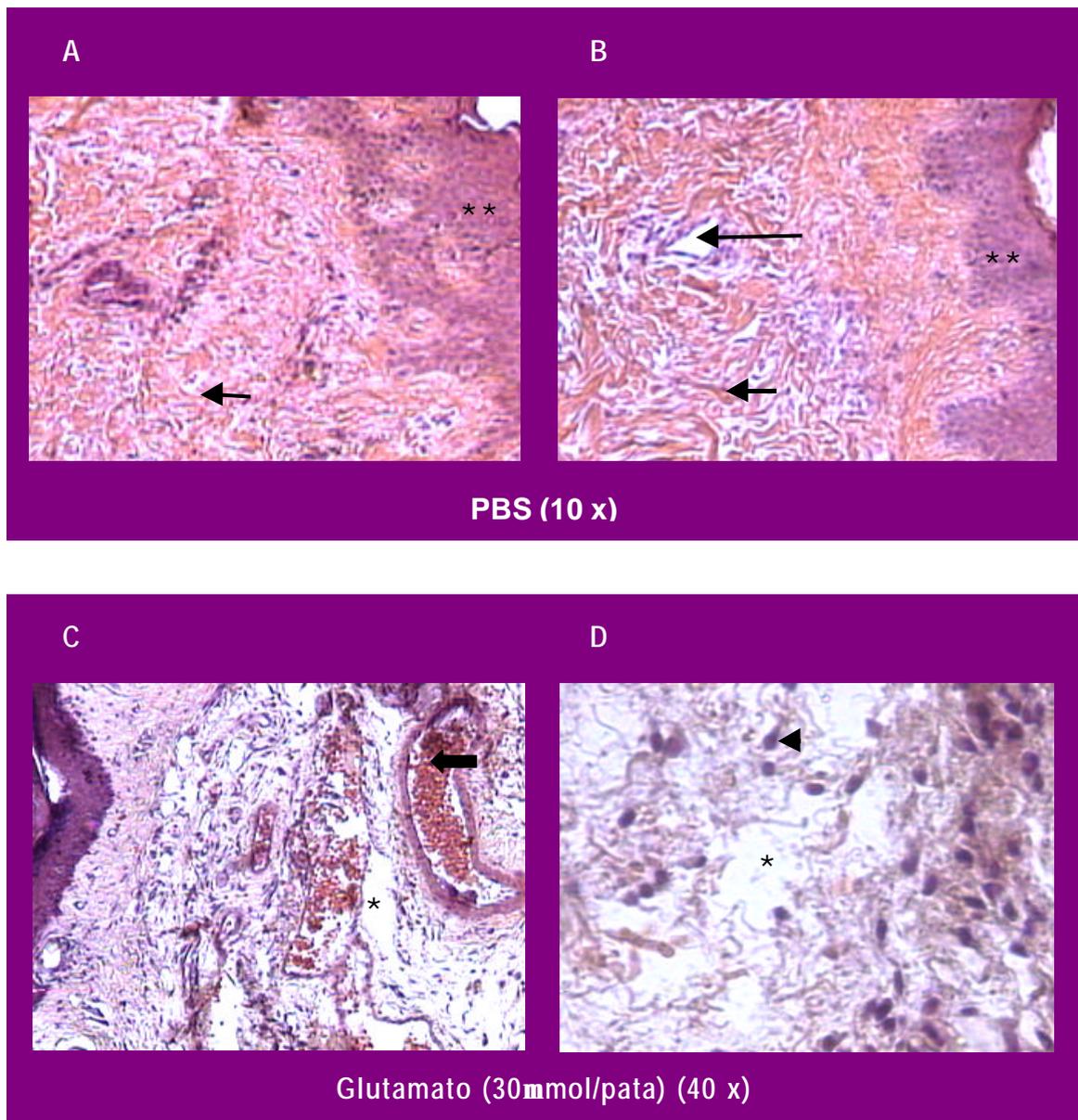


Figura 24 - Alterações morfológicas (teciduais) induzidas pela injeção intraplantar de veículo (PBS, A e B) ou glutamato (30,0  $\mu\text{mol/pata}$ , C e D) após 15 min, na pata de camundongos. \*\* = epitélio escamoso; seta fina e comprida = vaso sangüíneo; seta fina e curta = fibras do colágeno; \* = edema dérmico; seta larga = congestão vascular; ponta de seta = linfócitos esparsos.

#### 4.7 Medida do desempenho motor

Os antagonistas utilizados nos experimentos relatados nesta tese não alteraram significativamente a resposta motora dos animais (resultados não apresentados).

### 5. DISCUSSÃO

A dor fantasma<sup>11</sup>, tão bem descrita no depoimento que antecipa a introdução, não foi abordada neste trabalho, embora os receptores NMDA estejam intimamente envolvidos na hiperalgesia que se desenvolve no modelo de amputação da cauda, em camundongos (Zhuo, 1998). A citação tem a finalidade de nos lembrar do sofrimento que a dor impõe e da importância do desenvolvimento de novos modelos de dor experimental com o objetivo de desenvolver novas estratégias terapêuticas. Como diz sabiamente Jean-Marie Besson (França, 1997), “os principais modelos de dor experimental utilizados certamente não fornecem uma representação compreensiva de todas as síndromes relacionadas à dor encontradas na prática clínica, mas fornecem novos dados relativos aos aspectos fisiológicos, comportamentais e farmacológicos da dor”. Uma das principais vantagens do modelo descrito neste trabalho de nocicepção e edema de pata causados pela injeção intraplantar de glutamato e os mecanismos periféricos que parecem mediar estas respostas, é a possibilidade de buscar analgésicos que atuem localmente. A administração local de drogas

analgésicas é uma via segura, pois evita efeitos sistêmicos indesejáveis. O uso sistêmico de antagonistas de receptores glutamatérgicos, por exemplo, está associado ao prejuízo de aprendizado e memória, à diminuição do tônus muscular e à sedação (Cunningham et al., 1993). Esses efeitos variados mostram que os aminoácidos excitatórios estão distribuídos em muitas áreas do cérebro e, portanto, é fundamental a descoberta de drogas que atuem em subpopulações específicas de receptores ou que não atravessem a barreira hemato-encefálica.

Inúmeras evidências têm relacionado o sistema glutamatérgico, receptores e neurotransmissores, com a patofisiologia da dor aguda e crônica. Alguns autores descrevem modelos de dor causada por aminoácidos excitatórios ou por agonistas seletivos de seus receptores ionotrópicos e metabotrópicos, enquanto vários outros sugerem o potencial terapêutico de antagonistas seletivos desses receptores. Modelos de hiperalgesia térmica (Jackson et al., 1995) e mecânica (Carlton et al., 1995; Zhou et al., 1996; Coggeshall et al., 1997; Lawand et al., 1997; Leem et al., 2001), alodinia mecânica (Carlton et al., 1995; Zhou et al., 1996; Lawand et al., 1997) e nocicepção espontânea (Menéndez et al., 1997; Li e Clark, 2002; Scheidt et al., 2002) causada por agonistas glutamatérgicos já foram descritos na literatura. Existem ainda as pesquisas destinadas a caracterizar a presença e a função de aminoácidos excitatórios e a variação da expressão e o papel de seus receptores em modelos de dor aguda e crônica. No modelo clássico da dor induzida pela formalina, por exemplo, um estudo conduzido com ratos anestesiados mostra que há um aumento importante da liberação de glutamato (283%, com pico entre 40-45 min após a injeção) e aspartato (305%, com pico

---

<sup>11</sup> O conceito de dor fantasma é oriundo de relatos de pacientes que sofreram amputação e continuaram a sentir dor e outras sensações nos membros amputados (MacFarlane et al., 1997).

entre 90 min após a injeção) na pata dos animais durante as duas fases deste modelo, 0-10 min e 10-60 min após a injeção, consideradas dor aguda e inflamatória, respectivamente (Omote et al., 1998). Por outro lado, em estudo utilizando o mesmo modelo, realizado com ratos conscientes, foi observado o aumento da liberação de aminoácidos excitatórios como glutamato (92%) e aspartato (119%), além de taurina (84%) e glicina (57%), na região lombar da medula espinhal, principalmente nos primeiros 10 min após a injeção de formalina (Malmberg e Yaksh, 1995a; 1995b). De acordo com esses resultados, foi demonstrado o aumento da liberação de glutamato (43%) no corno dorsal da região lombar (L4) da medula espinhal somente nos primeiros min após a injeção de formalina (até 18 min), correspondentes à fase aguda da nocicepção. Aumento semelhante da liberação de glutamato (45%) no mesmo tecido ocorre cerca de 18 min após a injeção intraplantar de zimosan (Vetter et al., 2001). Além disso, nos primeiros 10 min após a estimulação da junção temporomandibular de ratos anestesiados com óleo de mostarda, um modelo de inflamação aguda, também ocorre um aumento da liberação de glutamato (> 35%) no núcleo trigeminal espinhal (Bereiter e Benetti, 1996). A estimulação elétrica ou a aplicação de capsaicina aumenta a liberação de glutamato (> 100%) a partir do nervo ciático de ratos (De Groot et al., 2000). Da mesma forma, o aumento da liberação de glutamato pode ser observado em fatias isoladas da medula espinhal obtidas de ratos sensibilizados a estímulos frios, antes do sacrifício, e expostas à presença de capsaicina *in vitro* (Okano et al., 1997). Desse modo, parece evidente que os aminoácidos excitatórios desempenham um papel fundamental na transmissão nociceptiva.

Os resultados do corrente estudo indicam que a injeção intraplantar de glutamato em camundongos causa comportamento característico de nocicepção, efeito de natureza claramente dependente da dose, que tem início rápido e curta duração (cerca de 15 min). A nocicepção observada após a injeção intraplantar de glutamato foi caracterizada pelo comportamento dos animais de manter a pata suspensa e próxima ao corpo, associado à reação de despender tempo lambendo, agitando ou mordendo-a; sinais evidentes de desconforto. Em alguns estudos que buscam caracterizar a relação entre o sistema glutamatérgico e a transmissão nociceptiva, o glutamato ou agonistas seletivos de receptores ionotrópicos ou metabotrópicos são administrados através da via intraplantar, mas, de maneira geral, o efeito é observado como hiperalgesia ou alodinia, e não dor espontânea. Em 1995, Carlton e colaboradores administraram doses crescentes de glutamato na pata de ratos e mostraram que esse neurotransmissor, quando aplicado exogenamente, causa alodinia e hiperalgesia mecânica. Porém, os autores verificaram que, com as doses utilizadas naquele estudo (0,01 a 1,0 mM), o glutamato não causou comportamento nociceptivo espontâneo, como é observado após a injeção de capsaicina ou formalina. No ano seguinte (1996), Zhou e colaboradores demonstraram que a injeção intraplantar de NMDA, AMPA e KA também é capaz de induzir alodinia e hiperalgesia mecânica em ratos, com doses que variaram de 0,001 a 10 mM, efeito bloqueado com o uso de antagonistas seletivos de cada receptor. De acordo com o descrito por Carlton e colaboradores (1995), Zhou e colaboradores (1996) não mencionam qualquer alteração comportamental causada pelas injeções dos agonistas, mas em ambos os estudos (supracitados) os animais foram anestesiados com halotano para a realização dos tratamentos e só ficaram totalmente despertos após 5 min, portanto é possível

que a observação da nocicepção espontânea tenha ficado comprometida. Até mesmo o comportamento nociceptivo resultante da injeção intraplantar de formalina (considerado "exagerado" pelos autores) é sutil em ratos e exige um observador atento (Carlton et al., 1995; Zhou et al., 1996). Jackson e colaboradores (1995) verificaram que a administração intraplantar de glutamato também causa hiperalgesia térmica, efeito que é reduzido pelo tratamento com antagonistas seletivos de receptores ionotrópicos. Após administrar concentrações elevadas (0,03 a 100  $\mu\text{mol}$ , em 50  $\mu\text{l}$ ) de glutamato na pata de ratos com o objetivo de caracterizar a interação entre receptores de adenosina e glutamatérgicos, Liu e colaboradores (2002) observaram que os aminoácidos excitatórios e outros agentes pró-nociceptivos (formalina, por exemplo) são capazes de induzir a liberação periférica de adenosina que, segundo os autores, atuando em receptores  $A_{2A}$ , exerceria um *feedback* negativo sobre a transmissão de estímulos nociceptivos por fibras sensoriais aferentes sensíveis à capsaicina. Curiosamente, os ratos utilizados no estudo de Liu e colaboradores foram anestesiados para a realização de microdiálise e, portanto, os autores não descrevem qualquer efeito comportamental causado pelo tratamento intraplantar com glutamato, mas consideram-no um estímulo potencialmente nociceptivo, uma vez que este aminoácido excitatório é liberado periféricamente após a injeção de formalina (Omote et al., 1998; Liu et al., 2002). Existem diferenças importantes entre estes estudos, especialmente em relação à dose de glutamato utilizada e ao tecido utilizado, o que dificulta a comparação.

Após a despolarização da membrana pré-sináptica e a liberação do conteúdo vesicular de glutamato, há um aumento significativo da sua concentração extracelular, chegando a ficar muito próxima daquela que causa

morte neuronal. Por conseguinte, para prevenir a excitotoxicidade é importante que a concentração extracelular de glutamato e sua compartimentalização sejam delicadamente controladas (Lipton e Rosenberg, 1994). Tal função é executada por transportadores de glutamato, presentes tanto nos neurônios quanto nos astrócitos e células de Schwann. Esses sistemas de captação e recaptção são úteis para manter a concentração de glutamato baixa na fenda sináptica e captá-lo para a reciclagem e posterior liberação. Em condições normais, o sistema transportador de glutamato pode reduzir sua concentração extracelular para 0,6  $\mu\text{M}$ , sendo que sua concentração máxima permitida nesse compartimento sem risco de toxicidade neuronal é de 1 a 5  $\mu\text{M}$  (Albers et al., 1994; Hansson et al., 2000). Os transportadores têm alta afinidade para glutamato e aspartato e são específicos para estes dois aminoácidos excitatórios. Cinco desses transportadores já foram identificados em humanos e denominados EAATs (transportadores de aminoácidos excitatórios) 1 a 5, sendo que os EAATs 2 e 3 são os homólogos dos transportadores GLT-1 e EAAC1, respectivamente, identificados inicialmente em ratos (Skerry e Genever, 2001). Embora as doses de glutamato utilizadas neste estudo sejam maiores do que as utilizadas em alguns estudos anteriores (Carlton et al. 1995; Jackson et al. 1995), os experimentos realizados na presença de um inibidor da captação de glutamato, o composto Chicago sky blue 6B (100,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.p.), tornam evidente que grande parte do glutamato administrada é removida, provavelmente pelas células de Schwann e em menor escala pelo neurônio sensorial, quando esse aminoácido é injetado na pata de camundongos. Os sistemas transportadores também estão presentes na pele, mais especificamente em queratinócitos e fibroblastos dermais, onde o glutamato participa da proliferação e sinalização celular (Skerry

e Genever, 2001); por conseguinte, essas células estariam colaborando para a captação de glutamato após sua injeção na pata de camundongos. Principalmente nas menores doses, 0,01 a 0,03  $\mu\text{mol/pata}$ , a nocicepção causada pelo glutamato é potencializada pelo tratamento com o inibidor do transporte de aminoácidos excitatórios, mostrando que, na sua presença, concentrações cerca de seis vezes menores de glutamato seriam necessárias para causar nocicepção espontânea.

Diversas evidências sugerem que existe uma liberação excessiva de aminoácidos excitatórios, principalmente glutamato, após lesões na medula espinhal ou após certos processos inflamatórios, sugerindo que estes neurotransmissores desempenham um papel relevante na transmissão nociceptiva (Westlund et al. 1992; Jackson et al. 1995; Zhou et al. 1996; McNearey et al. 2000). Recentemente, Lawand e colaboradores (2000) demonstraram que na inflamação articular no joelho de ratos, causada por uma mistura de caolin e carragenina, ocorre um aumento pronunciado e sustentado do nível de glutamato, chegando a cerca de 8  $\mu\text{M}$ , imediatamente após a indução da inflamação. Tendo em vista que drogas anestésicas locais como a lidocaína atenuam o aumento do nível de glutamato no sítio da inflamação, os mesmos autores concluíram que, embora se saiba que o glutamato pode ser liberado de diferentes células, no seu estudo, em particular, ele pode ser oriundo principalmente de neurônios sensoriais. Considerando os experimentos realizados com o inibidor da captação do glutamato, que diminui cerca de seis vezes o valor da  $\text{DE}_{50}$  para a nocicepção induzida pelo glutamato, é razoável predizer que as menores doses de glutamato utilizadas no presente estudo podem ser atingidas em processos traumáticos. Infelizmente, a maioria dos estudos que mostra o aumento da liberação de aminoácidos excitatórios após estímulos lesivos apresenta seus resultados em

porcentagem e não em concentração, o que torna difícil a comparação dos dados aqui relatados com a concentração de glutamato atingida nos estudos descritos na literatura. Em tecidos cerebrais, sob condições normais, a concentração de glutamato intracelular (na realidade, intravesicular) é de 10 mM e a concentração extracelular é de 0,6  $\mu\text{M}$ . Lesões por excitotoxicidade em neurônios hipocampais e corticais começam a ocorrer quando a concentração extracelular de glutamato atinge 2 a 5  $\mu\text{M}$  (Lipton e Rosenberg, 1994). A energia utilizada pelos transportadores de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) é obtida a partir de uma bomba de sódio e potássio que utiliza a seguinte estequiometria para manter a concentração extracelular de glutamato em 0,6  $\mu\text{M}$ : 1 glutamato<sup>-</sup> + 2 Na<sup>+</sup> são captados pela célula (neurônio ou glia), em troca de 1 K<sup>+</sup> e 1 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou OH<sup>-</sup>. Em caso de despolarização ou condições anóxicas, o gradiente de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> pode ser reduzido e permitir um acúmulo de cerca de 370  $\mu\text{M}$  de glutamato, concentração potencialmente tóxica (Albers et al., 1994). A concentração de glutamato utilizada neste estudo pode ser considerada alta, mas a extensão da possível excitotoxicidade não foi avaliada.

Diversos receptores relacionados com a transmissão da dor<sup>12</sup> são ativados pela queda de pH, mas os canais iônicos sensíveis a ácidos (ASICs) são diretamente ativados por prótons e estão amplamente expressos em muitos tecidos (Reeh e Kress, 2001). A aplicação de soluções ácidas, portanto, tornou-se um modo de avaliar a nocicepção decorrente da ativação desses receptores. No estudo realizado por Carpenter (2001), a aplicação de soluções ácidas na pata de ratos sob anestesia provocou a ativação das fibras aferentes nociceptivas do tipo C e A $\delta$  e as tornou mais sensíveis a estímulos térmicos e mecânicos.

Embora não se saiba a capacidade de tamponamento do tecido íntegro após a aplicação de substâncias ácidas, essas respostas dos nociceptores aumentaram de acordo com a diminuição do pH (2.5 a 5.85) (Carpenter et al., 2001). Grande parte dos estudos descreve a ativação dos nociceptores com soluções de pH em torno de 5.2 (Baumann et al., 1996; Bevan, 1999; Millan, 1999; Steen et al., 2001), pois as descargas máximas dos nociceptores cutâneos são atingidas com pH 5.2 e diminuem em pHs menores. Um possível mecanismo para esse bloqueio da geração de potenciais de ação em pH abaixo de 5 é principalmente a inibição, dependente de pH, da condutância de alguns canais ativados por voltagem, como por exemplo a corrente de cálcio ativada por alta voltagem e correntes de sódio sensíveis à tetrodotoxina (Reeh e Kress, 2001). Logo, a faixa adequada de pH para ativar as terminações nociceptivas está em torno de 5.2 a 6.9. O glutamato é um aminoácido carregado negativamente. Sendo assim, a solução com concentração de 30  $\mu\text{mol}$ , aplicada na pata dos camundongos na maioria dos experimentos realizados neste trabalho, apresenta um pH baixo (em torno de 2). Mesmo tendo sido preparada com tampão fosfato (PBS, composição mmol/l: NaCl 137, KCl 2,7 e tampão fosfato 10, pH 7.4) para que a resposta nociceptiva comportamental não sofresse influência, não foi possível manter o pH no nível fisiológico. Buscando descartar a hipótese de que os nociceptores seriam ativados pelo pH da solução de glutamato, outro grupo de animais foi tratado intraplantarmente com uma solução ácida (pH 2.2) e, nestas condições, não foi observada nocicepção espontânea significativa (figura 4). Resultado semelhante foi obtido por Hamamoto e colaboradores (1998), na tentativa de estabelecer uma relação pH *versus* hiperalgesia mecânica, aplicando soluções com diferentes pHs:

---

<sup>12</sup> Como o receptor vanilóide do tipo 1 (VR1).

7.4, 6.0, 5.0, 4.0 ou 3.0. A resposta verificada por Hamamoto e colaboradores (1998) após a aplicação das soluções com pH 6.0 ou 5.0 não foi diferente da resposta obtida com a aplicação da solução com pH 7.4 (fisiológico, utilizado como controle), revelando que somente a faixa de pH entre 6.0 até 6.38 é capaz de induzir hiperalgesia e, neste sentido, a faixa de pH tecidual relacionada à nocicepção é limitada.

Além de causar nocicepção quando injetado pela via intraplantar, o glutamato causou edema de pata, efeito também dependente da dose empregada e que teve sua formação máxima aos 15 min após a injeção. A dose de glutamato necessária para induzir a formação máxima de edema é significativamente menor (cerca de 5 vezes) quando comparada àquela necessária para induzir nocicepção. Em estudos que demonstram a nocicepção induzida por glutamato não existem relatos de sua ação edematogênica, apesar de, em alguns casos, as doses utilizadas serem semelhantes. Quando injetado na articulação temporomandibular de ratos em alta concentração (5  $\mu\text{mol}$  em 20  $\mu\text{l}$ ), o glutamato não foi capaz de causar expansão tecidual (medida indireta da formação de edema naquele protocolo), ao contrário do óleo de mostarda, utilizado como controle positivo (Fiorentino et al., 1999). A combinação de aminoácidos excitatórios capaz de induzir nocicepção quando aplicada na articulação do joelho de ratos da mesma forma não provocou edema nessa região, embora as doses utilizadas naquele estudo tenham sido consideravelmente menores (cerca de 10 vezes) do que as utilizadas no presente estudo (Lawand et al., 1997). Por outro lado, Zhou e colaboradores (1996) e Coggeshall e colaboradores (1997) demonstraram que a injeção intraplantar de glutamato causa um leve intumescimento e rubor da pata dos ratos, respectivamente, que desaparecem após 2 a 3 min, apesar das doses

utilizadas terem sido ainda menores do que as utilizadas na articulação do joelho, por Lawand (1997). A inflamação, assim como a dor, é uma reação de defesa do hospedeiro contra irritação, lesão ou infecção, e é caracterizada pelos sintomas clássicos: rubor, calor, tumor, dor e perda da função. O rubor e o calor são resultantes do aumento do fluxo sanguíneo, a formação de edema é resultante do aumento da permeabilidade vascular e a dor ocorre pela ativação e sensibilização das fibras nervosas aferentes primárias (Levine e Reichling, 1999). No processo inflamatório, ocorre também a migração de células: os neutrófilos são as principais células envolvidas na fase aguda e os monócitos/macrófagos e alguns tipos de linfócitos são as principais células recrutadas na fase tardia da inflamação (Huerre e Gounon, 1996). O extravasamento plasmático causado pela injeção intraplantar de glutamato ficou bastante evidente quando realizado na presença do azul de Evans, um indicador do aumento da permeabilidade vascular. Curiosamente, pelo menos até 15 min após o tratamento intraplantar com glutamato, o edema não parece envolver a migração de células para a área injetada, uma vez que o tratamento com fucoidina, um inibidor de selectinas P e E, não foi capaz de alterar a formação de edema. As selectinas são polissacarídeos necessários para a adesão das células inflamatórias às células endoteliais e, portanto, para a sua posterior migração para o sítio da lesão (Teixeira e Hellewell, 1997; Sousa et al., 2000). Outro indício de que não há influência da migração de células da fase inicial do processo inflamatório sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato, pelo menos em 15 min, foi o ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase, que serve como parâmetro para a avaliação indireta do recrutamento de neutrófilos (Schneider e Issekutz, 1996). Não foi detectada alteração da atividade da mieloperoxidase 15

min após a injeção intraplantar de glutamato. No entanto, 2 h após o tratamento com glutamato i.pl. ocorre um leve aumento da atividade da mieloperoxidase que se torna significativo após 4 h e permanece extremamente elevado até 24 h. Tal efeito pode ser decorrente da migração e/ou ativação tardia das células para o local da lesão, o que não pode ser verificado concomitantemente à resposta nociceptiva espontânea, que tem sua resposta máxima aos 15 min. Os cortes histológicos das patas extraídas 15 min após a injeção de glutamato mostram que há congestão vascular, formação de edema discreta a moderada e escassos linfócitos. É provável que somente algumas células do processo inflamatório tenham migrado 15 min após a injeção intraplantar de glutamato e, como mostra o resultado da atividade da mieloperoxidase, aparentemente uma migração maciça de células inicia em estágios mais tardios (4 h após a injeção de glutamato). A formação de edema observada nos cortes histológicos está de acordo com o extravasamento plasmático medido através da concentração do corante azul de Evans extraído das patas.

Considerando que todos os subtipos de receptores glutamatérgicos, ionotrópicos e metabotrópicos, são expressos no sistema nervoso central e periférico (Coggeshall e Carlton, 1997; Liu et al., 1997; Kinkelin et al., 2000; Bhave et al., 2001; Walker et al., 2001b) e que parecem estar envolvidos no desenvolvimento e manutenção da transmissão da dor (Ferreira e Lorenzetti, 1994; Walker et al., 2001a; 2001b), outros grupos de experimentos foram realizados com o objetivo de caracterizar esses receptores com o emprego de antagonistas seletivos. A administração i.pl. de E4CPG, um antagonista seletivo de receptores glutamatérgicos metabotrópicos, causou inibição da nocicepção causada por glutamato, mostrando que esses subtipos de receptores estão

envolvidos na resposta nociceptiva induzida pelo glutamato. O tratamento dos animais com MK 801, um antagonista não-competitivo seletivo para o receptor NMDA, administrado através da via i.pl., causou inibição, dependentemente da dose, da nocicepção induzida por glutamato. Tal reação indica que a nocicepção induzida por glutamato, quando injetado na pata traseira de camundongos, envolve a participação desses receptores. Outro dado interessante do presente estudo foi a observação de que o tratamento dos animais, através da via i.pl., com diversos antagonistas seletivos de receptores ionotrópicos não-NMDA como NBQX (receptores KA), SYM 2206 (receptores AMPA) ou ainda com felbamato, um antagonista que atua no sítio de ligação da glicina associado ao receptor NMDA (Dickenson e Aydar, 1991), causou inibição significativa da nocicepção induzida pela injeção de glutamato. Tais dados sugerem que a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato ocorre por sua interação com receptores metabotrópicos, bem como com os ionotrópicos, NMDA e não-NMDA. No entanto, dentre todos os antagonistas glutamatérgicos utilizados, somente o NBQX, antagonista seletivo de receptores KA, foi capaz de reduzir significativamente o edema associado à injeção de glutamato, indicando que existem diferenças importantes em relação ao receptor através do qual o glutamato produz nocicepção e formação de edema de pata. O antagonismo ou bloqueio local de receptores glutamatérgicos tem sido efetivo em diminuir diversos tipos de dor (Davidson et al., 1997; Taniguchi et al., 1997; Pedersen et al., 1998; Davis e Inturrisi, 2001; Karim et al., 2001a; Leem et al., 2001) e o presente estudo comprova que a nocicepção causada por glutamato envolve sítios de ação periféricos. Um dos fatores que pode contribuir para a cooperação e participação de todos os subtipos de receptores glutamatérgicos na diminuição da nocicepção causada pela injeção i.pl. de glutamato pode advir do

fato de que os receptores metabotrópicos, principalmente os do grupo I, uma vez ativados, promovem a ativação e sensibilização dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (Neugebauer, 2002). Em motoneurônios espinhais de rã, a interação entre agonistas seletivos de receptores metabotrópicos do grupo I promove a ativação da proteína  $G_q$ , que por sua vez estimula a fosfolipase C a clivar fosfolípidos de membrana, gerando  $IP_3$  e DAG. Uma vez formado, o  $IP_3$  aumenta a concentração de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular através da sua mobilização a partir de estoques internos não mitocondriais e do seu influxo do meio extracelular. Esse aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular é fundamental para a facilitação das respostas mediadas pelo receptor NMDA induzida pela ativação de receptores metabotrópicos do grupo I. Outro fator importante para a ativação dos receptores NMDA mediada pelos receptores metabotrópicos do grupo I parece ser a proteína kinase C (Holohean et al., 1999). Curiosamente, os receptores metabotrópicos parecem estar envolvidos principalmente na sensibilização dos neurônios e na dor crônica, não na dor aguda (Dogrul et al., 2000). Levando-se em consideração os efeitos indesejáveis causados pela administração de antagonistas seletivos de receptores NMDA, alguns autores propuseram a combinação de antagonistas seletivos dos diferentes sítios de modulação<sup>13</sup> da atividade desse receptor, em doses sublimiares, para obter efeito antinociceptivo significativo e minimizar as disfunções motoras e comportamentais que estes antagonistas promovem (Coderre e Empel, 1994).

Evidências anteriores indicam que a via do óxido nítrico/GMPc desempenha um papel crítico nos mecanismos através dos quais o glutamato

---

<sup>13</sup> Os sítios de modulação no receptor NMDA com maior possibilidade de intervenção farmacológica são: o sítio de reconhecimento do NMDA, os sítios modulatórios da glicina e de poliaminas e o canal iônico associado ao receptor NMDA.

medeia respostas nociceptivas quando estudados em diferentes modelos de nocicepção (Malmberg e Yaksh, 1993; Meller et al., 1996; Ferreira et al., 1999). Os resultados deste estudo confirmam e estendem essas observações, demonstrando que a nocicepção e o edema de pata induzidos pelo glutamato, quando injetado na pata de camundongos, são mediados, em grande parte, pela liberação de NO. Essa observação provém dos dados obtidos com o inibidor da óxido nítrico sintase, a L-NOARG que, quando administrada através das vias i.p. ou i.pl, inibiu significativamente a nocicepção induzida pelo glutamato. Quando administrada através da via i.p., a L-NOARG também foi capaz de inibir o edema induzido pela injeção intraplantar de glutamato. Além disso, a inibição da nocicepção e do edema causada pela L-NOARG (i.p.) foi marcadamente revertida pelo pré-tratamento dos animais com L-arginina mas não com D-arginina, indicando uma ação estereo-seletiva. Outra evidência sugerindo o envolvimento do NO na nocicepção induzida por glutamato é oriunda do fato de que um doador de NO, o SNAP, potencializou a nocicepção e o edema causados pela injeção i.pl. de doses sublimiáres de glutamato. Finalmente, a injeção i.pl. de glutamato causou aumento, dependente da dose, da produção de nitrito no exsudato da pata dos camundongos. Resultados semelhantes foram observados recentemente por Lawand e colaboradores (2000), que demonstraram que o aumento do nível de glutamato na articulação da pata inflamada causada por uma mistura de caolin e carragenina estava associada ao aumento paralelo dos níveis de citrulina e arginina na articulação. Esses resultados, em conjunto, fornecem claras evidências de que o NO é um dos mediadores que contribui para a inflamação periférica e a nocicepção causadas pelo glutamato.

Estudos recentes indicam que o NO participa do desenvolvimento de edema, promovendo a dilatação de microvasos e aumento da permeabilidade microvascular (Davies et al., 1995; Omote et al., 2000; 2001). No modelo da carragenina, o NO participa tanto da fase inicial quanto tardia da resposta edematogênica, e acredita-se que seja produzido principalmente pelas NOS constitutiva e induzida, respectivamente, nestas duas fases (embora na fase tardia as NOS constitutivas continuem gerando NO e participando do processo inflamatório). A liberação de NO e seus metabólitos após a injeção de carragenina, medida através de microdiálise na pata de ratos, é inibida pela L-N<sup>G</sup>-monometil arginina (L-NMMA), um inibidor não seletivo das isoformas de NOS, em todas as fases do edema induzido pela carragenina (0 até 8 h) (Salvemini et al., 1996; Omote et al., 2001). Além disso, com a neurotomia do nervo ciático ipsilateral observa-se o início da liberação pronunciada de NO somente 3 h após a injeção de carragenina, sugerindo que, nesse caso, a indução da NOS<sub>i</sub> em outras células, como por exemplo macrófagos, ossos, osteoblastos e glia, seria responsável por esta produção tardia de NO (Omote et al., 2001). A discreta inibição do edema induzido pela injeção intraplantar de glutamato pela L-NOARG também pode ser decorrente do fato de que a dose de glutamato utilizada nestes experimentos (30  $\mu$ mol/pata) foi selecionada para avaliação do efeito antinociceptivo, ou seja, é 5 vezes maior do que a dose necessária para induzir a resposta edematogênica em camundongos. Um estudo particular, com doses apropriadas de glutamato, seria mais adequado para definir a participação de diversos mediadores na resposta edematogênica. É interessante observar que após o tratamento neonatal com capsaicina, que degenera fibras sensoriais aferentes, houve significativa diminuição da formação de edema, o que pode ser

um indício da participação do NO, receptores NK1 e outros, presentes em neurônios aferentes neste efeito, embora a medida dos metabólitos do NO não tenha sido realizada nestes experimentos. Como mostram Handy e Moore (1998), a administração de um inibidor da NOSn, 7-nitro indazol (7-NI) atenua a primeira fase do edema mediado por carragenina, portanto é possível que o NO detectado após a injeção intraplantar de glutamato também seja proveniente da NOS constitutiva presente em células neuronais. Dentre os eventos desencadeados pela ativação do receptor NMDA, está a ativação das formas constitutivas da NOS (Meller e Gebhart, 1993). O NO produzido se difunde do local onde é produzido tanto para o neurônio pré-sináptico quanto para células adjacentes e, no caso dos neurônios, ativando a guanilato ciclase solúvel e facilitando a liberação de aminoácidos excitatórios e taquicininas, atuando como um mensageiro retrógrado e perpetuando o processo (Park et al., 2000).

Existem evidências indicando que o glutamato e alguns neuropeptídeos, especialmente a substância P (SP), co-existem em fibras sensoriais periféricas de grande e pequeno diâmetro (Biasi e Rustioni, 1988; Smullin et al., 1990; Urban e Nagy, 1997) e podem ser liberados de fibras aferentes primárias (Biasi e Rustioni, 1988; Teoh et al., 1996). Ademais, Carlton e colaboradores (1998) observaram que a SP, injetada perifericamente, potencializa a nocicepção induzida pelo glutamato. Outras evidências igualmente sugerem que o glutamato e a SP podem atuar sinergisticamente na transmissão da dor (Rusin et al., 1993; Teoh et al., 1996). Os resultados do presente trabalho demonstram que as neurocininas, atuando em receptores NK2, e em menor extensão em receptores NK1, estão envolvidas na nocicepção mediada pelo glutamato, enquanto somente o subtipo de receptores NK2 parece estar envolvido na formação de edema

induzida pelo glutamato. Ao contrário, o SR 142801, um antagonista seletivo de receptores NK3, falhou em interferir tanto na nocicepção quanto na formação do edema induzidos pelo glutamato, sugerindo que estas respostas não envolvem a ativação do receptor NK3. O RNAm do receptor NK3 é indetectável em neurônios sensoriais aferentes primários, mesmo após a injeção intraplantar de formalina, mostrando que o papel desses receptores na nocicepção pode ser muito diferente dos outros receptores para taquicininas (McCarson, 1999). Tais descobertas sugerem que existem algumas diferenças importantes nas ações das neurocininas liberadas de fibras sensoriais sensíveis à capsaicina, após injeção i.pl. de glutamato em camundongos, quando comparado a outros modelos de nocicepção e inflamação. Estudos prévios mostram que os receptores NK1, NK2 e NK3 estão envolvidos em dois modelos de nocicepção mediados em parte pela liberação de glutamato, formalina e capsaicina (Santos e Calixto, 1997). No estudo realizado por Santos e Calixto (1997), os antagonistas NK1 foram efetivos em inibir principalmente a primeira fase da nocicepção induzida pela formalina, período no qual ocorre a maior liberação periférica de aminoácidos excitatórios (Omote et al., 1998). A nocicepção causada por doses sublimiares de formalina foi potencializada pela co-administração de SP e glutamato em ratos, efeito revertido pelo pré-tratamento dos animais com inibidores da síntese de NO, da produção de metabólitos do ácido araquidônico e da proteína quinase C. O efeito antinociceptivo dos três inibidores foi observado na fase tardia do modelo, sugerindo que estes segundos mensageiros estão criticamente envolvidos na transmissão nociceptiva tardia causada pela formalina (Coderre e Yashpal, 1994).

Em 1988, Biasi e Rustioni demonstraram que a SP e o glutamato coexistem em terminais aferentes periféricos (fibras C e A $\delta$ ) e nas lâminas superficiais da

medula espinhal e sugeriram que esses dois neuromediadores poderiam ser co-liberados dos mesmos terminais. Essa hipótese foi confirmada posteriormente por estudos que demonstraram a liberação de SP, NKA e aminoácidos excitatórios de fibras aferentes não mielinizadas após estimulação nociceptiva e que estes mediadores podem, além de excitar membranas pós-sinápticas, modular a função pré-sináptica (Juránek e Lembeck, 1997; Liu et al., 1997; Urban e Nagy, 1997). O tratamento com antagonistas de receptores NK1 também causa diminuição da resposta nociceptiva provocada pela injeção de NMDA, apresentando mais uma evidência de que os aminoácidos excitatórios interagem com as taquicinininas para causar nocicepção (Liu et al., 1997).

Os resultados deste trabalho sugerem que o neuropeptídeo CGRP, que co-existe com a SP em terminais sensoriais e participa de maneira importante da resposta inflamatória, incluindo a formação de edema, extravasamento de proteínas plasmáticas e vasodilatação (Brain et al., 1985; Brain e Williams, 1989), parece não exercer papel relevante na nocicepção e no edema de pata mediados pelo glutamato. Esta conclusão está baseada nos resultados indicando que o antagonista seletivo de receptores de CGRP, o fragmento CGRP<sub>8-37</sub>, administrado em uma dose que inibe o edema de pata induzido pelo agonista B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-BK (Ferreira et al., 2000), falhou em interferir nas respostas mediadas por glutamato.

O antagonista seletivo de receptores B<sub>1</sub> para as cininas, a des-Arg<sup>9</sup>[Leu<sup>8</sup>]-BK, causou inibição dependente da dose, da nocicepção causada por glutamato quando co-injetado com este na pata de camundongos, indicando que o receptor B<sub>1</sub> participa da nocicepção induzida por glutamato. Ao contrário, os receptores B<sub>2</sub> para as cininas parece não estar envolvido na nocicepção e no edema de pata

induzidos por glutamato, uma vez que o antagonista seletivo destes receptores, o HOE 140, em dose que inibe a nocicepção espontânea induzida pela bradicinina (dados não publicados), não foi capaz de interferir com as respostas nociceptiva e edematogênica induzidas pelo glutamato. Os resultados do presente estudo demonstram, pela primeira vez, que pelo menos em camundongos o receptor B<sub>1</sub> para as cininas tem uma importante contribuição na nocicepção mediada pelo glutamato. Posto que ambos os tipos de receptores glutamatérgicos, ionotrópicos e metabotrópicos, foram encontrados em determinados processos inflamatórios e durante a hiperalgesia persistente (Carlton e Coggeshall, 1999; Coggeshall e Carlton, 1999; Stanfa e Dickenson, 1999; DeGroot et al., 2000; Mills e Hulsebosch, 2002), é possível postular que antagonistas seletivos dos receptores B<sub>1</sub> podem ter valor terapêutico no controle das desordens nociceptivas e inflamatórias envolvendo o glutamato. A bradicinina e outros mediadores induzem um aumento da liberação de glutamato a partir de neurônios do gânglio da raiz dorsal e células de Schwann de ratos *in vitro* e, portanto, podem modular a ação de mediadores pró-nociceptivos (Parpura et al., 1995; Rydh-Rinder et al., 2001). Camundongos, espécie na qual os receptores B<sub>1</sub> são expressos constitutivamente e perdem a capacidade de expressá-los através de manipulação genética (*no caute* para o receptor B<sub>1</sub>), são hipoalgésicos na primeira fase do teste da formalina e no teste da capsaicina, reforçando a hipótese de que este receptor participa da nocicepção neurogênica (Pesquero et al., 2000).

Para avaliar o papel desempenhado pela liberação de neuropeptídeos das fibras sensoriais na nocicepção e no edema de pata induzidos por glutamato, um grupo de camundongos foi tratado durante o período neonatal com capsaicina, com uma dose da neurotoxina que depleta irreversivelmente fibras aferentes

primárias não mielinizadas (Holzer, 1991). O tratamento neonatal com capsaicina inibiu significativamente tanto a nocicepção como o edema de pata induzidos pelo glutamato. Este resultado reforça o conceito que os neuropeptídeos liberados de fibras aferentes sensoriais sensíveis à capsaicina, principalmente as do tipo C, desempenham papel crítico na nocicepção e no edema resultantes da injeção i.pl. de glutamato em camundongos. De acordo com esses dados, foi relatado que o tratamento neonatal de ratos com capsaicina bloqueia 50% da resposta nociceptiva induzida pela injeção i.t. de NMDA (Lovinger e Weight, 1988). Dentre os neurotransmissores depletados após o tratamento neonatal com capsaicina, os principais envolvidos com a transmissão da dor são: SP, NKA e CGRP (Holzer, 1991). A diminuição da síntese de mediadores induzida pelo tratamento com doses altas de capsaicina ( $\geq$  que 50 mg/kg) varia conforme o tecido e a espécie, mas normalmente é irreversível.

O fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) é um fator de transcrição que normalmente está seqüestrado no citoplasma pela sua proteína inibitória, o I $\kappa$ B. Sinais que ativam o NF $\kappa$ B causam a degradação do I $\kappa$ B, permitindo que o NF $\kappa$ B seja transportado até o núcleo da célula, ligue a regiões específicas do DNA e ative a expressão de alguns genes. Já foi demonstrado que o tratamento de neurônios com glutamato ou cainato e a ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos resulta na migração do NF $\kappa$ B para o núcleo e conseqüente aumento da expressão de algumas proteínas como: superóxido dismutase de manganês, calbindina, fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF), proteínas da família Bcl-2, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), proteínas inibidoras de apoptose, NOSi e outras (Madrigal et al., 2001; Wellmann et al., 2001; Wood, 2001; Hardingham e Bading,

2003). A injeção i.pl. de glutamato, pelo menos no período analisado, parece não induzir a expressão rápida de genes regulados pelo NF $\kappa$ B, o que foi demonstrado pela impossibilidade de identificá-lo no núcleo das células isoladas da pata de camundongos 15 min após a injeção de glutamato.

De acordo com dados descritos na literatura, a hipótese de uma interação entre cininas, taquicinas e aminoácidos excitatórios poderia ser responsável, em parte, pela nocicepção observada neste modelo (figura 25). Os receptores de taquicinas (NK1 e NK2), cininas (B<sub>1</sub>) e glutamatérgicos metabotrópicos do grupo I, positivamente acoplados à proteína G, ativam a fosfolipase C que gera IP<sub>3</sub> e DAG. O DAG, por sua vez, ativa a proteína quinase C (PKC), que é translocada do citoplasma até a membrana plasmática e fosforila proteínas presentes tanto no citoplasma quanto na membrana. Uma das proteínas fosforiladas pela PKC é o receptor NMDA, cuja fosforilação altera a cinética da ligação do magnésio (Mg<sup>2+</sup>), liberado do seu sítio com potencial de membrana próximo ao repouso, o que não ocorre em condições normais. O aumento do influxo de Ca<sup>2+</sup> através do receptor NMDA facilita a ativação posterior da PKC. A elevação da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular estimula a NOS a produzir NO, que se difunde para neurônios adjacentes e para o próprio neurônio pré-sináptico, induzindo a produção de mediadores pró-nociceptivos. Outro mecanismo responsável pelo aumento das respostas do receptor NMDA após a ativação dos receptores metabotrópicos é a ativação da adenilato ciclase e de outras quinases dependentes da produção de AMPc. Através dos mesmos sinais de transdução, os receptores metabotrópicos do grupo I induzem, indiretamente, a fosforilação dos receptores NMDA, AMPA e KA, através da PKC, PKA e ERK/MAP quinases. Por outro lado, a ativação de

receptores glutamatérgicos metabotrópicos dos grupos II e III, acoplados à proteína  $G_i$ , e em alguns casos do grupo I, inibe a atividade do receptor NMDA.

Analisados em conjunto, os resultados do presente estudo fornecem evidências consistentes indicando que a injeção intraplantar de glutamato em camundongos resulta em nocicepção significativa, com rápido início e curta duração, associada à formação de edema de pata. Ambos os efeitos foram claramente proporcionais à dose de glutamato empregada. A resposta nociceptiva induzida pelo glutamato parece envolver sítios de ação periféricos, sendo mediada principalmente por receptores NMDA, não NMDA, pelo sítio modulatório da glicina e pela liberação de NO. A ativação do receptor  $B_1$  (mas não do receptor  $B_2$ ) para as cininas e a liberação de neurocininas e conseqüente ativação dos receptores NK2, e em menor extensão os receptores NK1, também contribuem de maneira importante na gênese da resposta nociceptiva mediada por glutamato. Já o edema de pata associado à resposta nociceptiva causada pelo glutamato parece ser mediado principalmente pela ativação de receptores glutamatérgicos não-NMDA, receptores NK2 e pela liberação de NO. As fibras sensíveis à capsaicina parecem participar de maneira importante de ambas as respostas induzidas pelo glutamato, exercendo um papel mais pronunciado no controle da resposta nociceptiva do que na formação de edema.

A participação do sistema glutamatérgico na transmissão nociceptiva periférica está bem caracterizada. Todos os subtipos de receptores (ionotrópicos e metabotrópicos) já foram identificados em terminais sensoriais e a participação dos aminoácidos excitatórios mais abundantes, glutamato e aspartato, na gênese de diversos tipos de dor, já foi determinada. A alternativa de tratar diversos tipos de dor localmente pode eliminar uma série de efeitos indesejáveis causados pelos

antagonistas glutamatérgicos administrados sistemicamente. A associação de doses sublimiares de antagonistas glutamatérgicos ou o desenvolvimento de antagonistas que não atravessam a barreira hemato-encefálica são opções viáveis para a terapia periférica da dor, dissociando-a dos efeitos adversos causados pela diminuição da transmissão glutamatérgica central. A possibilidade de fornecer uma ferramenta simples e rápida para o estudo e o desenvolvimento de terapias adequadas para as condições patológicas em que os aminoácidos excitatórios estão envolvidos é que torna este estudo importante do ponto de vista terapêutico.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente estudo indicam que:

- 1) a injeção intraplantar de glutamato em camundongos resulta em nocicepção significativa, com rápido início e curta duração, associada à formação de edema de pata. Ambos os efeitos foram claramente proporcionais à dose de glutamato empregada.
- 2) a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato parece envolver sítios de ação periféricos, sendo mediada principalmente por receptores NMDA, não NMDA, pelo sítio modulatório da glicina e pela liberação de NO.
- 3) a ativação do receptor  $B_1$  (mas não do receptor  $B_2$ ) para as cininas e a liberação de neurocininas e conseqüente ativação dos receptores NK2, e em menor extensão os receptores NK1, também contribuem de maneira importante na gênese da resposta nociceptiva mediada por glutamato.

- 4) o edema de pata associado à resposta nociceptiva causada pelo glutamato parece ser mediado principalmente pela ativação de receptores glutamatérgicos não-NMDA, receptores NK2 e pela liberação de NO.
- 5) As fibras sensíveis à capsaicina parecem participar de maneira importante de ambas as respostas induzidas pelo glutamato, exercendo um papel mais pronunciado no controle da resposta nociceptiva do que na formação de edema.



## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AANONSEN, L.M.; WILCOX, G.L. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and sigma agonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 1, p. 9-19, 1987.
- AANONSEN, L.M.; WILCOX, G.L. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. **Pain**, v. 41, p. 309-321, 1990.
- ALBERS, R.W.; SIEGEL, G.J.; STAHL, W.L. Membrane transport. In: SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; MOLINOFF, P.B. **Basic neurochemistry**. Raven Press : New York, p. 367-387, 1994.
- ALEY, K.O.; McCARTER, G.; LEVINE, J.D. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 7008-7014, 1998.
- ANAND, K.J.S.; CRAIG, K.D. New perspectives on the definition of pain. **Pain**, v. 67, p. 3-6, 1996.
- APPLETON, I. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pain. In: DICKENSON, A.; BESSON, J.-M. **The pharmacology of pain**, Germany : Springer, p. 43-54, 1997.
- BABBEDGE, R.C.; HART, S.L.; MOORE, P.K. Anti-nociceptive activity of nitric oxide inhibitors in the mouse: dissociation between the effect of L-NAME and L-NMMA. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, p. 77-79, 1993.
- BAUMANN, T.K.; BURCHIEL, K.J.; INGRAM, S.L.; MARTENSON, M.E. Responses of adult human dorsal root ganglion neurons in culture to capsaicin and low pH. **Pain**, v. 65, p. 31-38, 1996.
- BEIRITH A.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CALIXTO, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 345, p. 233-245, 1998.
- BEREITER, D.A.; BENETTI, A.P. Excitatory amino release within spinal trigeminal nucleus after mustard oil injection into the temporomandibular joint region of the rat. **Pain**, v. 67, p. 451-459, 1996.
- BESSON, J.-M. La complexité des aspects physiopharmacologiques de la douleur. **Drugs**, v. 53, p. 1-9, 1997.
- BESSON, J.-M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.
- BESSON, J.-M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Reviews**, v. 67, p. 67-185, 1987.

- BEVAN, S. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone : Londres, p. 1-8, 1999.
- BHAVE, G.; KARIM, F.; CARLTON, S.M.; GEREAU IV, R.W. Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. **Nature Neurosci.**, v. 4, p. 417-423, 2001.
- BIASI, S.; RUSTIONI, A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 7820-7824, 1988.
- BILEVICIUTE, I.; STENFORS, C.; THEODORSSON, E.; LUNDEBERG, T. Unilateral injection of calcitonin gene-related peptide (CGRP) induces bilateral oedema formation and release of CGRP-like immunoreactivity in the rat paw. **Br. J. Pharmacol.**, v. 124, p. 1304-1312, 1998.
- BOXALL, S.J.; BERTHELE, A.; LAURIE, D.J.; SOMMER, B.; ZIEGLGANSBERGER, W.; URBAN L.; TOLLE, T.R. Enhanced expression of metabotropic glutamate receptor 3 messenger RNA in the rat spinal cord during ultraviolet irradiation induced peripheral inflammation. **Neuroscience**, v. 82, p. 591-602, 1998.
- BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J.; TIPPINS, J.R.; MORRIS, H.R.; MACINTYRE, I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. **Nature**, v. 313, p. 54-56, 1985.
- BRAIN, S.D.; WILLIAMS, T.J. Interactions between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema formation and blood flow in rat skin. **Br. J. Pharmacol.**, v. 97, p. 77-82, 1989.
- CAHUSAC, P.M.B.; EVANS, R.H.; HILL, R.G.; RODRIQUEZ, R.E.; SMITH, D.A.S. The behavioural effects of an N-methylaspartate receptor antagonist following application to the lumbar spinal cord of conscious rats. **Neuropharmacology**, v. 23, p. 719-724, 1984.
- CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, p. 1-5, 2000.
- CAMPOS, R.O.P.; HENRIQUES, M.G.M.O.; CALIXTO, J.B. Systemic treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guérin (BCG) potentiates kinin B1 receptor agonist-induced nociception and oedema formation in the formalin test in mice. **Neuropeptides**, v. 32, p. 393-403, 1998.
- CARPENTER, K.J.; NANDI, M.; DICKENSON, A.H. Peripheral administration of low pH solutions causes activation and sensitization of convergent dorsal horn neurones in the anaesthetised rat. **Neurosci. Lett.**, v. 298, p. 179-182, 2001.
- CARLTON, S.M.; HARGETT, G.L.; COGGESHALL, R.E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Neurosci. Lett.**, v. 197, p. 25-28, 1995.

- CARLTON, S.M. ZHOU, S.; COGGESHALL, R.E. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. **Brain Res.**, v. 790, p. 160-169, 1998.
- CARLTON, S.M.; COGGESHALL, R.E. Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations. **Brain Res.**, v. 820, p. 63-70, 1999.
- CARLTON, S.M. Peripheral excitatory amino acids. **Cur. Op. Pharmacol.**, v. 1, p. 52-56, 2001.
- CASHMAN, J.N. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. **Drugs**, v. 52, n. 5, p. 13-23, 1996.
- CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K.L.T.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTOS, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.
- CODERRE, T.J. The role of excitatory amino acid receptors and intracellular messengers in persistent nociception after tissue injury in rats. **Mol. Neurobiol.**, v. 7, p. 229-246, 1993.
- CODERRE, T.J.; EMPEL, I.V. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. II. Assessment of the antinociceptive activity of combinations of competitive and non-competitive NMDA antagonists with agents acting at allosteric-glycine and polyamine receptor sites. **Pain**, v. 59, p. 353-359, 1994.
- CODERRE, T.J.; YASHPAL, K. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. **Eur. J. Neurosci.**, v. 6, p. 1328-1334, 1994.
- COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Res. Rev.**, v. 24, p. 28-66, 1997.
- COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M. Evidence for an inflammation-induced change in the local glutamatergic regulation of postganglionic sympathetic efferents. **Pain**, v. 83, p. 163-168, 1999.
- COGGESHALL, R.E.; ZHOU, S.; CARLTON, S.M. Opioid receptor on peripheral sensory axons. **Brain Res.**, v. 764, p. 126-132, 1997.
- CONN, P.J.; PIN, J.-P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 37, p. 205-237, 1997.
- CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 193-198, 1993.

- COUTURE, R.; LINDSEY, C.J. Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. In: QUIRION, R.; BJÖRKLUND, A.; HÖKFELD, T. **Handbook of chemical anatomy peptide receptors**. Elsevier : Amsterdam, v. 16, p. 241-298, 2000.
- CRAIG, A.D.; DOSTROVSKY, J.O. Medulla to thalamus. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone : Londres, p. 1-8, 1999.
- CUNNINGHAM, M.D.; FERKANY, J.W.; ENNA, S.J.K. Excitatory amino acid receptors: a gallery of new targets for pharmacological intervention. **Life Sci.**, v. 54, p. 135-148, 1993.
- D'ACQUISTO, F.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DI VAIO, R.; CARNUCCIO, R. Local administration of transcription factor decoy oligonucleotides to nuclear factor- $\kappa$ B prevents carrageenin-induced inflammation in rat hind paw. **Gene Therapy**, v. 7, p. 1731-1737, 2000.
- DAVIDSON, E.M.; COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. **Neuroreport**, v. 8, p. 941-946, 1997.
- DAVIES, M.G.; FULTON, G.J.; HAGEN, P.O. Clinical biology of nitric oxide. **Br. J. Surg.**, v. 82, p. 1598-1610, 1995.
- DAVIS, A.M.; INTURRISI, C.E. Attenuation of hyperalgesia by LY235959, a competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. **Brain Res.**, v. 894, p. 150-153, 2001.
- DE FELIPE, C.; HERRERO, J.F.; O'BRIEN, J.A.; PALMER, J.A.; DOYLE, C.A.; SMITH, A.J.H.; LAIRD, J.M.A.; BELMONTE, C.; CERVERO, F.; HUNT, S.P. Nociception, analgesia and aggression are disrupted in mice lacking the substance P receptor. **Nature**, v. 392, p. 394-397, 1998.
- DeGROOT, J.; ZHOU, S.; CARLTON, S.M. Peripheral glutamate release in the hindpaw following low and high intensity sciatic stimulation. **Neuroreport**, v. 11, p. 497-502, 2000.
- DICKENSON, A.; AYDAR, E. Antagonism at the glycine site on the NMDA receptor reduces spinal nociception in the rat. **Neurosci. Lett.**, v. 121, p. 263-266, 1991.
- DICKENSON, A. Central acute pain mechanisms. **Ann. Med.**, v. 27, p. 223-227, 1995.
- DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acid mechanisms and their control. In: DICKENSON, A.; BESSON, J.-M. **The pharmacology of pain**. Springer : Berlin, p. 167-209, 1997.

- DINGLEDINE, R.; MCBAIN, C.J. Excitatory amino acid transmitters. In: SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; MOLINOFF, P.B. **Basic neurochemistry**. Raven Press : New York, p. 367-387, 1994.
- DOGRUL, A.; OSSIPOV, M.H.; LAI, J.; MALAN, P.T.; PORRECA, F. Peripheral and spinal antihyperalgesic activity of SIB-1757, a metabotropic glutamate receptor (mGluR<sub>5</sub>) antagonist, in experimental neuropathic pain in rats. **Neurosci. Let.**, v. 292, p. 115-118, 2000.
- DOLAN, S.; NOLAN, A.M. Behavioural evidence supporting a differential role for group I and II metabotropic glutamate receptors in spinal nociceptive transmission. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 1132-1138, 2000.
- DOUBEL, T.P.; MANNION, R.J.; WOOLF, C.J. The dorsal horn: state-dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone : Londres, p. 1-8, 1999.
- DU, J.; KOLTZENBURG, M.; CARLTON, S.M. Glutamate-induced excitation and sensitization of nociceptors in rat glabrous skin. **Pain**, v. 89, p. 187-198, 2001.
- DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide – cyclic GMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 186, p. 289-293, 1990.
- DUGGAN, A.W.; HENDRY, I.A.; MORTON, C.R.; HUTCHISON, W.D.; ZHAO, Z.-Q. Cutaneous stimuli releasing substance P in the dorsal horn of the cat. **Brain Res.**, v. 451, p. 261-273, 1988.
- FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature**, v. 240, p. 200-203, 1972.
- FERREIRA, P.K.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. The role of sensorial neuropeptides in the edematogenic responses mediated by B(1) agonist des-Arg(9)-BK in rats pre-treated with LPS. **Regul. Pept.**, v. 89, p. 29-35, 2000.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1479-1485, 1994.
- FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 835-842, 1999.
- FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; BADER, M.; CALIXTO, J.B. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. **Neuropharmacology**, v. 41, p. 1006-1012, 2001.

- FIORENTINO, P.M.; CAIRNS, B.E.; HU, J.W. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. **Arch. Or. Biol.**, v. 44, p. 27-32, 1999.
- FUNDYTUS, M.E.; OSBORNE, M.G.; HENRY, J.L.; CODERRE, T.J.; DRAY, A. Antisense oligonucleotide knockdown of mGluR<sub>1</sub> alleviates hyperalgesia and allodynia associated with chronic inflammation. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 6676, p. 1-10, 2002.
- GASIC, G.P.; HOLLMANN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 54, p. 507-533, 1992.
- GIOVENKO, S.L.; KITTO, K.F.; KURTZ, H.J.; VELÁZQUEZ, R.A.; LARSON, A.A. Parenterally administered kainic acid induces a persistent hyperalgesia in the mouse and rat. **Pain**, v. 83, p. 347-358, 1999.
- GRANADOS-SOTO, V.; RUFINO, M.O.; LOPES, L.D.G.; FERREIRA, S.H. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 340, p. 177-180, 1997.
- GRANGER, D.L.; HIBBS, J.P.; PERFECT, J.R.; DURAK, D.T. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 85, p. 264-273, 1990.
- GUIRIMAND, F.; LE BARS, D. Physiologie de la nociception. **Ann. Fr. Anesth. Réanim.**, v. 15, p. 1048-1079, 1996.
- GUYTON, A.C. Sensações somáticas: II. Dor, cefaléia e sensações térmicas. In: GUYTON, A.C. **Tratado de fisiologia médica**. Guanabara Koogan : Rio de Janeiro, p. 458-467, 1992.
- HALEY, J.E.; DICKENSON, A.H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 251-258, 1992.
- HALEY, J.E.; WILCOX, G.L. Involvement of excitatory amino acids and peptides in the spinal mechanisms underlying hyperalgesia. In: WILLIS, Jr.W.D. **Hyperalgesia and Allodynia**. Raven Press Ltd : New York, v. 24, p. 281-293, 1992.
- HAMAMOTO, D.T.; ORTIZ-GONZALEZ, X.R.; HONDA, J.M.; KAJANDER, K.C. Intraplantar injection of hyaluronic acid at low pH into the rat hindpaw produces tissue acidosis and enhances withdrawal responses to mechanical stimuli. **Pain**, v. 74, p. 225-234, 1998.
- HANDY, R.L.C.; MOORE, P.K. Effects of selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia. **Neuropharmacology**, v. 37, p. 37-43, 1998.

- HANSSON, E.; MUYDERMAN, H.; LEONOVA, J.; ALLANSSON, L.; SINCLAIR, J.; BLOMSTRAND, F.; THORLIN, T.; NILSSON, M.; RÖNNBÄCK, L. Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. **Neurochem. Intern.**, v. 37, p. 317-329, 2000.
- HARDINGHAM, G.E.; BADING, H. The yin and yang of the NMDA receptor signalling. **Trends Neurosci.**, v. 26, p. 81-89, 2003.
- HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 17 p. 31-108, 1994.
- HOLOHEAN, A.; HACKMAN, J.C.; DAVIDOFF, R.A. Mechanisms involved in the metabotropic glutamate receptor-enhancement of NMDA-mediated motoneurone responses in frog spinal cord. **Br. J. Pharmacol.**, v. 126, p. 333-341, 1999.
- HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanism of action, and selectivity for thin sensory neurones. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 143-201, 1991.
- HOLZER, P. Implications of tachykinins and calcitonin gene-related peptide in inflammatory bowel disease. **Digestion**, v. 59, p. 269-283, 1998.
- HUDSPITH, M.J. Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. **Br. J. Anaesth.**, v. 78, p. 731-747, 1997.
- HUERRE, M.R.; GOUNON, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Res. Immunol.**, v. 147, p. 417-434, 1996.
- IRNICH, D.; BURGSTAHLER, R.; BOSTOCK, H.; GRAFE, P. ATP affects both axons and Schwann cells of unmyelinated C fibres. **Pain**, v. 92, p. 343-350, 2001.
- JACKSON, D.L.; AANONSEN, L.M.; RICHARDSON, J.D.; GEIER, H.; HARGREAVES, K.M. An evaluation of the effects of excitatory amino acids in bovine dental pulp. **Soc. Neurosci. Abstr.**, v. 19, p. 996, 1993.
- JACKSON, D.L.; GRAFF, C.B.; RICHARDSON, J.D.; HARGREAVES, K.M. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 284, p. 321-325, 1995.
- JEFTINIJA, S.D.; JEFTINIJA, K.D. ATP stimulates release of excitatory amino acids from cultured Schwann cells. **Neuroscience**, v. 82, p. 927-934, 1998.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.
- JURÁNEK, I.; LEMBECK, F. Afferent C-fibres release substance P and glutamate. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 75, p. 661-664, 1997.

- KARIM, F.; BHAVE, G.; GEREAU IV, R.W. Metabotropic glutamate receptors on peripheral sensory neuron terminals as targets for the development of novel analgesics. **Mol. Psychiatry**, v. 6, p. 615-617, 2001a.
- KARIM, F.; WANG, C.-C.; GEREAU, R.W. Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 3771-3779, 2001b.
- KINKELIN, I.; BRÖCKER E.-V.; KOLTZENBURG, M.; CARLTON, S.M. Localization of ionotropic glutamate receptors in peripheral axons of human skin. **Neurosci. Let.**, v. 283, p. 149-152, 2000.
- LAIRD, J.M.A.; ROZA, C.; DE FELIPE, C.; HUNT, S.P.; CERVERO, F. Role of central and peripheral tachykinin NK1 receptors in capsaicin-induced pain and hyperalgesia in mice. **Pain**, v. 90, p. 97-103, 2001.
- LAM, H.H.D.; HANLEY, D.F.; TRAPP, B.D.; SAITO, S.; RAJA, S.; DAWSON, T.M.; YAMAGUCHI, H. Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin injection in the rat hind paw. **Neurosci. Let.**, v. 210, p. 201-204, 1996.
- LAWAND, N.B.; MCNEARNEY, T.; WESTLUND, K.N. Amino acid release into the knee joint: key role in nociception and inflammation. **Pain**, v. 86, p. 69-74, 2000.
- LAWAND, N.B.; WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 324, p. 169-177, 1997.
- LEEM, J.W.; HWANG, J.H.; HWANG, S.J.; PARK, H.; KIM, M.K.; CHOI, Y. The role of peripheral N-methyl-D-aspartate receptors in Freund's complete adjuvant induced mechanical hyperalgesia in rats. **Neurosci. Let.**, v. 297, p. 155-158, 2001.
- LEVINE, J.D.; FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **J. Neurosci.**, v. 13, p. 2273-2286, 1993.
- LEVINE, J.D.; REICHLING, D.B. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone : Londres, p. 1-8, 1999.
- LEVY, D.; ZOCHODNE, D.W. Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. **Pain**, v. 86, p. 265-271, 2000.
- LI, X.; CLARK, J.D. Spinal cor heme oxygenase participates in glutamate-induced pain-related behaviors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 450, p. 43-48, 2002.

- LIPTON, S.A.; ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **New Eng. J. Med.**, v. 330, p. 613-622, 1994.
- LIU, H.; MANTYH, P.W.; BASBAUM, A.I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**, v. 386, p. 721-724, 1997.
- LIU, X.J.; WHITE, T.D.; SAWYNOK, J. Intraplantar injection of glutamate evokes peripheral adenosine release in the rat hindpaw: involvement of peripheral ionotropic glutamate receptors and capsaicin-sensitive sensory afferents. **J. Neurochem.**, v. 80, p. 562-570, 2002.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.
- LOVINGER, D.M.; WEIGHT, W.D. Glutamate induces despolarization of adult rat dorsal root ganglion neurons that is mediated predominantly by NMDA receptors. **Neurosci. Lett.**, v. 94, p. 314-320, 1988.
- MA, Q.P.; HILL, R.; SIRINATHSINGHJI, D. Basal expression of bradykinin B1 receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. **Neuroreport**, v. 11, p. 4003-4005, 2000.
- MACCA, M. Central da dor do hospital do câncer. In: ROCHA, A.A.; LINSKER, R. **Cuidados pela vida**. Terra Virgem : São Paulo, p. 74, 2001.
- MacFARLANE, B.V.; WRIGHT, A.; O'CALLAGHAN, J.; BENSON, H.A.E. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacol. Ther.**, v. 75, p. 1-19, 1997.
- MADRIGAL, J.L.; MORO, M.A.; LIZASOAIN, I.; LORENZO, P.; CASTRILLO, A.; BOSCA, L.; LEZA, J.C. Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. **J. Neurochem.**, v. 76, p. 532-538, 2001.
- MAGGI, C.A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Prog. Neurobiol.**, v. 45, p. 1-98, 1995.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 1069-1075, 1995a.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acid evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **J. Neurosci.**, v. 14, p. 2768-2776, 1995b.

- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. **Pain**, v. 54, p. 291-300, 1993.
- MAO, J.; PRICE, D.D.; HAYES, R.L.; LU, J.; MAYER, D.J. Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. **Brain Res.**, v. 598, p. 271-278, 1992.
- MAYER, M.L.; VYKLIČKY, L.JR.; PATNEAU, D.K. Glutamate receptors in cultures of mouse hippocampus studied with fast applications of agonists, modulators and drugs. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 268, p. 3-11, 1990.
- McCARSON, K.E. Central and peripheral expression of neurokinin-1 and neurokinin-3 receptor and substance P-encoding messenger RNAs: peripheral regulation during formalin-induced inflammation and lack of neurokinin receptor expression in primary afferent sensory neurons. **Neuroscience**, v. 93, p. 361-370, 1999.
- McLEOD, A.L.; RITCHIE, J.; CUELLO, A.C.; JULIEN, J.P.; RIBEIRO-DA-SILVA, A.; HENRY, J.L. Transgenic mice over-expressing substance P exhibit allodynia and hyperalgesia which are reversed by substance P and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. **Neuroscience**, v. 89, p. 891-899, 1999.
- McNEAREY, T.; SPEEGLE, D.; LAWAND, N.B.; LISSE, J.; WESTLUND, K.N. Excitatory amino acid profiles of synovial fluid derived from patients with arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 27, p. 739-745, 2000.
- 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**, v. 71, p. 327-335, 1996.
- MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, v. 52, p. 127-136, 1993.
- MENÉNDEZ, L.; HIDALGO, A.; BAAMONDE, A. Spinal calmodulin inhibitors reduce N-methyl-D-aspartate- and septide-induced nociceptive behavior. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 335, p. 9-14, 1997.
- MERSKEY, H. The definition of pain. **Eur. J. Psychiatry**, v. 6, p. 153-159, 1991.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 1-164, 1999.
- MILLER, K.E.; RICHARDS, B.A.; KRIEBEL, R.M. Glutamine-, glutamine synthetase-, glutamate dehydrogenase- and pyruvate carboxylase-immunoreactivities in the rat dorsal root ganglion and peripheral nerve. **Brain Res.**, v. 945, p. 202-211, 2002.

- MILLS, C.D.; HULSEBOSCH, C.E. Increased expression of metabotropic glutamate receptors subtype 1 on spinothalamic tract neurons following spinal cord injury in the rat. **Neurosci. Let.**, v. 319, p. 59-62, 2002.
- MINAMI, T.; NISHIHARA, I.; UDA, R.; ITO, S.; HYOTO, M.; HAYAISHI, O. Characterization of EP receptor subtypes involved in allodynia and hyperalgesia induced by intrathecal administration of prostaglandin to mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 112, p. 735-740, 1994.
- MINAMI, T.; ONAKA, M.; OKUDA-ASHITAKA, E.; MORI, H.; ITO, S.; HAYAISHI, O. L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase, blocks the established allodynia induced by intrathecal administration of prostaglandin E<sub>2</sub>. **Neurosci. Let.**, v. 201, p. 239-242, 1995
- MIYAMOTO, T.; OGINO, N.; YAMAMOTO, S.; HAYAISHI, O. Purification of prostaglandin endoperoxid synthetase from bovine vesicular gland microsomes. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 2629-2636, 1976.
- MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; HART, S.L. L-N<sup>G</sup>-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 102, p. 198-202, 1991.
- NAKANISHI, S.; MASU, M. Molecular diversity and functions of glutamate receptors. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 23, p. 319-348, 1994.
- NEEDLEMAN, P.; ISAKSON, P.C. The discovery and function of COX-2. **J. Rheumatol.**, v. 24, n. 49, p. 6-8, 1997.
- NEUGEBAUER, V. Metabotropic glutamate receptors - important modulators of nociception and pain behavior. **Pain**, v. 98, p. 1-8, 2002.
- OKANO, K.; UEDA, M.; KURAIISHI, Y.; SATOH, M. Effect of repeated cold stress on capsaicin-evoked release of glutamate from rat spinal dorsal slices. **Neurosci. Res.**, v. 29, p. 319-324, 1997.
- OMOTE, K.; HAZAMA, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAKAYAKA, Y.; TORIYABE, M.; NAMIKI, A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. **Brain Res.**, v. 912, p. 171-175, 2001.
- OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. **Brain Res.**, v. 787, p. 161-164, 1998.
- OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAKAYAMA, N.; HAZAMA, K.; NAMIKI, A. Activation of peripheral NMDA-nitric oxide cascade in formalin test. **Anesthesiology**, v. 93, p. 173-178, 2000.
- PARK, Y.H.; SHIN, C.Y.; LEE, T.S.; HUH, I.H.; SOHN, U.D. The role of nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> on the hyperalgesia induced by excitatory amino acids in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 52, p. 431-436, 2000.

- PARPURA, V.; LIU, F.; JEFTINIJA, K.V.; HAYDON, P.G.; JEFTINIJA, S.D. Neuroligand-evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from Schwann cells. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 5831-5839, 1995.
- PEDERSEN, J.L.; GALLE, T.S.; KEHLET, H. Peripheral analgesic effects of ketamine in acute inflammatory pain. **Anesthesiology**, v. 89, p. 58-66, 1998.
- PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; HEPPENSTALL, P.A.; STUCKY, C.L.; SILVA, J.A.JR.; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S.M.; PESQUERO, J.L.; PAIVA, A.C.; CALIXTO, J.B.; LEWIN, G.R.; BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 8140-8145, 2000.
- PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; HEPPENSTALL, P.A.; STUCKY, C.L.; SILVA, J.A.Jr.; WALTER, T.; OLIVEIRA, S.M.; PESQUERO, J.L.; PAIVA, A.C.; CALIXTO, J.B.; LEWIN, G.R.; BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, p. 8140-8145, 2000.
- RAINE, C.S. Neurocellular anatomy. In: SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERS, R.W.; MOLINOFF, P.B. **Basic neurochemistry**. Raven Press : New York, p. 3-31, 1994.
- RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone : Londres, p. 1-8, 1999.
- RECIO, M.C.; GINER, R.M.; URIBURU, L.; MÁÑEZ, S.; CERDÁ, M.; DE LA FUENTE, J.R.; RÍOS, J.L. *In vivo* activity of pseudoguaianolide lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sci.**, v. 66, p. 2509-2518, 2000.
- REEH, P.W.; KRESS, M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. **Cur. Op. Pharmacol.**, v. 1, p. 45-51, 2001.
- REN, K.; WILLIAMS, G.M.; HYLDEN, J.L.K.; RUDA, M.A.; DUBNER, R. The intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonists selectively attenuated carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 219, p. 235-243, 1992.
- RIVOT, J.-P.; SOUSA, A.; MONTAGNE-CLAVEL, J.; BESSON, J.-M. Nitric oxide (NO) release by glutamate and NMDA in the dorsal horn of the spinal cord: na *in vivo* electrochemical approach in the rat. **Brain Res.**, v. 821, p. 101-110, 1999.
- ROCHE, A.K.; COOK, M.; WILCOX, G.L.; KAJANDER, K.C. A nitric oxide synthesis inhibitor (L-NAME) reduces licking behavior and Fos-labeling in the spinal cord of rats during formalin-induced inflammation. **Pain**, v. 66, p. 331-341, 1996.

- ROSETH, S.; FYKSE, E.M.; FONNUM, F. Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. **J. Neurochem.**, v. 65, p. 96-103, 1995.
- ROSLAND, J.H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. **Pharmacol. Toxicol.** v. 66, p. 382-386, 1990.
- RUSIN, K.I.; JIANG, M.C.; CERNE, R.; RANDIC, M. Interactions between excitatory amino acids and tachykinins in the rat spinal dorsal horn. **Brain Res. Bull.**, v. 30, p. 329-338, 1993.
- RYDH-RINDER, M.; KEREKES, N.; SVENSSON, M.; HÖKFELT, T. Glutamate release from adult primary sensory neurons in culture is modulated by growth factors. **Reg. Pept.**, v. 102, p. 69-79, 2001.
- SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TANNO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; HARA, A.; ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural response in the mouse. **Neurochem. Int.**, v. 3, p. 271-278, 1996.
- SALVEMINI, D.; WANG, Z.Q.; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINO, M.H.; MANNING, P.T.; CURRIE, M.G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 118, p. 829-838, 1996.
- SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, p. 381-389, 1997.
- SATO, K.; KIYAMA, H.; PARK, H.T.; TOHYAMA, M. AMPA, KA and NMDA receptors are expressed in the rat DRG neurones. **Neuroreport**, v. 4, p. 1263-1265, 1993.
- SCHEIDT, C.; SANTOS, A.R.S.; FERREIRA, J.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by the sesquiterpene drimaniol. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 340-347, 2002.
- SCHNEIDER, T.; ISSEKUTZ, A.C. Quantitation of eosinophil and neutrophil infiltration into rat lung by specific assays for eosinophil peroxidase and myeloperoxidase. Application in a Brown Norway rat model of allergic pulmonary inflammation. **J. Immunol. Meth.**, v. 198, p. 1-14, 1996.
- SIMMONS, D.L.; XIE, W.; CHIPMAN, J.G.; EVETT, G.E. Multiple cyclooxygenases: cloning of a mitogen-inducible form. In: BAILEY, J.M. **Prostaglandins, leukotrienes, lipoxins and PAF**. Plenum : New York, p. 324-451, 1991.
- SKERRY, T.M.; GENEVER, P.G. Glutamate signalling in non-neuronal tissues. **TRENDS Pharmacol. Sci.**, v. 22, p. 174-181, 2001.

- SLUKA, K.A.; WESTLUND, K.N. An experimental arthritis in rats: dorsal horn aspartate and glutamate increases. **Neurosci. Lett.**, v. 145, p. 141-144, 1992.
- SLUKA, K.A.; WESTLUND, K.N. An experimental arthritis model in rats: the effects of NMDA and non-NMDA antagonists on aspartate and glutamate release in the dorsal horn. **Neurosci. Lett.**, v. 149, p. 99-102, 1993.
- SMITH, W.L.; REGIER, M.K.; MORITA, I., SCHINDLER, M.; DE WITT, D.L.; LANEUVILLE, O.; LECOMTE, M.; BHATTACHARYYA, D.; OTTO, J.C. Structure, function and regulation of PGH synthase isozymes. Proceedings of the 9th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds, Florence, 1994.
- SMULLIN, D.H.; SKILLING, S.R.; LARSON, A.A. Interactions between substance P, calcitonin gene-related peptide, taurine and excitatory amino acids in the spinal cord. **Pain**, v. 42, p. 93-101, 1990.
- SOLOMON, L.M.; JUHLIN, L.; KIRCHENBAUM, M.B. Prostaglandins on cutaneous vasculature. **J. Invest. Derm.**, v. 51, p. 280-282, 1968.
- SOUZA, D.G.; COUTINHO, S.F.; SILVEIRA, M.R.; CARA, D.C.; TEIXEIRA, M.M. Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 403, p. 121-128, 2000.
- STANFA, L.C.; DICKENSON, A.H. The role of non-N-methyl-D-aspartate ionotropic glutamate receptors in the spinal transmission of nociception in normal animals and animals with carrageenan inflammation. **Neuroscience**, v. 93, p. 1391-1398, 1999.
- STEEN, K.H.; WEGNER, H. MELLER, S.T. Analgesic profile of peroral and topical ketoprofen upon low pH-induced muscle pain. **Pain**, v. 93, p. 23-33, 2001.
- STERANKA, L.R.; MANNING, D.C.; DeHAAS, C.J.; FERKANY, J.W.; BOROSKY, S.A.; CONNOR, J.R.; VAVREK, R.J.; STEWART, J.M.; SNYDER, S.H. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 3245-3249, 1988.
- TANIGUCHI, K.; SHINJO, K.; MIZUTANI, M.; SHIMADA, K.; ISHIKAWA, T.; MENNITI, F.S.; NAGAHISA, A. Antinociceptive activity of CP-101, na NMDA receptor NR2B subunit antagonist. **Br. J. Pharmacol.**, v. 122, p. 809-812, 1997.
- TAO, Y.-X.; JOHNS, R.A. Activation and up-regulation of spinal cord nitric oxide receptor, soluble guanylate cyclase, after formalin injection into the rat hind paw. **Neuroscience**, v. 112, p. 439-446, 2002.

- TEIXEIRA, M.M.; HELLEWELL, P.G. The effect of the selectin binding polysaccharide fucoidin on eosinophil recruitment *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 120, p. 1059-1066, 1997.
- TEOH, H.; MALCANGIO, M.; FOWLER, L.J.; BOWERY, N.G. Evidence for release of glutamic acid, aspartic acid and substance P but not  $\gamma$ -aminobutyric acid from primary afferent fibres in rat spinal cord. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 302, p. 27-36, 1996.
- THOMAS, R.J. Excitatory amino acids in health and disease. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 43, p. 1279-1289, 1995.
- URBAN, L.; NAGY, I. Is there a nociceptive carousel? **Trends in Pharmacol. Sci.**, v. 18, p. 223-224, 1997.
- URBAN, L.; THOMPSON, S.W.N.; DRAY, A. Modulation of spinal excitability: co-operation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. **TINS**, v. 17, p. 432-438, 1994.
- VALLANCE, P.; LEIPER, J. Blocking NO synthesis: how, where and why? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 939-950, 2002.
- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, v. 44, p. 1-10, 1995.
- VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.-G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Progr. Neurobiol.**, v. 64, p. 327-363, 2001.
- VETTER, G.; GEISLINGER, G.; TEGEDER, I. Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation. **Pain**, v. 92, p. 213-218, 2001.
- ZHANG, X.W.; LIU, Q.; THORLACIUS, H. Inhibition of selectin function and leukocyte rolling protects against dextran sodium sulfate-induced murine colitis. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 36, p. 270-275, 2001.
- ZHOU, S.; BONASERA, L.; CARLTON, S.M. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviours in rats. **Neuroreport**, v. 7, p. 895-900, 1996.
- ZHOU, S.; KOMAK, S.; DU, J.; CARLTON, S.M. Metabotropic glutamate 1 $\alpha$  receptor in peripheral primary afferent fibers: their role in nociception. **Brain Res.**, v. 913, p. 18-26, 2001.
- ZHUO, M. NMDA receptor-dependent long term hyperalgesia after tail amputation in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 349, p. 211-220, 1998.

- WALKER, K.; BOWES, M.; PANESAR, M.; DAVIS, A.; GENTRY, C.; KESINGLAND, A.; GASPARINI, F.; SPOOREN, W.; STOEHR, N.; PAGANO, A.; FLOR, P.J.; VRANESIC, I.; LINGENHOEHL, K.; JOHNSON, E.C.; VARNEY, M.; URBAN, L.; KUHN, R. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGlu5) and nociceptive function I. Selective blockade of mGlu5 receptors in models of acute, persistent and chronic pain. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 1-9, 2001a.
- WALKER, K.; REEVE, A.; BOWES, M.; WINTER, J.; WOTHERSPOON, G.; DAVIS, A.; SCHMID, P.; GASPARINI, F.; KUHN, R.; URBAN, L. mGlu receptors and nociceptive function II. mGlu5 receptors functionally expressed on peripheral sensory neurones mediate inflammatory hyperalgesia. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 10-19, 2001b.
- WALL, P.D. Introduction to the fourth edition. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone : Londres, p. 1-8, 1999.
- WELLMANN, H.; KALTSCHMIDT, B.; KALTSCHMIDT, C. Retrograde transport of transcription factor NF- $\kappa$ B in living neurones. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 11821-11829, 2001.
- WESTLUND, K.N.; SUN, Y.C.; SLUKA, K.A.; DOUGHERTY, P.M.; SORKIN, L.S.; WILLIS, W.D. Neural changes in acute arthritis in monkeys. II. Increased glutamate immunoreactivity in the medial articular nerve. **Brain Res. Rev.**, v. 17, p. 15-27, 1992.
- WILLIAMS, T.J.; PECK, M.J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature**, v. 270, p. 530-532, 1977.
- WOOD, I. Transcription factors move with the glow. **TRENDS Pharmacol. Sci.**, v. 22, p. 166, 2001.
- WOTHERSPOON, G.; WINTER, J. Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. **Neurosci. Lett.**, v. 294, p. 175-178, 2000.
- YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N.; MIZUGUCHI, T. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw. **Anesth. Anal.**, v. 77, p. 886-890, 1993.

## SUMMARY

This study characterizes the receptor subtypes and investigates some of the mechanisms by which glutamate, injected intraplantarly (i.pl.) into the mouse paw, produces nociception and paw oedema. I.pl. injection of glutamate induced a rapid onset, dose-related pain response, apparently pH independent, associated with oedema formation, associated with plasma-protein extravasation. Pre-treatment with Chicago sky blue 6B, an inhibitor of glutamate uptake, caused a significant (about six fold) reduction of the mean ED<sub>50</sub> value for glutamate-induced nociception, but not paw oedema. NMDA receptor antagonist MK 801, given by i.pl. route, produced graded inhibition of glutamate-induced nociception. Kainate and AMPA receptor antagonists, NBQX and SYM 6602, metabotropic antagonist E4CPG, and also the antagonist that acts at the NMDA receptor-associated glycine binding site felbamate, i.pl., significantly inhibited the nociception induced by the i.pl. glutamate injection. The tachykinin NK2 (SR 48968), and to a lesser extent the NK1 (FK 888), selective receptor antagonists (i.pl.) caused a significant reduction in glutamate-induced nociception. In contrast, the selective NK<sub>3</sub> (SR 142801) or the calcitonin gene-related peptide (CGRP<sub>8-37</sub>) selective receptor antagonists failed to significantly affect glutamate-induced nociception or oedema formation. SR 48968, but not FK 888, significantly inhibited glutamate-induced paw oedema formation. The selective B<sub>1</sub> receptor antagonists des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-BK, but not the B<sub>2</sub> receptor antagonist HOE 140 (i.pl.), together with glutamate, also inhibited nociception in a graded manner without affecting the glutamate-induced paw oedema. L-N<sup>o</sup>-nitro-arginine (L-NOARG, intraperitoneal [i.p.] or i.pl.) reduced the nociception and paw oedema caused by glutamate, an effect that was reversed by L-arginine but not by D-arginine. S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine, i.pl., greatly potentiated glutamate-induced nociception and oedema. In addition, the i.pl. injection of glutamate also increased, in a graded manner, the nitrite levels in the hindpaw exudate. Neonatal-capsaicin treatment inhibited glutamate-induced nociception and to a lesser extent glutamate-mediated oedema formation. The nociception or oedema induced by i.pl. injection of glutamate were not altered by the animal

treatment with fucoidin, a selectin-inhibitor. In the time point studied (15 min), the i.pl. injection of glutamate did not produced a increase of myeloperoxidase activity or activation of the nuclear factor  $\kappa$ B. Histological analysis of the tissue collected from the paw treated i.pl with vehicle or glutamate demonstrated that have little infiltration of cells, moderate oedema and vascular congestion.

Collectively, the current results indicate that the nociception caused by i.pl. injection of glutamate in mice is clearly mediated by ionotropic and metabotropic glutamate receptors activation, by a mechanism which largely depends on the L-arginine-nitric oxide pathway, capsaicin-sensitive fibres and by release of neurokinins from sensory neurones that activate NK2 receptors and to a lesser extent NK1 receptors, besides kinins acting at B<sub>1</sub> receptors. In contrast, glutamate-induced paw oedema seems to be primarily mediated via activation of NK2 receptors, KA receptors, nitric oxide and stimulation of capsaicin-sensitive C-fibres. CGRP receptors do not seem to be involved in either of the glutamate responses.

*Somos todos malucos,  
quem não quer ver malucos  
deve quebrar os espelhos.*

Voltaire