

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Taciane Stein da Silva

**PAPEL DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS DA MEDULA
ESPINHAL NA INFLAMAÇÃO ARTICULAR DE RATOS E SUA
POSSÍVEL CONTRIBUIÇÃO COMO ADJUVANTE PARA OS
EFEITOS ANALGÉSICOS DA MORFINA**

Florianópolis

2012

Taciane Stein da Silva

**PAPEL DOS RECEPTORES HISTAMINÉRGICOS DA MEDULA
ESPINHAL NA INFLAMAÇÃO ARTICULAR DE RATOS E SUA
POSSÍVEL CONTRIBUIÇÃO COMO ADJUVANTE PARA OS
EFEITOS DA MORFINA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Carlos Rogério Tonussi

Florianópolis

2012

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo Antônio e Maria Marlene, meus exemplos de amor e dedicação; ao meu noivo, Bruno César, por seu total apoio, paciência e compreensão.

A minha vovó, Ana Alzira, pelo seu carinho e todas as orações.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades dadas, por sempre me guiar nas minhas escolhas e por me ajudar a concluir com sucesso mais esta etapa;

Ao meu orientador Carlos Rogério Tonussi, pela generosidade em compartilhar seus ensinamentos e suas descobertas;

Aos colegas de laboratório, Eduardo, Vanessa, Flora, Alessandra pela amizade e companheirismo;

Aos alunos de iniciação científica, Lucas, Carol e Franci Ellen, pela amizade e auxílio na execução dos experimentos;

A CAPES pelo apoio financeiro;

Aos animais utilizados.

Resumo

A medula espinhal é conhecida por ser um centro de controle ortodrômico (nocicepção), bem como antidrômico (vasodilatação) na via nociceptiva. Os receptores de histamina participam da transmissão nociceptiva na medula espinhal, assim, é concebível que a histamina possa também desempenhar um papel no controle medular da vasodilatação periférica. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da via histaminérgica medular na incapacitação, no edema articular e na migração celular induzida pela injeção da carragenina na articulação do joelhos de ratos. Os animais receberam todos os fármacos por via intratecal 20 min antes da injeção intraarticular de carragenina (50 mg). A incapacitação articular foi medida pela contagem do tempo de elevação da pata (TEP), durante 1 min de caminhada forçada a cada hora, num total de 6 horas. O edema foi avaliado pela mensuração do diâmetro articular (DA). Após 6 h, o líquido sinovial foi coletado para a avaliação do infiltrado de leucócitos. A histamina foi hiponociceptiva e pró-edematogênica, diminuindo dessa forma o TEP (20 nmol) e aumentando o DA (0,002 nmol). Da mesma forma, 2-PEA diminuiu o TEP (1 nmol), e aumentou o DA (0,001 nmol). Cetirizina aumentou o TEP (0,126 pmol), e diminuiu do edema (12,6 nmol). O dimaprit diminuiu incapacitação, mas aumentou edema (18 pmol). Da mesma forma, ranitidina aumentou a incapacitação e diminuiu o edema (38 pmol). Immeip diminuiu a incapacitação (8 nmol), mas aumentou o edema (32 nmol). A tioperamida foi hipernociceptiva (4 nmol), e pró-edematogênica (0,04 nmol). A morfina inibiu incapacitação e edema (5, 45 nmol). A co-administração de morfina (0,5 nmol) com cetirizina (12,6 nmol) e immeip (16 pmol) causou hiponocicepção. Cetirizina e thioperamide aumentou o conteúdo sinovial leucócitos. A histamina pode atuar na medula espinhal por receptores H_1 e H_3 causando hiponocicepção, mas sua ação também pode aumentar a inflamação periférica.

Palavras Chaves: dor, inflamação, histamina, morfina e medula espinhal.

Abstract

Spinal cord is known to be a center that controls orthodromic (nociception) as well as antidromic traffic (vasodilation) in the nociceptive pathway. Histamine receptors are known to participate in the spinal cord nociceptive transmission, thus it is conceivable that histamine may also play a role in the spinal cord control on the peripheral vasodilation. The aim of this study was evaluate the role of spinal cord histamine in the articular incapacitation, edema and cell migration induced by carrageenan injection into rat knee-joints. The animals received intrathecal injection with drugs 20 min before knee-joint carrageenan injection (50 µg). Articular incapacitation was measured by counting the paw elevation time, during 1-min periods of forced walk hourly. Edema was accessed by the metering of the articular diameter. After 6 h, synovial fluid was collected for the evaluation of leukocyte infiltration. Histamine decreased the incapacitation (20 nmol), while increased the edema (0.002 nmol). Similarly, 2-PEA decreased the incapacitation (1 nmol), and increased the edema (0.001 nmol). Cetirizine increased the incapacitation (0.126 pmol), and decreased edema (12,6 nmol). Dimaprit decreased incapacitation, but increased edema (18 pmol). Similarly, Ranitidine increased incapacitation and decreased edema (38 pmol). Immepip decreased the incapacitation (8 nmol), but increased the edema (32 nmol). Thioperamide increased the incapacitation (4 nmol), and the edema (0.04 nmol). Morphine inhibited incapacitation and edema (5; 45 nmol). The co-administration of morphine (0.5 nmol) with cetirizine (12,6 nmol) and immepip (16 pmol) decreased incapacitation. Cetirizine and thioperamide increased the synovial leukocyte content. Histamine may act in the spinal cord by H₁ and H₃ receptors to cause hyponociception, but this action may also increase peripheral inflammation.

Keywords: pain, inflammation, histamine, morphine and spinal cord.

LISTA DE ABREVIÇÕES

- SNC – sistema nervoso central
- HDC - histidina descarboxilase
- VMAT-2 – transportador vesicular de monoaminas 2
- TM – túbero mamilar
- H₁R – receptor de histamina H₁
- H₂R – receptor de histamina H₂
- H₃R – receptor de histamina H₃
- H₄R – receptor de histamina H₄
- FLC – fosfolipase C
- IP₃ – inositol trifosfato
- AC – adenilato ciclase
- PKA – proteína quinase A
- CREB – proteína de ligação ao elemento de resposta do AMP
- DAG – diacilglicerol
- GC – guanilato ciclase
- MAPK – proteína quinase ativadora de mitógeno
- i.a. – intra-articular
- TEP – tempo de elevação da pata
- DA – diâmetro articular
- i.t. – intratecal
- i.c.v. – intracerebrovetricular
- LT – leucócitos totais
- MON – mononucleares
- PMN – polimorfonucleares
- FS – fluido sinovial
- 2-PEA – 2-pyridylethylamine dihydrochloride
- K_d – constante de dissociação
- K_i – constante de inibição
- TM – túbero mamilar

LISTA DE FIGURAS

1.1	Síntese, transporte e metabolismo da histamina em neurônios	22
1.2	Vias de sinalização ativadas pelos receptores histaminérgicos	25
3.1	Esquema ilustrativo da injeção intra-articular	33
3.2	Aparelho para medir o tempo de elevação da pata	34
3.3	Mensuração do diâmetro articular	35
3.4	Caixas para observação comportamental	36
3.5	Figura ilustrativa da injeção intratecal	37
3.6	Leucócitos presentes no fluido sinovial de ratos	38
3.7	Protocolo experimental	38
4.1	Curva dos efeitos da incapacitação, edema articular e migração leucocitária em ratos sensibilizados com carragenina	42
4.2	Curva dos efeitos da histamina administrada por via intratecal na incapacitação, edema articular e migração de leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina	44
4.3	Curva dos efeitos da Cetirizina administrada por via intratecal na incapacitação, edema articular e migração de leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina	46
4.4	Curva dos efeitos do 2-PEA administrado por via intratecal na incapacitação, edema articular e migração de leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina	48
4.5	Curva dos efeitos da ranitidina administrada por via intratecal na incapacitação, edema articular e migração de leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina	50
4.6	Curva dos efeitos do dimaprit administrado por via intratecal na incapacitação, edema articular e migração de leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina.....	52

4.7	Curva dos efeitos do tioperamida administrada por via intratecal na incapacitação, edema articular e migração de leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina.....	54
4.8	Curva dos efeitos do immepip administrado por via intratecal na incapacitação, edema articular e migração de leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina	56
4.9	Curva dos efeitos da morfina administrada por via intratecal na incapacitação, edema articular e migração de leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina	58
4.1	Resposta da morfina combinada com cetirizina e immepip administradas por via intratecal na incapacitação, edema articular e migração de leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina	60
6.1	Modelo esquemático da ação da histamina intratecal sobre os receptores histaminérgicos medulares.....	74

SUMÁRIO

1. Introdução	19
1.1 Medula espinhal e a modulação da nocicepção.....	19
1.2 Histamina e seus receptores.....	20
1.3 Neurônios histaminérgicos e a modulação da dor.....	26
1.4 Histamina e opióides.....	27
2. Objetivos	29
2.1 Objetivos gerais.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. Materiais e métodos	31
3.1 Animais	31
3.2 Fármacos, reagentes e soluções	31
3.3 Modelo experimental da incapacitação induzida pela carragenina	32
3.4 Testes comportamentais	33
3.4.1 Teste algesimétrico	33
3.4.2 Mensuração do edema articular	35
3.4.3 Caixa de observação comportamental	35
3.5 Métodos	36
3.5.1 Injeção intratecal.....	36
3.5.2 Avaliação da migração leucocitária.....	37
3.6 Protocolo Experimento.....	38
3.7 Análise Estatística.....	39
4. Resultados	41
4.1 Curva dose resposta dos efeitos da carragenina na incapacitação, edema articular e migração leucocitária em ratos	41

4.2 Efeito da administração da histamina intratecal na incapacitação, no edema articular e na migração dos leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina.....	43
4.3 Efeito da administração do antagonista H ₁ , Cetirizina, na incapacitação, no edema articular e na migração dos leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina	45
4.4 Efeito da administração do 2-PEA na incapacitação, no edema articular e na migração dos leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina	47
4.5 efeito da administração da Ranitidina por via intratecal na incapacitação, no edema articular e na migração dos leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina	49
4.6 Efeito da administração do Dimaprit por via intratecal na incapacitação, no edema articular e na migração dos leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina	51
4.7 Efeito da administração da Tioperamida intratecal na incapacitação, no edema articular e na migração dos leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina.....	53
4.8 Efeito da administração do Imnepip por via intratecal na incapacitação, no edema articular e na migração dos leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina	55
4.9 Efeito da administração da morfina intratecal na incapacitação, no edema articular e na migração dos leucócitos em ratos sensibilizados com carragenina	57
4.10 Potencialização do efeito da morfina através do bloqueio do receptor H ₁ e ativação do receptor H ₃ espinhais em ratos sensibilizados com carragenina	59
4.11 Avaliação dos comportamentos nociceptivos expressos pelos animais na caixa de observação comportamental	61
5 Discussão	63
6 Conclusão	73
7 Referencias	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 Medula espinhal e a modulação da nocicepção

A fisiopatologia da dor envolve muitas interações em diferentes estruturas centrais e periféricas que se estendem desde a superfície da pele e das articulações até o córtex cerebral. Nocicepção é o mecanismo por meio do qual os estímulos nocivos são transmitidos ao sistema nervoso central (SNC). O sinal nociceptivo é gerado por estímulos intensos, podendo esse estímulo ser químico, mecânico ou térmico, geralmente conduzido por fibras nervosas especializadas do tipo C ou A δ (FÜRST 1998).

Devido às limitações das técnicas eletrofisiológicas, a maioria dos estudos se concentram nos tipos aparentemente mais comuns de fibras nociceptoras. Fibras mielinizadas A δ de grosso calibre com velocidade de condução de 5 a 30m/s e fibras C amielinizadas de pequeno calibre com velocidade de condução de 0,5 a 2 m/s. Ambos os grupos, transmitem a informação dos receptores periféricos para a medula espinhal. O corno dorsal é a região da medula espinhal que recebe a maioria desses aferentes primários originados na pele, víscera, articulações e músculos, e transmite a informação dos receptores sensoriais para o SNC (TODD e KOEBERG, 2006).

O estímulo nociceptivo chega de maneira altamente organizada no corno dorsal da medula espinhal, com as fibras A δ terminando principalmente nas lâminas I e V e as fibras C na lâmina II (MILLAN, 2002). As lâminas mais profundas III-VI também têm um papel importante na dor: alguns aferentes nociceptivos primários terminam nesta região, e muitos dos neurônios destas lâminas (incluindo algumas células de projecção) são ativados por estímulos nocivos (CAMPBELL et al., 1988). A conexão sináptica entre as fibras aferentes primárias e os neurônios do corno dorsal envolve neurotransmissores como o glutamato e a substância P (MILLAN, 2002).

Assim os aferentes primários nociceptivos terminam quase exclusivamente no corno dorsal, e que dessa forma, é o local da primeira sinapse das vias ascendentes que transmitem ao cérebro informações sensoriais da percepção da dor (TODD e KOEBERG, 2006).

A ação de substâncias algogênicas nas fibras aferentes primárias, resulta na sua despolarização e na transmissão ortodrômica dos impulsos para o corno dorsal da medula, porém essa atividade pode estimular ramos colaterais de outros nociceptores, produzindo potenciais de ação antidrômicos, essa descarga direta para trás através dos aferentes primários é relatada como reflexo da raiz dorsal (RRD).

O mecanismo de deflagração do RRD envolve um processo de despolarização das fibras aferentes primárias na medula espinhal, denominado PAD (Primary afferent depolarization). Essa despolarização causa uma inibição pré-sináptica através da inativação de canais de sódio, cálcio e o aumento da condutância aos íons cloreto e potássio, essas ações culminam com a redução da amplitude dos potenciais de ação que invadem os terminais pré-sinápticos. A redução do tamanho do potencial de ação pré-sináptico pode resultar em um menor influxo de cálcio para dentro do terminal pré-sináptico e, assim, diminuir a quantidade de neurotransmissor liberado (WILLIS, 2006).

Embora a PAD seja normalmente um evento inibitório, pode ser convertido em um mecanismo excitatório se o RRD for deflagrado. Por exemplo, durante um processo inflamatório periférico, o processo de PAD é intensificado para evocar um potencial de ação que pode ser conduzido de forma antidrômica. Esse fenômeno promove uma liberação periférica de aminoácidos excitatórios, por exemplo, substância P e outros mediadores que aumentam a nocicepção tanto por ação de feedback sobre os aferentes primários quanto por ação de outros tecidos envolvidos no processo nociceptivo e inflamatório (WILLIS, 1999). Disto resulta que a modulação da transmissão nociceptiva na medula espinhal tenha também influência sobre eventos inflamatórios periféricos.

1.2 Histamina e seus receptores

A histamina é uma amina biogênica endógena, sintetizada pela primeira vez em 1907 pelos pesquisadores Adolf Windaus e Karl Vogt. Três anos depois Henry Dale e George Barger isolaram a histamina a partir de uma bactéria contaminada com o extrato de ergot. Desde sua descoberta há 100 anos, ela tem sido muito

estudada pela medicina, devido seu amplo espectro de atividades, incluindo seu funcionamento como neurotransmissor (THURMOND, 2011).

A histamina é sintetizada em diversos tipos de células no sistema nervoso central e periférico, sabe-se que essa amina praticamente não ultrapassa a barreira hematoencefálica (SUZUKI, et al., 2005), o que serve de proteção ao cérebro dos possíveis efeitos da histamina via corrente sanguínea. Ela é principalmente encontrada em mastócitos, onde é estocada em grânulos citoplasmáticos e liberada por exocitose para exercer suas ações em resposta a vários estímulos imunológicos e não-imunológicos (KASKAVAS et al., 2006). A histamina não derivada de mastócitos é oriunda de diversas fontes, como células enterocromafins do trato gastrointestinal (PRINZ et al., 2003), e neurônios (PANULA et al., 1984).

A histamina é sintetizada a partir do aminoácido histidina. A histidina é transportada para o fluido cérebroespinal e os neurônios através do transportador L-aminoácido presente na membrana celular (HASS e PANULA 2003). Uma vez no citoplasma, a L-histidina é descarboxilada pela enzima específica histidina descarboxilase (HDC) (Figura 1.1) dando origem então a histamina. A HDC apresenta atividade elevada no hipocampo, onde se localizam os corpos celulares dos neurônios histaminérgicos, mas existe também atividade da HDC nos terminais nervosos (WATANABE et al., 1983). O fator limitante para a síntese da histamina é a biodisponibilidade do seu precursor histidina. Após sua síntese ela é rapidamente captada pelo transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT-2) que utiliza o gradiente eletroquímico de prótons para transportá-la ao interior das vesículas onde são estocadas (KUKKO-LUKJANOV e PANULA, 2003; MERICKEL e EDWARDS, 1995). Após a ocorrência do potencial de ação gera-se um influxo de cálcio pelos canais de cálcio sensíveis a voltagem, as vesículas contendo a histamina fundem-se à membrana pré-sináptica liberando-a. No espaço extracelular, ela é metilada pela enzima histamina metil-transferase, localizada nas regiões pós sinápticas e na glia. Dessa metilação resulta a tele-metil-histamina, um metabólito sem atividade histaminérgica. Além dos neurônios, outras fontes de histamina são encontradas no SNC, como mastócitos (REIT, 1972) e possivelmente células da glia (ALMEIDA e BEAVEN, 1981).

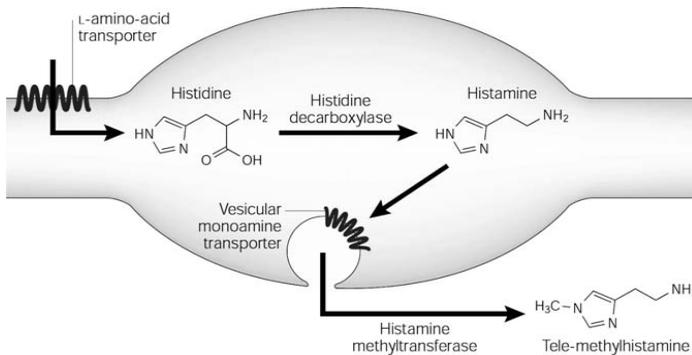


Figura 1.1: Síntese, transporte e metabolismo da histamina em neurônios (HAAS e PANULA, 2003).

A histamina é amplamente distribuída no SNC de mamíferos (ADAM e HYE, 1966) e apresenta um papel de neurotransmissor e neuromodulador (PRELL e GREEN, 1986). Em humanos (PANULA et al., 1990) e roedores (PANULA et al., 1984) essa amina é produzida em neurônios que estão localizados no núcleo túbero mamilar (TM), no hipotálamo posterior. Dessa área originam-se as projeções dos neurônios histaminérgicos que são emitidas através de duas vias, uma via ascendente que se direciona para diferentes áreas como córtex, amígdala, substância negra, estriado, tálamo e retina, e outra via descendente para o tronco cerebral e a medula espinhal. Na medula espinhal as fibras histaminérgicas são encontradas no corno ventral nas laminae VII-IX (PANULA et al., 1989).

O caráter regulatório pleiotrópico da histamina em eventos celulares é atribuído a sua ligação a quatro subtipos distintos de receptores acoplados a proteína G, designados H_1 , H_2 , e H_3 e o recentemente descoberto H_4 .

O receptor H_1 (H_1R) em mamíferos é encontrado em células musculares lisas, células endoteliais, trato gastrointestinal, sistema genitourinário, sistema cardiovascular, medula adrenal, linfócitos e SNC (HILL, 1990), seu papel fisiológico inclui vasodilatação, broncoconstrição, modulação da função da barreira endotelial, dor e prurido. Os antagonistas do H_1R são comumente utilizados para o tratamento de rinite alérgica e irritação de pele (HILL et al., 1997).

A interação do agonista com o H_1R ocorre através da ativação de um receptor acoplado a proteína $G_{q/11}$ (HILL et al., 1990; BAKKER et al., 2004; BROWN et al., 2002; ERIKSSON et al., 2001) que leva a ativação da enzima fosfolipase C (FLC). A enzima FLC promove a formação de dois segundos mensageiros, o diacilglicerol (DAG), sensível a ativação da proteína quinase C (PKC), e o inositol trifosfato (IP_3). O IP_3 libera cálcio (Ca^{2+}) da reserva intracelular (MATSUMOTO et al., 1986; KOTLEKOFF et al., 1987; HALL e HILL 1988) promovendo quatro processos dependentes do Ca^{2+} , 1) a abertura de canais de cátion voltagem dependente, o que resulta em uma despolarização (BROWN et al., 2002), 2) ativação do trocador eletrogênico Na^+-Ca^{2+} , o que resulta na despolarização (SMITH E ARMSTRONG 1996, ERIKSSON et al., 2001), 3) formação de óxido nítrico e GMP cíclico (RICHELSON, 1978; PRAST e PHILIPPU 2001) e 4) abertura de canais de potássio (K^+), resultando na hiperpolarização (WEIGER et al., 1997). Outro efeito da via do H_1R é a produção de ácido araquidônico (SNIDER, et al., 1984) (Figura 1.2).

O receptor de histamina H_2 (H_2R) é localizado em vários tecidos incluindo cérebro, células gástricas e tecido cardíaco (HILL et al., 1997). A localização desses receptores no SNC é muito difusa, esse receptor é encontrado no gânglio basal, na amígdala, no hipocampo, e no córtex (McCORMICK e WILLIAMSON 1989) bem como cerebelo, tronco cerebral, medula espinhal. Este receptor esta presente também em células da glia (Hösli e Hösli, 1984). Uma de suas funções é a secreção do ácido gástrico, desta forma os antagonistas do H_2R são usados clinicamente no tratamento de úlceras pépticas (SCHBERT e PEURA 2008).

Os H_2R são preferencialmente acoplados a uma proteína G_s que ativam a enzima adenilato ciclase (AC) e subsequentemente leva ao aumento do AMPc intracelular e a ativação da proteína quinase A (PKA), que fosforila e ativa a proteína de ligação ao elemento de resposta do AMP (CREB) (HAAS e KONNERTH, 1983) (figura 1.2). Todos esses eventos apresentam um papel fundamental na fisiologia e plasticidade neural (ATZORI et al., 2000; PEDARZANI e STORM 1995).

O receptor H_3 (H_3R) é encontrado de forma difusa no SNC, este receptor está presente também no gânglio da raiz dorsal, medula espinhal e tecidos periféricos (HERON et al., 2001; PILLOT

et al 2002), mas na medula espinhal esses receptores estão presentes em baixa densidade, particularmente nas camadas externas do corno dorsal (POLLARD et al., 1993). O H_3R primeiramente foi descrito sendo um autoreceptor inibitório pré-sináptico do SNC (ARRANG et al., 1983; ARRANG et al., 1987). Posteriormente estudos revelaram a existência desse receptor como heteroreceptores inibitórios em neurônios pós-sinápticos (POLLARD et al., 1993). Os H_3R estão localizados no corpo celular, nos dendritos e nos axônios (varicosidades), onde por meio de um feedback negativo diminuem a síntese e liberação da histamina (SCHLICKER et al., 1994) e a liberação de vários neurotransmissores, como glutamato (BROWN e HAAS, 1999), acetilcolina, e noradrenalina no SNC e periférico (ESBENSHADE et al., 2008). A ativação do H_3R periférico inibe a liberação de peptídeos, sugerindo sua localização em fibras sensoriais (OHKUBO et al., 1995; IMAMUTA et al., 1996; NEMMAR et al., 1999). Estudos de imunohistoquímica confirmaram a sua existência em neurônios sensoriais, no gânglio da raiz dorsal e em fibras sensoriais da pele e medula espinhal (CANNON et al., 2007). Estes receptores são acoplados a uma proteína $G_{i/o}$ e a canais de cálcio de alta voltagem, um mecanismo básico de liberação de neurotransmissores. A sua transdução inibe a adenilato ciclase e consecutivamente a formação de cAMP e estimula a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (DRUTEL et al., 2001) (figura 1.2).

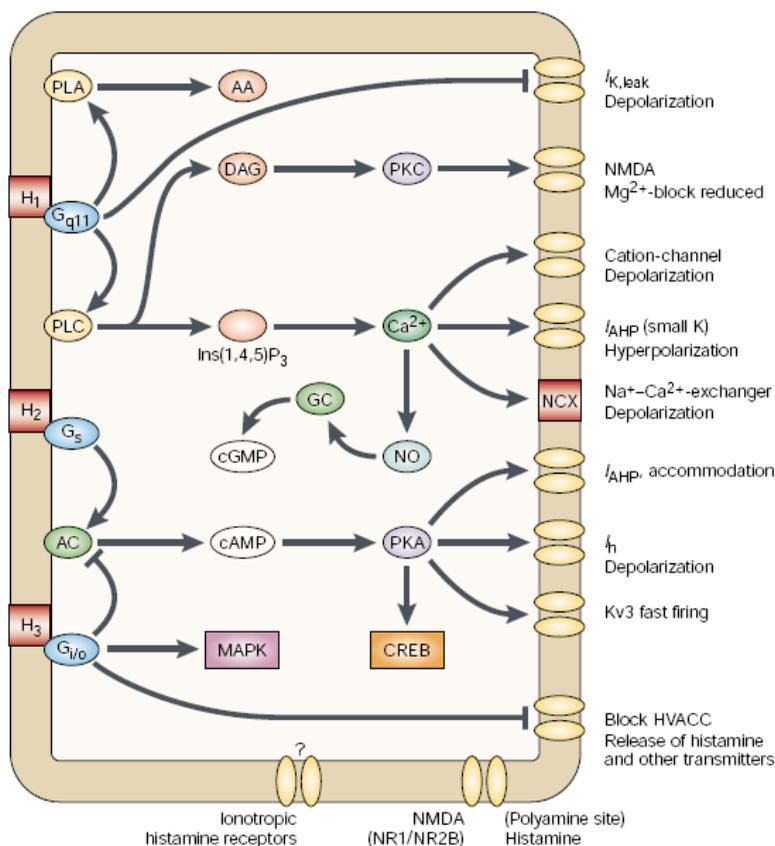


Figura 1.2: Vias de sinalização ativadas pelos receptores de histamina. Os receptores de histamina e a proteína G que cada um desses estão acoplados são representados a esquerda. A direita esta representado o alvo de ativação do receptor sobre a membrana. Na parte interna do quadrado apresenta-se as vias de sinalizações e os alvos intracelulares. AA, o ácido araquidônico; AC, adenilato ciclase; CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta do AMP; DAG, diacilglicerol; GC, guanilato ciclase; HVACC corrente Ca^{2+} ativado por alta voltagem; I_{AHP} , corrente de K^+ ativado por Ca^{2+} ; I_h , corrente cátions ativado por hiperpolarização; $I_{\text{K,leak}}$, vazamento, canais de K^+ em repouso; Ins(1,4,5)P₃, inositol-1,4,5-trifosfato; MAPK, proteínas quinases ativadas por mitógenos; NCX, trocador eletrolítico Na^+ - Ca^{2+} ; NMDA, N-metil-D-aspartato; NO, óxido nítrico; PKA, proteína quinase A; PKC, proteína quinase C; PLA, fosfolipase A; PLC, fosfolipase C. (Adaptado de HAAS e PANULA, 2003).

1.3 Neurônios histaminérgicos e a modulação da dor

Embora a histamina seja um componente familiar do processo inflamatório, sua ação ainda é pouco entendida. Sabe-se que em altas concentrações ela pode causar dor, acredita-se que seja devido à capacidade da histamina liberar substância P e CGRP nos terminais das fibras aferentes primárias (BELEVECIUTE et al., 1997) ativando neurônios responsivos ao estímulo doloroso no corno dorsal de uma maneira semelhante ao observado com o estímulo nocivo cutâneo (YAO et al., 1992). Além disso, canais centrais de K^+ parecem estar envolvidos na modulação da dor, através da abertura desses canais observou-se antinocicepção em animais (WELCK e DUNLOW, 1993; NARITA et al., 1993). Já foi descrito na literatura que a histamina exerce efeito sobre a modulação das correntes de K^+ nos neurônios, causando o aumento da corrente de K^+ e hiperpolarização da célula (HAAS e KONNERTH, 1983).

Os neurônios histaminérgicos descendentes originados no núcleo túbero mamilar projetam-se para áreas relacionadas com a percepção da dor (BASBAUM E FIELDS, 1984) como núcleos da rafe, região cinzenta periaquedutal, e o corno dorsal da medula espinhal (PALULA et al., 1984; PANULA et al., 1989; PANULA et al., 1989). Vários estudos têm demonstrado que a histamina aplicada diretamente no SNC induz antinocicepção (PAROLARO et al., 1989; MALMBERG-AIELLO et al., 1994), um exemplo disso, é a sua administração intraventricular causando analgesia através dos H_1R (HOUGH e NALWALK 1992). Seguindo essa linha, a redução da histamina no cérebro através da alfa-fluorometilhistamina ou com a ativação dos H_3R geram nocicepção (MALMBERG-AIELLO et al. 1994; MALMBERG-AIELLO et al. 1998). Estudos usando ligantes histaminérgicos ou camundongos *knock-out* para receptores H_1 e H_2 (MOBARAKEH, et al., 2005) sugerem que são esses os receptores responsáveis pela mediação dos efeitos da histamina na percepção da dor.

Fibras peptidérgicas são conhecidas pelo seu envolvimento na nocicepção (MILLAN, 1999; FURST, 1999). A inibição da atividade destas fibras, por agonistas do H_3R pode estar envolvido com a modulação da transmissão da dor, atenuando alguns tipos de transmissão nociceptiva. A administração oral de agonista do H_3R , BP 2-94, reduziu em camundongos a resposta a fenilbenzoquinona

no teste da formalina, mas falhou na redução da nocicepção no teste da placa quente (ROULEAU et al., 1997).

Estudos recentes utilizando camundongo *knock-out* para H₃R vêm fortalecendo a hipótese do envolvimento desses receptores espinhais na antinocicepção (CANNON et al., 2007; CANNON et al., 2003). Sabe-se que a ativação dos H₃R inibe somente certos tipos de dor como a induzida por estímulo mecânico de baixa intensidade (CANNON e HOUGH, 2005). A antinocicepção produzida por antagonistas H₄ (CORUZZI et al., 2007) e a recente descrição da expressão de H₄R na medula espinhal (CANNON e HOUGH, 2005) sugere um papel do receptor H₄ na percepção da dor.

1.4 Histamina e opióides.

Os receptores opióides são amplamente expressos no sistema nervoso central e sua ativação resulta em potente analgesia via inibição da transmissão nociceptiva ascendente excitatória e ativação de sistemas de inibição descendentes (STAMFORD, 1995). Existem três tipos principais de receptores opióides: μ (mu), κ (kappa) e δ (delta) que estão presentes no hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, corno dorsal da medula e nos nervos aferentes periféricos (STAMFORD, 1995; HOLDEN et al., 2005). Na periferia os receptores estão localizados nos corpos celulares do gânglio da raiz dorsal das fibras aferentes primárias (WANG e WESSENDORF, 2001) com expressão também nos terminais periféricos dos neurônios aferentes primários (STEIN, 2001).

Evidências têm demonstrado que a morfina aumenta a liberação de histamina nos terminais nervosos (ONODERA et al., 1994). Já foi relatado o aumento da liberação de histamina e da sua concentração na substância cinzenta periaquedutal após administração de morfina (NISHIBORI et al., 1983) sugerindo que o sistema histaminérgico está envolvido nos efeitos da morfina. Porém pouco é conhecido sobre o envolvimento desse sistema na modulação dos efeitos induzidos pela morfina e muitos resultados ainda são controversos. Suzuki (1991) demonstrou que os efeitos antinociceptivos induzidos pela morfina são atenuados por antagonistas do receptor H₂, e potencializados pelos antagonistas

do receptor H_1 , de forma contrária o próprio Suzuki demonstrou que antagonista H_1 e H_2 potencializou o efeito da morfina (SUZUKI et al., 1995).

Pelo exposto acima, a possível ação da histamina e seus receptores sobre a transmissão nociceptiva na medula espinhal também pode modificar o processo inflamatório periférico, sendo portanto, fundamental a compreensão dos eventos que ocorrem na periferia mediante manipulação farmacológica da região medular. Assim, uma melhor compreensão da função dos receptores de histamina medulares sobre a inflamação periférica, bem como sua influência na mediação do efeito dos opióides, pode contribuir para o aperfeiçoamento dos procedimentos analgésicos e antiinflamatórios.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse estudo foi compreender o efeito da histamina no canal medular lombar sobre a dor e a inflamação articular induzida por carragenina intra-articular e sua possível contribuição na ação analgésica da morfina.

2.1.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da injeção intratecal de histamina na incapacitação, no edema articular e no acúmulo de leucócitos no fluido sinovial, induzido por carragenina.

Avaliar o papel dos receptores H₁ medular na incapacitação, no edema articular e no acúmulo de leucócitos no fluido sinovial, induzido por carragenina intra-articular.

Avaliar o papel do receptor H₂ medular na incapacitação, no edema articular e no acúmulo de leucócitos no fluido sinovial, induzido por carragenina intra-articular.

Avaliar o papel do receptor H₃ medular na incapacitação, no edema articular e no acúmulo de leucócitos no fluido sinovial, induzido por carragenina intra-articular.

Avaliar o efeito da injeção intratecal de morfina na incapacitação, no edema articular e no acúmulo de leucócitos no fluido sinovial, induzido por carragenina.

Verificar o efeito da interação da via histaminérgica com a morfina sobre a incapacitação, o edema articular e o acúmulo de leucócitos no fluido sinovial, induzido por carragenina intra-articular.

Avaliar as respostas comportamentais expressas pelos animais logo após a injeção intratecal de histamina ou salina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar da linhagem *Rattus norvegicus*, machos e pesando entre 250-350 gramas. Os ratos foram criados no Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB, UFSC), transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia após o desmame e, posteriormente, para o biotério do Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção (LANEN). No LANEN os ratos foram agrupados em caixas contendo 5 animais e mantidos sob temperatura controlada (21 ± 2 °C), ciclo claro / escuro (12 horas claro / 12 horas escuro) e livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados entre as 8:00 e 18:00 horas, após ambientação prévia de pelo menos uma hora na sala onde os experimentos seriam realizados. Todos os experimentos foram realizados seguindo os preceitos éticos definidos pela Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP, 1983) e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo 23080.034306/2009-69, todos os esforços foram realizados para minimizar o número de ratos utilizados nos experimentos.

3.2 Fármacos reagentes e soluções

- Carragenina (kappa/lambda, BDH Chemist Ltda., UK). Veículo: solução fisiológica 0.9%;
- Histamina (Sigma, EUA): Veículo: solução fisiológica 0.9%;
- Ranitidina (Tocris, EUA): Veículo: solução fisiológica 0.9%;
- Tioperamida (Sigma, EUA): Veículo: solução fisiológica 0.9%;
- Cetirizina (Galena Química Farmacêutica Ltda., Brasil): Veículo: solução fisiológica 0.9%;

- ImmePIP (Sigma, EUA): Veículo: solução fisiológica 0.9%;
- 2-Pyridylethylamine dihydrochloride: (Tocris, EUA): Veículo: solução fisiológica 0.9%;
- Dimaprit (Tocris, EUA): Veículo: solução fisiológica 0.9%;
- Sulfato de Morfina (Dimorf®; Cristália, Brasil): veículo solução fisiológica 0.9%;
- Anestésico inalatório Isoflurano (Abbott, argentina);
- Solução salina 0.9% (Áster, Brasil);
- Cloral hidratado (Vetec Química Fina Ltda, Brasil). Veículo: solução fisiológica 0.9%.

3.3 Modelo experimental da incapacitação induzida pela carragenina

A carragenina é um mucopolissacarídeo sulfatado extraído do *Chondrus crispus*, quando injetada na articulação de coelho e cobaia desencadeia um quadro agudo de sinovite mono articular (GARDER et al., 1960), cujas alterações articulares mimetizam alguns dos sinais e sintomas da artrite reumatóide, incluindo o edema, a dor, infiltrado leucocitário e alterações morfológicas e bioquímicas da sinóvia. Além disso, a carragenina induz incapacitação articular durante o deambular (VAN ARMAN et al., 1970; TONUSSI e FERREIRA, 1992), sensibilização da articulação, manifestada pela retirada do membro quando a articulação inflamada é pressionada, síntese e liberação de mediadores inflamatórios que produzem edema e infiltração leucocitária (SANTER et al., 1983). Sabe-se que a carragenina não é antigênica, não induz efeitos sistêmicos e tem um alto grau de reprodutividade, além disso, é de fácil manuseio, portanto, uma substância adequada para o estudo do processo inflamatório.

Para a injeção intra-articular (i.a.) o animal foi imobilizado cuidadosamente com uma flanela, de um modo que apenas o terço

inferior do abdômen permaneceu livre. O animal foi posicionado em decúbito dorsal com a perna direita fletida, em seguida o joelho direito foi tricotomizado e imediatamente após foi realizado a anti-sepsia do local com solução de álcool iodado. Com o joelho tricotomizado foi possível observar o tendão infrapatelar, uma faixa esbranquiçada longitudinal que ancora a patela ao fêmur e a tíbia, a injeção i.a. de carragenina foi realizada através desse tendão para dentro da cavidade sinovial. Para a realização da injeção uma agulha (BD Ultra fine; comprimento 8 mm; calibre 0,33 ou 29 gauge) foi introduzida perpendicularmente em cerca de 1/3 do seu comprimento (figura 3.1).

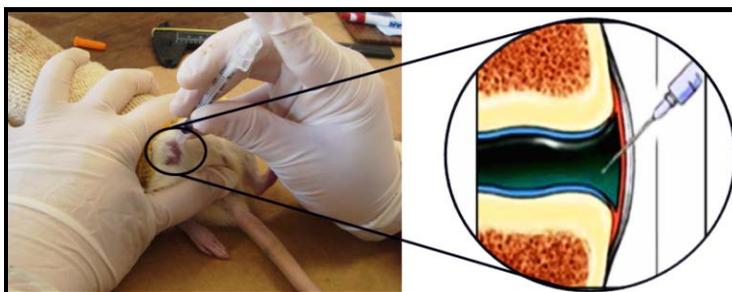


Figura 3.1: Figura ilustrativa da injeção intra articular. O diagrama mostra o local da inserção da agulha.

A carragenina foi diluída em solução salina e fervida por poucos minutos, após foi deixada em temperatura ambiente e então injetada na articulação 20 minutos após a injeção intratecal das drogas. O volume máximo injetado na cavidade articular foi de 50 ul.

3.4 Testes comportamentais

3.4.1 Teste algesimétrico

A nocicepção articular foi avaliada pelo sistema de registro da nocicepção articular descrito por Tonussi e Ferreira em 1992 que consiste de um aparato eletrônico que permite avaliar o estado funcional das articulações. O equipamento consiste de: 1) um cilindro (30 cm de altura e 30 cm de diâmetro) revestido por malha trançada em aço inox (2 mm). 2) Sapatilhas metálicas

(confeccionadas em folhas de flandres). 3) Microcomputador. O animal foi submetido à deambulação forçada no cilindro pelo período de 1 minuto. Para que o computador registre a incapacitação articular, uma sapatilha metálica foi acoplada em cada uma das patas traseiras do animal, mas apenas uma era conectada ao computador através de um fio condutor. Desse modo, o computador registrou a perda de função de apoio do membro afetado, ou seja, tempo total que a pata sensibilizada ficou sem tocar a superfície do cilindro durante o período de 1 minuto, o que é denominado de tempo de elevação da pata (TEP; segundos) e constitui a medida de incapacitação articular (figura 3.2). O TEP foi avaliado uma hora após a injeção de carragenina e subsequentemente a cada hora por um período total de 6 horas. No dia anterior a cada experimento os animais foram ambientados e treinados no sistema de registro de incapacitação articular a fim de aprenderem a deambular sem cair do cilindro e a se adaptarem ao uso das sapatilhas. Nesse momento foi realizado o registro dos valores basais de cada animal.



Figura 3.2: Aparelho para avaliação da incapacitação articular. Um cilindro em rotação constante permite a deambulação dos ratos e o registro do tempo de TEP, ou seja, a medida da incapacitação articular.

Neste modelo, o TEP de animais sem estimulação articular varia em torno de 10 segundos, enquanto a injeção intra-articular de substâncias algogênicas causa elevação deste valor indicando o desenvolvimento de incapacitação articular.

3.4.2 Mensuração do edema articular

O edema articular induzido pela carragenina foi quantificado através da medida do diâmetro articular fêmuro-tibial (eixo médio-lateral), com auxílio de um paquímetro não digital. As medidas foram realizadas imediatamente após cada registro de TEP, ou seja, a cada hora por um período de 6 horas. A medida basal foi realizada imediatamente antes da injeção i.a. de carragenina. Para isso os animais foram imobilizados cuidadosamente em uma flanela apenas pelo período necessário para a medida do diâmetro articular, foram realizadas 3 medidas e a maior foi registrada (figura 3.3). Os dados são apresentados como a diferença entre o diâmetro articular imediatamente antes da injeção i.a. de carragenina e as medidas subsequentes obtidas ao longo das 6 horas de avaliação (DA; mm).



Figura 3.3: Foto ilustrativa da medida do diâmetro articular com auxílio de um paquímetro não digital.

3.4.3 Caixa de observação comportamental

Para a avaliação dos comportamentos expressados pelos animais, imediatamente após a injeção da histamina intratecal (0,002 ou 20 nmol/20 μ l) ou salina (20 μ l) os animais foram colocados individualmente numa caixa de acrílico transparente (29X29X35 cm) onde eram filmados por 20 minutos (figura 3.4). Posteriormente na análise das filmagens foram contabilizados os

números de lambidas, sacudidas e mordidas das patas posteriores traseiras



Figura 3.4 – Foto ilustrativa da caixa de observação comportamental.

Os animais foram previamente familiarizados durante 10 minutos as caixas.

3.5 Métodos

3.5.1 Injeção intratecal

As drogas foram injetadas na medula espinhal no nível da coluna lombar, utilizando o método previamente descrito por Mestre e colaboradores (1994). Neste procedimento, os animais serão previamente anestesiados com isoflurano (2% em oxigênio hospitalar) e uma agulha (BD Ultra fine; comprimento 12,7 mm; calibre 0,33 ou 29 gauge) foram cuidadosamente inserida perpendicularmente no espaço intervertebral L5 e L6, até atingir o espaço subaracnóide (figura 3.5). Uma movimentação rápida da cauda (flick) deve ser percebida, indicando que o espaço subaracnóide foi atingido corretamente e dessa forma a injeção foi concluída. Os animais que não apresentaram o movimento rápido de cauda foram descartados. O volume máximo injetado pela via intratecal foi de 20 μ l.

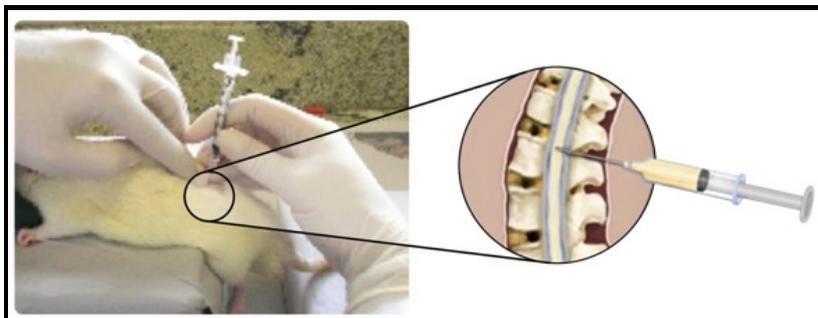


Figura 3.5: Figura ilustrativa da injeção intratecal. O diagrama mostra o local de inserção da agulha no espaço intervertebral entre L5 e L6.

3.5.2 Avaliação da migração leucocitária

Logo após a última medida do diâmetro articular, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico de hidrato de cloral (15%) seguido de deslocamento cervical. Foi coletado 5 μ l do fluido sinovial da articulação inflamada para o preparo de uma lâmina de esfregaço, com desse esfregaço foi realizado a contagem diferencial dos leucócitos (mononucleares e polimorfonucleares) em microscópio óptico e objetiva de 100x (figura 3.6). Os corantes utilizados para corar esses esfregaços foram may-grunwald e giemsa. Para a contagem total da migração leucocitária foi realizada uma lavagem articular com uma solução de 100 μ l de solução fisiológica 0,9 % com 4 μ l de E.D.T.A 5%, a coleta do líquido sinovial foi feita com auxílio de uma pipeta. Dessa coleta, 20 μ l foi então diluído em líquido de Turk (ácido acético glacial 2 ml, azul de metileno 1% e água destilada 98 ml) e a contagem das células totais foi realizada numa câmara de Neubauer (células/mm³).

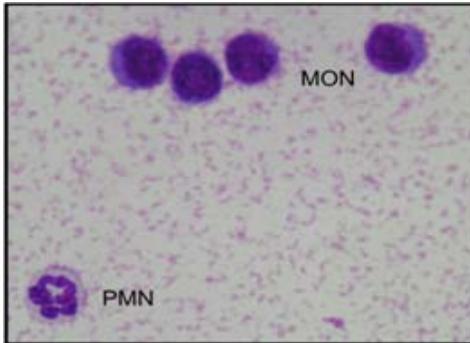


Figura 3.6: Leucócitos presentes no infiltrado sinovial. MON, mononucleares e PMN, polimorfonucleares.

3.6 Protocolo Experimental

O esquema a seguir (figura 3.7) representa o protocolo experimental adotado no presente estudo.

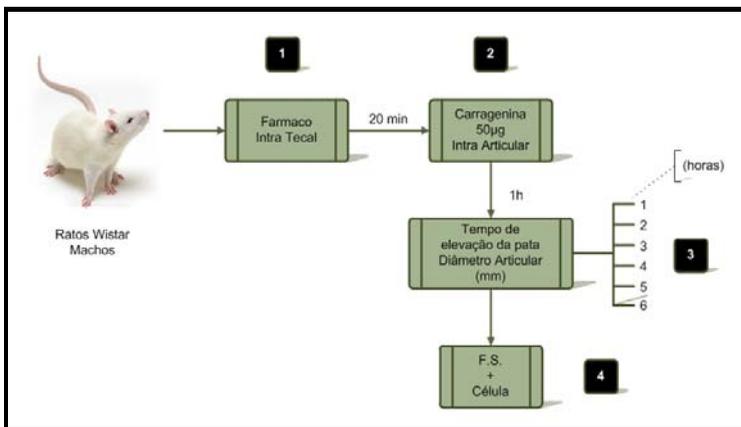


Figura 3.7: Protocolo experimental. Ratos Wistar macho naïve receberam inicialmente a injeção i.t. dos fármacos (1), 20 minutos depois foi realizada a injeção intra-articular de carragenina 50 µg/50 µl (2). Uma hora após a carragenina, iniciou-se as medidas do tempo de elevação da pata e do diâmetro articular (3). Após 6 horas de avaliação do TEP e do DA coletou-se o fluido sinovial (F.S.) e foi processada a contagem das células.

3.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0[®]. Para análise das curvas de incapacitação e diâmetro articular, utilizou-se ANOVA de uma via para medidas repetidas. Assim, apenas as variabilidades entre os diferentes grupos experimentais foram avaliadas. Realizou-se a comparação das curvas, como um todo, entre os diferentes grupos experimentais. O relevante nesse estudo foi verificar o efeito dos fármacos sobre a intensidade da nocicepção ou diâmetro articular durante um determinado período de tempo como um todo. Entretanto, quando comparado somente dois grupos experimentais foi utilizado o test t não pareado, e o resultado foi considerado estatístico quando um nível de significância de pelo menos $p < 0,05$ foi detectado. No caso da contagem de leucócitos sinoviais utilizou-se ANOVA de uma via para medidas simples. O pós teste Dunnett foi aplicado sempre que a diferença de $p < 0,05$ foi detectada. Os grupos experimentais foram compostos de 6 animais e os dados foram representados como a média \pm erro padrão da media (E.P.M).

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos da carragenina na incapacitação, edema articular e migração leucocitária em ratos.

Inicialmente, uma curva dose resposta de carragenina (50; 150 ou 300 μg / 50 μl) foi realizada com o intuito de estabelecer a concentração ideal de carragenina a ser usada nos próximos experimentos, concentração desejada era uma que permitisse a observação tanto da potencialização quanto da inibição das variáveis analisadas.

A incapacitação articular foi avaliada através do tempo de elevação da pata (TEP, s), uma hora após a administração das doses de carragenina. Foi observado o desenvolvimento de uma hipernocicepção nos animais com a administração das doses de carragenina, com o aumento do TEP em forma dose dependente em relação ao grupo controle salina (50 μg ; $p < 0,01$, 150 e 300 μg ; $p < 0,001$) (figura 4.1 A). O edema articular é representado através da diferença entre o valor da mensuração do diâmetro articular realizado antes e depois da injeção de carragenina, nessa curva dose resposta observamos que todas as doses de carragenina aumentaram o diâmetro articular em forma dose dependente (50, 150 e 300 μg ; $p < 0,001$ para todos) (figura 4.1 B). A linha vermelha no eixo da abscissa representa o período em horas utilizado para a realização da análise estatística.

O infiltrado de leucócitos no fluido sinovial foi avaliado através da contagem de leucócitos totais (LT/ mm^3), mononucleares (MON/ mm^3) e polimorfonucleares (PMN/ mm^3). A carragenina promoveu um aumento na migração celular de leucócitos totais (50 e 300 μg ; $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente), foi observado um aumento também no número de monócitos (300 μg ; $p < 0,05$) e polimorfonucleares (50 e 300 μg ; $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) (figura 4.1 C).

A partir dessa avaliação inicial, definimos que a concentração de 50 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ apresenta melhor perfil para o seguimento desse estudo, por ter provocado resposta mediana das variáveis analisadas.

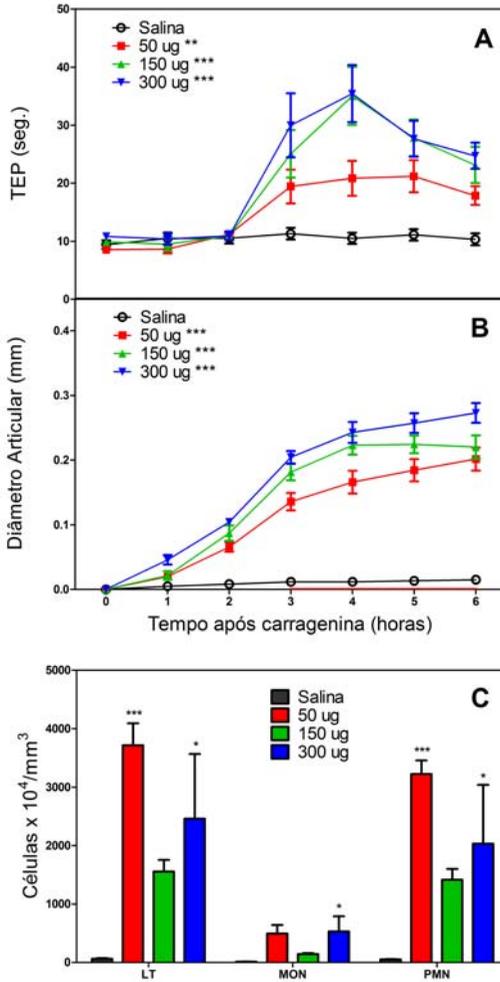


Figura 4.1: Curva do efeito dose crescente da carragenina i.a. na incapacitação (A), edema articular (B) e migração leucocitária (C) em ratos. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=8). Para análise da incapacitação e do edema (2-5 horas, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett. Para migração de leucócitos ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett. *, ** e *** representam a diferença estatística em relação ao controle com $p < 0,05$, 0,01 e 0,001, respectivamente.

4.2 Efeito da Histamina i.t. na incapacitação, edema articular e migração leucocitária em ratos sensibilizados com carragenina.

A primeira etapa desse estudo foi avaliar o efeito da histamina administrada por via intratecal na incapacitação, no edema articular e na migração leucocitária. Tanto a incapacitação articular como o edema articular, foram avaliados a cada hora durante seis horas, sendo o primeiro registro realizado uma hora após a administração de carragenina. As doses de histamina (0,002; 0,2; 2; 20 nmol/20 μ l) ou salina (controle/20 μ l) foram administradas por via i.t. 20 minutos antes da aplicação da carragenina na articulação do joelho direito (50 μ g/50 μ l). No que diz respeito à incapacitação articular a histamina em alta dose apresentou um papel hiponociceptivo (20 nmol), de forma contrária, em baixas doses a histamina apresentou um papel hipernociceptivo (0,002 e 0,2 nmol) (figura 4.2 A). No que diz respeito ao edema articular, a histamina em baixa dose (0,002 nmol) foi pró-edematogênica (fig. 4.2 B). Tanto a incapacitação quanto o edema articular apresentaram diferença significativa entre duas e cinco horas da coleta de dados do experimento. Não foi observada diferença significativa no perfil leucocitário com a administração de histamina i.t. (figura 4.2 C).

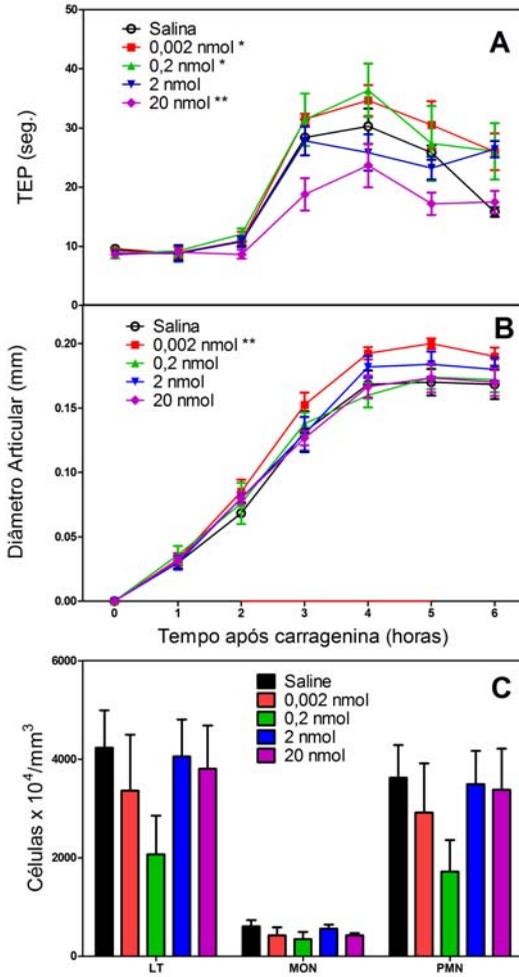


Figura 4.2: Efeitos da histamina administrada por via i.p. na incapacitação (A), edema articular (B) e migração de leucócitos (C) em ratos sensibilizados com carragenina. Os dados representam a média \pm E.P.M. ($n=8$). Para análise da incapacitação e do edema (2-5 horas, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett. Para migração de leucócitos ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett. * e ** representam a diferença estatística em relação ao controle com $p<0,05$ e $0,01$ respectivamente.

4.3 Efeito do antagonista H₁, Cetirizina, na incapacitação, edema articular e migração leucocitária em ratos sensibilizados com carragenina.

Visto a participação da histamina no teste de incapacitação articular e edema, passamos a discriminar a participação de cada receptor histaminérgico possivelmente envolvido na modulação desses eventos na medula espinhal.

O primeiro receptor estudado foi o receptor H₁, através do seu antagonista Cetirizina. A escolha das doses testadas (0,126; 1,26; 12,6 e 126 pmol) baseou-se pela constante de inibição (K_i) dos receptores H₁ (GILLARD 2001), objetivou-se com esse experimento determinar o papel da histamina endógena sobre o receptor H₁.

Com a administração na medula espinhal do antagonista H₁, nós obtivemos um efeito hiponociceptivo com a menor dose (0,126 pmol) e um efeito hipernociceptivo com a maior dose (126 pmol) (figura 4.3 A). No diâmetro articular, as maiores doses (12,6 pmol e 126) conseguiram inibir a formação do edema pela carragenina (figura 4.3 B). Com a menor dose (0,126 pmol) obtivemos um aumento da migração leucocitária total e de células polimorfonucleares (figura 4.3 C).

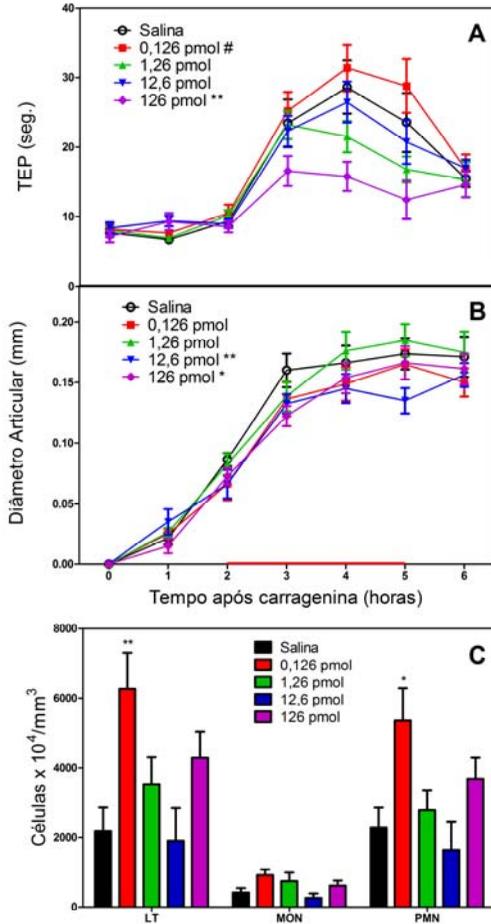


Figura 4.3: Efeito da Cetirizina administrada por via i.t. na incapacitação (A), edema articular (B) e migração de leucócitos (C) em ratos sensibilizados com carragenina. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=8). Para análise da incapacitação e do edema (2-5 horas, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett ou teste t de student. Para migração de leucócitos ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett. * e ** representam a diferença estatística em relação ao controle com $p < 0,05$ e $0,01$ respectivamente, # representa diferença estatística em relação ao controle salina estéril com valor de $p < 0,05$ para teste t de student.

4.4 Efeito do agonista H₁, 2-Pyridylethylamine dihydrochloride (2-PEA), na incapacitação, edema articular e migração leucocitária em ratos sensibilizados com carragenina.

Após a observação de que os receptores H₁ possuem participação nos efeitos causados pela carragenina intra-articular, verificamos a possível influência do agonista H₁, 2-PEA, na incapacitação, edema articular e migração de células. A escolha das doses testadas (0,001; 0,01; 0,1 e 1 nmol) baseou-se pela constante de dissociação (Kd) dos receptores H₁ (HILL et al., 1997).

O 2-PEA foi hiponociceptivo quando injetado por via i.t., foi obtido uma diminuição da incapacitação articular causada pela carragenina após a sensibilização (0,01 nmol e 1 nmol) (figura 4.4 A). Quanto ao diâmetro articular o 2-PEA demonstrou-se pró-edematogênico nas três menores doses (0,001 nmol; 0,01 nmol e 0,1 nmol) (Figura 4.4 B) após quatro horas da sensibilização com a carragenina.

Não foi observado diferença na migração celular (Figura 4.4 C) em comparação com o controle.

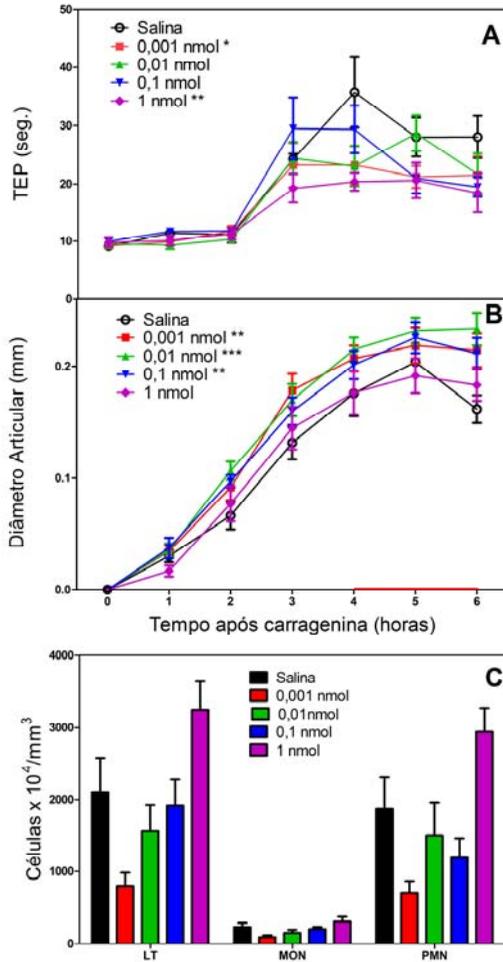


Figura 4.4: Curva dos efeitos do 2-PEA administrado por via intratecal na incapacitação (A), edema articular (B) e migração de leucócitos (C) em ratos sensibilizados com carragenina. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=7). Para análise da incapacitação e do edema (4-6 horas, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett. Para migração de leucócitos ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett. *, ** e *** representam a diferença estatística em relação ao controle com $p < 0,05$, $0,01$ e $0,001$, respectivamente.

4.5 Efeito do antagonista H₂, Ranitidina, na incapacitação, edema articular e migração leucocitária em ratos sensibilizados com carragenina.

Com o objetivo de avaliar a participação do receptor H₂ utilizamos o antagonista ranitidina i.t. A escolha das doses testadas (0,38; 3,8; 38 e 380 pmol) baseou-se na constante de inibição (K_i) dos receptores H₂ (AGUT et al., 1997).

Dentre as doses testadas somente a dose mediana (38 pmol) promoveu hipernocicepção em relação ao grupo controle (figura 4.5 A). Da mesma forma, somente essa dose foi capaz de provocar diminuição do diâmetro articular causado pela carragenina (Figura 4.5 B). Nenhuma das doses foi capaz de promover alteração significativa no perfil de migração celular (figura 4.5 C).

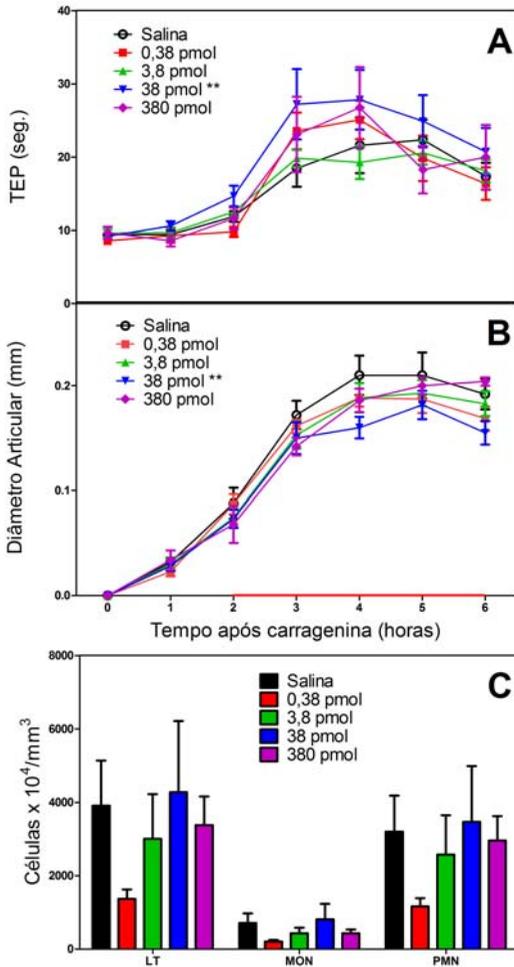


Figura 4.5: Efeitos da ranitidina administrada por via i.t. na incapacitação (A), edema articular (B) e migração de leucócitos (C) em ratos sensibilizados com carragenina. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=7). Para análise da incapacitação e do edema (2-6 horas, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett. Para migração de leucócitos ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett. ** representam a diferença estatística em relação ao controle com o valor de $p < 0,01$.

4.6 Efeito do agonista H₂, Dimaprit, na incapacitação, edema articular e migração leucocitária em ratos sensibilizados com carragenina.

Após a observação de que os receptores H₂ também possuem participação nos efeitos causados pela carragenina intra-articular, verificamos a possível influência do agonista H₂, Dimaprit, na incapacitação, edema articular e migração de células. A escolha das doses testadas (0,6; 2; 6 e 18 pmol) foi de acordo com a constante de dissociação (Kd) dos receptores H₂ (JANSEN et al., 1994).

O dimaprit foi hiponociceptivo na maior dose (18 pmol) quando injetado na medula espinhal e comparado com o grupo controle salina (figura 4.6 A). No diâmetro articular o dimaprit foi capaz de gerar um aumento do volume da articulação, demonstrando-se pró-edematogênico nas duas maiores doses (6 e 18 pmol) (Figura 4.6 B) comparado com o seu controle salina.

Nenhuma das doses testadas foi eficaz em alterar a migração dos leucócitos no fluido sinovial (figura 4.6 A).

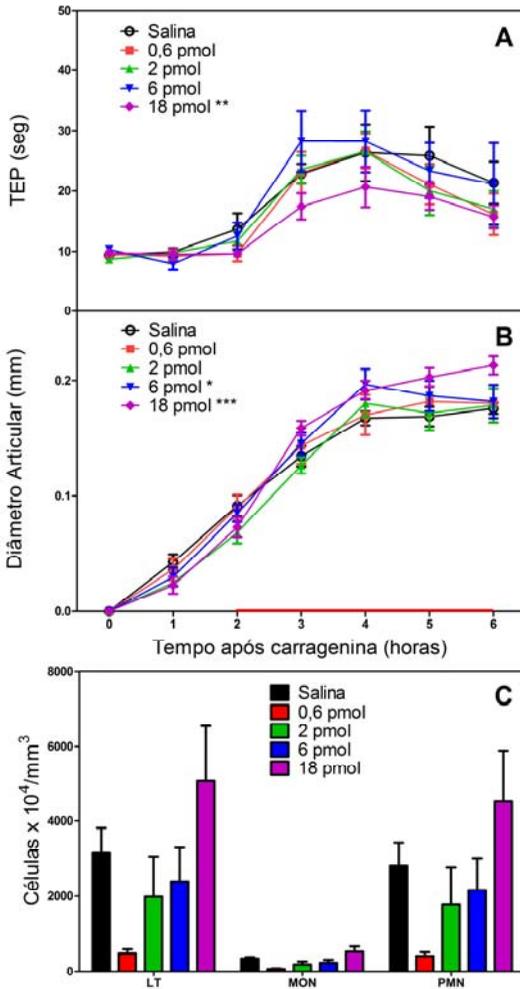


Figura 4.6: Efeitos do dimaprit administrado por via i.t. na incapacitação (A), edema articular (B) e migração de leucócitos (C) em ratos sensibilizados com carragenina. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=8). Para análise da incapacitação e do edema (2-6 horas, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett. Para migração de leucócitos ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett. *, ** e *** representam a diferença estatística em relação ao controle com $p < 0,05$, $0,01$ e $0,001$, respectivamente.

4.7 Efeito do agonista inverso H₃, Tioperamida, na incapacitação, edema articular e migração leucocitária em ratos sensibilizados com carragenina.

Objetivando-se avaliar a participação do receptor H₃ utilizamos o antagonista tioperamida administrado na medula espinhal. A escolha das doses testadas (0,0004; 0,04 e 4 nmol) baseou-se na constante de inibição (K_i) dos receptores H₃ (HILL, 1997).

Entre as doses utilizadas, no que se refere à incapacitação as doses mais altas (0,04 e 4 nmol) foram capazes de potencializar a nocicepção gerada pela carragenina (figura 4.7 A). Da mesma forma no diâmetro articular, a dose mediana (0,04 nmol) apresentou a capacidade de potencializar o edema originado pela carragenina (figura 4.7 B). Quanto a migração de leucócitos, a menor dose (0,0004 nmol) demonstrou-se capaz de aumentar o número de leucócitos totais, células mononucleares e polimorfonucleares no fluido sinovial dos ratos sensibilizados por carragenina (figura 4.7 C).

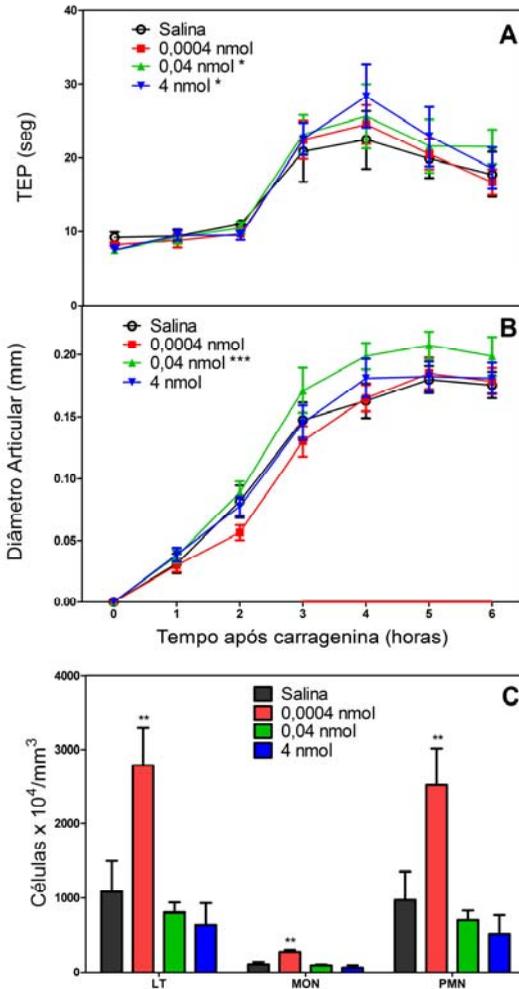


Figura 4.7: Efeitos da tioperamida i.t. na incapacitação (A), edema articular (B) e migração de leucócitos (C) em ratos sensibilizados com carragenina. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=8). Para análise da incapacitação e do edema (3-6 horas, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett. Para migração de leucócitos ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett. *, ** e *** representam a diferença estatística em relação ao controle com $p < 0,05$, 0,01 e 0,001, respectivamente.

4.8 Efeito do agonista H₃, Immepip, na incapacitação, edema articular e migração leucocitária em ratos sensibilizados com carragenina.

Após a observação de que os receptores H₃ também possuem participação nos efeitos causados pela carragenina intra-articular, verificamos a possível influência do agonista H₃, immepip, na incapacitação, edema articular e migração de células. A escolha das doses testadas (4; 8; 16 e 32 nmol) baseou-se na constante de dissociação (Kd) dos receptores H₃ (VOLLINGA et al, 1994).

As menores doses testadas (4 e 8 nmol) do agonista H₃ demonstraram ser hiponociceptiva, diminuindo o tempo de elevação da pata dos animais comparados com o controle salina (figura 4.8 A). No edema articular, observamos que a maior dose (32 nmol) aumentou o diâmetro articular, quando comparado com o controle (figura 4.8 B). O agonista H₃ immepip não foi capaz de alterar o perfil celular do fluido sinovial (figura 4.8 C).

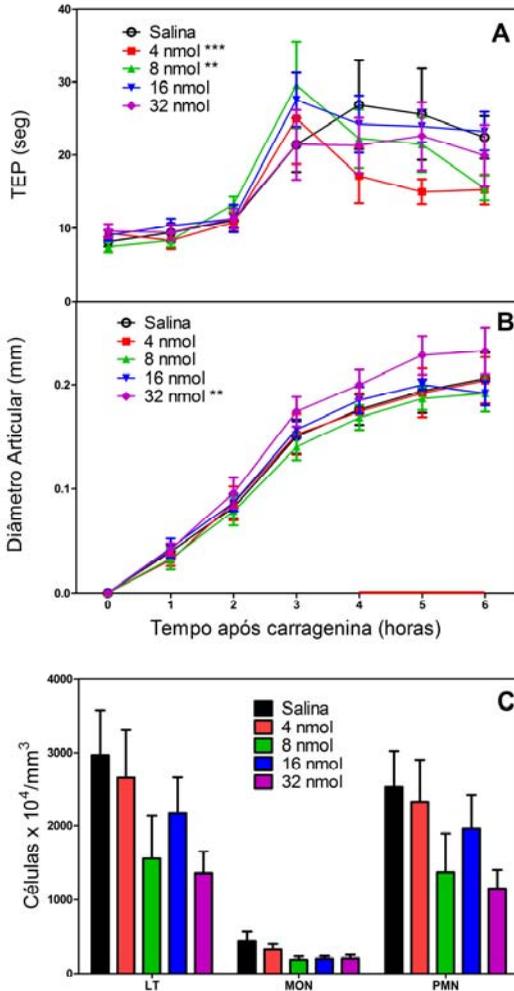


Figura 4.8: Efeitos do imipip i.t. na incapacitação (A), edema articular (B) e migração de leucócitos (C) em ratos sensibilizados com carragenina. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=8). Para análise da incapacitação e do edema (4-6 horas, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett. Para migração de leucócitos ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett. ** e *** representam a diferença estatística em relação ao controle com $p < 0,01$ e $0,001$, respectivamente.

4.9 Efeito da Morfina i.t. na incapacitação, edema articular migração leucocitária em ratos sensibilizados com carragenina.

Passamos a investigar o papel modulatório da histamina na analgesia promovida pela morfina. No primeiro momento realizamos uma curva dose resposta da morfina com o objetivo de identificar uma dose sub-efetiva de morfina, que pudesse ser co-administrada com agonistas e antagonistas histaminérgicos, a fim de se observar a potencialização ou a inibição dos possíveis efeitos da morfina na incapacitação, edema e migração leucocitária

Morfina (0,5, 5 ou 45 nmol; 20 µl) ou salina (controle; 20 µl) foram administradas por via intratecal 20 minutos antes da administração de carragenina intra-articular. As maiores doses de morfina (45 e 5 nmol) promoveram a inibição do aumento da incapacitação articular e a inibição do aumento do diâmetro articular sem promover alteração na migração leucocitária (figura 4.9 A, B e C). Assim sendo, a dose de 0,5 nmol foi à escolhida para a continuidade o trabalho.

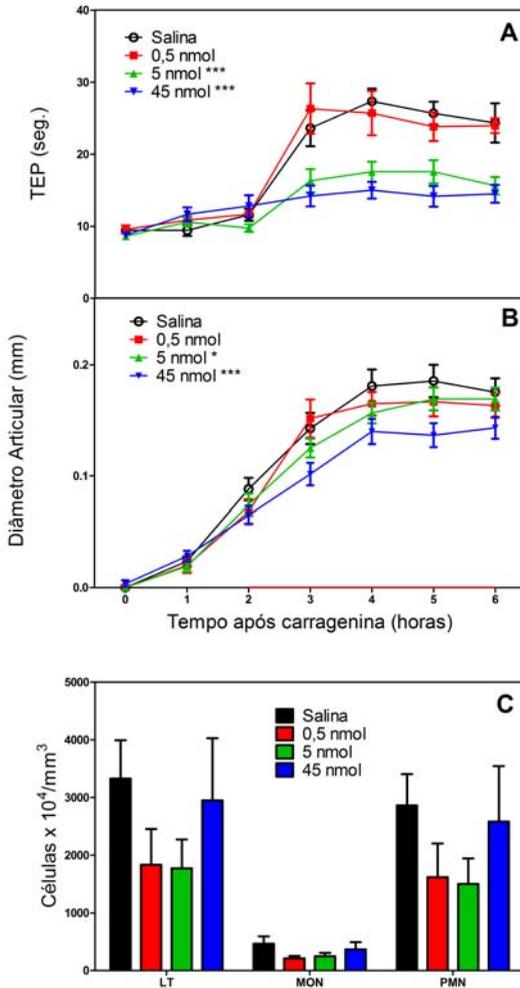


Figura 4.9: Curva dos efeitos da morfina i.t. na incapacitação (A), edema articular (B) e migração de leucócitos (C) em ratos sensibilizados com carragenina. Os dados representam a média \pm E.P.M. (n=8). Para análise da incapacitação e do edema (2-6 horas, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett. Para migração de leucócitos ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett. * e *** representam a diferença estatística em relação ao controle com $p < 0,05$ e $0,001$, respectivamente.

4.10 Potencialização do efeito da morfina através do bloqueio do receptor H₁ e ativação do receptor H₃ espinhais observados em ratos sensibilizados com carragenina.

A fim de se analisar as possíveis interações da morfina com os antagonista H₁ e a agonista H₃ combinamos a morfina com a cetirizina e o immepip. Quando administrados de forma isolada, morfina (0,5 nmol), cetirizina (12,6 pmol) e immepip (16 pmol), não foram capazes de alterar a nocicepção induzida pela carragenina. A combinação da morfina com a cetirizina e a morfina com immepip inibiu de forma significativa a hiperalgesia induzida pela carragenina (figura 4.10 A). Somente morfina foi capaz de inibir o aumento do edema inflamatório (figura 4.10 B) e nenhuma das drogas alterou a migração celular (figura 4.10 C).

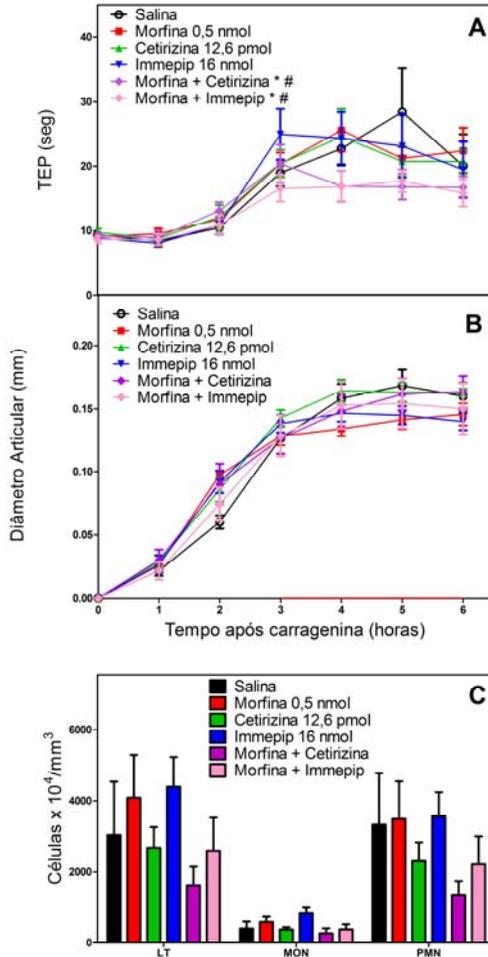


Figura 4.10: Resposta da morfina combinada com cetirizina e imipip na incapacitação (A), edema articular (B) e migração de leucócitos (C) em ratos sensibilizados com carragenina. Os dados representam a média \pm E.P.M. ($n=7$). Para análise da incapacitação e do edema (3-6 horas, linha vermelha), ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida do pós teste de Dunnett. Para migração de leucócitos ANOVA de uma via seguida do pós teste de Dunnett. * representam a diferença estatística em relação ao controle salina com $p<0,05$, e # representa diferença estatística em relação à morfina.

4.11 Avaliação dos comportamentos nociceptivos expressos pelos animais na caixa de observação comportamental

Estudos relatam que a administração intratecal de histamina em doses semelhantes às utilizadas nos nossos estudos gera padrões de comportamento como morder, lambear e coçar a região lombar e patas posteriores de camundongos, comportamentos esses que os autores relatam como uma forma de dor espontânea (SAKURADA et al., 2003; SAKURADA et al., 2004). Com o objetivo de excluirmos dos nossos resultados os comportamentos descritos acima e demonstrarmos que o comportamento nociceptivo observado no nosso experimento são desencadeados pela sensibilização de carragenina, realizamos a filmagem dos animais imediatamente após a administração i.t. da histamina (0,002 nmol ou 20 nmol/20 µl) e salina (20 µl), posteriormente essas imagens foram analisadas. Não observamos nenhum dos padrões de comportamento anteriormente relatados.

5. DISCUSSÃO

Inicialmente demonstramos neste estudo que a histamina exógena administrada por via intratecal em animais sensibilizados com carragenina intra-articular, apresentou dois padrões de resposta sobre a incapacitação, sendo em baixas doses hipernociceptiva (0,002 nmol) e em altas doses hiponociceptiva (20 nmol). Quanto ao edema articular, obtivemos o aumento do mesmo com a administração da histamina intratecal na dose de 0,002 nmol. Vários estudos já demonstram o efeito hipernociceptivo da histamina intratecal (SAKURADA et al., 2003; YOSHIDA et al., 2005) o que corrobora nosso achado. Por outro lado, uma nova linha de pesquisa demonstrou que a histamina quando administrada no joelho de ratos (20 nmol) causou hiponociceção no teste da formalina (SOUZA-SILVA, 2009).

A inflamação é um mecanismo básico disponível para a recuperação do tecido após uma lesão e é composto por uma cascata de eventos microvasculares e celulares. Está cascata inclui edema, aumento da permeabilidade microvascular e a migração de vários tipos de células para o tecido (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006). A formação do edema ocorre devido a uma série de eventos que atuam na microcirculação. Estes compreendem uma leve vasoconstrição, seguida de dilatação, aumento do fluxo local e da permeabilidade vascular, que culmina no extravasamento do conteúdo protéico do plasma para o interstício (GARCIA-LEME et al., 1973). Associados a esses eventos periféricos a atividade antidrômica em fibras aferentes primárias que secretam mediadores neurogênicos também está presente durante a inflamação periférica. Os neurônios sensoriais conduzem informação do tecido para o sistema nervoso central e funcionam como eferentes neurosecretores, com a liberação de substância P e CGRP pelos terminais dos aferentes primários (MAGGI e MELLI, 1988; WILLIS, 1999). Esse componente neurogênico da inflamação pode ter sido responsável por parte da amplificação do edema articular observado após a aplicação da carragenina no joelho dos animais.

Camundongos *knock-out* para o receptor H_1 demonstraram uma menor resposta aos três tipos de estímulos nocivos (químico, térmico e mecânico), quando comparados a camundongos Wild-type, com isso foi demonstrado que a ação do H_1R pode aumentar a sensibilidade a estímulos dolorosos (MOBARAKEH et al., 2000).

Esse resultado vai ao encontro de nossos achados, quando demonstramos que ao antagonizar o receptor H_1 com o seu antagonista cetirizina (126 nmol), obtivemos a diminuição da incapacitação articular.

A enzima fosfolipase C (PLC) através da fosforilação lipídica gera o diacilglicerol (DAG), um ativador da proteína cinase C (PKC). A PKC é amplamente relacionada com mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da dor aguda e persistente (ZIMMERMANN, 2001; KAMEI et al., 1999). O receptor H_1 é acoplado a PLC/PKC (HILL 1997). A administração i.c.v. de agonistas do receptor H_1 ativa a via PLC/PKC o que resulta em hiperalgesia (GALEOTTI et al., 2004). A resposta da histamina é bloqueada por antagonistas dos receptores H_1 . Recentemente, foi reportado que a antinocicepção induzida por antagonistas do receptor H_1 está relacionada à ativação do mecanismo de transdução operado por uma proteína G_i (GALLEOTTI et al., 1996; 1999). A administração intracerebroventricular (i.c.v.) da toxina pertussis, um composto que inativa seletivamente a proteína G_i , impediu o aumento do limiar de dor induzido por fármacos antagonistas do receptor H_1 , difenidramida, prometazina e pirlamina, no teste da placa quente em camundongos (GALEOTTI et al., 1996, 1999). A redução da percepção da dor também tem sido observada em camundongos *knock-out* para o gene que codifica os subtipos da família das proteínas $G_{i/o}$ (JIANG et al., 1998). Existem evidências do envolvimento de canais de potássio ativados por cálcio na antinocicepção por anti-histamínicos H_1 . O bloqueio do receptor H_1 parece aumentar a corrente de K^+ (GALEOTTI et al., 1999). Os antagonistas do receptor H_1 , prometazina e difenidramina impediram o aumento do limiar da dor após a administração i.c.v. de um bloqueador de canais de potássio ativado por cálcio, proveniente do veneno de abelha (RUDY, 1988). Já foi demonstrado que o aumento da expressão de RNAm da proteína cFOS na dor inflamatória é suprimida por administração de antagonistas H_1 no teste da formalina (ASHIMAWI et al., 2003).

Em 1927 Lewis e Marvin apresentaram evidências que o impulso antidrômico proveniente do corno dorsal da medula espinal liberava na pele uma substância que seria a responsável pela vasodilatação antidrômica. Em 1951 o grupo de pesquisa liderado por Ibrahim confirmou a hipótese de Lewis e Marvin, demonstrando que a substância responsável pela vasodilatação era a histamina.

Atualmente está bem definido que durante a inflamação induzida por carragenina ocorre liberação de substâncias farmacologicamente ativas como a histamina, as cininas e prostaglandina E (WILLIS, 1969). A histamina é um potente vasodilatador endógeno, que causa o aumento da permeabilidade vascular com a formação de pápula e vermelhidão (flare) este efeito vasodilatador é mediado por receptores H_1 localizados no endotélio vascular, que possuem a capacidade de aumentar a permeabilidade vascular (EHRINGER et al., 1996).

No presente trabalho quando administramos o bloqueador do receptor H_1 , cetirizina (12,6 e 126 pmol), obtivemos a diminuição do edema articular confirmamos esse resultado quando administramos o agonista H_1 , 2-PEA por via intratecal (0,001, 0,01 e 1 nmol) e obtivemos potenciação do edema induzido pela carragenina. Já é bem relatado que estímulos na parte distal das fibras aferentes primárias evocam vasodilatação antidrômica na pele (LANGLEY 1922, 1923). Essa vasodilatação pode ser originada através de estímulos em fibras A δ e C que geram o aumento da permeabilidade vascular e a formação do edema (KROLTZENBERG et al., 1990) através da liberação de substâncias vasoativas na região terminal do aferente primário (LEWIS, 1927). As principais substâncias liberadas são substância P, neurocinina A (NKA) e peptídeo relacionado o gene da calcitonina (CGRP), além da histamina (WILLIS, 1999).

Com a análise dos resultados referentes ao receptor H_1 , observamos que esse receptor é possivelmente responsável pela modulação medular da dor e do edema, confirmando nossa hipótese de que a histamina endógena atua sobre H_1R de forma a causar hipernocicepção e efeitos pró-edematogênico. Quanto ao resultado contraditório da diminuição da incapacitação articular com a administração de altas doses de 2-PEA, acreditamos que a oferta de histamina exógena possa estar saturando os receptores H_1 e atuando em outros receptores, não determinados, camuflando o real efeito do receptor H_1 .

Sabe-se que os receptores H_2 também estão envolvidos na formação do edema. O bloqueio desses receptores realizado com a cimetidina administrado de forma sistêmica causou a supressão do edema de pata induzido por carragenina, de forma semelhante, a cimetidina administrada no edema da artrite adjuvante induzida pelo

complexo adjuvante de Freund foi eficaz na supressão do aumento do volume do membro (AL-HABOUDI e ZEITLIN 1979). Nós observamos em nosso trabalho uma diminuição do edema induzido por carragenina com o bloqueio realizado do receptor H_2 pela ranitidina (38 pmol) intratecal. Ainda são escassas as informações sobre a ação do receptor H_2 medular, mas podemos observar pelo nosso trabalho que aparentemente esse receptor também está envolvido na modulação da inflamação periférica.

Quanto ao aumento da incapacitação articular e da diminuição do edema articular observada no bloqueio medular do receptor H_2 , com seu antagonista ranitidina (38 pmol), somando-se ao achado da diminuição da incapacitação e aumento do edema articular com a administração medular do agonista H_2 , dimaprit (18 pmol), concluímos que a histamina endógena que atua sobre o receptor medular H_2 possui a característica de ser hiponociceptiva na incapacitação articular, e pró-edematogênica no processo inflamatório periférico.

Quanto ao receptor H_2 e a modulação da nocicepção, foi demonstrado que a impromidina, um agonista H_2 , administrado por via i.c.v. causou antinocicepção, enquanto o antagonista desse mesmo receptor a burimamida causou hipernocicepção a estímulos mecânicos, químicos e térmicos nos modelos de pressão na pata, contorção abdominal e teste da placa quente (LAMBERTI et al., 1996).

Constatamos que o bloqueio do receptor H_3 com o seu antagonista, tioperamida, desencadeou o aumento tanto na incapacitação (0,04 e 4 nmol) quanto no edema articular (0,04 nmol), sugerindo que a função medular exercida por esse receptor é responsável pela diminuição da nocicepção e da inflamação. Tioperamida administrada i.c.v. ou por via sistêmica produz efeito antinociceptivo aos estímulos térmicos, químicos e mecânicos (MALMBERG-AIELLO et al 1994).

Ao administrarmos o agonista do receptor H_3 obtivemos a diminuição da incapacitação articular (4 e 8 nmol), reforçando assim a ideia da função moduladora desse receptor na nocicepção. Esse resultado é corroborado com o estudo de Cannon (2003), no qual o immpip em baixas doses por via intratecal demonstrou atenuar a nocicepção mecânica.

A possível explicação para esses achados, é que o receptor H_3 pode estar localizado no terminal da fibra aferente primária, onde poderia inibir a síntese e/ou a liberação de neurotransmissores (OHKUBO et al., 1995).

Neurônios histaminérgicos estão sob um controle tônico inibitório da liberação de histamina através dos autoreceptores H_3 . Esses receptores possuem sua via de transdução acoplada a uma proteína $G_{(i/o)}$ que quando ativada inibe a atividade da adenilato ciclase (AC) diminuindo a síntese e liberação de histamina do terminal sináptico por inibição de proteínas quinase dependentes do AMPc (AMPc/PKA) e inibição da via cálcio calmodulina (GOMEZ-RAMIREZ et al., 2002; TORRENT et al., 2005). O tratamento dos neurônios do núcleo túbero mamilar (TM) *in vitro* com antagonista do receptor H_3 tioperamida, demonstrou um aumento da taxa de disparo desses neurônios, enquanto que a administração da própria histamina reduz a frequência dos disparos sem nenhuma alteração no seu potencial (STEVENS et al., 2001). Estudos demonstraram que o efeito inibitório na liberação de histamina foi eliminado quando a concentração de Ca^{2+} extracelular foi aumentada (ARRANG et al., 1985). Os canais de cálcio ativados por alta tensão (HVA) dos neurônios histaminérgicos do TM são suprimidos por histamina, este efeito inibitório é completamente bloqueado pelo antagonista competitivo do receptor H_3 , tioperamida, e pode ser mimetizado pelo agonista R- α -metilhistamina, demonstrando assim que o receptor H_3 restringe a corrente de cálcio, que é essencial para a liberação de histamina (ARRANG et al., 1985; TAKESHITA et al., 1998).

A inibição dos canais de cálcio HVA ocorre através da ativação de uma proteína G (DOLPHIN 1990). Foi demonstrado que o canal de cálcio HVA dos neurônios histaminérgicos do TM são regulados por uma proteína $G_{(i/o)}$ a qual é ativada por receptor H_3 (TAKESHITA et al., 1998).

De forma contraditória, quando o agonista do receptor H_3 , immpip, foi administrado obtivemos um aumento do edema articular. Como esse aumento foi evidenciado na maior dose utilizada (32 nmol), talvez tal resultado possa ser explicado pela interação da droga com alvos não-específicos, sabemos que a droga exerce sua ação primaria através da interação com seus alvos moleculares específicos, altas concentrações da droga podem gerar

uma interação com uma ampla variedade de moléculas biológicas e resultar em alterações funcionais.

Os opióides exercem sua analgesia através de mecanismos periféricos, bem como mecanismos centrais (COGGESHALL e CARLTON, 1997; WANG e WESSENDORF, 2001). Dentro da medula espinhal, um grande número de receptores opióides são encontrados nas lâminas I e II do corno dorsal (NINKOVIC et al., 1981). Opióides inibem a liberação de substância P da medula espinhal. Quanto à localização desses receptores, sabe-se que eles são encontrados no axônio terminal pré-sináptico do aferente primário e nos neurônios pos-sinápticos.

Muitos estudos têm sugerido que os receptores de histamina estão envolvidos com algumas ações farmacológicas da morfina. O estudo de Mobarakeh e colaboradores em 2002 sugeriram que a histamina pode ser liberada por estímulos nociceptivos e que o bloqueio da ação da histamina poderia mudar a percepção da dor nas vias de transmissão espinhal da dor.

No presente trabalho, observamos que o bloqueio do receptor H_1 com cetirizina (12,6 pmol), provocou a potencialização do efeito hiponociceptivo da morfina (0,5 nmol), doses essas que quando administradas sozinhas não apresentavam efeito.

Previamente foi mostrado que antagonismo do receptor H_1 possui um importante papel no desenvolvimento e na potencialização da analgesia dos opióides (HUI, et al 1983). Mais recentemente, foi demonstrado que camundongos *knock-out* para o receptor H_1 apresentam uma redução da resposta à dor para estímulos nocivos térmicos, químicos e mecânicos quando comparados com camundongos normais (MOBARAKEH, 2002).

A histamina está envolvida na regulação da antinocicepção induzida por opióides. Por exemplo, a antinocicepção induzida por morfina foi neutralizada por injeção i.c.v. ou sistêmica, de antagonistas do receptor H_2 (GOGAS et al., 1989; HOUGH e NALWALK 1992) da histamina no teste de retirada da cauda. Foi demonstrado também que microinjeções de antagonistas dos receptores H_2 na substância cinzenta periaquedutal atenuou a antinocicepção induzida por morfina em ratos (HOUGH e NALWALK, 1992).

Estudos recentes têm mostrado que os receptores H₃ espinhais desempenham um papel importante na percepção da dor, assim como os receptores H₁ e H₂, sugerindo que a histamina exerça um papel inibitório na analgesia induzida por morfina através do receptores H₃ espinhais (FARZIN et al, 2002; CANNON e HUGHT 2005; BRABANT et al, 2005).

No nosso trabalho obtivemos a potencialização da analgesia obtida pela morfina (0,5 nmol) através da ativação dos receptores H₃, com o agonista immpip (16 nmol). Doses essas que não apresentaram efeito quando administradas sozinhas na medula espinhal. Corroborando nossos achados, estudos com camundongo *knock-out* tem mostrado que receptores H₃ no cérebro e na medula espinhal possuem um papel na modulação da dor. Foi demonstrado que administração i.t. de immpip, produziu antinocicepção no teste compressão da cauda em camundongos normais, mas não em camundongos *knock-out* para H₃R (CANNON et al., 2003) em outro estudo o immpip atenuou resposta nociceptiva térmica e química (ROULEAU et al., 1997). De forma conflitante, Mobarakeh e colaboradores de 2009 demonstraram que a associação de morfina com tioperamida resultou numa significativa diminuição dos comportamentos de dor nos testes de placa quente, “tail-flick”, retirada da pata e teste da formalina, atenuando dessa forma a antinocicepção induzida pela morfina (MOBARAKEH et al., 2009).

Recentemente foi relatado que antagonistas dos receptores H₃ a nível espinhal, GSK 189254 e GSK 334429, são eficazes na reversão da hipersensibilidade neuropática induzido por modelos cirúrgicos de dor neuropática em ratos (MEDHURST et al., 2008). Acredita-se que esses resultados são devido ao bloqueio do receptor H₃ que gera um aumento da liberação de neurotransmissores como acetilcolina, noradrenalina, dopamina e histamina (SCHLICKER et al., 1994; BROWN e HAAS, 1999). Postula-se que a administração de morfina causa a liberação de histamina e aumenta o nível da histamina na substância cinzenta periaquedutal (NICHIBORI et al., 1983).

Essa discrepância observada dos estudos citados para o nosso, pode ser devido à diferença de espécies utilizadas, os tipos de testes analgésicos e os agonistas e antagonistas utilizados.

O perfil celular da reação inflamatória é representado pelos leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), mononucleares (monócitos e linfócitos) que migram dos vasos para o local da lesão (FLOREY, 1979). A migração celular na inflamação aguda apresenta um perfil temporal, nas primeiras 24 a 48 horas observa-se a migração dos neutrófilos e posteriormente monócitos (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1992).

Observamos que a habilidade da histamina em alterar o perfil celular ainda é controverso, no presente trabalho obtivemos aumento na migração celular com o bloqueio dos receptores H_1 e H_3 , efeito esse que é contrário ao que a literatura relata. A revisão da literatura nos mostra que a cetirizina possui a capacidade de inibir o infiltrado de eosinófilos e neutrófilos na sexta, sétima e oitava hora após a administração intradérmica do extrato da ambrosia americana (CHARLESWORTH et al., 1989). Sugere-se ainda, que o mecanismo pelo qual a cetirizina exerça suas ações seja proveniente da inibição da degranulação de mastócitos e da inibição de mediadores provenientes dos próprios eosinófilos (FADEL et al., 1987).

O receptor H_4 possui um papel importante nas patologias inflamatórias. Sabe-se que esse receptor está envolvido na amplitude dos sintomas alérgicos, bem como na manutenção da inflamação (JABLONOWSKI et al., 2004). Recentemente foi descoberto que o agonista inverso tioperamida apresenta afinidade também pelo receptor H_4 (GBAHOU et al., 2006). Tendo em vista essa informação não podemos garantir que os resultados observados com o farmaco tioperamida sejam somente por bloqueio de H_3 , ainda mais quando observamos que as doses que apresentaram o efeito hipernociceptivo (0,04 e 4 nmol) e o aumento do edema (0,04 nmol) são muito mais elevadas que as doses seletivas para o receptor H_3 (12 pmol) e o receptor H_4 (8,6 pmol) considerando o K_i de 43 nmol/l e 60 nmol/l respectivamente (LIGNEAU et al., 2000).

Quanto aos comportamentos de hiperalgesia relatados com a administração da histamina intratecal em camundongos (SAKURADA et al., 2003; SAKURADA et al., 2004). No presente trabalho, não observamos nenhum comportamento relacionado à nocicepção com a administração da histamina intratecal em ratos. Tendo em vista os diferentes comportamentos observados com a

administração da histamina intratecal, em diferentes espécies utilizadas, ratos no presente trabalho e camundongos no de Sakurada, podemos concluir que a histamina intratecal não se comporta de maneira igual nas duas espécies de animais.

6. CONCLUSÃO

– Analisando o exposto até aqui, acreditamos que a histamina endógena atuando sobre os receptores H_1 da medula espinhal apresenta um efeito hipernociceptivo. Quando essa histamina endógena atua sobre os autoreceptores H_3 espinhais temos como efeito hiponocicepção.

– Podemos ainda concluir que a histamina endógena atua de forma pró-edematogênica sobre os receptores H_1 espinhais e antiedematogênica sobre receptores H_3 espinhais.

– Nossos resultados sugerem que o receptor H_2 é hiponociceptivo e pró-edematogênico

– Quanto à migração celular, parece não existir uma relação direta entre a nocicepção e o edema articular com a migração de células para o líquido sinovial, nós não conseguimos quantificar esses eventos de forma a correlacioná-los. Nossos resultados não são conclusivos, necessitando de mais experimentos.

– O bloqueio de H_1 e a ativação de H_3 potencializou o efeito hiponociceptivo da morfina, sugerindo que o sistema histaminérgico espinhal pode ser explorado clinicamente para diminuir a concentração de morfina intratecal.

– A administração de morfina associada ao bloqueio de H_1 e ativação de H_3 parece não alterar o efeito edematogênico do processo inflamatório originado pela sensibilização da carragenina.

A figura 6.1 esquematiza os efeitos dos neurônios histaminérgicos na medula espinhal sobre a inflamação articular.

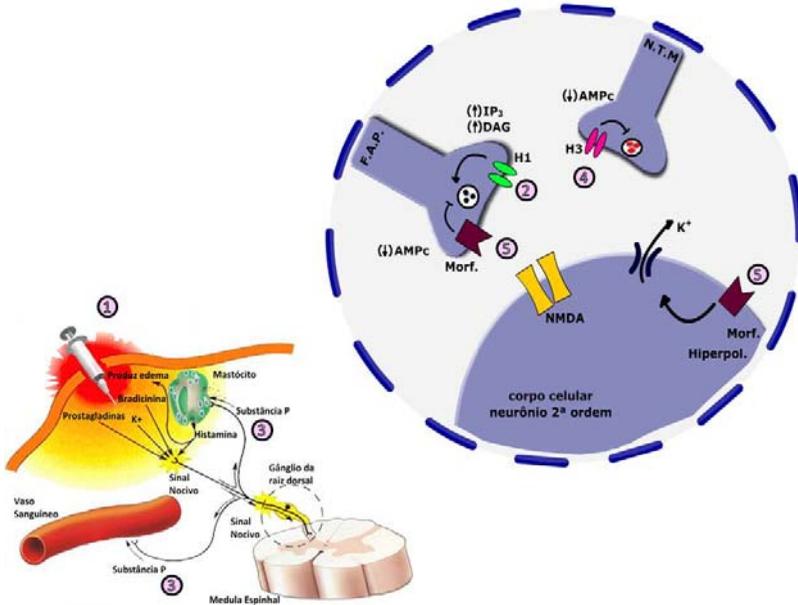


Figura 6.1: Esquema da modulação da inflamação articular por receptores de histamina medulares. (1) Lesão e/ou inflamação dos tecidos articulares resulta em sensibilização periférica, um processo que envolve a ativação dos nociceptores e transmissão do impulso nociceptivo para o corno dorsal da medula espinhal; (2) A ativação do H_1R presente na fibra do aferente primário leva ao aumento da produção de IP_3 , DAG e da permeabilidade dos canais de K^+ o que gera hiperalgesia. (3) Uma vez ativado, o aferente primário contribui para o reflexo da raiz dorsal liberando neuropeptídeos no terminal periférico gerando aumento da vasodilatação e do extravasamento plasmático, contribuindo com a formação do edema; (4) A ativação do autoreceptor H_3 pré-sináptico inibe a síntese e a liberação da histamina, gerando a diminuição da excitabilidade dos neurônios da medula espinhal com a inibição do reflexo da raiz dorsal e conseqüente diminuição da dor e do edema articular. (5) O bloqueio do H_1R e a ativação do H_3R associados à ativação dos receptores medulares de morfina gera a potencialização dos efeitos hiponociceptivos da morfina, demonstrando assim, que a diminuição da excitabilidade neural através da diminuição da concentração de histamina medular pode potencializar o efeito da morfina.

7. REFERENCIAS

- ADAM, H. M.; HYE, H. K. A. Concentration of histamine in different parts of brain and hypophysis of cat and its modification by drugs. **Br. J. Pharmacolo**, v. 28, p. 137-152, 1966.
- AGUT, J.; SANCHES, J. C.; SACRISTÁN, A.; ORTIZ, J. A. Action of ebrotidine, ranitidine and cimetidine on the specific binding to histamine H1- and H2- receptors. *Arzneimittelforschung*, v. 47, p. 447-449, 1997.
- AI-HABOUBI, H., A.; ZEITLIN, L., J. The actions of cimetidine, mepyramine, indomethacin and aprotinin (Trasylol) on the inflammatory responses in adjuvant rats. **Br. J. Pharmacol.** v. 67, p. 446, 1979.
- ALMEIDA, A., P.; Beaven, M., A. Phylogeny of histamine in vertebrate brain. **Brain Res.** v. 208, p. 244-250, 1981.
- ARRANG, J., M.; GARBARG, M.; SCHWARTZ, J.; C. Autoregulation of histamine release in brain by presynaptic H3-receptors. **Neuroscience.** v. 15, p. 553-562, 1985.
- ASHMAWI, H. A.; CHAMBERGO, F. S.; ARAÚJO PALMEIRA, C. C.; DE PAULA POSSO, I. The effects of pyrilamine and cimetidine on mRNA C-fos expression and nociceptive flinching behavior in rats. **Anesth Analg**, v. 97, p. 541-546, 2003.
- ATZORI, M.; LAU, D.; TANSEY, E. P.; CHOW, A.; OZAITA, A.; RUDY, B., Transmitters involved in antinociception in the spinal Cord. Susanna Fürst. **Brain Research Bulletin.** v. 48, n. 2, 129-141, 1999.
- BAKKER, R. A.; CASAROSA P, TIMMERMAN H, SMIT MJ, LEURS R. Constitutively active Gq/11-coupled receptors enable signaling by co-expressed G(i/o)-coupled receptors. **J Biol Chem.** v. 279; p. 5152-5161, 2004.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu Rev Neurosci**, v. 7, p. 309-338, 1984.
- BEST, C. H; DALE, H. H; DUDLEY, H. W. The nature of the vaso-dilator constituents of certain tissue extracts. **J Physiol**, v. 62, p. 397-417, 1927.
- BILEVICIUTE, I.; THEODORSSON, E.; LUNDEBERG, T. Effects of histamine on neuropeptide release into the knee joint perfusate and cerebrospinal fluid in rats. **Neuroscience Letters.** v. 226, p. 9-12, 1997.
- BILEVICIUTE, I.; THEODORSSON, E.; LUNDEBERG, T. Effects of histamine on neuropeptide release into the knee joint perfusate and cerebrospinal fluid in rats. **Neurosci. Lett.** v. 226, p. 9-12, 1997.
- BRABANT, C.; CHARLIER, Y.; QUERTEMONT, E.; TIRELLI, E. The H3 antagonist thioperamide reveals conditioned preference for a context associated with an inactive

small dose of cocaine in C57BL/6J mice. **Behav. Brain Res.** v. 160, p. 161–168, 2005.

BROWN, R. E.; HAAS, H. L. On the mechanism of histaminergic inhibition of glutamate release in the rat dentate gyrus. **J. Physiol.** v. 515, p. 777-783, 1999.

BROWN, R. E.; SERGEEVA, O. A.; ERIKSSON, K. S.; HAAS, H. L. Convergent excitation of dorsal raphe serotonin neurons by multiple arousal systems (orexin/hypocretin, histamine and noradrenaline). **J Neurosci.** v. 22, p. 8850-8859, 2002.

CAMPBELL, J. N.; RAJA, S. N.; MEYER, R. A.; MACKINNIN, S., E. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. **Pain.** v. 32, p. 89-94, 1988.

CANNON, K. E.; CHAZOT, P. L.; HANN, V.; SHENTON, F.; HOUGH, L. B.; RICE, F. L. Immunohistochemical localization of histamine H3 receptors in rodent skin, dorsal root ganglia, superior cervical ganglia, and spinal cord: Potential antinociceptive targets. **Pain,** v. 129, p. 76-92, 2007.

CANNON, K. E.; LEURS, R.; HOUGH L. B. Activation of peripheral and spinal histamine H3 receptors inhibits formalin-induced inflammation and nociception, respectively. **Pharmacol Biochem Behav,** v. 88, p. 122-129, 2007.

CANNON, K. E; HOUGH, L. B. Inhibition of chemical and low-intensity mechanical nociception by activation of histamine H3 receptors. **J Pain,** v. 6, p. 193-200, 2005.

CANNON, K., E.; NALWALK, J., W.; STADEL, R.; GE, P.; LAWSON, D.; SILOS-SANTIAGO, I.; HOUGH, L., B. Activation of spinal histamine H3 receptors inhibits mechanical nociception. **Eur. J. Pharmacol.** v. 470, p. 139–147, 2003.

CHARLESWORTH, E., N; KAGEY-SOBOTKA, A.; NORMAN, P., S.; LICHTENSTEIN, L., M. Effect of cetirizine on mast cell-mediator release and cellular traffic during the cutaneous late-phase reaction. **J Allergy Clin Immunol.** v. 83 p. 905-12, 1989.

CORUZZI, G.; ADAMI, M.; GUAITA, E.; DE ESCH, I., J.; LEURS, R. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the selective histamine H4-receptor antagonists JNJ7777120 and VUF6002 in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation. **Eur J Pharmacol,** v. 563, p. 240-244, 2007.

DOLPHIN A., C., G protein modulation of calcium currents in neurons. **A. Rev. Physiol.** v. 52, p. 243–255, 1990.

DRUTEL, G.; PEITSARO, N.; KARLSTEDT, K.; WIELAND, K.; SMIT, M. J.; TIMMERMAN, H.; PANULA, P.; LEURS, R. Identification of rat H3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. **Mol. Pharmacol.** v. 59, p. 1-8, 2001.

EHRINGER, W., D.; EDWARDS, M., J.; MILLER, F., N. Mechanisms of a-thrombin, histamine and bradykinin induced endothelial permeability. **J Cell Physiol.** v. 167, p. 562-569, 1996.

- ERIKSSON KS, SERGEEVA O, BROWN RE, HAAS HL. Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. **J Neurosci.** v. 21, p. 9273-9279, 2001.
- ESBENSHADE, T., A.; BROWMAN, K., E.; BITNER, R., S.; STRAKHOVA, M.; COWART, M., D.; BRIONI, J., D. The histamine H3 receptor: an attractive target for the treatment of cognitive disorders. **Br J Pharmacol**; v. 154, p. 1166–1181, 2008.
- FADEL, R.; HERPIN-RICHARD, N.; RIHOUX, J., P.; HENOCQ, E. Inhibitory effect of cetirizine 2HCl on eosinophil migration in vivo. **Clin Allergy.** p. 17, v. 373-379, 1987.
- FALCONE, F. H.; ZILLIKENS, D.; GIBBS, B. F. The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity. **Exp Dermatol.** v. 15, p. 855–864, 2006.
- FARZIN, D.; ASGHARI, L.; NOWROUZI, M. Rodent antinociception following acute treatment with different histamine receptor agonists and antagonists. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 72, p. 751–760, 2002.
- FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res Bull.** v. 48, p. 129-141, 1999.
- GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C.; BARTOLINI F. The role of potassium channels in antihistamine analgesia **Neuropharmacology.** v. 38, p. 1893–1901, 1999..
- GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C.; BARTOLINI, A. Eject of pertussis toxin on morphine, diphenhydramine, baclofen, clomipramine and physostigmine antinociception. **Eur. J. Pharmacol.** v. 308, p. 125-133. 1996.
- GALEOTTI, N.; MALMBERG-AIELLO, P.; BARTOLINI, A.; SCHUNACK ,W.; GHELARDINI C. H1-receptor stimulation induces hyperalgesia through activation of the phospholipase C-PKC pathway. **Neuropharmacology.** v. 47, p. 295–303, 2004..
- GARCIA LEME, J.; HAMAMURA, L.; LEITE, M., P.; ROCHA SILVA, M. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. **Br J Pharmacol.** v. 48, p. 88-96, 1973.
- GARDNER, D. L. Production of Arthritis in the rabbit by the local injection of the mucopolysaccharide caragheenin. **Ann. Rheum. Dis.** v. 19, p. 369-376, 1960.
- GBAHO, F.; VINCENT, L.;HUMBERT-CLAUDE, M.; TARDIVEL-LACOMBE, J.; CHABRET C.; BRITISH J., M., A. Compared pharmacology of human histamine H3 and H4 receptors: structure–activity relationships of histamine derivatives. **Journal of Pharmacology.** v. 147, p. 744–754, 2006.
- GILLARD, M.; PERREN, C. V. D.; MOGUILEVSKY, N.; MASSINGHAM, R.; CHATELAIN P. Binding Characteristics of Cetirizine and Levocetirizine to Human H1 Histamine Receptors: Contribution of Lys191 and Thr19. **Mol Pharmacol,** v. 61, p. 391–399, 2002.

GOGAS, K., R.; HOUGH, L., B.; EBERLE, N., B.; LYON, R., A.; GLICK, S.; D, WARD, S.; J. YOUNG, R, C.; PARSONS, M.; E. A role for histamine and H₂-receptors in opioid antinociception. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 250, p. 476–484, 1989.

GOMEZ-RAMIREZ, J.; ORTIZ, J.; BLANCO, I. Presynaptic H₃ autoreceptors modulate histamine synthesis through cAMP pathway. **Mol Pharmacol.** p. 61 v. 239–245, 2002.

HAAS, H. L.; KONNERTH, A. Histamine and noradrenaline decrease calcium-activated potassium conductance in hippocampal pyramidal cells. **Nature.** v. 302, p. 432-434, 1983.

HAAS, H. L.; SERGEEVA, O. A.; SELBACH, O. Histamine in the nervous system. **Physiol Rev.** v. 88, p. 1183–1241, 2008.

HAAS, H.; PANULA, P.; The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. **Nat Ver Neurosci,** v. 4, p. 121-130, 2003.

HALL, I. P.; HILL, S. J. β 2-adrenoceptor stimulation inhibits histamine stimulated inositol phospholipid hydrolysis in bovine tracheal smooth muscle. **Br. J. Pharmacol,** v. 95, p. 1204-1212, 1988.

HERON, A.; ROULEAU, A.; COCHOIS, V.; PILLOT, C.; SCHWARTZ, J. C.; ARRANG, J. M. Expression analysis of the histamine H(3) receptor in developing rat tissues. **Mech Dev,** v. 105, p. 167-173, 2001.

HILL, S. J.; GANELLIN, C. R.; TIMMERMAN, H.; SCHWARTZ, J. C.; SHANKLEY, N. P.; YOUNG, J. M.; SCHUNACK, W.; LEVI, R.; HAAS, H. L. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. **Pharmacol Ver,** v. 49, p. 253-278, 1997.

HOLDEN, J. E.; JEONG Y.; FORREST, J. M. The endogenous opioid system and clinical pain management. **The American Academy of Clinical Neuropsychology Clinical Issues.** v. 16, p. 291-301, 2005.

HORIUCHI, Y.; DOROOG, E., J.; HENRICSON, J.; WIKSTROM, T.; LENNQUIST, S.; SJOBERG, F. Role of histamine release in nonspecific vasodilatation during anodal and cathodal iontophoresis. **Microvasc Res.** v. 67, p. 192-196, 2004.

HÖSLI, E.; HÖSLI, L. Autoradiographic localization of binding sites for [3H]histamine and H₁- and H₂-antagonists on cultured neurones and glial cells. **Neuroscience.** v. 13, p. 863-870, 1984.

HOUGH, L., B.; NALWALK, J., W. Inhibition of morphine antinociception by centrally administered histamine H₂ receptor antagonists. **Eur J Pharmacol.** v. 215, p. 69–74, 1992.

HOUGH, L., B.; NALWALK, J., W. Modulation of morphine antinociception by antagonism of H₂ receptors in the periaqueductal gray. **Brain Res.** v. 588, p. 58–66, 1992.

- HOUGH, L., B.; NALWALK, J., W.; BATTLES, A., H. Zolantidine-induced attenuation of morphine antinociception in rhesus monkeys. **Brain Research**. v. 526, p. 153-155, 1990.
- HUI, F., W.; SUN, C., J.; TOCUS, E., C.; HANIC, J., P. The effect of tripeleennamine alone and in combination with opiates to produce antinociception in mice. **Life Sciences**. v. 32, p. 1531-1538, 1983.
- IBRAHIM, F., D.; STELLA, G.; TALAAT, M. The mechanism of antidromic vasodilatation. **Q J Exp Physiol Cogn Med Sci**. v. 36, p. 189-198, 1951.
- IMAMURA, M.; SMITH, N. C.; GARBARG, M.; LEVI, R. Histamine H3-receptor-mediated inhibition of calcitonin gene-related peptide release from cardiac C fibers. A regulatory negative-feedback loop. **Circ Res**, v. 78, p. 863-869, 1996.
- INOUE, I.; TANIUCHI, I.; KITAMURA, D.; JENKINS, N., A.; GILBERT, D., J.; COPELAND, N., G.; WATANABE, T. Characteristics of the mouse genomic histamine H1 receptor gene. **Genomics**. v. 36, p. 178-181, 1996.
- JABLONOWSKI, J., A.; CARRUTHERS, N., I.; THURMOND, R., L. The histamine H4 receptor and potential therapeutic uses for H4 ligands. **Mini Rev Med Chem**. v. 4, p. 993-1000, 2004.
- JANSEN, F. P.; WU, T. S.; VOSS, H. P.; STEINBUSCH, H. W.; VOLLINGA, R. C.; RADEMAKER, B.; BAST, A.; TIMMERMAN, H. Characterization of the binding of the first selective radiolabelled histamine H3-receptor antagonist, 125i-iodophenpropit, to rat brain. **Br J Pharmacol**, v. 113, p. 355-362, 1994.
- JIANG, M.; GOLD, M., S.; BOULAY, G.; SPICHER, K.; PEYTON, M.; BRABET, P.; SRINIVASAN, Y.; RUDOLPH, U.; ELLISON, G.; BIRNBAUMER, L. Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. **Proc. Natl. Acad. Sci**. v. 95, p. 3269-3274, 1998.
- KAKAVAS, S.; ZAMPELI, E.; PAPAMICHAEL, K.; DELITHEOS, B.; TILIGADA, E. The mast cell pathway to inflammation and homeostasis: Pharmacological insights. **Anti-Inflamm Anti-Allergy Agents Med Chem**. v. 5, p. 323-334, 2006.
- KAMEI, J.; MIZOGUCHI, H.; NARITA, M.; TSENG, L., F. Therapeutic potential of PKC inhibitors in painful diabetic neuropathy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**. v. 9, p. 1653-1664, 2001.
- KOLTZENBURG, M.; LEWIN, G.; MCMAHON, S. Increase in blood flow in skin and spinal cord following activation of small diameter primary afferents. **Brain Res**. v. 509, p. 145-149, 1990.
- KOTLIKOFF, M. I.; MURRAY, R. K.; REYNOLDS, E. E. Histamine-induced calcium release and phorbol antagonism in cultured airway smooth muscle cells. **Am. J. Physiol**, v. 253, p. 561-566, 1987.

KUKKO-LUKJANOV, T. K.; PANULA, P. Subcellular distribution of histamine, GABA and galanin in tuberomamillary neurons in vitro. **J Chem Neuroanat**, v. 25, p. 279-292, 2003.

LAMBERTI, C.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C.; MALMBERG-AIELLO, P. Investigation into the role of histamine receptors in rodent antinociception. **Biochem Behav**, v. 53, p. 567-574, 1996.

LANGLEY J., N. Antidromic action. Part II, stimulation of the peripheral nerves of the cat's hind foot. **J Physiol**. v. 58, p. 49-69, 1923

LANGLEY, J., N. Antidromic action. Part I. **J Physiol**. v. 57, p. 428-446, 1922.

LIGNEAU, X.; MORISSET, S.; TARDIVEL-LACOMBE, J.; GBAHOU, F.; GANELLIN, C.R.; STARK, H.; SCHUNACK, W.; SCHWARTZ, J., C.; ARRANG, J., M. Distinct pharmacology of rat and human histamine H3 receptors: role of two amino acids in the third transmembrane domain. **Br. J. Pharmacol**. v. 131, p. 1247-1250, 2000.

MAGGI, C., A.; MELLI, A. The sensory-effect function of capsaicin-sensitive sensory neurons. **General pharmacology**. v. 152, p. 183-154, 1988.

MALMBERG-AIELLO, P.; LAMBERTI, C.; GHELARDINI, C.; GIOTTI, A. BARTOLINI, A. Role of histamine in rodent antinociception. **Br J Pharmacol**, v. 111, p. 1269-1279, 1994.

MALMBERG-AIELLO, P.; LAMBERTI, C.; IPPONI, A.; BARTOLINI, A.; SCHUNACK, W.. Evidence for hypernociception induction following histamine H1 receptor activation in rodents. **Life Sci**, v. 63, p. 463-476, 1998.

MATSUMOTO, J.; KANAIDE, H.; NISHIMURA, J.; SHOGAKIUCHI, Y.; KOBAYASHI, S.; NAKAMURO, M. Histamine activates H1-Receptors to induce cytosolic free calcium transients in cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 135, p. 172-177, 1986.

MCBAIN, C., J. H2 histamine receptor-phosphorylation of Kv3.2 modulates interneuron fast spiking. **Nat Neurosci**. v. 3, p. 791-798, 2000.

MCCORMICK, D., A.; WILLIAMSON, A. Convergence and divergence of neurotransmitter action in human cerebral cortex. **Proc Natl Acad Sci**. v. 86, p. 8098-8102, 1989.

MEDHURST, S., J.; COLLINS, S., D.; BILLINTON, A.; BINGHAM, S.; DALZIEL, R., G.; BRASS, A.; ROBERTS, J., C.; MEDHURST, A., D.; CHESSELL, I, P. Novel histamine H3 receptor antagonist GSK189254 and GSK 334429 are efficacious in surgically-induced and virally-induced rat models of neuropathic pain. **Pain**. v. 15, p. 61-69, 2008.

MERICKEL, A.; EDWARDS, R. H. Transport of histamine by vesicular monoamine transporter-2. **Neuropharmacology**, v. 34, p. 1543-1547, 1995.

- MESTRE, C.; PELISSIER, T.; FIALIP, J. WILCOX, G.; ESCHALIER, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **Journal of Pharmacology toxicology methods**. v. 32, p. 197-200, 1994.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review 1. **Prog Neurobiol**, v. 57, p. 1-164 1999.
- MILLAN, M., J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.
- MOBARAKEH, J., I.; SAKURADA, S.; NISHINO, S.; WATANABE, H.; KATO, M.; NAGHDI, N.; YANAIA, K. Enhanced antinociception by intracerebroventricularly administered orexin A in histamine H1 or H2 receptor gene *knock-out* mice. **Pain**, v. 118, p. 254-262, 2005.
- MOBARAKEH, J., I.; SAKURADA, S.; HAYASHI, T.; ORITO, T.; OKUYAMA, K.; SAKURADA, T.; KURAMASU, A.; WATANABE, T.; WATANABE, T.; YANAI, K. Enhanced antinociception by intrathecally-administered morphine in histamine H1 receptor gene *knock-out* mice. **Neuropharmacology**. v. 42, p. 1079–1088, 2002.
- MOBARAKEH, J., I.; SAKURADA, S.; KATSUYAMAC, S.; KUTSUWAC, M.; KURAMASU, A.; WATANABE, T.; WATANABE, T.; YANAI, K. T.; YANAIA, K. Role of histamine H1 receptor in pain perception: a study of the receptor gene *knock-out* mice. **European Journal of Pharmacology**. V. 391, p. 81-89, 2000.
- NARITA, M.; TAKAMORI, K.; KAWASHIMA, N.; FUNADA, M.; KAMEI, J.; SUZUKI, T.; MISAWA, M.; NAGASE, H. Activation of central ATP-sensitive potassium channels produces the antinociception and spinal noradrenaline turnover-enhancing effect in mice. **Psychopharmacology**. v. 113, p. 11–14, 1993.
- NEMMAR, A.; DELAUNOIS, A.; BECKERS, J. F.; SULON, J.; BLODEN, S.; GUSTIN, P. Modulatory effect of imetit, a histamine H3 receptor agonist, on C-fibers, cholinergic fibers and mast cells in rabbit lungs in vitro. **Eur J Pharmacol**, v. 371, p. 23-30, 1999.
- NINKOVIC, M.; HUNT, S., P.; GLEAVE, J., R., W. Localization of opiate and histamine H1-receptors in the primate sensory ganglia and spinal cord. **Brain Res**. v. 241, p. 197–206, 1982.
- NINKOVIC, M.; HUNT, S., P.; KELLY, J., S. Effect of dorsal rhizotomy on the autoradiographic distribution of opiate and neurotensin receptors and neurotensin like immunoreactivity within the rat spinal cord. **Brain Research**. v. 230, p. 111–119, 1981.
- OGGESHALL, R., E.; CARLTON, S., M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Res. Brain Res. Rev.** v. 24, p. 28–66, 1997.
- OHKUBO, T.; SHIBATA, M.; INOUE, M.; KAYA, H.; TAKAHASHI, H. Regulation of substance P release mediated via prejunctional histamine H3 receptors. **Eur J Pharmacol**, v. 273, p. 83-88, 1995.

ONODERA, K.; YAMATODANI, A.; WATANABE, T.; WADA, H.; Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. **Prog. Neurobiol.** v. 42, p. 685–702, 1994.

PALUDO, K., S.; BISCAIA, S., M., P.; CHAIM, M.; OTUKI, M., F.; NALIWAIKO, K.; DOMBROWSKI, P. A.; FRANCO, C., R., C.; VEIGA, S., S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: A pharmacological investigation. **Comparative Biochemistry and Physiology.** v. 149, p. 323–333, 2009.

PANULA, P.; AIRAKSINEN, M. S.; PIRVOLA, U.; KOTILAINEN, E. A histamine-containing neuronal system in human brain. **Neuroscience**, v. 34, p. 127-132, 1990.

PANULA, P.; FLÜGGE, G.; FUCHS, E.; PIRVOLA, U.; AUVINEN, S.; AIRAKSINEN, M. S. Histamine-immunoreactive nerve fibers in the mammalian spinal cord. **Brain Res**, v. 484, p. 234-239, 1989.

PANULA, P.; PIRVOLA, U.; AUVINEN, S.; AIRAKSINEN, M. S. Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. **Neuroscience**, v. 28, p. 585-610, 1989.

PANULA, P.; YANG, H. Y.; COSTA, E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. **Proc. Natl Acad. Sci.** v. 81, p. 2572-2576, 1984

PARADA, C.A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. HThe major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v. 102, p. 937–944, 2001.

PAROLARO, D.; PATRINI, G.; MASSI, P.; MA.; MAINARDI, P.; GIAGNONI.; SALA, M.; GORI, E.. D. Histamine as a central modulator of rat intestinal transit. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 249 p. 324-328, 1989.

PEDARZANI, P.; STORM, J., F. Protein kinase A-independent modulation of ion channels in the brain by cyclic AMP. **Proc Natl Acad Sci.** v. 92, p. 11716–11720, 1995.

PILLOT, C.; HERON, A.; COCHOIS, V.; TARDIVEL-LACOMBE, J.; LIGNEAU, X.; SCHWARTZ, J. C.; ARRANG, J. M. A detailed mapping of the histamine H₃ receptor and its gene transcripts in rat brain. **Neuroscience**, v. 114, p. 173-193, 2002.

POLLARD, H.; MOREAUS, J.; ARRANG, M.; SCHWARTZ, J. C. A detailed autoradiographic mapping of histamine H₃ receptors in rat brain areas. **Neuroscience.** v. 52, p.169-168, 1993.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog Neurobiol.** v. 64, p. 51-68, 2001.

PRELL, G. D.; GREEN, J. P. Histamine as a neuroregulator. **Annu. Ver. Neurosci.**, v. 9, p. 209-254, 1986.

PRINZ, C.; ZANNER, R.; GRATZL, M. Physiology of gastric enterochromaffin-like cells. **Annu Rev Physiol.** v. 65, p. 371–382, 2003.

- REITE, O. B. Comparative physiology of histamine. **Physiol. Rev.** v. 52, p. 778–819, 1972.
- REXED, B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *Journal of Comparative Neurology.* v. 96, p. 415-495, 1952.
- RICHELSON, E. Histamine H1 receptor-mediated guanosine 3',5'-monophosphate formation by cultured mouse neuroblastoma cells. **Science**, v. 201, p. 69-71, 1978.
- ROULEAU, A.; GARBARG, M.; LIGNEAU, X.; MANTION, C.; LAVIE, P.; ADVENIER, C.; LECOMTE, J. M.; KRAUSE, M.; STARK, H.; SCHUNACK, W.; SCHWARTZ, J. C. Bioavailability, antinociceptive and antiinflammatory properties of BP 2-94, a histamine H3 receptor agonist prodrug. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 281, p. 1085-1094, 1997.
- RUDY, B. Diversity and ubiquity of K channels. **Neuroscience.** v. 25, p. 729–749, 1988.
- SAKURADA, S.; WATANABE, H.; MIZOGUCHI, H.; YONEZAWA, A.; ORIT, T.; KATSUYAMA, S.; KURAMASU, A.; SAKURADA, C.; YANAY, K.; SAKURADA, T.; Involvement of the histaminergic system in the nociceptin-induced pain-related behaviors in the mouse spinal cord. **Pain**, v.112, p. 171-182, 2004.
- SAKURADA, S.; ORIT, T.; FURUTA, S.; WATANABE, H.; MOBARAKEH, J. I.; YANAI, K.; WATANABE, T.; SATO, T.; ONODERA, K.; SAKURADA, C.; SAKURADA, T.; Intrathecal histamine induces spinally mediated behavioral response through tachykinin NK1 receptors. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 74, p. 489-493, 2003.
- SANTER, V.; SRIRATANA, A.; LOWTHER, D. A. Carrageenin-induced arthritis: V. A morphologic study of the development of inflammation in acute arthritis. **Semin. Arthritis. Rheum.** v. 3, p. 223-245, 1989.
- SCHLICKER, E.; BEHLING, A.; LUMMEN, G.; GOTHERT, M. Histamine H3A receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the mouse brain cortex. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** v. 345, p. 489-493, 1992.
- SCHLICKER, E.; MALINOWSKA, B.; KATHMANN, M.; GOËTHERT, M.. Modulation of transmitter release via histamine H3 heteroreceptors. *Fundam. Clin. Pharmacol*, v. 8, p. 128-137, 1999.
- SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W., Analysis of inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** v. 8, p. 93–151, 2006.
- SCHUBERT, M., L.; PEURA, D., A. Control of gastric acid secretion in health and disease. *Gastroenterology*. v. 134, p. 1842-60, 2008.
- SMITH, B. N.; ARMSTRONG, W. E. The ionic dependence of the histamine induced depolarization of vasopressin neurones in the rat supraoptic nucleus. **J. Physiol.** v. 495, p. 465-478, 1996.

SNIDER RM, MCKINNEY M, FORRAY C, RICHELSON E. Neurotransmitter receptors mediate cyclic GMP formation by involvement of arachidonic acid and lipoxygenase. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 81, p. 3905-3909, 1984.

SOUZA-SILVA, E. O papel hiponociceptivo do receptor H1 articular. 70f. **Dissertação** (mestrado em farmacologia) – departamento de farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

STAMFORD, J., A. Descending control of pain. **British Journal of Anaesthesia**. v. 75, p. 217-227, 1995.

STEIN, C.; MACHELSKA, J.; BINDER, W.; SCHFER, M. Periferal opioid analgesia. **Current opinion in pharmacology**. v. 47, p. 62-65, 2001.

STEVENS, D., R.; ERIKSSON, K., S.; BROWN, R., E.; HAAS, H., L. The mechanism of spontaneous firing in histamine neurons. **Behav Brain Res**. v. 124, p. 105-112, 2001

SUZUKI, H.; MOBARAKEH, J. I.; NUNOKI, K.; SUKEGAWA, J.; WATANABE, H.; KURAMASU, A.; WATANABE, T.; YANAI, K.; YANAGISAWA, T. Effects of activation of central nervous histamine receptors in cardiovascular regulation; studies in H(1) and H(2) receptor gene *knock-out* mice. **Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol**. v. 371, p. 99-106, 2005.

SUZUKI, T.; MASUKAWA, Y.; SHIOZAKI, Y.; MISAWA, M. Potentiation of pentazocine conditioned place preference by tripeleminamine in rats. **Psychopharmacology**. v. 105, p. 9 – 12, 1991.

SUZUKI, T.; TAKAMORI, K.; MISAWA, M.; MISAWA, M.; ONODERA, K.. Effects of the histaminergic system on the morphine-induced conditioned place preference in mice. **Brain Res**. v. 675, p. 195– 202, 1995.

TAKESHITA, Y.; WATANABE, T.; SAKATA, T.; MUNAKATA, M.; ISHIBASHI, H.; AKAIKE, N. Histamine modulates high-voltage-activated calcium channels in neurons dissociated from the rat tuberomammillary nucleus. **Neuroscience**. v. 87, p. 797–805, 1998.

THURMOND R. L. Histamine in inflammation. editora landes biosciences. 2011, USA.

TING, E.; ROVERONI, R. C.; FERRARI, L. F.; LOTUFO, C. M.; VEIGA, M. C.; PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H. Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. **Life Sci** v. 81 p. 765–771. 2007.

TODD, A., J.; KOEBERG, H. R. Neuroanatomical substrates of spinal nociception MELZAK. WALL: **Text-book of Pain**. 5 ed. Churchill livingstone, edinburgh: 73 – 90. 2006.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carrageenan incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**. v. 48, p. 421-427,1992.

TORRENT, A.; MORENO-DELGADO, D.; GÓMEZ-RAMÍREZ, J.; RODRÍGUEZ-AGUDO, D.; RODRÍGUEZ-CASO, C.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.; BLANCO, I.; ORTIZ, J. H3 autoreceptors modulate histamine synthesis through calcium/ calmodulin- and cAMP-dependent protein kinase pathways. **Mol Pharmacol**. v. 67 p. 195–203, 2005.

VAN ARMAN, G. G.; CARLSON, R. P.; RISLEY, E. A.; THOMAS, R. H.; NUSS, G. W. Inhibitory effects on indomethacin, aspirin and certain other drugs on inflammations induced in rat and dog by carrageenan, sodium urate and ellagic acid. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 175, p. 459-468.1970.

VOLLINGA, R. C.; DE KONING, J. P.; JANSEN, F. P.; LEURS, R.; MENGE, W. M.; TIMMERMAN, H. A new potent and selective histamine H3 receptor agonist H-(1Himidazol-4-ylmethyl)piperidine. **J. Med. Chem.**, v. 37, p. 332-333, 1994.

WANG, H.; WESSENDORF, M., W. Equal proportions of small and large DRG neurons Express opioid receptor mRNAs. **The Journal of Comparative Neurology**. v.429, p. 590-600, 2001.

WANG, H.; WESSENDORF, M., W. Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs. **J. Comp. Neurol.** v. 429, p. 590–600, 2001.

WATANABE, T.; TAGUCHI, Y.; HAYASHI, H.; TANAKA, J.; SHIOSAKA, S.; TOHYAMA, M.; KUBOTA, H.; TERANO, Y.; WADA, H. L. Evidence for the presence of a histaminergic neuron system in the rat brain: an immunohistochemical analysis. **Neurosci Lett**, v. 39, p. 249-254, 1983.

WEIGER, T.; STEVENS, D. R.; WUNDER, L.; HAAS, H. L. Histamine H1 receptors in C6 glial cells are coupled to calcium-dependent potassium channels via release of calcium from internal stores. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol**, v. 355, p. 559-565, 1997.

WELCH, S., P.; DUNLOW, L., D. Antinociceptive activity of intrathecally administered potassium channel openers and opioid agonists: a common mechanism of action? **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 267, p. 390–399, 1993.

WILLIS, W., D. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double edged sword. **Experimental Brain Research**. v. 124, p. 395-421,1999.

YAO, G., L.; TOHYAMA, M.; SENBA, E. Histamine-caused itch induces Fos like immunoreactivity in dorsal horn neurons: effect of morphine pretreatment. **Brain Res**. v. 599, p. 333-337, 1992.

YOSHIDA, A.; MOBARAKEH, J., I.; SAKURAI, E.; SAKURADA, S.; ORITO, T.; KURAMASU, A.; KATO, M.; YANAI, K. Intrathecally-administered histamine facilitates nociception through tachykinin NK1 and histamine H1 receptors: a study in histidine decarboxylase gene *knock-out* mice. **Eur J Pharmacol**. v. 17, p. 55-62, 2005.

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

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**. v. 429, p. 23–37, 2001.