

EDUARDO SOUZA SILVA

**EFEITO HIPONOCICEPTIVO DA HISTAMINA
INTRA-ARTICULAR**

Florianópolis- SC

2009

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

EFEITO HIPONOCICEPTIVO DA HISTAMINA INTRA-ARTICULAR

EDUARDO SOUZA SILVA

Dissertação apresentada ao Curso 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: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi

Florianópolis/SC, 19 de Fevereiro de 2009

AGRADECIMENTOS

Em especial aos meus pais **Elmarion S. Silva e Maria José S. Silva**, meus irmãos **Leonardo S. Silva e Ricardo S. Silva** e minha namorada **Patrícia Magagnin**.
Pessoas sempre presentes em minha vida, pelos seus exemplos de dedicação força, persistência, competência e caráter.

Ao meu mestre e Prof. Dr. **Carlos Rogério Tonussi**, por ter aberto as portas da carreira científica, pelo exemplo de caráter e fé, e por estimular o meu crescimento como ser humano.

Aos amigos de laboratório **Elisângela Bressan, Lúcia de Castro Bastos, Maria Alcina Martins e Tatiany Jovita de Farias** pela paciência e atenção empregadas para me instruir durante o desenvolvimento deste trabalho. Em especial ao amigo e irmão **Daniel Teixeira de Oliveira** que ingressou comigo neste projeto científico e divide o trabalho em todos os experimentos.

A todos os **professores e funcionários** do Departamento de Farmacologia.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)** pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE IMAGENS.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
I- INTRODUÇÃO.....	14
1. DOR.....	14
1.1 NOCICEPÇÃO.....	15
1.2 VIAS NOCICEPTIVAS.....	16
2. ARTICULAÇÃO.....	17
3. HISTAMINA E RECEPTORES.....	21
3.1 HISTAMINA E NOCICEPÇÃO.....	24
4. NOCICEPÇÃO, MASTÓCITOS E ARTICULAÇÃO....	26
5. TESTE DE FORMALINA E HISTAMINA.....	27
II- OBJETIVOS.....	30
III- MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
IV- RESULTADOS.....	40
V- DISCUSSÃO.....	63
5.1- ESQUEMA DE MODULAÇÃO CENTRAL DA NOCICEPÇÃO ARTICULAR.....	72
VI- CONCLUSÕES.....	74
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE ABREVIACES

5-HT	- Serotonina
AH	- cido Hialurnico
AMP _c	- Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	- Análise de variância
ATM	- Articulação Tmporo-mandibular
BHE	- Barreira remato-encefálica
CGRP	- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CMH	- Fibras C responsivas a estímulo mecânico e térmico
CROMO	- Cromoglicato de sódio
DA	- Diâmetro articular
DAG	- Diacilglicerol
EP	- Extravasamento plasmático
EPM	- Erro padrão da média
F1	- Fase 1 da resposta  formalina
F2	- Fase 2 da resposta  formalina
FIG	- Figura
FLA ₂	- Fosfolipase A ₂
FLC	- Fosfolipase C
FS	- Fluido Sinovial
GDNF	- Fator neurotrófico derivado de células gliais
GRD	- Gânglio da Raiz Dorsal
Gβγ	- Subunidade da proteína G
HIST	- Histamina
HMGB1	- High mobility group B1 protein
I.A.	- Intra-articular
I.P.	- Intraperitoneal
I.V.	- Intravenoso (veia gengival)
IASP	- International Association for the Study of Pain
IL-16	- Interleucina-16
IP ₃	- Trifosfato de inositol
Ki	- Constante de inibição
LOR	- Loratadina

LTB ₄	- Leucotrieno B ₄
MAPK	- Proteína quinase ativada por mitógeno
NHE	- Transportador Na ⁺ -H ⁺
NOS	- Óxido nítrico sintase
NPY	- Neuropeptídeo Y
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PIP ₂	- Difosfato de fosfatidilinositol
PKC	- Proteína quinase C
PRO	- Prometazina
RNT	- Ranitidina
SNC	- Sistema Nervoso Central
TEP	- Tempo de elevação da pata
TIOP	- Tioperamida
trkA	- Tirosina Quinase A
trkB	- Tirosina Quinase B
trkC	- Tirosina Quinase C

LISTA DE IMAGENS

- A - Equipamento eletrônico para análise do TEP
- B - Sapatilha acoplada a pata do animal

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Seqüência do protocolo experimental
- Figura 2 - Efeito dose-resposta da Formalina no modelo de incapacitação articular (TEP)
- Figura 3 - Efeito dose-resposta da Formalina no diâmetro articular e extravasamento plasmático
- Figura 4 - Efeito da administração sistêmica de Prometazina no teste de incapacitação articular (TEP)
- Figura 5 - Efeito da administração sistêmica de Prometazina na variação do edema articular e extravasamento plasmático
- Figura 6 - Efeito da administração sistêmica de Loratadina no teste de incapacitação articular (TEP)
- Figura 7 - Efeito da administração sistêmica de Loratadina na variação do edema articular e extravasamento plasmático
- Figura 8 - Efeito da administração local de Loratadina no teste de incapacitação articular (TEP)
- Figura 9 - Efeito da administração local de Loratadina na variação do edema articular e extravasamento plasmático
- Figura 10 - Efeito da administração local de Thioperamida no teste de incapacitação articular (TEP)
- Figura 11 - Efeito da administração local de Thioperamida na variação do edema articular e extravasamento plasmático
- Figura 12 - Efeito da administração local de Histamina no teste de incapacitação articular (TEP)
- Figura 13 - Efeito da Histamina na variação do edema articular e extravasamento plasmático
- Figura 14 - Efeito da co-administração de Histamina com formalina no teste de incapacitação articular (TEP)
- Figura 15 - Efeito da co-administração de Histamina na variação do edema articular e extravasamento plasmático
- Figura 16 - Efeito da administração de Cromoglicato de Sódio sozinho ou com histamina no teste de incapacitação articular (TEP) induzido por formalina
- Figura 17 - Efeito da co-administração de Cromoglicato de Sódio sozinho ou com histamina na variação do edema articular e extravasamento plasmático induzido por formalina intra-articular
- Figura 18 - Efeito da administração sistêmica de Loratadina sozinha e com administração de Cromoglicato de Sódio sozinho ou com Histamina local no teste de incapacitação articular (TEP) induzido por formalina
- Figura 19 - Efeito da administração sistêmica de Loratadina sozinha e com administração de Cromoglicato de Sódio sozinho ou com histamina local na variação do edema articular e extravasamento plasmático induzido por formalina
- Figura 20 - Efeito da administração sistêmica de Ranitidina no teste de incapacitação articular (TEP)
- Figura 21 - Efeito da administração sistêmica de Ranitidina na variação do edema articular e extravasamento plasmático
- Figura 22 - Efeito da administração local de Ranitidina no teste de incapacitação articular (TEP)
- Figura 23 - Efeito da administração local de Ranitidina na variação do edema articular e extravasamento plasmático
- Figura 24 - Esquema mostrando o possível mecanismo central de modulação da nocicepção articular

Histamina é encontrada no líquido sinovial de pacientes indivíduos saudáveis e em diversos tipos de artrite. É sabido que a histamina provoca coceira nos tecidos cutâneos, apesar de em tecidos profundos a sua função sensorial não ser clara. Nosso objetivo foi avaliar o papel da histamina na incapacitação articular, edema, extravasamento de plasma após injeção de formalina em joelhos de ratos. Incapacitação articular foi medida através da contagem do tempo de elevação da pata (TEP; s) durante o período de 1 min de caminhada forçada, a cada 5 minutos, durante uma sessão experimental de 60 min. Edema articular foi avaliado pelo aumento de diâmetro articular, (DA; cm), e o extravasamento de plasma foi medido pela quantidade de azul de Evans (25 mg / kg, iv, 30 min antes do teste) no líquido sinovial (EP; mg / ml) 1 hora após a injeção de formalina. Formalina evocou duas fases de incapacitação, bem como aumento do DA e EP de forma dose-dependente. Prometazina (0.5 e 12 mg / kg, ip, $P < 0.05$ e $P < 0,01$) 1 h antes de formalina causou hiper e hiponocicepção na 2ª fase, respectivamente. Loratadina (10 mg / kg, ip, $P < 0,01$) e ranitidina (10 mg / kg ip, $P < 0,05$) causaram hipernocicepção na 2ª fase. No entanto, nenhum dos tratamentos inibiu ou aumentou DA e o EP. Co-injeção de loratadina (20 pmol $P < 0,01$), ranitidina (2 e 17 pmol $P < 0,01$) e tioperamida (4 e 40 nmol $P < 0,05$ e $P < 0,01$) com formalina causou hipernocicepção na 2ª fase. Apenas tioperamida (0,4 nmol $P < 0,05$) causou hipernocicepção na 1ª fase. Loratadina (20 pmol $P < 0,05$) e tioperamida (40 pmol $P < 0,01$) causaram diminuição de EP. Histamina sozinha (200 e 20.000 nmol) causou nocicepção ($P < 0,01$). No entanto, a histamina co-injetada com formalina (20.000 nmol) causou hiponocicepção na 1ª fase ($P < 0,01$) e (0,2 e

20 nmol) causou hiponocicepção na 2ª fase ($P < 0,01$) da resposta. Nenhum destes tratamentos modificou o DA e EP. Co-injeção de cromoglicato sódico (1,6 mg / i.a) com formalina causou hiponocicepção na 2ª fase de resposta da formalina ($P < 0,01$), e impediu o efeito hipernociceptivo da loratadina, bem como o efeito hiponociceptivo da histamina. Estes dados sugerem que a liberação de histamina articular a partir de mastócitos, em receptores H1, H2 e H3 tem um papel hiponociceptivo em vez de nociceptivo. Além disso, este efeito da histamina parece ser independente de qualquer efeito vascular.

Histamine is found in synovial fluid from healthy subjects and various types of arthritic patients. It is well known that histamine induces itch in cutaneous tissues, although in deep tissues its sensorial function is not clear. Our aim was to evaluate the role of histamine in the articular incapacitation, edema, and plasma leakage after formalin injection into rat knee-joints. Articular incapacitation was measured by counting the paw elevation time (PET; s) during 1 min period of forced walk, each 5 min throughout a 60-min experimental session. Edema was evaluated by the articular diameter increase (AD; cm), and plasma leakage was measured by the amount of Evans Blue (25 mg/kg, i.v., 30 min before the test) in synovial fluid (PL; $\mu\text{g/mL}$) 1 hour after formalin injection. Formalin dose-dependently evoked two phases of incapacitation, as well as AD and PL increase. Promethazine (0.5 and 12 mg/kg i.p., $P<0.05$ and $P<0.01$) 1 h before formalin caused hyper and hyponociception in the 2nd phase, respectively. Loratadine (10 mg/kg i.p., $P<0.01$) and ranitidine (10 mg/kg i.p., $P<0.05$) caused hypernociception in the 2nd phase. However, none of the treatments inhibited the AD increase and plasma leakage. Co-injecting loratadine (20 pmol $P<0.01$), ranitidine (2 and 17 pmol $P<0.01$) and thioperamide (4 and 40 nmol $P<0.05$ and $P<0.01$) with formalin caused hypernociception in 2nd phase. Only thioperamide (0.4 nmol $P<0.05$) caused hypernociception in 1st phase. Loratadine (20 pmol $P<0.05$) and thioperamide (40 pmol $P<0.01$) caused decreased of plasma leakage. Histamine alone (200 and 20.000 nmol) caused nociception ($P<0.01$). However, histamine co-injected with formalin (20.000 nmol) caused hyponociception in 1st phase ($P<0.01$) and (0.2 and 20 nmol) caused hyponociception in the 2nd phase ($P<0.01$) of

response. None of these treatments modified DA and PL. Co-injecting sodium cromoglycate (1.6 mg/joint) with formalin caused hyponociception in the 2nd phase of formalin response ($P < 0.01$), and prevented the hypernociceptive effect of loratadine, as well as the effect hyponociceptive of histamine. These data suggest that the articular release of histamine from mast cells has a H1, H2 and H3-mediated hyponociceptive rather than a nociceptive role. In addition, this effect of histamine seemed to be unrelated to any vascular effect.

INTRODUÇÃO

I- INTRODUÇÃO

1. DOR

Dor é um dos sintomas mais freqüentes da prática clínica, sendo caracterizado por uma sensação desagradável atuando como um alarme de defesa do organismo. A dor, enquanto modalidade de percepção constitui um sistema de proteção ao organismo de uma lesão tecidual, através da ativação de mecanismos que envolvem vias reflexas espinhais e supra-espinhais (Dray, 1994; Julius e Basbaum, 2001).

Entretanto, o termo dor não possui uma definição ideal e de acordo com a International Association for the Study of Pain (IASP) a palavra dor é definida como “experiência sensorial e emocional desagradável, associada à uma lesão real ou potencial, ou descrita nestes termos” (IASP, 2008). Há mais de um século, Sherrington (1906) sugeriu a existência de nociceptores. Estas fibras são representadas por neurônios sensoriais primários, que ativados por estímulos periféricos nocivos, capazes ou não de gerar danos teciduais, os transforma em impulsos nervosos que são codificados e transmitidos ao sistema nervoso central (IASP, 2008). Assim, calor, frio, pressão, distensão, traumas, estímulos químicos, dentre outros, podem direta ou indiretamente, ativar os nociceptores (Bessou e Perl, 1969; Handwerker e Reeh, 1994). A dor pode ser modulada por uma série de experiências comportamentais, pois envolve não somente a transmissão do estímulo nocivo, mas também fatores emocionais, sociais, culturais, ambientais e cognitivos (Merskey, 1979; Russo e Brose, 1998; Julius e Basbaum, 2001). Assim sendo, nem todo estímulo que ativam os nociceptores resulta necessariamente em uma experiência dolorosa. A relação entre a ativação dos nociceptores e a percepção da dor envolve um

complexo processamento através das vias sensoriais e, a natureza altamente subjetiva da dor dificulta sua compreensão e seu tratamento clínico (Basbaum e Jessel, 2000).

Sendo assim, na pesquisa com animais se faz necessário distinguir os termos dor e nocicepção, onde nocicepção refere-se somente ao processamento neural de codificação e transmissão do estímulo nocivo (IASP, 2008), evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (nociceptores), existentes no local estimulado (Fürst, 1999). Deste modo, adotaremos o termo nocicepção para descrever a estimulação excessiva de fibras sensoriais nociceptivas, que faz referência ao comportamento elicitado como nociceptivo.

1. 1 NOCICEPÇÃO

A duração da sensação nociceptiva pode ser classificada como transitória, aguda ou crônica. Na transitória, a ativação dos receptores de nocicepção acontece na ausência de qualquer dano tecidual, como por exemplo, a retirada da mão após o estímulo de uma temperatura elevada. A nocicepção aguda, por sua vez é uma resposta normal causada por uma lesão do tecido com conseqüente ativação dos receptores no local da lesão, desaparecendo mesmo antes da reestruturação das condições fisiológicas no local lesionado. A nocicepção crônica, ao contrário das anteriores, é provocada por uma lesão ou doença que geralmente supera a capacidade de recuperação do organismo (Loeser e Melzack, 1999).

Quanto à localização, a nocicepção pode ser classificada como somática ou visceral. A nocicepção somática ocorre quando estímulos sensoriais

nociceptivos provêm de locais que não são as vísceras. De acordo com a estrutura do corpo, a classificação também pode ser dividida como nocicepção superficial cutânea (pele e tecido conjuntivo) e profunda (ossos, articulações e músculos). A nocicepção visceral, por sua vez, ocorre quando os estímulos produtores da sensação nociceptiva provêm de vísceras (Raja, 1999).

1. 2 VIAS NOCICEPTIVAS

As fibras sensoriais, sozinhas ou em conjunto, fornecem informações ao sistema nervoso central não somente sobre o meio-ambiente, mas também sobre o estado do organismo. Entre as diferentes variedades de fibras sensoriais os nociceptores normalmente respondem a múltiplas formas de energia que produzem lesão (estímulo térmico, mecânico e químico), fornecendo informações ao sistema nervoso central em relação a localização e intensidade do estímulo nocivo.

Os nociceptores podem ser classificados com respeito a quatro critérios:

- 1)** Descrição das características morfo-funcionais: fibras aferentes tipo C, não-mielinizadas e menor diâmetro (0,4 – 1,2 μm), com baixa velocidade de condução (0,5 – 2.0 m/s) e fibras aferentes tipo A, mielinizadas e maior diâmetro (> 2 μm) e maior velocidade de condução (> 2.0 m/s);
- 2)** modalidades de estímulos que evocam uma resposta;
- 3)** características da resposta;
- 4)** diferentes marcadores químicos (receptores expressos na membrana).

2. ARTICULAÇÃO

Existe muita semelhança entre a anatomia articular do joelho de humanos e ratos (Greene, 1963; Hebel, 1986). O joelho de ambos caracteriza-se por ser uma articulação sinovial, em dobradiça (fêmur e tíbia) e plana (fêmur e patela), sendo composta anatomicamente pela extremidade distal do fêmur, pela extremidade proximal da tíbia, e pela patela. A articulação femuro-tibial é parcialmente dividida pelos meniscos entre as faces articulares correspondentes, não sendo mantido por suas estruturas ósseas, mas por ligamentos e músculos. (Gray 1995; Lehmkuhl, 1989; Lippert, 1996).

Os ligamentos cruzados e laterais são um tipo de tecido conjuntivo denso, modelado e estão localizados no interior da cápsula articular e, por isso, são chamados ligamentos intracapsulares. Os meniscos, medial e lateral, são dois discos fibrocartilagosos, localizados na superfície superior da tíbia tendo a função de absorver os impactos mecânicos sobre o joelho. Treze bolsas sinoviais estão localizadas no joelho com o propósito de reduzir fricção entre os tendões e os ossos da articulação. Os músculos articulares dividem-se em: reto femoral, vasto lateral, vasto medial, vasto intermediário, semimembranoso, semitendinoso, bíceps femoral, poplíteo, gastrocnêmico, grácil, sartório e tensor fáscia lata (Gray, 1995 e Lippert, 1996).

As articulações são revestidas externamente pela cápsula articular fibrosa que reveste a articulação como um envelope. Tem como função manter a união entre os ossos, proporcionando maior resistência a articulação impedindo que ocorram movimentos em planos indesejáveis, além de limitar a amplitude dos movimentos considerados normais.

O revestimento interno das articulações possui uma membrana que proporciona fechamento hermético a articulação, chamado de forro sinovial ou sinóvia. É formada por uma primeira linha de células que forma a membrana sinovial, sendo constituída por uma fina camada de revestimento, aproximadamente 50 µm em humanos, composta por células do tipo A, semelhantes a macrófagos, e de células tipo B, semelhantes a fibroblastos (Athanasou e Quinn, 1991; Revell, 1989; Wilkinson et al., 1992). As células do tipo B têm função de secreção de colágeno e fibronectina (Matsubara, 1983). Ambas as células secretam ácido hialurônico (AH) a partir da difusão do plasma pelas paredes dos capilares sinoviais, estando presente no fluído sinovial (FS) de articulações normais na concentração de 3-4 mg/ml (Yielding, 1957; Barnabé et al., 2004; Hamerman e Schuster, 1958).

A primeira linha celular é apoiada por uma espessa linha composta por tecido conjuntivo frouxo chamada de subsinóvia (Mello, 2008; Blewis et al., 2007) que possui amplo sistema de vasos para depuração das moléculas, além de terminações nervosas livres. Esta camada possui característica delgada, mas resistente, reforçada em quase toda sua extensão por ligamentos fibrosos constituídos por fibras colágenas, elásticas e reticulares dispostos em paralelo ou intimamente entrelaçados, sendo maleáveis e flexíveis, tendo uma grande diversidade celular residente que inclui fibroblastos, macrófagos, plasmócitos, mastócitos, além de tecido adiposo, sendo bastante innervado e vascularizado (Nigrovic e Le, 2004).

No espaço articular o fluído sinovial tem a função de auxiliar na lubrificação das articulações e prover a nutrição de aproximadamente dois terços da cartilagem articular. O fluído sinovial normal é claro e de cor amarelo

pálida, sendo composto de ácido hialurônico e glicoproteínas. Ele não coagula, visto a ausência de fibrinogênio e protrombina, sendo uma substância viscosa que normalmente contém poucas células brancas.

Na superfície interna articular encontra-se a cartilagem articular, caracterizada por um tecido conjuntivo com função de dar suporte aos tecidos moles, revestindo as superfícies articulares a fim de promover a facilitação do deslizamento dos ossos ao movimento, absorvendo o impacto sobre a articulação. Este tecido não possui inervação, é avascular e alinfático, sendo compostos por uma substância fundamental amorfa, delgadas fibras colágenas e três tipos celulares: o condroblasto, o condrócito e o condroclasto.

A vascularização da articulação ocorre através do ramo descendente da artéria circunflexa arterial da coxa, artéria superior lateral do joelho, artéria inferior lateral do joelho, ramo circunflexo fibular, artéria recorrente tibial anterior, artéria tibial anterior, e medialmente são recorrentes da artéria genicular descendente, ramo articular da artéria genicular descendente, artéria superior medial do joelho, artéria inferior do joelho. A veia que drena a articulação é a veia popliteante sural (Gray, 1995).

A inervação da articulação do joelho ocorre comumente por dois nervos, o nervo articular medial e posterior (Willis, 1992). As terminações nervosas são identificadas na cápsula, ligamentos, meniscos, periósteo e região subcondral (Marinozzi, 1991; McDougall, 1997). Cada um destes nervos possui aproximadamente 650 fibras aferentes, sendo que cerca de 80% das fibras do joelho são nociceptores (Langford, 1983; Hildebrand, 1991), além de 500 fibras não mielinizadas simpáticas eferentes (Langford, e Schmidt, 1983). As fibras

nervosas sensoriais articulares podem ser definidas em quatro (4) categorias de acordo com sua velocidade de condução (Willis, WD., 1992).

I- Velocidade de condução 65-100 m/s, unidades que são ativadas por movimentos não nocivos na articulação;

II- Velocidade de condução 21-65 m/s, unidades que são pouco ativadas por movimentos não nocivos na articulação, normalmente ativadas por estímulos de pressão ;

III- Velocidade de condução 2.5-20 m/s, 55% destas unidades são ativadas apenas por movimentos nocivos na articulação e aproximadamente 45% (nociceptores silenciosos), não respondem mesmo a este estímulo;

IV- Velocidade de condução < 2.5 m/s, 70% destas unidades são ativadas apenas por movimentos nocivo na articulação e aproximadamente 30% (nociceptores silenciosos) não respondem mesmo a este estímulo;

De acordo com a propriedade das fibras nervosas aferentes sensoriais as fibras com grande velocidade de condução I e II, ou seja, fibras A β , têm como função primária, na ausência de lesão tecidual ou nervosa, detectar e transmitir informações mecânicas de baixa intensidade da articulação ao sistema nervoso central, codificando e transmitindo sinais proprioceptivos, que podem ser interpretados como dinâmico (sensações de movimento) ou estático (Dorn, 1991). As fibras III e IV, ou seja, fibras A δ e C, podem ser considerados nociceptores, pois, possuem alto limiar de ativação e teriam como função detectar e transmitir informações mecânicas de alta intensidade da articulação ao sistema nervoso central.

O movimento articular gera um estresse de cisalhamento no axolema de terminações nervosas livres, resultando na abertura de canais iônicos sensíveis

a estímulo mecânico. Este processo leva a despolarização da terminação nervosa com conseqüente geração de potenciais de ação, transmitidos ao sistema nervoso central sendo codificados como sensação mecânica. Se um movimento nocivo é aplicado à articulação, a categoria de disparo de nervos aferentes aumenta dramaticamente e o sistema nervoso central interpreta esta atividade nociceptiva como dor (Schaible, 1983; Grigg, 1986). Além disso, o processo inflamatório faz com que as fibras III e IV passem a responder a estímulos de movimentos normais e quase não se detectam fibras silenciosas.

3. HISTAMINA E RECEPTORES

Designada como autacóide (grego para “automedicação”), a histamina tem participação em diversos processos fisiológicos, tais como prurido, regulação vascular, regulação de secreção gástrica e broncoconstrição, dentre outros. Este mediador atua nos receptores histaminérgicos H1, H2, H3 e recentemente existem relatos da existência do subtipo H4.

O receptor subtipo H1 está localizado em diferentes tecidos de mamíferos, tais como neurônios no sistema nervoso central, coração, medula adrenal, linfócitos e células endoteliais, onde promove a contração destas células, contribuindo para o extravasamento de plasma nas fases iniciais dos processos inflamatórios (Hill, 1997). O receptor H1 também está localizado em fibras nervosas sensoriais (Kashiba, 2001_a) onde a histamina promove a despolarização dos aferentes primários (Ständer, 2003). Segundo Kashiba (2001_b) este receptor está expresso em fibras C, sendo exclusivo a fibras peptidérgicas que expressam neuropetídio Y e não substância P e CGRP. Outros efeitos além dos citados anteriormente, podem ser vistos através do

receptor H1, como aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase (via dependente de cálcio/calmodulina) e subsequente aumento da guanilato ciclase solúvel (Schmidt et al., 1990; Leurs et al., 1991; Yuan et al., 1993; Casale et al., 1985; Duncan et al., 1980; Hattori et al., 1990; Sertl et al., 1987), além da liberação de ácido araquidônico e a síntese de produtos do metabolismo do ácido araquidônico, como prostaciclina e tromboxano A2 (Carter et al., 1988; Resink et al., 1987; Leurs et al., 1994; Muriyama et al., 1990).

Este receptor encontra-se acoplado a proteína- $G_{q/11}$ (Hill, 1990), onde fortes evidências demonstram que o mecanismo de ação do receptor H1 ocorre pela ativação da enzima fosfolipase C (FLC), resultando na clivagem de difosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), com formação de diacilglicerol (DAG), que ativa a proteína quinase C (PKC), e do trifosfato de inositol (IP_3) que promove liberação de cálcio das reservas intracelulares (Matsumoto et al., 1986; Kotlikoff et al., 1987; Takuwa et al., 1987; Hall e Hill, 1988; Panettieri et al., 1989; Amsterdam et al., 1989). Entretanto, em alguns tecidos, a histamina pode estimular a hidrólise do fosfatidil inositol, mobilizando as reservas de cálcio intracelular, independente do receptor H1 (Hill, 1997).

O receptor H2 está amplamente distribuído, sendo encontrado em células parietais gástricas, útero, células cardíacas, neutrófilos, mastócitos e basófilos (Hill, 1997). O mecanismo de ação do receptor H2 ocorre pelo acoplamento à proteína G_s (Hill, 1990). A histamina através do receptor H2 é um potente estimulador de acúmulo de AMP-cíclico em muitos tipos de células (Johnson, 1982), inclusive em basófilos (Lichtenstein e Gillespie, 1975), e neutrófilos (Busse e Sosman, 1977).

Este receptor pode inibir uma variedade de respostas do sistema imune (Hill, 1990). Em basófilos e mastócitos tem a função de inibir a liberação de histamina (Bourne et al., 1971; Lichtenstein e Gillespie, 1975; Lett-Brown e Leonard, 1977; Ting et al., 1980; Plaut e Lichtenstein, 1982). Em linfócitos pode inibir a síntese de anticorpos, proliferação de células T e produção de citocinas (Bourne et al., 1971; Melmon et al., 1974, 1981; Griswold et al., 1984; Khan et al., 1985, 1986; Sansoni et al., 1985; Melmon e Khan, 1987).

O receptor H3 foi identificado primeiramente por Arrang e seus colaboradores em (1983) no sistema nervoso central. Atualmente sabe-se que está presente em nervos periféricos, coração, trato gastrointestinal e células endoteliais (Hill, 1997). Este receptor atua como um auto-receptor para histamina, além de modulador de outros transmissores no sistema nervoso central (Arrang, 1995). O receptor H3 regula na periferia a liberação de acetilcolina de terminais parassimpáticos, assim como noradrenalina de terminais simpáticos e, além disto, regula a liberação de substância P de terminações de aferentes primários (Ohkubo et al., 1995).

Existe na literatura vigente pouca evidência concreta a respeito do mecanismo de transdução de sinal deste receptor. Acredita-se que o mecanismo esteja acoplado a proteína $G_{i/o\alpha}$ (Arrang et al., 1990; West et al., 1990; Kilpatrick e Michel, 1991; Zweig et al., 1992; Clark e Hill, 1995), porém, pouco se sabe sobre as vias ativadas por este receptor (Hill, 1997). Segundo Bongers (2007), o receptor H3 pode: inibir a adenilato ciclase, ativar a fosfolipase A_2 (FLA₂), modular a via MAPK, inibir o transportador Na^+-H^+ (NHE) e, ainda, modular canais de potássio ativados por cálcio.

O receptor H4 foi identificado por Oda (2000) em humanos. Existe grande similaridade entre a isoforma do receptor H3 com o subtipo H4 em suas cadeias de aminoácidos (Esch I. 2005). O receptor H4 está preferencialmente localizado em células da medula óssea, eosinófilos e mastócitos (Oda et al. 2000; Zhu et al 2001). Acredita-se que o mecanismo de transdução de sinal do receptor H4 seja pelo acoplamento a proteína $G_{i/o\alpha}$, produzindo efeito inibitório a enzima adenilato ciclase (Esch I. 2005). Em mastócitos a ativação do receptor H4 promove aumento das respostas ao cálcio via fosfolipase C, indicando que a subunidade $G\beta\gamma$ da proteína G é responsável pelo aumento da concentração de cálcio (Esch I. 2005). Os estudos vigentes estão apontando para o papel pró-inflamatório deste receptor pela ação de seus antagonistas específicos bloqueando em aproximadamente 50% a neutrofilia em modelos de peritonite induzido por zimosan (Takeshita et al., 2003; Thurmond et al., 2004), bem como o tratamento com tioperamida, antagonista H3 e H4, reduziu a liberação de leucotrieno B_4 (LTB_4) em mastócitos, diminuindo a quimiotaxia para neutrófilos (Takeshita et al., 2003). Outra evidência que sugere a importância deste receptor no processo inflamatório é que agonistas H4, (R)- α -metilhistamina e clobenpropit, promoveram a liberação da citocina IL-16 em mastócitos (Ling et al., 2004).

3.1. HISTAMINA E NOCICEPÇÃO

A relação da histamina com a dor vem sendo discutida desde o início do século passado (Rosenthal, 1939), onde vários autores sugerem que a histamina exerce um papel de mediador na dor cutânea, tanto em observações clínicas em humanos, como nocicepção em animais.

Esta relação da histamina como mediador da nocicepção é baseada pela ação de antihistamínicos, pois sua administração subcutânea conseguiu abolir as respostas nociceptivas provocadas por beliscão, picadas ou corte em animais experimentais. Em (1946) Dews conduziu o primeiro estudo do efeito hiponociceptivo dos antihistamínicos, relatando que a pirilamina (antagonista do receptor H1) tinha efeito oito vezes maior do que o de narcóticos em ratos. Desde então, estudos subseqüentes avançaram no intuito de desvendar os mecanismos pelo qual a histamina atua na nocicepção.

No entanto, a histamina administrada apenas em doses muito elevadas aplicadas em tecido cutâneo pré-sensibilizado promove nocicepção (Baron, 2001), pois, normalmente, a sensação evocada é apenas o prurido (Ikoma, 2006). Apesar disso, a sensação de prurido induzido pela histamina pode facilitar a dor em humanos, pois sua aplicação cutânea aumentou a nocicepção química produzida pela capsaicina aplicada profundamente, no músculo (Wasner, 2004).

Atualmente o papel da histamina tem sido fortalecido por experimentos em camundongos com deleção gênica (knockout) para o receptor H1 da histamina (Mobarakeh et al., 2000, 2002) e para a própria histamina endógena (Yoshida et al., 2005), que apresentaram resposta nociceptiva significativamente menor em testes de nocicepção térmica, química e mecânica quando comparados com animais normais (wildtype), explicando que a interrupção de circuitos histaminérgicos centrais estão relacionados à nocicepção.

4. NOCICEPÇÃO, MASTÓCITOS E ARTICULAÇÃO

Doenças articulares estão entre as maiores causas de ausência do trabalho, bem como figura entre as afecções de maior prevalência em idosos (OMS, 2003). Devido à intensidade de sobrecarga que sofre, a articulação fêmuro-patelo-tibial (joelho) está entre as mais acometidas, fazendo com que inúmeros estudos em diferentes espécies animais, tanto bípedes quanto quadrúpede, tentem entender os mecanismos envolvidos nos processos patológicos envolvendo esta articulação.

Quando há lesão articular, ocorre uma complexa interação entre diferentes células residentes (condrócitos, fibroblastos, macrófagos, plasmócitos e mastócitos) com os nociceptores. Na ausência de inflamação, os mastócitos estão localizados de forma dispersa no tecido conjuntivo ou agrupados em torno de vasos e nervos, formando até 3% de todas as células (Nigrovic e Le, 2004). Nos últimos anos, inúmeros trabalhos identificam estas células como extremamente atuantes no processo de degeneração articular. Porém a função dos mastócitos no tecido articular normal permanece para ser elucidado.

A partir do início da lesão tecidual, inúmeros mediadores são liberados de grânulos dos mastócitos em questão de segundos, incluindo histamina, proteoglicanos (heparina) e uma série de proteases neutras (triptases, quimases e carboxipeptidases) (Nigrovic e Le, 2004), além de serotonina em ratos (Brown, 2007). Em uma fase intermediária após a estimulação, os mastócitos começam a sintetizar eicosanóides oriundos da clivagem de ácido araquidônico de fosfolípidios de membrana. Dentro de horas, em uma fase posterior após a estimulação, os mastócitos promovem a transcrição e

tradução de novos genes gerando uma série de citocinas e quimiocinas (Nigrovic e Le, 2004).

A resposta celular articular envolvida no contato com um agente irritante estranho, p.ex., originam manifestações vasculares secundárias importantes, sendo evidenciada pelo aumento da circulação sanguínea nos vasos articulares, com aumento da permeabilidade vascular, além de migração de células e extravasamento de proteínas do plasma, através das fenestrações nos capilares subsinoviais para o interior da articulação. Este processo vascular ocorre através da redução da pressão osmótica intravascular e aumento da pressão osmótica do líquido intersticial. Este fenômeno, aliado ao aumento da pressão hidrostática secundária à vasodilatação, leva à fuga de líquido e seu acúmulo no tecido intersticial, conduzindo à formação do edema.

5. TESTE DE FORMALINA E HISTAMINA

O teste de formalina subcutâneo constitui um modelo bifásico de dor persistente, no qual a duração do comportamento nociceptivo é de aproximadamente uma hora (Debuisson e Dennis, 1997; Abbott et al., 1995). A primeira fase da resposta nocifensiva da formalina (dor aguda), está relacionada à ativação direta dos nociceptores, devido à estimulação química periférica (Wheeler-Aceto e Cowan, 1991; Taylor et al., 2000). Na segunda fase (dor tônica) o comportamento nociceptivo é gerado pela estimulação contínua dos nociceptores por mediadores secundários inflamatórios e/ou por uma hiperexcitabilidade da medula espinhal induzida pela primeira fase (sensibilização central) (Dickenson e Sullivan, 1987;Coderre et al., 1990; Tjolsen et al., 1992; Taylor et al., 1995). O intervalo entre a primeira e a

segunda fase é denominado período de quiescência sendo resultante de uma inibição da transmissão nociceptiva através de circuitos supra-espinhais (Matthies e Franklin, 1992) e espinhais (Kaneko e Hammond, 1997). Este teste experimental é amplamente utilizado para avaliar o efeito de fármacos analgésicos, considerado um modelo de dor inflamatória tônica (Carstens, 1997; Tjolsen et al., 1992).

A dor elicitada pela formalina é apenas um dos componentes de uma reação inflamatória local induzida por este agente irritante. Estudos prévios indicam a participação da histamina oriunda de mastócitos na nocicepção elicitada pela injeção subcutânea de formalina (Parada et al., 2001; Shibata et al., 1989). Porém, a maioria dos trabalhos envolvendo mediação histaminérgica e nocicepção estão relacionados à sua participação no tecido superficial, sendo somente relatados os efeitos pró-nociceptivos da histamina (Parada et al., 2001). Contudo, nos modelos animais atualmente utilizados não é possível fazer-se uma distinção clara entre prurido e nocicepção, apenas pelos comportamentos observados. Além disso, a formalina também gera edema local, em decorrência do extravasamento plasmático induzido direta ou indiretamente por este agente (Hong e Abbott, 1995). Em tecidos profundos a participação da histamina está vinculada, em conjunto com os mastócitos, somente em estágios avançados do processo de degeneração articular (Nigrovic e Le, 2004). Porém, pouco se sabe a respeito da função sensorial da histamina no tecido articular (Ting, 2007) e sendo assim, neste estudo, avaliamos o papel da histamina na nocicepção induzida pela formalina em tecido profundo articular, paralelo às respostas vasculares locais de edema e extravasamento plasmático.

OBJETIVOS

II- OBJETIVO

Como parte da resposta nociceptiva em eventos inflamatórios esta associada a edema e extravasamento plasmático, este trabalho tem como objetivo identificar o sítio do efeito hipernociceptivo de antihistamínicos periféricos a nível intra-articular.

Objetivos específicos:

a) Avaliar a participação de antihistamínicos H1 administrados por via sistêmica no comportamento nociceptivo, edema e extravasamento plasmático induzido por formalina intra-articular.

b) Avaliar a participação de antihistamínico H1, co-administrado com formalina intra-articular na nocicepção, edema e extravasamento plasmático.

c) Avaliar a participação de antihistamínico H2 administrado por via sistêmica no comportamento nociceptivo, edema e extravasamento plasmático induzido por formalina intra-articular.

d) Avaliar a participação de antihistamínico H2, co-administrado com formalina intra-articular na nocicepção, edema e extravasamento plasmático.

e) Avaliar a participação de antihistamínico H3, co-administrado com formalina intra-articular na nocicepção, edema e extravasamento plasmático.

f) Avaliar a participação da histamina na nocicepção, edema e extravasamento plasmático.

g) Avaliar a participação da histamina co-administrada com formalina na nocicepção, edema e extravasamento plasmático.

h) Avaliar a participação de mastócitos na nocicepção, edema e extravasamento plasmático induzidos por formalina intra-articular.

i) Avaliar a participação de antihistaminicos H1 e da histamina liberada de mastócitos na nocicepção, edema e extravasamento plasmático induzidos por formalina intra-articular.

MATERIAIS E MÉTODOS

III- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Os procedimentos experimentais foram realizados com ratos Wistar fêmeas com idade aproximada de 3 meses e peso variando entre 200 e 250g. Os animais foram criados, e mantidos em biotério sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo claro/escuro de 12 horas), dispondo de livre acesso de água e ração. Foram removidos do biotério para ambientação de 1h antes de quaisquer procedimentos experimentais, sendo os mesmos realizados entre 7 e 19 horas. Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo comitê de ética local para o uso de animais e, além disso, foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1983).

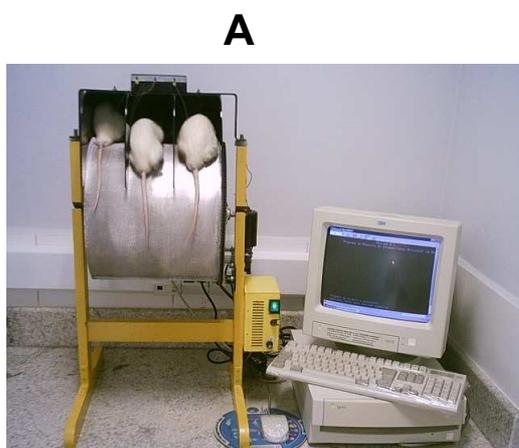
3.2 COMPOSTOS UTILIZADOS

- **Loratadina (Galena Química Farmacêutica LTDA, Brasil):** antagonista de receptor H1;
- **Prometazina (Aventis Pharma, Brasil):** antagonista do receptor H1;
- **Ranitidina (Tocris, EUA):** antagonista de receptor H2;
- **Tioperamida (Sigma, EUA):** antagonista do receptor H3;
- **Histamina (Sigma, EUA):** agonista dos receptores histaminérgicos;
- **Cromoglicato de Sódio (Galena Química Farmacêutica LTDA, Brasil):** estabilizador da membrana de mastócitos;
- **Tween 80 (Tocris, EUA):** utilizado a 5% para dissolução da Loratadina;
- **Solução salina 0,9% (Aster, Brasil):** utilizada para preparo de drogas;

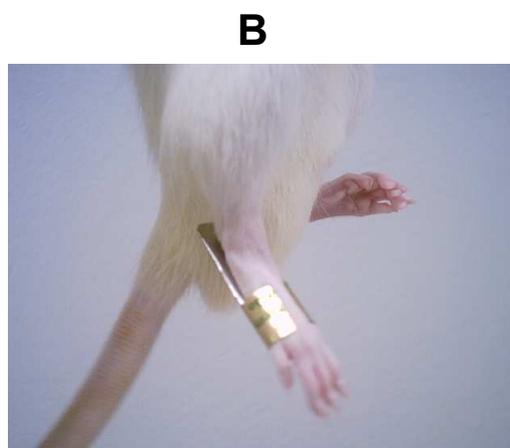
3.3. MODELO EXPERIMENTAL

3.3.1 TESTE DE INCAPACITAÇÃO ARTICULAR

O modelo de nocicepção que empregamos neste estudo foi o de incapacitação articular induzida por formalina (Martins, 2006). O sistema de registro da nocicepção articular (Tonussi e Ferreira, 1992) consiste de um aparato eletrônico que permite avaliar o estado funcional das articulações colocando-se os animais sobre um cilindro em rotação. 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), com separadores para formarem 3 trilhas sobre ele. 2) Sapatilhas metálicas (confeccionadas em folha de flandres), as quais são adaptadas às patas traseiras dos animais e conectadas, por fios de aço revestidos, à porta paralela de um microcomputador PC compatível. 3) Microcomputador. Todo o conjunto pode ser visualizado nas imagens abaixo:



A – Equipamento eletrônico para análise do TEP.



B – Sapatilha acoplada a pata do animal.

3.3.2 INDUÇÃO DE INCAPACITAÇÃO ARTICULAR POR FORMALINA

A incapacitação articular foi induzida pela injeção intra-articular de formalina (1.5%; 50 μ l). O sítio de injeção (joelho direito) foi previamente submetido à antisepsia com solução de álcool iodado. Imediatamente após a

injeção de formalina foi realizada a primeira medida da incapacitação articular (Martins, 2006).

3.3.3 AVALIAÇÃO DA INCAPACITAÇÃO ARTICULAR

Com o cilindro em rotação (3 r.p.m.), o animal colocado em sua trilha caminha objetivando permanecer no topo. Através de *software* específico, a perda de função de apoio do membro afetado, ou seja, o tempo em que a sapatilha adaptada na pata posterior direita do animal deixa de fazer contato com a superfície metálica do cilindro é registrado no computador.

Acumulando-se o tempo em que esta pata não toca o cilindro durante o tempo de observação de 60 segundos, obtemos o **tempo de elevação da pata**, ou **TEP**.

Neste modelo, o TEP de animais sem qualquer 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, oriunda da nocicepção. Em todos os procedimentos experimentais os animais são treinados a caminhar no aparelho de registro no dia anterior ao teste, quando seus valores basais são registrados, identificado nas figuras pelo valor (-5).

Durante os experimentos, a medida do TEP foi realizada a cada 5 min, durante 1 min, e por um período máximo de 1 hora. Os dados do TEP são apresentados como a média entre os valores de pelo menos seis animais.

3.3.4 AVALIAÇÃO DO EDEMA ARTICULAR

A avaliação do edema articular induzido pela formalina é realizada através da variação do diâmetro articular, de forma que dois valores são mensurados e comparados: um imediatamente antes da injeção de formalina e outro 60 min após. Para isso, os animais foram gentilmente imobilizados dentro de um cone de polietileno de maneira que fosse possível ter acesso apenas ao joelho direito, do qual foi obtida a medida do diâmetro da articulação do joelho com o auxílio de um paquímetro. Os dados são apresentados como a diferença média entre o valor obtido imediatamente antes da injeção da formalina e o valor do diâmetro articular obtidos 60 min após. (Variação do Diâmetro Articular, DA, cm).

3.3.5 AVALIAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO

Sob anestesia por halotano, os animais receberam uma injeção intravenosa (i.v; veia gengival) (De Oliveira et al., 2009) de Azul de Evans (25 mg/kg; 0,1 ml / 100 g) 30 min antes da injeção de formalina. O Azul de Evans é um corante com alta afinidade pela proteína albumina plasmática, formando um complexo corante-albumina que extravasa através da barreira endotelial lesada (Steele, 1966). Pode-se então avaliar a intensidade de extravasamento plasmático por análise da concentração de Azul de Evans no tecido pesquisado.

Uma hora após a injeção de formalina, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento de anestesia com hidrato de cloral 15% seguido de deslocamento cervical. Em seguida, foi realizada a lavagem articular com 100 µl de solução fisiológica 0,9 % com 4 µl de E.D.T.A 5%. A seguir foi feita a

coleta do líquido sinovial com auxílio de uma pipeta. O líquido sinovial foi diluído em solução fisiológica 0,9 % (1:50) e centrifugado (3000 r.p.m; 15 min) para retirada de hemácias. O sobrenadante foi utilizado para leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (630 nm). Estes valores foram expressos como a média \pm EPM ($\mu\text{g/ml}$).

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

A figura abaixo ilustra o protocolo experimental dividido em duas etapas.

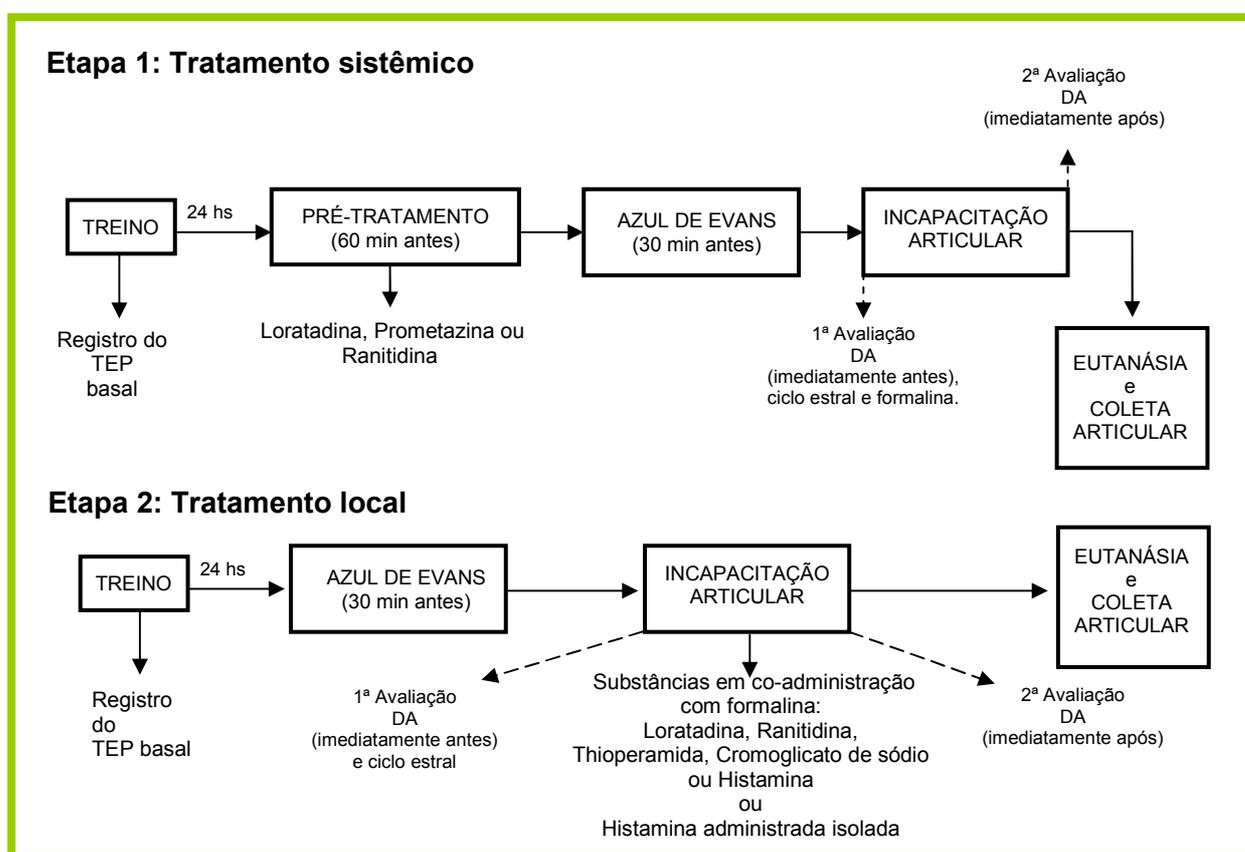


Fig. 1 – Seqüência do protocolo experimental dividido em tratamento sistêmico e local

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism versão 4 (<http://www.graphpad.com>). Os resultados da nocicepção em

cada seção estão expressos em média + - erro padrão da média (EPM) de um número (n) de 6 animais por grupo. Na primeira fase (F1 tempo 0 min) comparações entre os grupos foram feitas através da análise de variância (ANOVA) de uma via simples e quando um nível de significância de pelo menos $P < 0,5$ foi detectado, foi seguido pelo teste de Dunnet para comparações múltiplas. Na segunda fase (F2 a partir do tempo 5min) a comparação das curvas experimentais foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de uma via simples para medidas repetidas e, quando um nível de significância de pelo menos $P < 0,5$ foi detectado, foi seguido pelo teste de Dunnet para comparações múltiplas. Entretanto, quando comparamos somente dois grupos experimentais foi utilizado o teste t não-pareado e o resultado foi considerado estatístico quando um nível de significância de pelo menos $P < 0,5$ foi detectado.

A análise estatística da comparação da variação do DA, bem como o resultado da densidade óptica do EP, foi feita através da análise de variância (ANOVA) de uma via simples e, quando um nível de significância de pelo menos $P < 0,5$ foi detectado, foi seguido pelo teste de Dunnet para comparações múltiplas. Entretanto, quando comparamos somente dois grupos experimentais foi utilizado o teste t não-pareado e o resultado foi considerado estatístico quando um nível de significância de pelo menos $P < 0,5$ foi detectado.

RESULTADOS

IV- RESULTADOS

4.1 - Análise de resposta nociceptiva, edema e extravasamento plasmático com diferentes concentrações de formalina administrada intra-articular.

A etapa inicial de nossos estudos foi realizada com o intuito de aperfeiçoar o modelo experimental de incapacitação articular induzido por formalina (Martins, 2006). Para isto, foi realizada uma curva dose-resposta a partir da administração de formalina, em diferentes concentrações (0.5, 1.5, 2 e 3%), intra-articular. Paralelo a nocicepção foram avaliados a variação de edema e extravasamento plasmático induzido por este agente. Formalina nas diferentes concentrações induziu comportamento nociceptivo em padrão bifásico em relação ao grupo controle (salina) demonstrado na figura 2, com a primeira fase de resposta nociceptiva observada imediatamente após a sua administração (F1 - 0 min), seguida de um período de quiescência (5 min) e uma segunda fase de resposta nociceptiva (F2- a partir do tempo 5 min). A resposta nociceptiva da formalina é acompanhada de variação no edema (A) e extravasamento plasmático (B), demonstrado na figura 3.

As respostas foram dose-dependentes nos três parâmetros avaliados, sendo que com 3% a formalina mostrou o efeito máximo. Com base nestes resultados a concentração de 1,5% de formalina, por atingir um nível intermediário nos três parâmetros, foi tomada como padrão de indução de comportamento nociceptivo.

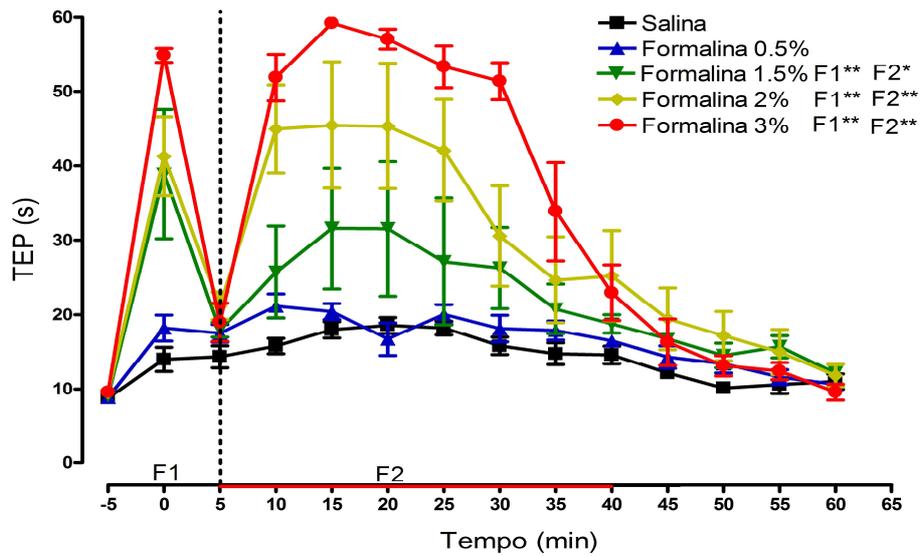


Fig.2- Efeito dose-resposta da Formalina no modelo de incapacitação articular.

Houve aumento do comportamento nociceptivo induzido pela formalina (1.5, 2 e 3%) de maneira dose dependente, em F1 e F2. Os resultados representam a média \pm EPM e * e ** representam a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0,05$ e $0,01$, respectivamente. Para análise estatística (F1- 0 min) foi utilizado ANOVA de uma via seguido do teste *Dunnet*. Para análise de (F2 intervalo de 5-40 min) foi utilizado ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguido de teste *Dunnet*. A formalina intra-articular foi aplicada no tempo 0 min. O tempo -5 min indica o valor de deambulação dos animais em estado normal. Os códigos F1 e F2 simbolizam a primeira e segunda fase do teste, respectivamente.

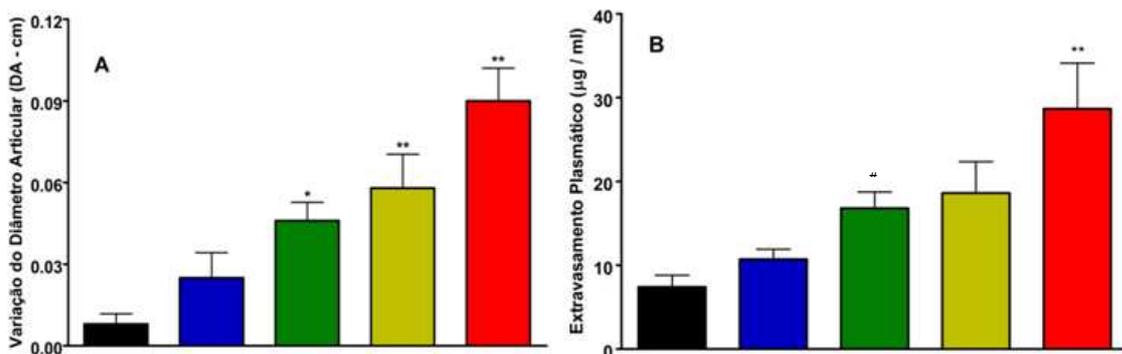


Fig.3- Efeito dose-resposta da Formalina no diâmetro articular e extravasamento plasmático. Houve aumento de diâmetro articular (A) nas concentrações de 1.5, 2 e 3% e extravasamento plasmático (B) na concentração de 1.5 e 3% de formalina em relação ao grupo controle (salina). Os resultados representam a média \pm EPM. * e ** representam a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0.05$ e $P < 0.01$, respectivamente. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*. # Representa a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0.05$. Para análise estatística foi utilizado teste t não pareado.

4.2 - Efeito da administração sistêmica de prometazina.

Com o objetivo de avaliar a participação do receptor H1 no modelo de incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático induzido por formalina foi administrado o antihistamínico (H1) prometazina (0,5; 4 e 12 mg/kg) intraperitoneal (i.p.). Prometazina na menor dose (0.5 mg/kg) nos pontos (F2 15 e 20 min), aumentou o comportamento nociceptivo. Entretanto, a maior dose (12 mg/kg) reduziu a segunda fase da segunda resposta nociceptiva (F2 5-40 min) induzido pela formalina intra-articular, como demonstrado na figura 4. Não foram observadas alterações na variação de edema (A) e extravasamento plasmático (B) em comparação ao grupo controle (formalina), como demonstrado na figura 5.

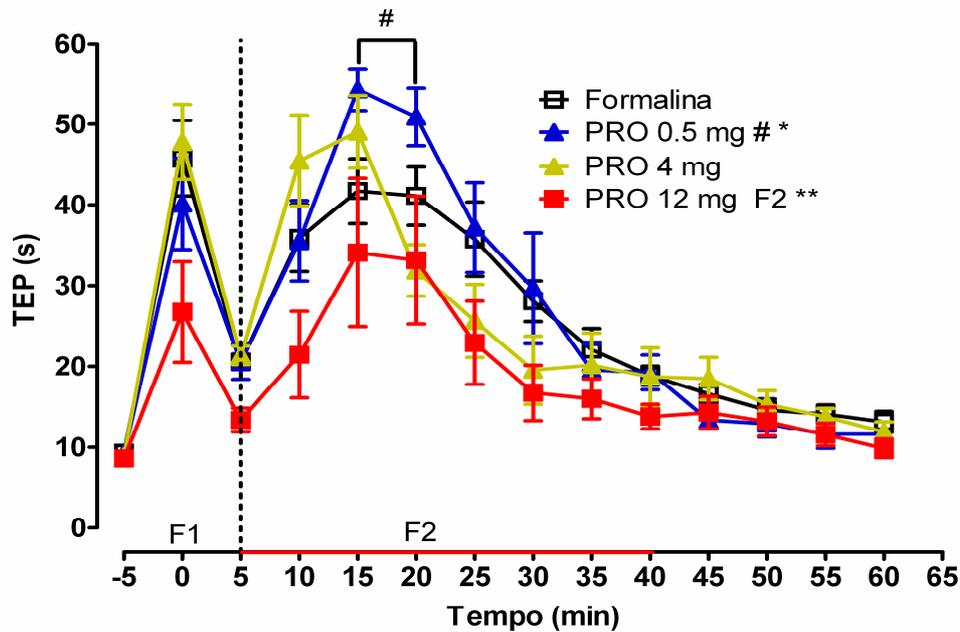


Fig.4 - Efeito da administração sistêmica de Prometazina no teste de incapacitação articular. A menor dose (0.5 mg/kg) e a maior dose (12 mg/kg) foi capaz de aumentar e diminuir o comportamento nociceptivo induzido por formalina na segunda fase (F2) comparado ao grupo controle, respectivamente. Os resultados representam a média \pm EPM e ** indica a diferença estatística significante ao nível de $P < 0,01$. Para (F2- 5-40 min) os resultados foram analisados por ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnet*. # Representa a diferença estatística significante ao nível de $P < 0,05$ nos pontos (F2 15 e 20 min). Para análise estatística foi utilizado teste t não pareado.

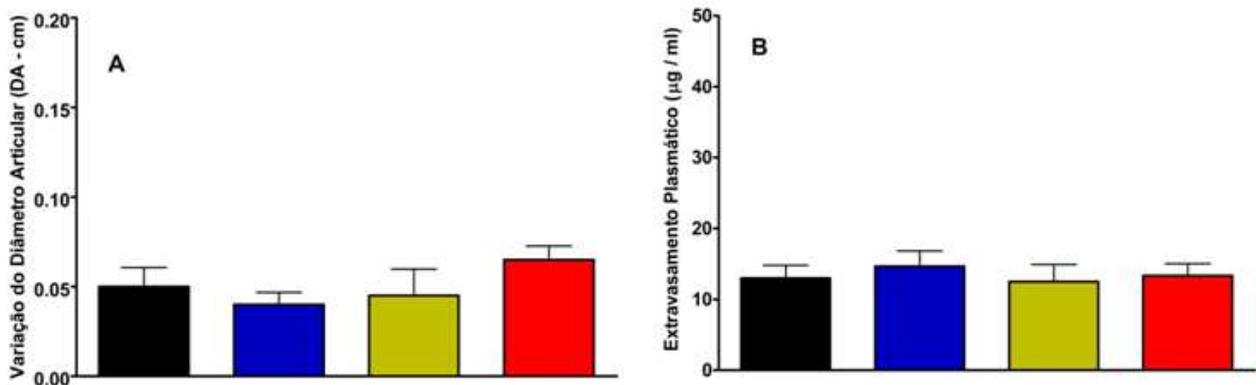


Fig.5 - Efeito da administração sistêmica de Prometazina na variação do edema articular e extravasamento plasmático. Nenhuma dose de prometazina foi capaz de alterar o diâmetro articular (A) e o extravasamento plasmático (B) comparado ao grupo controle (formalina). Os resultados representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*

4.3 – Efeito da administração sistêmica de loratadina.

Com o objetivo de avaliar a participação do receptor H1 periférico no modelo de incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático induzido por formalina foi administrado o antihistamínico (H1) loratadina (2,5; e 10 mg/kg) intra-peritoneal (i.p.). A dose de 10 mg/kg potencializou o comportamento nociceptivo na segunda fase da resposta nociceptiva (F2 5-40 min) induzida pela administração de formalina e veículo (Tween 80 1% i.p.), como demonstrado na figura 6. Não foram observadas alterações na variação de edema (A) e extravasamento plasmático (B) em comparação ao grupo controle (formalina), como demonstrado na figura 7.

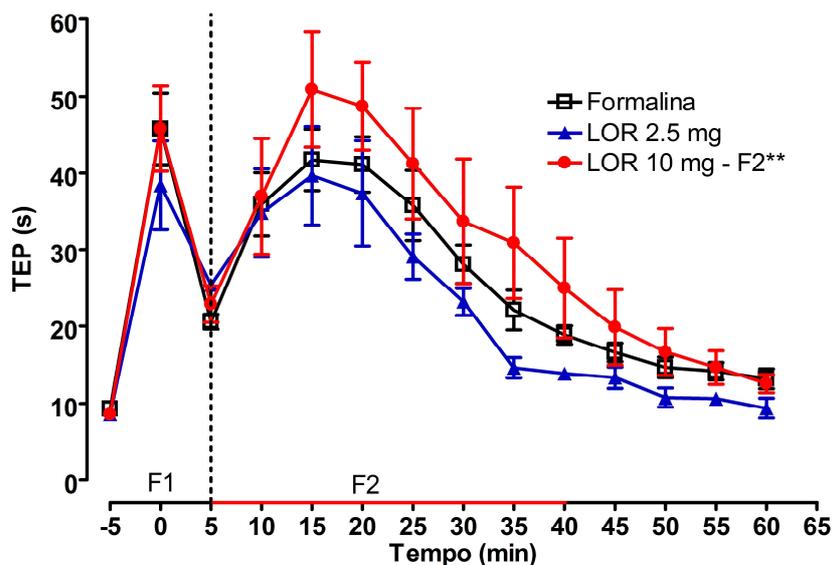


Fig.6- Efeito da administração sistêmica de Loratadina no teste de incapacitação articular. A maior dose (10 mg/kg) foi capaz de promover o aumento do comportamento nociceptivo na F2 do teste de incapacitação articular comparado ao grupo controle (Tween 80 com formalina). Os resultados representam a média \pm EPM e ** indica a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0.01$. Para (F2- 5-40 min) análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnet*.

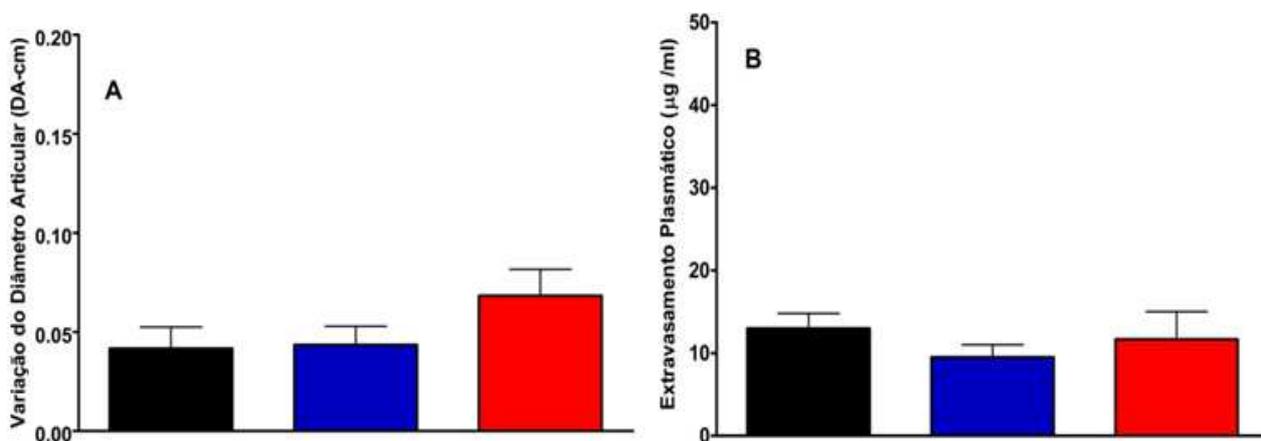


Fig.7 - Efeito da administração sistêmica de Loratadina na variação do edema articular e extravasamento plasmático. Nenhuma dose foi capaz de alterar o diâmetro articular (A) em relação ao grupo controle (Tween 80 com formalina). Não houve diferença estatística entre as doses de histamina no extravasamento plasmático (B) em relação ao grupo controle (formalina). Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

4.4- Efeito da administração local de loratadina intra-articular.

Com o objetivo de avaliar a participação do receptor H1 articular no modelo de incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático induzido por formalina foi administrado o anti-histamínico (H1) loratadina (2,1 e 20 pmol) intra-articular (i.a.). A escolha das doses foi baseada através da verificação da constante de inibição (K_i) do receptor H1 pela loratadina (Ahn e Barnett, 1986).

Somente a maior dose (20 pmol/i.a.) de loratadina co-administrada com formalina intra-articular promoveu comportamento hipernociceptivo, como demonstrado na figura 8, na segunda fase da resposta nociceptiva (F2 5-40 min). Não foram observadas alterações na variação de edema (A). Entretanto, a maior dose de loratadina promoveu diminuição do extravasamento plasmático (B) comparado ao grupo controle (formalina) como demonstrado na figura 9.

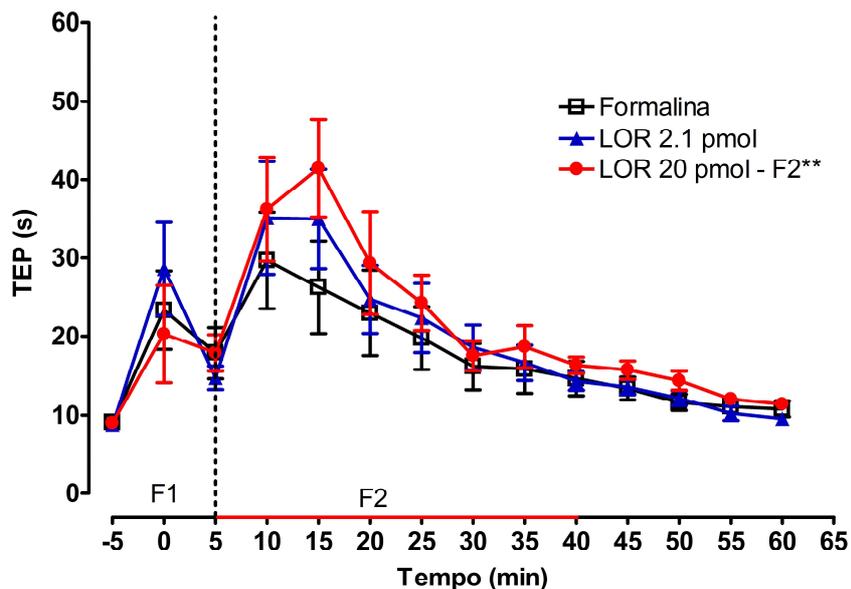


Fig.8 - Efeito da administração local de Loratadina no teste de incapacitação articular. (TEP). Somente a maior dose (20 pmol/i.a.) de loratadina foi capaz de aumentar o comportamento nociceptivo na (F2) comparado ao grupo controle (formalina). Os resultados representam a média \pm EPM e ** indica a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0,01$. Para (F2- 5-40 min) os resultados foram analisados por ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnet*.

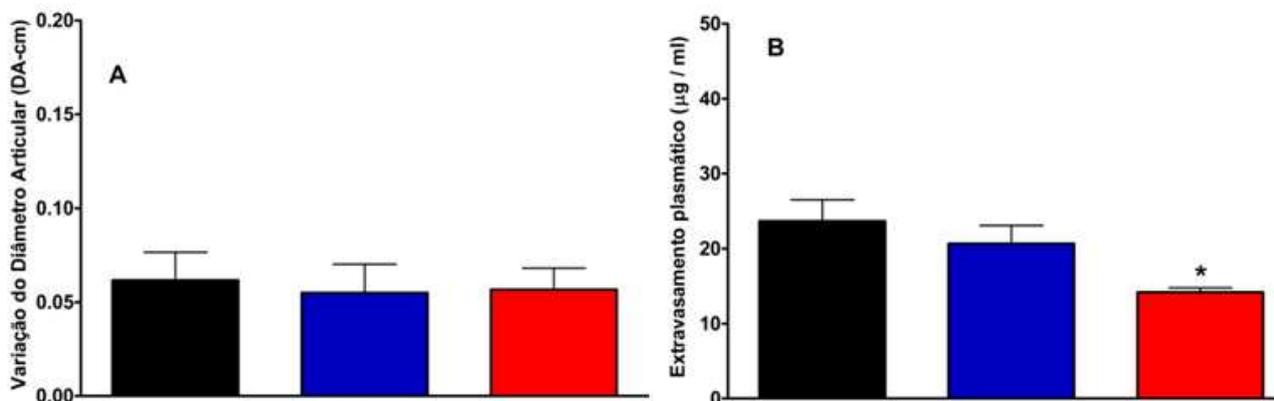


Fig.9 - Efeito da administração local de Loratadina na variação do edema articular e extravasamento plasmático. Nenhuma dose de loratadina foi capaz de alterar o diâmetro articular (**A**) comparado ao grupo controle (formalina). A maior dose (20 pmol/i.a.) de loratadina promoveu diminuição do extravasamento plasmático (**B**) comparado ao grupo controle (formalina). Os resultados representam a média \pm EPM e * indica a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0,05$. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

4.5- Efeito da administração local de tioperamida intra-articular.

Com o objetivo de avaliar a participação do receptor H3 articular no modelo de incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático induzido por formalina foi administrado o antihistamínico (H3) tioperamida (0,4; 4 e 40 nmol) intra-articular (i.a.). A escolha das doses foi baseada através da verificação da constante de inibição (K_i) do receptor H3 pela tioperamida (Kuriyama, 1992; Hill, 1997).

Somente a menor dose (0.4 pmol/i.a.) de tioperamida co-administrada com formalina intra-articular promoveu hipernocicepção na primeira fase (F1 0 min) da resposta nociceptiva. Além disso, somente as maiores doses (4 e 40 pmol/i.a.) de tioperamida promoveram comportamento hipernociceptivo na segunda fase da resposta nociceptiva (F2 5-40 min) como demonstrado na figura 10. Não foram observadas alterações na variação de edema (A). Entretanto, a maior dose (40 pmol/i.a.) de tioperamida promoveu diminuição do extravasamento plasmático (B) quando comparado ao grupo controle (formalina) como demonstrado na figura 11.

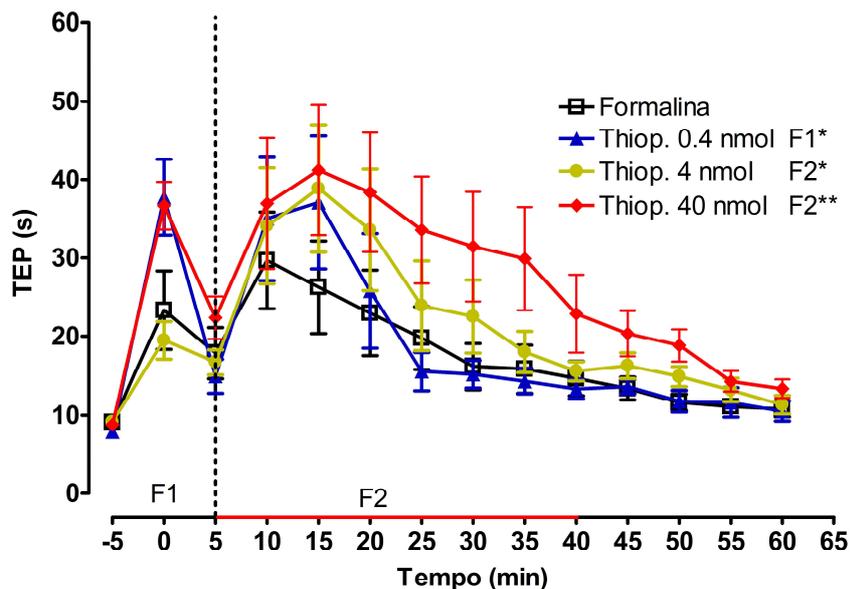


Fig.10 - Efeito da administração local de Tioperamida no teste de incapacitação articular. (TEP). Curva dose-resposta do comportamento nociceptivo a partir da administração local de diferentes doses (0,4; 4 e 40 nmol) de tioperamida co-injetada com formalina intra-articular. Os resultados são representados pela média \pm EPM onde * e ** indicam a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0.05$ e $P < 0.01$, respectivamente. Para (F1- 0 min) os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*. Para (F2- 5-40 min) os resultados foram analisados por ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnet*.

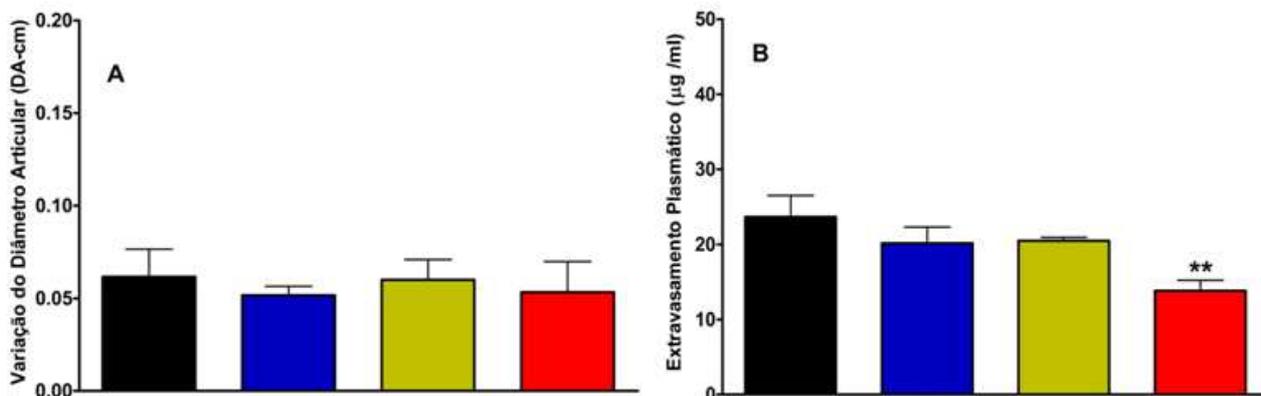


Fig.11 - Efeito da administração local de Tioperamida na variação do edema articular e extravasamento plasmático. Nenhuma dose de tioperamida foi capaz de alterar o diâmetro articular (A) comparado ao grupo controle (formalina). A maior dose de tioperamida (40 nmol/i.a.) diminuiu o extravasamento plasmático (B) em relação ao grupo controle (formalina). Os resultados representam a média \pm EPM e ** indica a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0.01$. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

4.6 - Efeito da administração local de histamina sozinha intra-articular.

Com o objetivo de avaliar a participação da histamina no modelo de incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático foram administrados diferentes concentrações (0,2; 20; 200 e 20.000 nmol) de histamina intra-articular (i.a.). Vale ressaltar que a administração de histamina sozinha intra-articular não apresentou perfil bi-fásico de comportamento nociceptivo como anteriormente observado com a administração de formalina intra-articular, sendo então a análise estatística realizada a partir do tempo 0 min.

Somente as maiores doses (200 e 20.000 nmol/i.a.) de histamina promoveram nocicepção no modelo de incapacitação articular como demonstrado na figura 12. Estas mesmas concentrações de histamina também promoveram alterações na variação de edema (A), entretanto, nenhuma dose de histamina sozinha promoveu alteração no extravasamento plasmático (B) quando comparado ao grupo controle (salina) como demonstrado na figura 13.

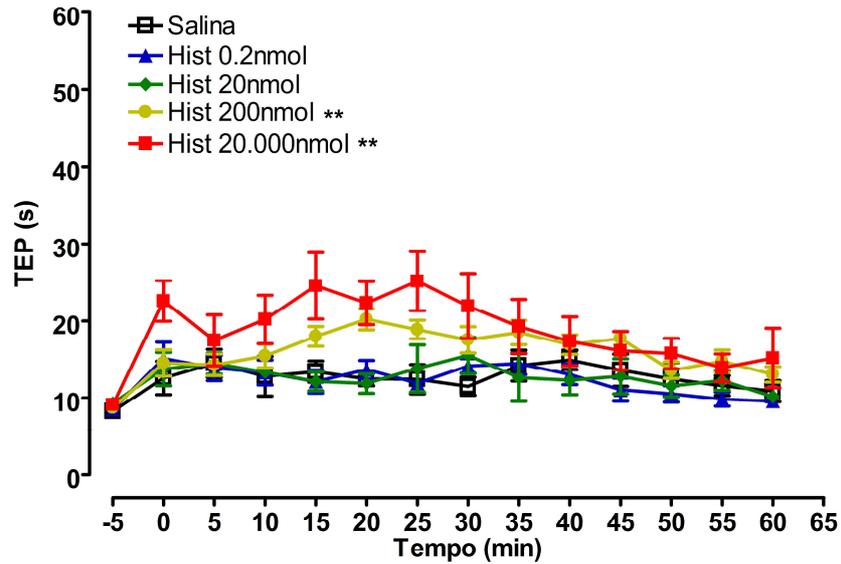


Fig.12 - Efeito da administração local de Histamina no teste de incapacitação articular (TEP). Efeito das maiores doses de histamina (200 e 20.000 nmol/i.a.) no comportamento nociceptivo comparado ao grupo controle (salina). Os resultados representam a média \pm EPM e ** indica a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0.01$. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnet* no intervalo de 0-60 min.

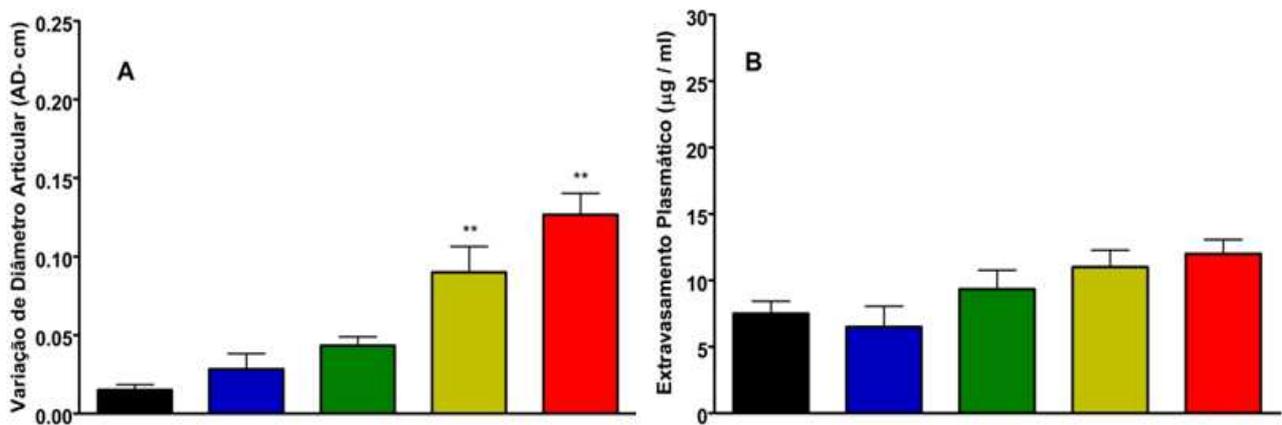


Fig.13 - Efeito da Histamina na variação do edema articular e extravasamento plasmático. Efeito das maiores doses de histamina (200 e 20.000 nmol/i.a.) no diâmetro articular (A) em relação ao grupo controle (salina). Não houve diferença estatística entre as doses de histamina no extravasamento plasmático (B) em relação ao grupo controle (salina). Os resultados representam a média \pm EPM e ** indica a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0.01$. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

4.7 - Efeito da administração local de histamina co-administrada com formalina.

Com o objetivo de avaliar a participação da histamina articular no modelo de incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático induzido por formalina foi administrada histamina em diferentes concentrações (0,2; 20; 200 e 20.000 nmol) intra-articular (i.a.).

Somente a maior dose (20.000 nmol/i.a.) de histamina promoveu hiponocicepção na primeira fase (F1 0 min) da resposta nociceptiva. Entretanto, as menores doses (0.2 e 20 nmol/i.a.) de histamina promoveram hiponocicepção na segunda fase (F2 5-30 min) da resposta nociceptiva induzida por formalina como demonstrado na figura 14.

A maior dose (20.000 nmol/i.a.) de histamina também promoveu alteração na variação de edema (A), entretanto, nenhuma dose de histamina co-administrada com formalina promoveu alteração no extravasamento plasmático (B) quando comparado ao grupo controle (formalina) como demonstrado na figura 15.

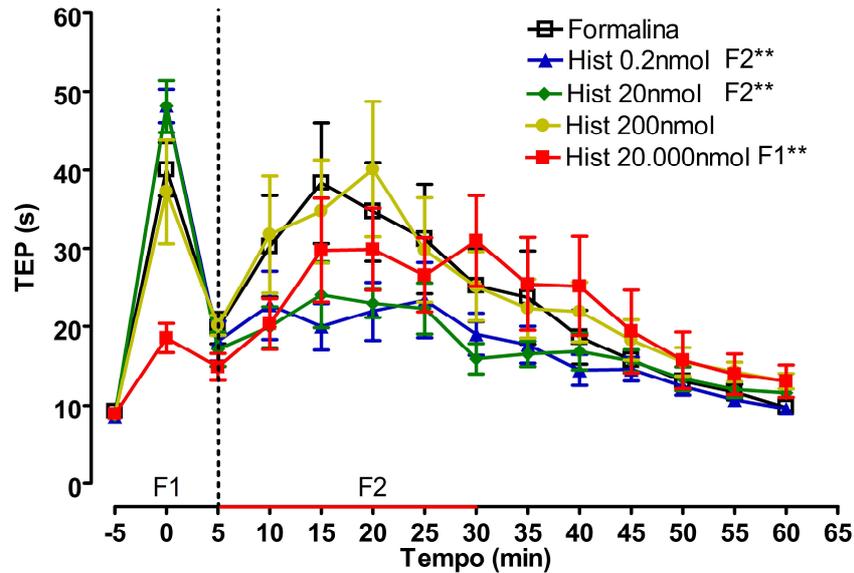


Fig.14 - Efeito da co-administração de Histamina com formalina no teste de incapacitação articular (TEP). Efeito hiponociceptivo das menores e maior dose de histamina (0,2; 20 e 20.000 nmol/i.a.) no comportamento nociceptivo (F2 5-30 min e F1 0 min), respectivamente, comparado ao grupo controle (formalina). Os resultados representam a média \pm EPM e ** indica a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0,01$. Para (F1- 0 min) os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*. Para (F2- 5-30 min) os resultados foram analisados por ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnet*.

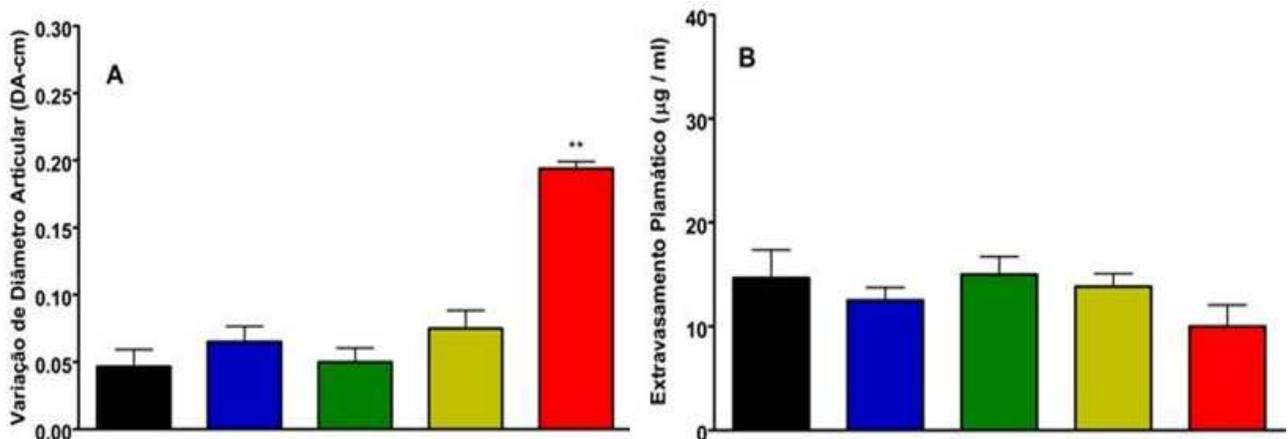


Fig.15 - Efeito da co-administração de Histamina na variação do edema articular e extravasamento plasmático. Efeito da maior dose de histamina (20.000 nmol/i.a.) no diâmetro articular (A) em relação ao grupo controle (formalina). Não houve diferença estatística entre as doses de histamina no extravasamento plasmático (B) em relação ao grupo controle (formalina). Os resultados representam a média \pm EPM e ** indica a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0.01$. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

4.8 - Efeito da administração local de cromoglicato de sódio sozinho ou com histamina, co-administrado com formalina intra-articular.

Com o objetivo de avaliar a participação da histamina dos mastócitos articulares no modelo de incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático induzido por formalina foi administrado cromoglicato de sódio em uma única e alta dose (1,6 mg) sozinho e co-administrado com histamina (20 nmol) intra-articular (i.a.).

Cromoglicato de sódio sozinho promoveu hiponocicepção na segunda fase (F2 5-30 min) da resposta nociceptiva induzida por formalina intra-articular. Entretanto, histamina (20 nmol) quando co-administrado com cromoglicato de sódio (1,6 mg) não alterou o comportamento nociceptivo da segunda fase (F2 5-30 min) induzido por cromoglicato de sódio sozinho e formalina intra-articular como demonstrado na figura 16.

Nem cromoglicato de sódio sozinho (1,6 mg), tampouco co-administrado com histamina (20 nmol) modificaram a variação de edema (A) e extravasamento plasmático (B) induzido por formalina intra-articular como demonstrado na figura 17.

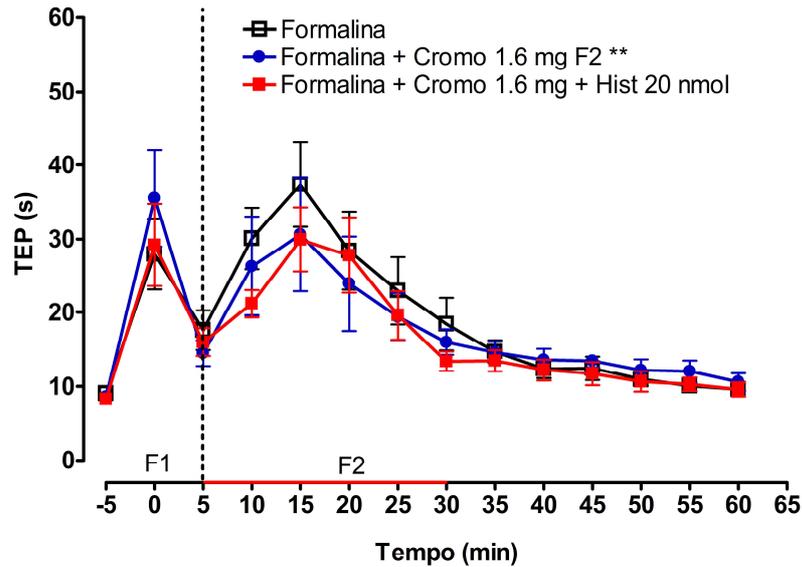


Fig.16 - Efeito da administração de Cromoglicato de Sódio sozinho ou com histamina no teste de incapacitação articular (TEP) induzido por formalina. Os resultados representam a média \pm EPM e ** indica a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0,01$ entre o grupo Formalina + Cromo 1.6 comparado ao grupo Formalina. Não houve diferença estatística entre Formalina + Cromo 1,6 mg + Hist 20 nmol comparado ao grupo Formalina + Cromo 1.6 . Para (F2- 5-30 min) os resultados foram analisados por teste t não-pareado.

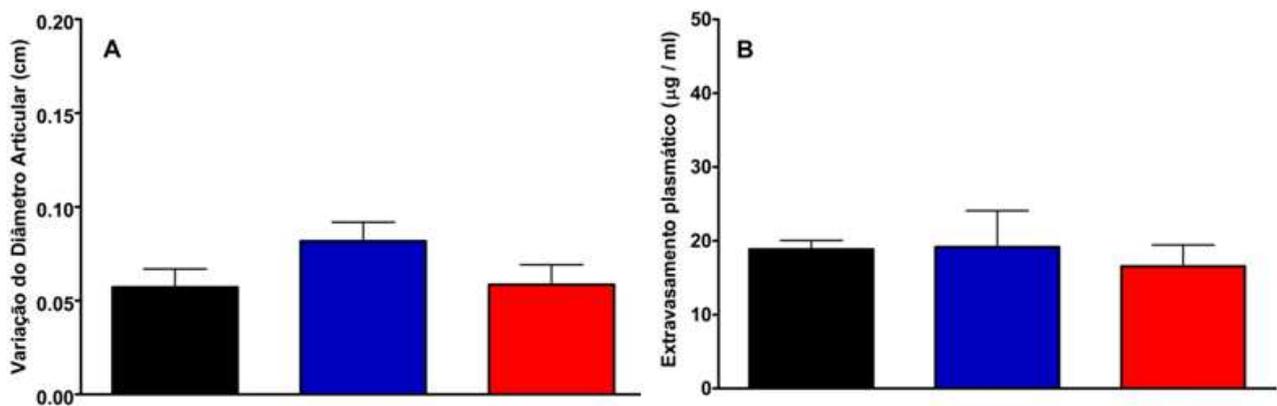


Fig.17 - Efeito da co-administração de Cromoglicato de Sódio sozinho ou com histamina na variação do edema articular e extravasamento plasmático induzido por formalina intra-articular. Não houve diferença estatística entre grupo Formalina + Cromo 1.6 comparado ao grupo Formalina e Formalina + Cromo 1,6 mg + Hist 20 nmol comparado ao grupo Formalina + Cromo 1.6 na variação de diâmetro articular (A) e extravasamento plasmático (B). Os resultados foram analisados por teste t não-pareado.

4.9 - Efeito da administração sistêmica de loratadina sozinha e com cromoglicato de sódio sozinho ou com histamina local, co-administrado com formalina intra-articular.

Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores H1, mastócitos e histamina articular no modelo de incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático induzido por formalina foi administrado loratadina (2.5 mg/kg) sozinha sistêmica ou administrada com cromoglicato de sódio sozinho, em uma única e alta dose (1,6 mg), ou com histamina (20 nmol) intra-articular (i.a.).

Loratadina sozinha administrada por via sistêmica promoveu hipernocicepção na segunda fase (F2 15-40 min) da resposta nociceptiva induzida por formalina intra-articular. Loratadina administrada por via sistêmica com cromoglicato de sódio administrado por via intra-articular, não causou qualquer modificação no comportamento nociceptivo na segunda fase (F2 15-40 min). Entretanto, nos pontos (20 e 25 min) da segunda fase (F2), loratadina 2,5 mg/kg + Cromo 1,6 mg/i.a (31,09 \pm 6,42 e 28,99 \pm 3,96) foi hiponociceptiva comparado ao grupo loratadina 2,5 mg/kg (42,26 \pm 7,73 e 40,03 \pm 6,92). A co-administração de histamina com cromoglicato de sódio não promoveu alteração do comportamento nociceptivo como demonstrado na figura 18.

Nem loratadina sozinha administrada, tampouco com cromoglicato de sódio administrado intra-articular modificaram a variação de edema (A) e extravasamento plasmático (B) induzido por formalina intra-articular como demonstrado na figura 19.

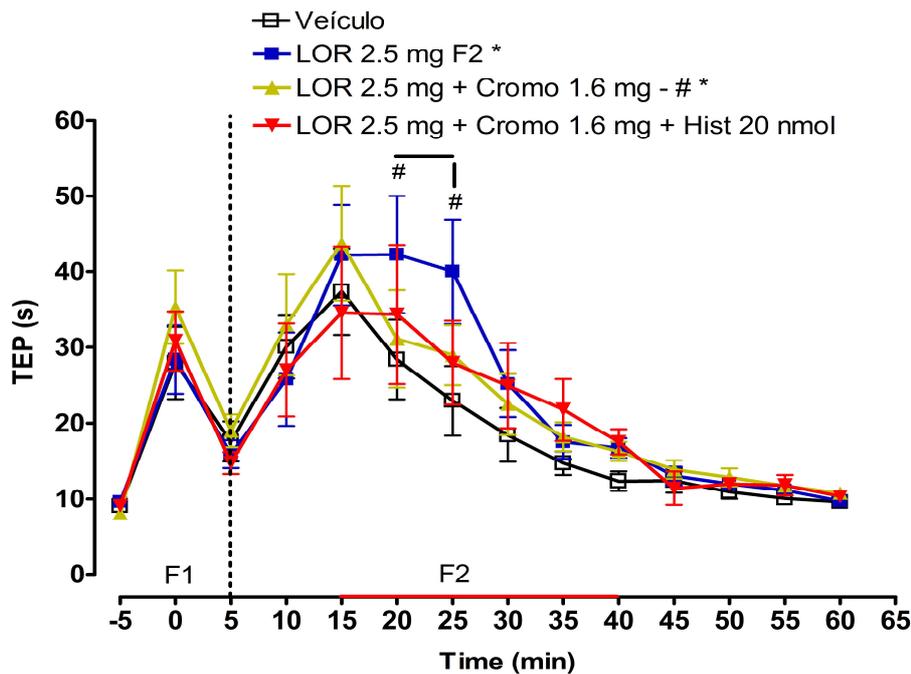


Fig.18- Efeito da administração sistêmica de Loratadina sozinha e com administração de Cromoglicato de Sódio sozinha ou com Histamina local no teste de incapacitação articular (TEP) induzido por formalina. Os resultados representam a média \pm EPM e * indica a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0,05$ entre o grupo Loratadina 2,5 mg/kg comparado ao grupo Veículo (tween 80) (F2 15-40). # representa significância nos pontos 20 e 25 min de F2 entre loratadina 2,5 mg/kg + Cromo 1,6 mg comparado ao grupo Loratadina 2,5 mg/kg. Os resultados foram analisados por teste t não-pareado.

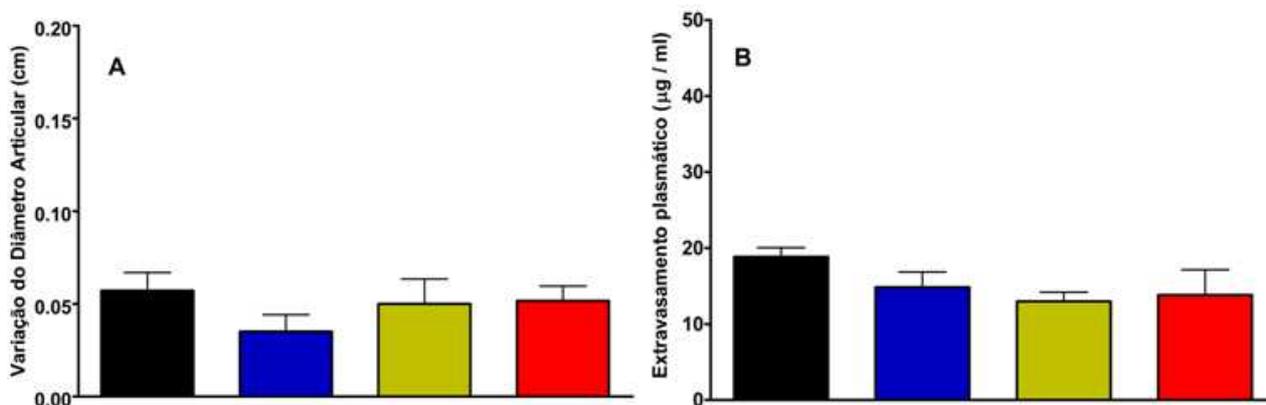


Fig. 19- Efeito da administração sistêmica de Loratadina sozinha e com administração de Cromoglicato de Sódio sozinha ou com histamina local na variação do edema articular e extravasamento plasmático induzido por formalina. Não houve diferença estatística entre os grupos na variação do diâmetro articular (A) e extravasamento plasmático (B) induzido por formalina. Os resultados foram analisados por teste t pareado.

4.10 - Efeito da administração sistêmica de ranitidina.

Com o objetivo de avaliar a participação do receptor H₂ periférico no modelo de incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático induzido por formalina foi administrado o anti-histamínico (H₂) ranitidina (2,5; e 10 mg/kg) intra-peritoneal (i.p.). A dose de 10 mg/kg promoveu comportamento hipernociceptivo, como demonstrado na Figura 20, na segunda fase da resposta nociceptiva (F2 5-40 min) induzida pela administração de formalina. Não foram observadas alterações na variação de edema (A) e extravasamento plasmático (B) em comparação ao grupo controle (formalina 1,5 %) como demonstrado na figura 21.

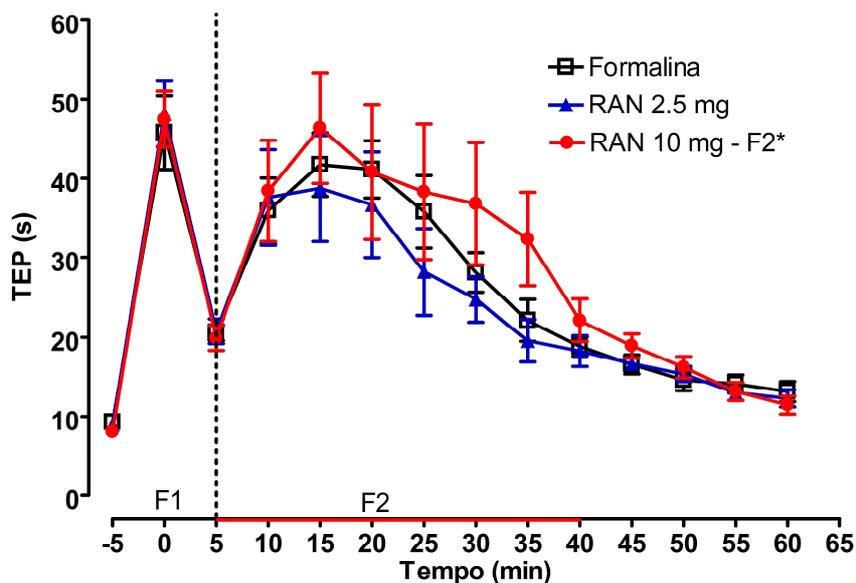


Fig.20 - Efeito da administração sistêmica de Ranitidina no teste de incapacitação articular. (TEP). Os resultados representam a média \pm EPM e * indica a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0.05$. Para (F2- 5-40 min) os resultados foram analisados por ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnet*.

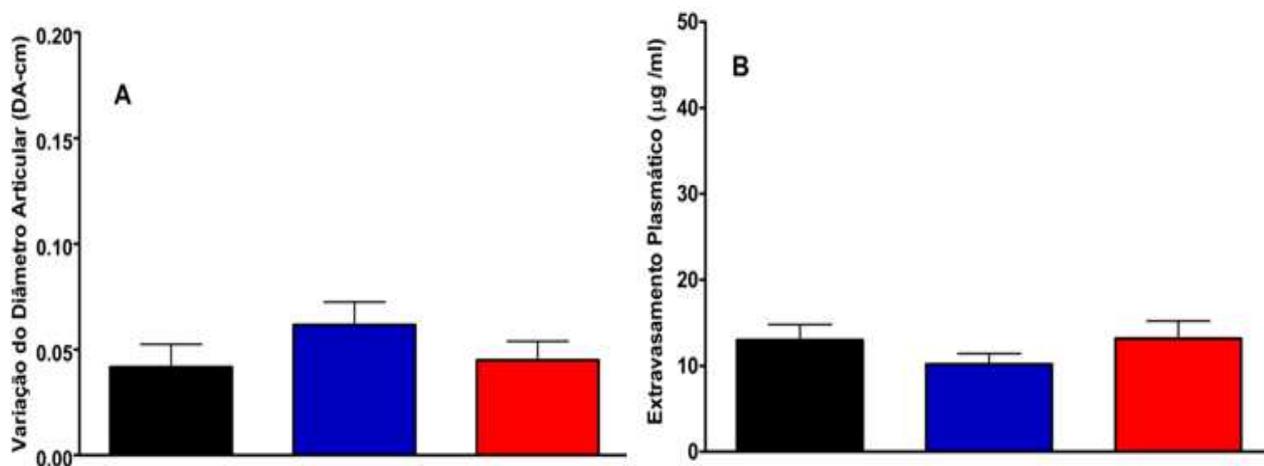


Fig.21 - Efeito da administração sistêmica de Ranitidina na variação do edema articular e extravasamento plasmático. Nenhuma dose de ranitidina foi capaz de alterar o diâmetro articular (A) comparado ao grupo controle (formalina). Não houve diferença estatística entre as doses de histamina no extravasamento plasmático (B) em relação ao grupo controle (formalina). Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

4.11 - Efeito da administração local de ranitidina intra-articular.

Com o objetivo de avaliar a participação do receptor H2 articular no modelo de incapacitação articular, edema e extravasamento plasmático induzido por formalina foi administrado o anti-histamínico (H2) ranitidina (2 e 17 pmol) intra-articular (i.a.). A escolha das doses foi baseada através da verificação da constante de inibição (K_i) do receptor H2 pela ranitidina (Agut, 1997).

Ambas as doses (2 e 17 pmol/i.a.) de ranitidina co-administrada com formalina intra-articular promoveu hipernocicepção na segunda fase (F2 5-40 min) da resposta nociceptiva, como demonstrado na figura 22. Não foram observadas alterações na variação de edema (A) e extravasamento de plasma (B), quando comparado ao grupo controle (formalina) como demonstrado na figura 23.

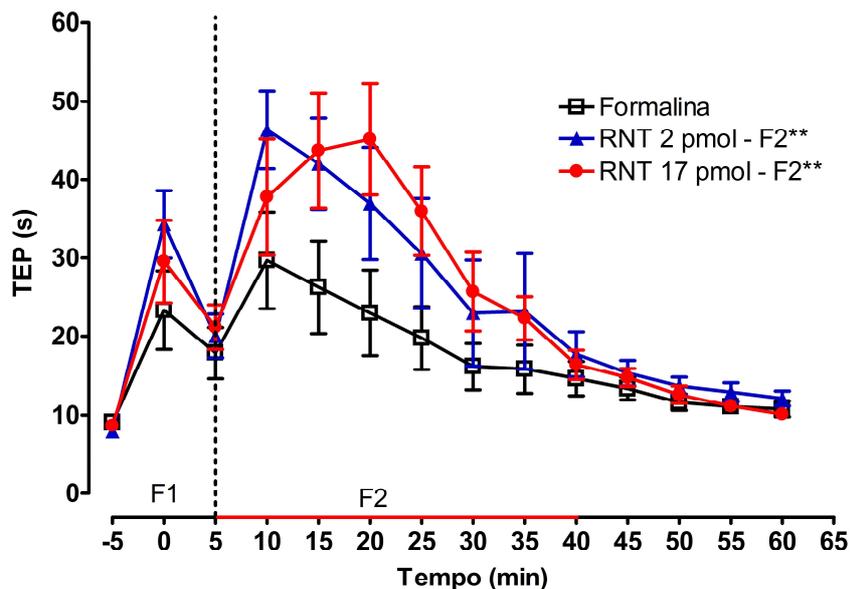


Fig.22 - Efeito da administração local de Ranitidina no teste de incapacitação articular. (TEP). Todas as doses de ranitidina (2 e 17 pmol/i.a.) foram capazes de aumentar o comportamento nociceptivo na (F2) comparado ao grupo controle (formalina). Os resultados representam a média \pm EPM e ** indica a diferença estatística significativa ao nível de $P < 0.01$. Para (F2- 5-40 min) os resultados foram analisados por ANOVA de uma via para medidas repetidas seguido de teste *Dunnet*.

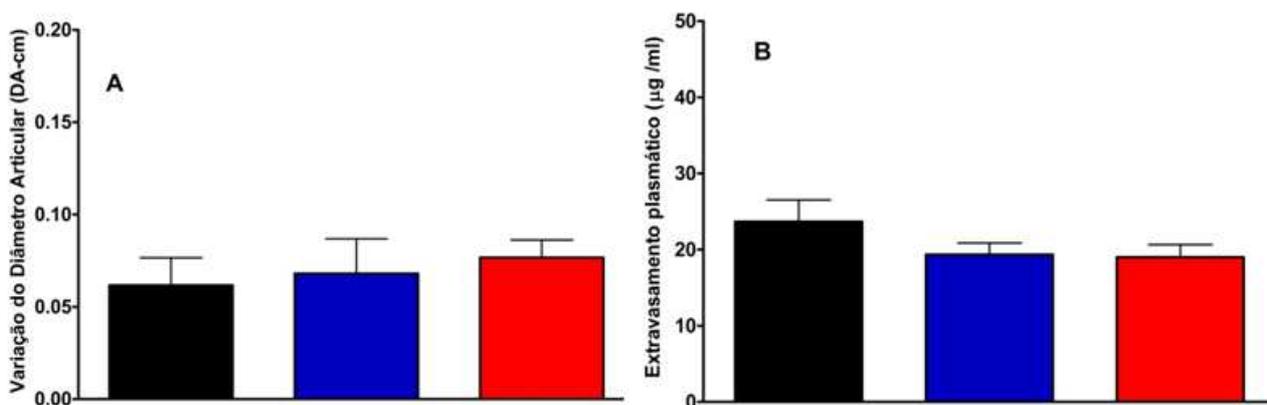


Fig.23 - Efeito da administração local de Ranitidina na variação do edema articular e extravasamento plasmático. Nenhuma dose de ranitidina foi capaz de alterar o diâmetro articular (A) comparado ao grupo controle (formalina). Não houve diferença estatística entre as doses de histamina no extravasamento plasmático (B) em relação ao grupo controle (formalina). Para análise estatística foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste *Dunnet*.

DISCUSSÃO

V- DISCUSSÃO

No presente trabalho verificamos que enquanto anti-histamínicos H1 permeantes da barreira hemato-encefálica (BHE) podem produzir hiponocicepção, antagonistas periféricos de receptores H1 e H2 aumentaram a resposta nocifensiva de ratos que receberam injeção intra-articular de formalina. Estes resultados sugerem um efeito hiponociceptivo local para a histamina, que contraria a noção geral de que a histamina liberada nas lesões teciduais tem papel na promoção da dor (Baron, 2001; Mobarakeh et al., 2000, 2002; Yoshida et al., 2005). No entanto, até hoje não existem evidências claras da participação da histamina periférica na dor inflamatória, ao contrário de sua reconhecida ação pruritogênica em tecido cutâneo de humanos (Schmelz, 1997; Ikoma et al., 2006).

Uma vez que em nossos resultados os antihistamínicos periféricos somente causaram aumento da nocicepção, o efeito hiponociceptivo da prometazina por ser permeante da BHE, deve ser resultante de sua conhecida ação central (Rumore et al., 1995; Akihiko et al., 2003). Nossos resultados confirmam e aprofundam observações anteriores de nosso grupo, quando observamos que uma dose sistêmica de loratadina havia aumentado a incapacitação articular induzida pela formalina em ratos (Martins et al., 2006). Naquele momento concluímos que o extravasamento plasmático induzido pela formalina no espaço sinovial, processo que em grande parte poderia ser mediado pela liberação local de histamina (Yoshida et al., 2005), poderia causar a diluição relativa da concentração aplicada de formalina, reduzindo assim a intensidade de nocicepção ocasionada por este agente. Neste contexto, a aplicação de um fármaco antihistamínico H1 periférico como a

loratadina, impediria parte deste extravasamento plasmático ocasionando assim a permanência de uma concentração mais elevada de formalina na articulação, aumentando a nocicepção. Esta hipótese foi testada neste estudo, entretanto, observamos que o tratamento sistêmico com loratadina em concentrações que inibam os efeitos da histamina em animais não foi capaz de alterar o extravasamento plasmático. É de comum conhecimento que antihistamínicos de segunda geração como loratadina e ranitidina pouco atravessam a BHE ao contrário de antihistamínicos de primeira geração como prometazina e meclisina. Entretanto, foi observado que a administração de loratadina (10 mg/kg) não alterou os testes comportamentais e cognitivos, mas, inibiu o “flare” elicitado por histamina na pele de humanos (Hindmarch, 2001). Em estudos prévios do nosso laboratório (Martins et al., 2006) o antihistamínico H1, meclisina, mostrou efeito hipernociceptivo em doses baixas e hiponociceptivo em doses altas. Corroborando com estes achados, Paalzow (1985) também relata o efeito hipo e hipernociceptivo da prometazina, relacionado à dose. Em nossos resultados foi observado o efeito hiper e hiponociceptivo da prometazina na menor e maior dose administrada, respectivamente. Por estes fatos descritos acreditamos na hipótese de um mecanismo de ação periférico da loratadina administrada de forma sistêmica. Esta hipótese é reforçada pelo fato de termos observado que a administração sistêmica de loratadina somente promoveu efeito hipernociceptivo. Além disso, a administração local de loratadina mostrou efeito hipernociceptivo, porém, associado à diminuição de extravasamento plasmático. Isto poderia sugerir que o efeito hipernociceptivo da loratadina administrada por via intra-articular estaria contribuindo para diminuir a diluição da concentração da formalina,

promovendo o aumento da nocicepção. Entretanto, na administração sistêmica, a loratadina não alterou o extravasamento de plasmático na sinóvia, sugerindo que o efeito da loratadina na nocicepção não está diretamente vinculado a efeitos vasculares. Além disto, nossos resultados mostraram que em baixas doses histamina co-administrada com formalina promoveu efeito hiponociceptivo, também sem alterar o extravasamento plasmático.

No tecido periférico os receptores H1 e H3 estão localizados em fibras nervosas sensoriais (Kashiba, 2001; Akihiho, 2003) onde a histamina promove efeitos excitatórios nos aferentes primários em H1 (Ständer, 2003) e ao contrário, possivelmente efeitos inibitórios em H3 (Ohkubo, 1995). Os receptores H2 e H4 estão localizados na membrana de mastócitos (Hill, 1997; Oda, 2000). Nossos resultados sugerem que o efeito hipernociceptivo ocasionado pela administração local de loratadina, antagonista H1 e também pelo antagonista do receptor H3, tioperamida em doses intermediárias, ocorra pelo bloqueio dos receptores H1 e H3 nas fibras aferentes, impossibilitando a ação modulatória negativa da histamina liberada dos mastócitos na nocicepção no tecido articular, além da própria ação da serotonina que possui sua conhecida ação hipernociceptiva em tecidos superficiais (Sawynok, 1997) como em tecidos profundos (Senba, 2005). Segundo Ohkubo (1995), a histamina, via receptor H3, inibe a liberação de substância P, que possui conhecida ação sensibilizadora na degranulação de mastócitos sendo também facilitadora para extravasamento de plasma. Partindo disso, ao atuar nestes receptores a tioperamida deveria promover o aumento do extravasamento de plasma em todas as doses. Porém, em nossos resultados a dose intermediária de tioperamida aumentou a nocicepção sem alterar o extravasamento de plasma,

sugerindo que o efeito inibitório promovido pelo receptor H3 em fibras parece estar desvinculado ao aumento do extravasamento induzido pela liberação de substância P. Entretanto, a tioperamida além de antagonista dos receptores H3, é antagonista H4 (Oda, 2001), localizados em células do sistema imune (Oda, 2000). Por isso, acreditamos que o aumento da concentração de tioperamida administrada intra-articular, não somente esteja atuando sobre os receptores H3 localizado em fibras nervosas, promovendo hipernocicepção, mas também sobre os receptores H4, possivelmente em mastócitos diminuindo a liberação do seu conteúdo, promovendo a diminuição do extravasamento plasmático.

O efeito hipernociceptivo demonstrado pela loratadina com formalina intra-articular contraria muitos trabalhos da literatura que mostram a participação hiponociceptiva de antihistamínicos H1. Entretanto, este resultado é apoiado por dois estudos clínicos em que alguns pacientes que receberam loratadina, reportaram aumento de dor em algumas circunstâncias (Scharf e Berkowitz, 2007; Antonijuan et al., 2007).

É visto que no fluído sinovial da articulação de joelhos de humanos é encontrada histamina na faixa que varia entre (0.01 -10 ng), sendo que esta concentração administrada na articulação fêmuro-tibial de camundongos não mostrou qualquer formação de sinovite, além de não modificar o processo inflamatório estimulado por *high mobility group (box chromosomal) B1 protein (HMGB1)* por peptideoglicano (Adlesic, 2007). Nossos resultados estão de acordo com estes achados, pois as menores doses de histamina administradas sozinhas na articulação não promoveram comportamento nociceptivo, tampouco alterações no edema e no extravasamento plasmático. Entretanto,

foi observado que histamina (250 µg) administrada na articulação temporomandibular (ATM) elicitou comportamento nociceptivo (Ting et al., 2007). Em nossos estudos utilizamos uma faixa similar de dose de histamina sozinha (200 nmol) e também observamos comportamento nociceptivo e edema. Porém, o grande achado do nosso trabalho foi verificar que a histamina, em menores doses, co-administrada com formalina diminuiu o comportamento nociceptivo elicitado por este agente irritante, sem promover alterações no edema e extravasamento plasmático.

Schmelz (1997) descreveu uma população de fibras C específicas, de altíssimo limiar mecânico (nociceptores silenciosos), que geram potenciais de ação à histamina, de forma robusta e prolongada. Assim como tem sido demonstrado vias especializadas para dor, foi demonstrada (Andrew e Craig, 2001) uma classe especializada de neurônios no corno dorsal da medula projetando-se para o tálamo que respondem fortemente à histamina administrada na pele por iontoforese. Isto sugere existir uma modalidade anatomicamente exclusiva de vias de projeção especializada para prurido. Esta via pruritoceptiva seria composta por neurônios projetando-se da lâmina I da medula espinhal para a região ventro-caudal do núcleo medial dorsal do tálamo, que se projeta para o córtex cingulado anterior e insular dorsal (Andrew e Craig, 2001; Craig 2002).

É fato conhecido que a sensação de prurido pode ser reduzida pela sensação nociceptiva do simples ato de coçar. Isto vem sendo demonstrado experimentalmente pela utilização de estímulos mecânicos, térmicos e químicos (Ward et al., 1996). Segundo Nilsson (1997), a estimulação elétrica reduz o prurido induzido pela histamina por horas, o que sugere um mecanismo

de ação central. Além disso, a administração sistêmica ou intra-espinhal de analgésicos opióides muitas vezes tem como resultado adverso o prurido (Andrew et al., 2003). Ao contrário, antagonistas μ -opióides possuem ação anti-pruritogênica em protocolos de prurido experimental e muitas vezes são utilizados para o tratamento do prurido crônico. Isto reforça que a nocicepção tem uma relação antagônica com o prurido o que sugere que o balanço entre as vias de prurido e nocicepção determinará qual será a sensação prevalente final por um mecanismo de silenciamento recíproco a nível medular. Partindo disso, e embora não mediando a mesma sensação cutânea, fibras homólogas às que medeiam à sensação de prurido cutâneo, poderiam estar também no tecido articular, reduzindo a transmissão da informação nociceptiva a nível central. Corroborando com isto, foi mostrado que no tecido articular do joelho de gatos uma classe específica de aferentes primários respondeu de forma similar ao estudo em humanos, promovendo disparo destas fibras, a baixas concentrações de histamina (Herbert, 2001), o que sugere que em tecido articular a ativação de fibras pela histamina pode não estar associado à dor.

Como foi mencionada, a ação da histamina em fibras sensoriais sobre H1 promove a despolarização dos aferentes primários (Ständer, 2003). Segundo Kashiba (1999), o receptor H1 está localizado em fibras C, co-expresso com o marcador de isolectina IB4. Por outro lado, em fibras C peptidérgicas o receptor H1 parece estar expresso somente em um subtipo de fibras, sendo exclusivo a fibras que expressam neuropeptídeo Y e não substância P e CGRP (Kashiba 2001).

O NPY administrado na medula espinhal promove hiponocicepção em diferentes modelos de dor, sendo seus efeitos semelhantes aos observados

com a administração de morfina (Smith, 2006; Brumovsky, 2007). Acredita-se que estes efeitos estejam ocorrendo via receptor Y1, que parecem estar localizados em pequenos neurônios medulares (Brumovsky, 2007), promovendo a hiperpolarização de neurônios excitatórios (Smith, 2006). Associado ao receptor Y1 especula-se a ação hiponociceptiva do NPY através da ação no receptor Y2, no qual tem sido encontrado exclusivamente, e com grande expressão, em aferentes primários e nas lâminas superficiais medulares (Brumovsky, 2007).

Outra possibilidade de ação hiponociceptiva da histamina mediada pelo receptor H1, pode ser estar relacionada com a liberação de óxido nítrico (NO), já que foi observado que este receptor promove o aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO), sendo via dependente de cálcio/calmodulina e subsequente aumento da atividade da guanilato ciclase solúvel (Hill, 1990). Valtchanoff et al (1992), mostraram por imunohistoquímica a co-localização de GABA e NOS em aferentes primários no corno dorsal da medula espinhal. Isto sugere um possível papel modulatório do NO nos impulsos recebidos da periferia e na atividade gabaérgica. Além disso, estudos mostram que o NO tem efeito hiponociceptivo por deprimir a atividade basal dos nociceptores no corno dorsal da medula (Hoheisel et al., 2000), e também por mediar o efeito hiponociceptivo de algumas drogas em vários modelos, incluindo o modelo de incapacitação articular (Tonussi e Ferreira, 1994).

O efeito hiponociceptivo mostrado pela histamina articular está de acordo com comportamento hipernociceptivo mostrado pelos antihistamínicos periféricos administrados de forma sistêmica, tanto quanto, administrados por

via intra-articular. Como a fonte de histamina endógena nos tecidos está vinculada aos mastócitos, isto sugere que estas células possuem um papel importante na modulação deste comportamento hiponociceptivo. A partir da interação da formalina com os mastócitos inúmeros mediadores são liberados dos grânulos destas células incluindo histamina, proteoglicanos e algumas proteases (Nigrovic e Le, 2004), além de serotonina em ratos (Brown, 2007). Esta hipótese de modulação negativa da histamina articular está de acordo com nossos resultados que mostraram que a administração de cromoglicato de sódio, em uma única e alta dose que inibe a degranulação de mastócitos (Okayama e Church, 1983), com formalina, diminuiu o efeito hipernociceptivo da loratadina sem alterar o edema e extravasamento plasmático. Nossa idéia é que o cromoglicato de sódio, além de diminuir a liberação da própria histamina, também promova alterações negativas significantes do conteúdo serotoninérgico liberado pelos mastócitos, explicando a diminuição da nocicepção observada por sua administração intra-articular. Além disso, a perda do comportamento hiponociceptivo mostrado anteriormente pela administração de histamina intra-articular, agora co-administrada com o cromoglicato de sódio mostra a importância da concentração de histamina liberada pelos mastócitos. Em nossos resultados, observamos que a ranitidina mostrou aumento do comportamento nociceptivo, sem alterações no diâmetro articular ou extravasamento de plasma de forma sistêmica como também co-administrado com formalina intra-articular. A ranitidina tem fraca capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (Hill, 1990). Isto reforça a idéia de que a ranitidina teve efeito periférico e local. Além disso, esta idéia é confirmada pelo

também aumento no comportamento nociceptivo a partir da co-administração de ranitidina local com formalina intra-articular.

Por outro lado, o efeito hipernociceptivo do antagonista H2 não pode ser entendido como decorrente da ação da histamina em fibras nervosas porque este receptor não está presente em fibras periféricas. Este receptor é expresso na membrana de mastócitos e tem como função regular negativamente a degranulação destes (Hill, 1997). Como foi mencionado anteriormente mastócitos de ratos liberam histamina e serotonina (5-HT). Possivelmente, o bloqueio de receptores H2 de mastócitos pela ranitidina, ocasionaria maior degranulação induzida pela formalina, com conseqüente liberação de mais serotonina na articulação e aumentando a nocicepção.

5.1 Esquema mostrando o possível mecanismo central de modulação da nocicepção articular induzida por formalina intra-articular.

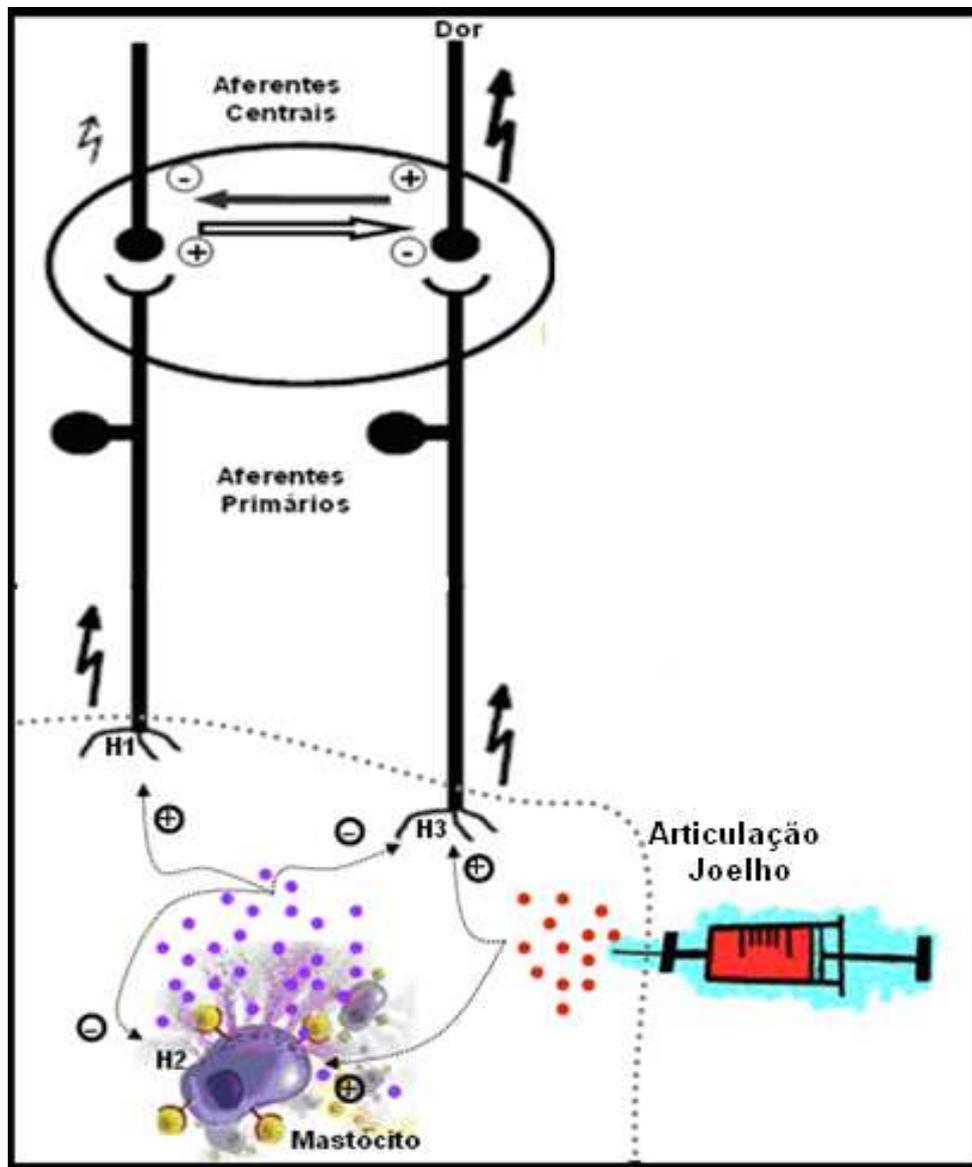


Fig. 24- Mecanismo central de modulação da nocicepção através da ativação de fibras sensíveis a histamina articulares pelo receptor H1, inibindo a nocicepção induzida pela formalina. Adaptado de Baron, 2001. H1, H2 e H3 são receptores histaminérgicos. Círculos violeta (Histamina) e círculos vermelhos (Formalina).

CONCLUSÕES

VI- Conclusões

O efeito hipernociceptivo observado com os antagonistas histaminérgicos periféricos sugere que a liberação articular de histamina por mastócitos, tenha um papel modulador negativo sobre a nocicepção induzida por formalina. Contudo, é importante avaliar o papel de outros mediadores liberados pelo mastócito de rato, p.ex. serotonina, para compreendermos melhor o sistema a partir da estimulação por formalina intra-articular. Ao que tudo indica o balanço entre estes mediadores liberados determinará a sensação prevalente.

Embora, os antihistamínicos H1 com ação central possam ter interesse clínico no controle da dor, nossos resultados sugerem que a ação periférica de fármacos antagonistas H1 e H2 podem aumentar a dor em pacientes com doenças inflamatórias articulares. Possibilidade esta que se agrava por serem medicamentos vendidos sem necessidade de receita médica.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT, F.V., FRANKLIN, K.B.J., WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of first and second phases of pain response in rats. **Pain**, 60:91-102, 1995.

ABDALLA, M. C. R. J., FILHO, M. C., QUEIROS, A. A. B., FILHO, F. S. F. Complicações da reconstrução intra-articular com tendão patelar: relato preliminar **Revista Brasileira de Ortopedia**. 27: 245-248,1992.

AGUT J., SANCHES JC., SACRISTÁN A., ORTIZ JA. Action of ebrotidine, ranitidine and cimetidine on the specific binding to histamine H1- and H2-receptors. **Arzneimittelforschung**. 47:447-9, 1997.

AHN HS., BARNETT A. Selective displacement of [3H]mepyramine from peripheral vs. central nervous system receptors by loratadine, a non-sedating antihistamine. **Eur J Pharmacol**. 127:153-5, 1986.

AKIHIKO I., ROMAN R., STÄNDER S., STEINHOFF M., MIYASHI Y., SCHMELZ M. Neuropysiology of pruritus: Interaction of itch and pain. **Arch Dermatol**; 139:1475-1478, 2003.

ANDREW D., CRAIG A. D. Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive histamine: a central neural pathway for itch. **Nature Neuroscience** 4:72-77, 2001.

ANDREW D., SCHMELZ M., BALLANTYNE J. C. Itch – mechanisms and mediators. **IASP Press, Scattle**, 213-216, 2003.

APRIL DELAURIER, NICHOLAS BURTON, MICHAEL BENNETT, RICHARD BALDOCK, DUNCAN DAVIDSON, TIMOTHY J MOHUN, MALCOLM PO LOGAN The Mouse Limb Anatomy Atlas: An interactive 3D tool for studying embryonic limb patterning **BMC Developmental Biology** 83:1-7, 2008.

ARRANG JM., GARBARG M., SCHWARTZ JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptors. **Nature** 302:832-837, 1983.

ARRANG, J. M., ROY, J., MORGAT, J. L., SCHUNACK, W., AND SCHWARTZ, J. C. Histamine H3-receptor binding sites in rat brain membranes: modulations by guanine nucleotides and divalent cations. **Eur. J. Pharmacol**. 188: 219–227,1990.

ARRANG, J. M., DRUTEL, G., AND SCHWARTZ, J. C. Characterization of histamine H3-receptors regulating acetylcholine release in rat entorhinal cortex. **Br. J. Pharmacol**. 114: 1518–1522, 1995.

AVERILL S., MCMAHON SB., CLARY DO, REICHARDT LF., PRIESTLEY JV. Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified

subgroups of adult rat sensory neurons. **The European journal of Neuroscience**, 7: 1484-1494,1995.

BARANAUSKAS, G., NISTRÌ, A., Sensitization of pain pathways in the spinalcord: cellular mechanisms. **Prog. Neurobiol.** 54: 349–365,1998.

BARON, R., SCHWARZ, K., KLEINERT, A., SCHATTSCHEIDER, J., WASNER, G. Histamine-induced itch converts into pain in neuropathic hyperalgesia. **Neuroreport.** 12: 3475–3478, 2001

BASBAUM, A.E., JESSEL, T.M. The perception of pain. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **The principles of Neural Science. 4ed.** McGraw-Hill: Nova Iorque, 472-791, 2000.

BASINI, N., BASINI, N. E. Reconstrução do ligamento cruzado anterior com enxerto quádruplo do semitendinoso e do grácil, com fixação com dupla placa. **Revista Brasileira de Ortopedia** 31: 159-164, 1996.

BESSOU, P., PERL, E.R. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **J. Neurophysiol.** 32: 1025-1043, 1969.

BOURNE, H. R.,MELMON, K. L., LICHTENSTEIN, L. M. Histamine augments leukocyte cyclic AMP and blocks antigenic histamine release. **Science** 173: 743–745, 1971.

BROMLEY, M., WOOLLEY, D.E. Histopathology of the rheumatoid lesion. Identification of cell types at sites of cartilage erosion. **Arthritis Rheum**, Philadelphia, 27:857-863,1984.

BUSSE, W. W., AND SOSMAN, J. Decreased H₂ histamine response of granulocytes of asthmatic patients. **J. Clin. Invest.** 59: 1080–1087, 1977.

CAMANHO, G. L., ANDRADE, M. M. Estudo comparativo da reabilitação dos pacientes submetidos à reconstrução do ligamento cruzado anterior com enxertos do terço médio do tendão patelar e com os dois tendões dos músculos flexores mediais do joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia.** 34: 513-518,1999.

CAMANHO, G. L., OLIVI, R., CAMANHO, L. F., MUNHOZ, M. A. S; MOURA, M. C. Tratamento da lesão aguda do ligamento cruzado anterior. **Revista Brasileira de Ortopedia** 32: 347-352,1997.

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.** 535: 155-158, 2007.

CARSTENS, E. Responses of rat spinal dorsal horn neurons to intracutaneous microinjection of histamine, capsaicin, and another irritants. **J. Neurophysiol.**, 77: 24499-514, 1997.

CARTER, T. D., HALLAM, T. J., CUSACK, N. J., AND PEARSON, J. D. Regulation of P2y-purinoceptor-mediated prostacyclin release from human endothelial cells by cytoplasmic calcium concentration. **Br. J. Pharmacol.** 95: 1181– 1190, 1988

CASALE, T. B., RODBARD, D., AND KALINER, M. Characterization of histamine H1-receptors on human peripheral lung. **Biochem. Pharmacol.** 34: 3285–3292, 1985.

CLARK, E. A., AND HILL, S. J. Differential effect of sodium ions and guanine nucleotides on the binding of thioperamide and clobenpropit to histamine H3-receptors in rat cerebral cortical membranes. **Br. J. Pharmacol.** 114: 357–362, 1995.

CODERRE, T.J., VACCARINO, A.L., MELZACK, R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Res.**, 535: 155-158, 1990.

CRAIG A. D. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. **Nature Reviews Neuroscience** 3:655-666, 2002.

DAVID C. IMMKE, NARENDER R. GAVVA The TRPV1 receptor and nociception. **Seminars in Cell & Developmental Biology.** 17: 582–591, 2006.

DAVIS, K.D., MEYER, R.A., CAMPBELL, J.N. Chemosensitivity and sensitization of nociceptive afferents that innervate the hairy skin of monkey. **Journal of Neurophysiology**, 69: 1071-1081, 1993.

DEBUISSON, D., DENNIS, S.C. The formalin test: a quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, 4:161-174, 1977.

DEWS, P.B., GRAHAM, J.P. The antihistamine substance 2786 RP. **Brit J Pharmacol Chemother, Hampshire**, 1: 278-286, 1946.

DICKENSON, A.H., SULLIVAN, A.F. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalininduced activity of rat dorsal horn neurones. **Neurosci. Lett.**, 83: 207-211, 1987.

DRAY, A., URBAN, L., DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol. Sci.**15:190-197, 1994.

DUNCAN, P. G., BRINK, C., ADOLPHSON, R. L., AND DOUGLAS, J. S. Cyclic nucleotides and contraction/relaxation in airway muscle: H1 and H2 agonists and antagonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 215: 434–442, 1980.

E.G. MELO, V.A. NUNES, C.M.F. REZENDE, M.G. GOMES, C. MALM, V.A. GHELLER Chondroitin sulfate and sodium hyaluronate in the treatment of the degenerative joint disease in dogs. Histological features of articular cartilage and synovium **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 60: 2008.

FONSECA, E. A., SAMPAIO, T. C. F. V. S., SOUZA, J. M. G. Reabilitação do joelho pós-reconstrução do ligamento cruzado anterior com tendão patelar. **Revista Brasileira de Ortopedia** 27: 241-244, 1992.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.** 48: 129-141, 1999.

GOMES, J. L. E., MARCZYK, R. R. S. Revista Brasileira de Ortopedia. Reconstrução dos ligamentos cruzados do joelho com o tendão duplo do semitendinoso. **Revista Brasileira de Ortopedia** 16:128-132, 1981.

GRAY, M. Anatomia **Guanabara Koogan**, 37: cap. 3, 4, 5, 6, 1995.

GRISWOLD, D. E., SALVATORE, A., BADGER, A. M., POSTE, G., HANNA, N. Inhibition of T suppressor cell expression by histamine type 2 (H2) receptor antagonists. **J. Immunol.** 132: 3054–3057, 1984.

IWAN J.P. DE ESCH, ROBIN L. THURMOND, ALDO JONGEJAN, ROB LEURS The histamine H4 receptor as a new therapeutic target for inflammation **Trends in Pharmacological Sciences** 26: September, 2005.

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

HANDWERKER, H.O., REEH, P.W. Algesimetry: a necessity in research on analgesic drugs. **Agents Actions Suppl.** 19: 33-49, 1986.

HANS-GEORG SCHAIBLE, ROBERT F. SCHMIDT Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. **Journal of Neurophysiology**, 54: 1109-1122, 1985.

HATTORI, Y., NAKAYA, H., ENDOU, M., AND KANNO, M. Inotropic, electrophysiological and biochemical responses in rabbit papillary muscles: evidence for co-existence of H1- and H2-receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 253: 250– 256, 1990.

HENDERSON, B., PETTIPHER, E.R. The synovial lining cell: biology and pathobiology. **Semin Arthritis Rheum**, 15:1-32, 1985.

HEPPELMANN, B., PAWLAK, M. Sensitisation of articular afferents in normal and inflamed knee joints by substance P in the rat. **Neurosci. Lett.**, 223: 97-100, 1997.

HERBERT, M.K., SCHMIDT, R.F. Activation of normal and inflamed fine articular afferent units by serotonin. **Pain**, 50: 79-88, 1992.

HILL S. J., GANELLIN C. R., YOUNG J. M., SCHUNACK W., LEVI R., HASS H. L. Classification of histamine receptors **Pharmacological Review** 49:253-270, 1997.

HILL S. J., GANELLIN C. R., YOUNG J. M., SCHUNACK W., LEVI R., HASS H. L. Classification of histamine receptors. **Pharmacological Review** 49:253-270, 1997.

HILL S.J. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptors. **Pharmacological Review** 42: 45-73, 1990.

HONG, Y., ABBOTT, F.V. Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the formalin test. **Eur. Pharmacol.** 277:21-29, 1995.

HUNT, S.P., MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. **Neuroscience** 2: 83-91, 2001.

I. HINDMARCH, S. JOHNSON, R. MEADOWS, T. KIRKPATRICK, Z. SHAMSI The acute and sub-chronic effects of levocetirizine, cetirizine, loratadine, promethazine and placebo on cognitive function, psychomotor performance, and wheal and flare. **Curr. Med. Res. Opin.** 17:241-255, 2001.

IKOMA A., STEINHOFF M., STÄNDER S., YOSIPOVITCH G., SCHMELZ M. The neurobiology of itch. **Nat Rev Neurosci.** 7:535-47, 2006.

INTERNATIONAL ASSOCIATION OF STUDY OF PAIN (IASP) Proposed taxonomy changes. www.iasp-pain.org 2008.

JOHNSON, C. L. Histamine receptors and cyclic nucleotides. **In Pharmacology of Histamine Receptors** ed. by R. Ganellin and M. Parsons, 146–216, Wright, Bristol, England, 1982

JULIUS, D., BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature** 413: 203-210, 2001.

KANAKA, R., SCHAIBLE, H.G., SCHMIDT, R.F. Activation of fine articular afferent units by bradykinin. **Brain Res.** 327: 81-90, 1985.

KANEKO, M., HAMMOND, D.L. Role of spinal gamma-aminobutyric acid receptors in formalin-induced nociception in the rat. **J. Pharmacol. Exper. Therap.**, 282: 928-938, 1997.

KASHIBA H., FUKUI H., MORIKAWA Y., SENBA E. Gene expression of histamine H1 receptor in guinea pig primary sensory neurons: a relationship between H1 receptor mRNA-expressing neurons and peptidergic neurons. **Brain Res. Mol.** 66:24-34, 1999.

KASHIBA H., FUKUI H., SENBA E. Histamine H1 receptor mRNA is expressed in capsaicin-insensitive sensory neurons with neuropeptide Y-immunoreactivity in guinea pigs. **Brain Research** 1-2: 85-93, 2001.

KASHIBA H., NOGUCHI K., UEDA Y. Coexpression of trk family members and low-affinity neurotrophin receptors in rat dorsal root ganglion neurons. **Molecular Brain Research** 30: 158-164, 1995

KHAN, M. M., MARR-LEISY, D., VERLANDER, M. S., BRISTOW, M. R., STROBER, S., GOODMAN, M., ANDMELMON, K. L. The effects of derivatives of histamine on natural suppressor cells. **J. Immunol.** 137: 308–314, 1986.

KHAN, M. M., SANSONI, P., ENGLEMAN, E. G., MELMON, K. L. Pharmacological effects of autacoids on subsets of T cells: regulation of expression/function of histamine-2 receptors by a subset of suppressor cells. **J. Clin. Invest.** 75: 1578–1583, 1985.

KILPATRICK, G. J., MICHEL, A. D. Characterisation of the binding of the histamine H₃-receptor agonist [3H](r)- α -methyhistamine to homogenates of rat and guinea-pig cortex. **Agents Actions** 33: 69–75, 1991.

KOTLIKOFF, M. I., MURRAY, R. K., AND REYNOLDS, E. E. Histamine-induced calcium release and phorbol antagonism in cultured airway smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.** 253: C561–C566, 1987.

LEHMKUML, L. D., SMITH, L. K. Cinesiologia clinica de Brunstron. **Manole** Cap.9,1989.

LETT-BROWN, M. A., LEONARD, E. J. Histamine-induced inhibition of normal human basophil chemotaxis to C5a. **J. Immunol.** 118: 815–818, 1977.

LEURS, R., BROZIUS, M. M., JANSEN, W., BAST, A., AND TIMMERMAN, H. Histamine H₁-receptor mediated cyclic GMP production in guinea-pig lung tissue is an L-arginine-dependent process. **Biochem. Pharmacol.** 42: 271–277, 1991.

LEURS, R., TRAIFFORT, E., ARRANG, J. M., TARDIRD-LACOMBE, J., RUAT, M., AND SCHWARTZ, J. C. Guinea-pig histamine H₁ receptor: II—stable expression in Chinese hamster ovary cells reveals the interaction with three major signal transduction pathways. **J. Neurochem.** 62: 519–527, 1994.

LEYSEN JE, GOMMEREN W, JANSSEN PF, SANZ G, GILLARDIN JM, SCHOTTE A, JANSENN PA. Non-sedative antihistaminics and binding to central and peripheral H₁ histamine receptors **Alleg. Immunol.** 23:51-7,1991.

LICHTENSTEIN, L. M., AND GILLESPIE, E. The effect of the H₁- and H₂-antihistamines on “allergic” histamine release and its inhibition by histamine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 192: 441–450, 1975.

LING, P. Histamine H₄ receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. **Br. J. Pharmacol.** 142: 161–171 2004.

LIPPERT, L. Cinesiologia clinica para fisioterapeutas. **Revinter 2ed.** cap. 12. 1996.

LOESER, J.D., MELZACK, R. Pain: an overview. **Pain**, 353:1607-1609,1999.

MALONE, D.G., IRANI, A.M., SCWARTZ, L.B., BARRET, K.E., METCALFE, D.D. Mast cell numbers and histamine levels in synovial fluids from patients with arthritis. **Arthritis Rheum.**, 29:956-63, 1986.

MARTINS, M.A., BASTOS, L.C., TONUSSI, C.R. Formalin injection into knee joint of rats: Pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. **The journal of pain**, 7:100-107, 2006.

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

MATTHIES, B.K., FRANKLIN, K.B. Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. **Pain**, 51: 199-206, 1992.

MCDOUGALL, J.J., WATKINS, L.; LI, Z. Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a modulator of joint pain in a rat model of osteoarthritis. **Pain**, 123: 98-105, 2006.

MCMAHON S. B, ARMANINI M. P, LING L.H Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets. **Neuron** 12: 1161- 1171, 1994.

MELMON, K. L., AND KHAN, M. M. Histamine and its lymphocyte-selective derivatives as immune modulators. **Trends Pharmacol. Sci.** 8: 437–441, 1987.

MELMON, K. L., BOURNE, H. R., WEINSTEIN, Y., SHEARER, G. M., KRAM, J., AND BAUMINGER, S. Hemolytic plaque formations by leukocytes in vitro. **J. Clin. Invest.** 53: 13–21, 1974.

MELMON, K. L., ROCKLIN, R. E., AND ROSENKRANZ, R. P. Autacoids as modulators of the inflammatory and immune response. **Am. J. Med.** 71: 100–106, 1981.

MERSKEY, H. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on Taxonomy. **Pain** 6: 249-252, 1979.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, 57: 1-164, 1999.

MOREIRA, C., CARVALHO, M. A. P. **Noções práticas de reumatologia.** 2: 1996.

MURIYAMA, T., KAJIYAMA, Y., AND NOMURA, Y. Histamine-stimulated and GTP-binding protein-mediated phospholipase A2 activation in rabbit platelets. **J. Biol. Chem.** 265: 4290–4295, 1990.

NILSSON H.J., LEVINSSON A., SCHOUENBORG J. Cutaneous field stimulation (CFS): a new powerful method to combat itch. **Pain** May;71(1):49-55, 1997.

ODA, T., MORIKAWA, N., SAITO, Y., MASUHO, Y., MATSUMOTO, S. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. **J. Biol. Chem.**, 275, 36781 – 36786, 2000.

ODA T, MATSUMOTO S. Identification and characterization of histamine H4 receptor **Nippon Yakurigaku Zasshi** 118: 36-42 2001.

PAALZOW GH, PAALZOW LK. Promethazine both facilitates and inhibits nociception in rats: effect of the testing procedure. **Psychopharmacology** 85:31-6, 1985.

PANETTIERI, R. A., MURRAY, R. K., DEPALO, L. R., YADVISH, P. A., KOTLIKOFF, M. I. A human airway smooth muscle cell line that retains physiological responsiveness. **Am. J. Physiol.** 256: 329–335, 1989.

PARADA, C.A., TAMBELI, C.H., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H: The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neurosci.** 102: 937-944, 2001.

PAROLARO, D., PATRINI, G., MASSI, P., MAINARDI, P., GIAGNONI, G., SALA, M., GORI, E. Histamine as a central modulator of rat intestinal transit. **J. pharmacol. exp. ther.** 249: 324–328, 1989.

PATRÍCIA DE ATHAYDE BARNABÉ, JOSÉ WANDERLEY CATTELAN, FABIANO ANTÔNIO CADIOLI Anatomophysiology of equine digital tendon sheath **Cienc. Rural** 34: 2004.

PLAUT, M., AND LICHTENSTEIN, L. M.: Histamine and immune responses. In *The Pharmacology of Histamine Receptors*: ed. by C. R. Ganellin and M. E. Parsons, **Wright, Bristol**, 392–435, 1982.

RAJA, S., MEYER, R.A., RINNKAMP, M., CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanism of nociception. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. (EDS). **Textbook of pain**. Edinburgh, Churchill Livingstone 4:11-57, 1999.

RESINK, T. J., GRIGORIAN, G. Y., MOLDABAEVA, A. K., DANILOV, S. M., AND BUHLER, F. R. Histamine-induced phosphoinositide metabolism in cultured human umbilical vein endothelial cells: association with thromboxane and prostacyclin release. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 144: 438–446, 1987.

ROSENTHAL, S.R., MINARD, D. Experiments on histamine as the chemical mediator for cutaneous pain. **J Exp Med**, 70: 415-425, 1939.

RUMORE M M, SCHLICHTING DA. - Analgesic effects of antihistaminics. **Life Sci.** 36:403-16, 1985.

RUSSO, C.M., BROSE, W.G. -Chronic pain. **Ann. Rev. Med.** 49: 123-133, 1998.

SANSONI, P., SILVERMAN, E. D., KHAN, M. M., MELMON, K. L., AND ENGLEMAN, E. G. Immunoregulatory T cells in man: histamine-induced suppressor T cells are derived from Leu 21 (T1) subpopulation distinct from that which gives rise to cytotoxic T cells. **J. Clin. Invest.** 75: 650–656, 1985.

SCHAIBLE H.G., SCHMIDT, R.F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E2. **J. Physiol.**, 403: 91-104, 1988.

SCHEPELMANN, K., MESSLINGER, K., SCHAIBLE, H.G., SCHMIDT, R.F. Inflammatory mediators and nociception in the joint: excitation and sensitization of slowly conducting afferents fibers of cat's knee joint by prostaglandin I2. **Neurosci.** 50: 237-47, 1992.

SCHMELZ M. Specific C – receptors for itc in human shin. **Journal of Neuroscience** 17:8003-8008, 1997.

SCHMIDT, H. H. H. W., ZERNIKOW, B., BAEBLICH, S., AND BOHME, E. Basal and stimulated formation and release of L-arginine-derived nitrogen oxides from cultured endothelial cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 254: 591–597, 1990.

SCHOLZ, J., WOOLF, C.J., Can we conquer pain? **nat. neurosci.** 5, 1062–1067, 2002.

SERTL, K., CASALE, T. B., WESCOTT, S. L., AND KALINER, M. A. Immunohistochemical localization of histamine-stimulated increases in cyclic GMP in guinea-pig lung. **Am. Rev. Respir. Dis.** 135: 456–462, 1987.

SHERRINGTON, C.S. The integrative action of the nervous system. **New York: Scribner**, 1906.

SMITH P.A., MORAN T.D., ABDULLA F., TUMBER K.K., TAYLOR BK. Spinal mechanisms of NPY analgesia. **Peptides** 28: 464-74, 2007

STÄNDER S., STEINHOFF M., SCHMELZ M., WEISSHAAR E., METZE D., LUGER T. Neurophysiology of pruritus: cutaneous elicitation of itch. **Archives of Dermatology** 11: 1463-1470, 2003.

STEELE, R.H., WILHELM, D.L. The inflammatory reaction in chemical injury. Increased vascular permeability and erythema induced by various chemicals. **Br J Exp Pathol**; 47: 612-23; 1966.

TAKESHITA, K. Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 307: 1072–1078, 2003.

TAKUWA, Y., TAKUWA, N., AND RASMUSSEN, H. Measurement of cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in bovine tracheal smooth muscle using aequorin. **Am. J. Physiol.** 253: 817–827, 1987.

TAYLOR, B.K., PETERSON, M.A., BASBAUM, A.I. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **J. Neurosci.** 15: 7575-7584, 1995.

TAYLOR, B.K., PETERSON, M.A., RODERICK, R.E., TATE, J., GREEN, P.G., LEVINE, J.O., BASBAUM, A.I. Opioid inhibition of formalin-induced changes in plasma extravasation and local blood flow in rats. **Pain** 84: 263-270, 2000.

THURMOND, R.L. A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 309: 404–413, 2004.

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.** 81:765-71, 2007.

TING, S., DUNSKY, E. H., ZWEIMAN, B. Histamine suppression of eosinophilotaxis and histamine release in vivo. **J. Allergy Clin. Immunol.** 65: 196–197, 1980.

TJOLSEN, A., BERGE, O.G., HUNSKAAR, S., ROSLAND, J.H., HOLE K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain** 51:5-17, 1992.

TONUSSI, C.R., FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain** 48:421-7, 1992.

TSUYAKO OHKUBO, MANABU SHIBATA, MASAYUKI INOUE, HIDEHIRO KAYA, HIROSHI TAKAHASHI Regulation of substance P release mediated via prejunctional histamine H3 receptors. **European Journal of Pharmacology** 273: 83-88, 1995.

VAN AMSTERDAM, R. G. M., MEURS, H., BROUVER, F., POSTEMA, J. B., TIMMERMANS, A., AND ZAAGSMA, J. Role of phosphoinositide metabolism in functional antagonism of airway smooth muscle contraction by β -adrenoceptor agonists. **Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.** 172: 175–183, 1989.

VERGE V. M., MERLIO J.P., GRONDIN J. Colocalization of NGF binding sites, trk mRNA, and low-affinity NGF receptor mRNA in primary sensory neurons: Responses to injury and infusion of NGF. **Journal of Neurosciense** 12: 4011-4022, 1992.

VERGE V. M., RICHARDSON P.M., BENOIT R. Histochemical characterization of sensory neurons with high-affinity receptors for nerve growth factor. **Journal of Neurocytology** 18: 583-591, 1989.

WARD L., WRIGTH E., MCMAHON S. B. A. Comparasion of the effects of noxious and innocuous counterstimuli on experimentally induced itch ann pain. **Pain** 64: 129-138, 1996.

WASNER G., SCHWARZ K., SCHATTSCHEIDER J., BINDER A.; JENSEN T.S.; BARON R. Interaction between histamine-induced itch and experimental muscle pain. **European Journal of Pain**, 8: 179-185, 2004.

WEST, R. E., JR., ZWEIG, A., SHIH, N. Y., SIEGEL, M. I., EGAN, R. W., AND CLARK, M. A. Identification of two H3-histamine receptor subtypes. **Mol. Pharmacol.**38: 610–613, 1990.

WETMORE C, OLSON L. Neuronal and non neuronal expression of neurotrophins and their receptors in sensory and sympathetic ganglia suggest new intercellular trophic interactions. **Journal of Comparative Neurology** 353: 143-159, 1995.

WHEELER-ACETO, H., COWAN, A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. **Psychopharmacol.** 104: 35-41, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. **World Health Organ Tech Rep Ser**; 919:1-218. 2003.

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 knockout mice. **Eur J Pharmacol.** 522: 55- 62, 2005.

YUAN, Y., GRANGER, H. J., ZAWIEJA, D. C., DEFILY, D. V., CHILIAN, W. M. Histamine increases venular permeability via a phospholipase C-NO synthase-guanylate cyclase cascade. **Am. J. Physiol.** 264: 1734–1739, 1993.

ZHU, Y., MICHALOVICH, D., WU, H., TAN, K.B., DYTOKO, G.M., MANNAN, I.J., BOYCE, R., ALSTON, J., TIERNEY, L.A., LI, X., HERRITY, N.C., VAWTER, L., SARAU, H.M., AMES, R.S., DAVENPORT, C.M., HIEBLE, J.P., WILSON, S., BERGSMA, D.J., FITZGERALD, L.R. Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. **Mol. Pharmacol.** 59: 434 - 441, 2001.

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

ZWEIG, A., SIEGEL, M. I., EGAN, R. W., CLARK, M. A., SHORR, R. G. L., ANDWEST, R. E.: Characterization of a digitonin-solubilised bovine brain H3-histamine receptor coupled to a guanine nucleotide-binding protein. **J. Neurochem.** 59: 1661–1666, 1992.