

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – Unifal - MG

HERICK ULISSES DE OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA
ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA
TRANSCUTÂNEA DO NERVO -TENS**

ALFENAS- MG

2015

HERICK ULISSES DE OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA
ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA
TRANSCUTÂNEA DO NERVO -TENS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL/MG.

Área de concentração: Fisiologia e Farmacologia da dor

Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Alfenas/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Oliveira, Herick Ulisses de.

Investigação do envolvimento do sistema endocanabinóide na antinocicepção induzida pela estimulação elétrica transcutânea do nervo-TENS. / Herick Ulisses de Oliveira -- Alfenas-MG, 2015.

96 f.

Orientador: Giovane Galdino de Souza.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. Endocanabinóide. 2. Estimulação Elétrica Nervosa Transcutânea
3. Analgésicos. I. Souza, Giovane Galdino de. II. Título.

CDD-615.84

HERICK ULISSES DE OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA
ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA
TRANSCUTÂNEA DO NERVO -TENS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL/MG.

Área de concentração: Fisiologia e Farmacologia da dor.

Aprovada em: 20/ 11 / 2015

Prof. Dr. Giovane Galdino Souza
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Assinatura:

Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais



Assinatura:

Prof. Dr. Carlos Giovani de Oliveira Nascimento
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Assinatura:

*Dedico aos meus amores: minha esposa Soraya Oliveira
e minha filha Ana Luiza.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força em momentos difíceis, e por ser sempre meu guia, a Nossa Senhora Aparecida que intercede e ilumina meus passos, abençoando com seu manto maternal.

A minha esposa Soraya e minha filha Ana Luiza, que mesmo com a minha ausência, incentivaram e me inspiraram em todo percurso. A vocês peço desculpas pelos momentos ímpares que perdemos, por dificuldades e receios. Apesar disso sempre me receberam com um sorriso no rosto e uma energia que me impulsionava nesse objetivo. Obrigado pelo carinho, amo vocês.

Ao meu pai Valdir, minha mãe Izabel por serem exemplo de dedicação, união e sempre me apoiarem nas decisões. Obrigado por disponibilizarem tempo para ajudar e cuidar da minha família em momentos que estive ausente, juntamente com meus irmãos Douglas e Breno, minha cunhada, meu sogro e minha sogra.

A minha Vó Didi pelas Bênçãos e pelos ensinamentos de vida e de simplicidade.

Aos meus primos, tios, tias: em especial a Tia Conceição e Cornélio pela hospedagem nos períodos que estive em Belo Horizonte. Obrigado pela força.

Ao amigo e orientador Dr. Giovane Galdino, pela credibilidade, ensinamentos e por me aceitar nesse seleto grupo, fazendo que eu me dedicasse e gostasse cada vez mais da pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós graduação em Fisiologia e de graduação em Fisioterapia da UNIFAL, em especial ao Dr. Alexandre Giusti-Paiva, Dra. Fabiana Giust, Dr. Leonardo Carvalho, Dra Juliana Bassalobre , Dra Silvia Lanziotti , Dr Marcelo, Dra Josie Resende , pelas dicas e disponibilidade.

Aos amigos e Colaboradores da UFMG Prof. Dr. Ênio Ferreira, Dr. José Felipe, e Dra. Ana Flávia, pelo trabalho assistencial, dedicação e pela paciência em ensinar.

Aos pós-graduandos do laboratório de Fisiologia da UNIFAL: Vanessa Veronesi, Vanessa Cardoso, Mara, Ana Cláudia, Sílvia, Layla, Ana Laura, Luciana, Merellym, Lidiane, Nathália, Clarice, Kriss, Tatiane, Délcio e Wesley e do LABFEX, em especial a Rafaela Santos, Ana Clara, Gonçalves Pedro, Marcelo, Jadina Santos, Julia Parisi, Ricardo pela convivência diária, ajuda e amizade.

Aos técnicos Luiz, Luciana, José Reis, Marina Venâncio, Luiz Felipe, João Vitório, Isabel as auxiliares Helena e D Zélia, pela disponibilidade e atenção,

À sempre atenciosa Maria Antonieta Nogueira, secretária do PMPGCF da UNIFAL

Aos amigos que me deram força em especial à eterna Rep. Projak.

À Universidade Federal de Alfenas, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro.

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes*

Cora Coralina

RESUMO

A dor patológica acomete 30% da população mundial. Visando seu controle, inúmeras intervenções são utilizadas, as quais envolvem além dos meios farmacológicos, procedimentos não farmacológicos. Assim, uma estratégia não farmacológica utilizada tem sido a Estimulação Elétrica Transcutânea do Nervo (TENS), um método que utiliza a corrente elétrica para induzir analgesia. No entanto, os mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo da TENS não estão totalmente elucidados. Com a descoberta do sistema endocanabinóide e a partir de estudos que demonstraram seu importante papel na modulação da dor, o presente estudo objetivou investigar o envolvimento desse sistema no efeito antinociceptivo proporcionado pela TENS em níveis periférico e central. Para tal, foram utilizados camundongos machos *Swiss* pesando 25 a 30, submetidos a um modelo de dor por meio de células tumorais de Ehrlich, injetadas em pata. Em seguida, com o intuito de verificar o efeito antinociceptivo da TENS de baixa e alta frequência sobre a alodinia mecânica induzida pelas células, os animais foram estimulados por ambas as frequências por 20 minutos, aplicadas por meio de eletrodos em pata posterior direita. A avaliação do limiar nociceptivo foi realizada pelo teste de filamentos de von Frey. Já, para avaliar a participação do sistema endocanabinóide, foram pré administrados por vias intra plantar (i.pl.), intratecal (i.t.) e intra Substância Cinzenta Periaquedutal dorso lateral (i.SCPd.l.), o antagonista para receptores canabinóides do tipo 1 (CB₁), o AM 251 e o inibidor da enzima responsável pela degradação de endocanabinóide anandamida (AEA), o MAFP. Além disso, também foram realizadas a análise de *Western Blot*, para investigar a expressão de receptores CB₁ e análise de imunofluorescência para quantificar e co-localizar esses receptores. Nossos resultados verificaram que ambas as frequências utilizadas reverteram de maneira significativa ($P < 0.05$) a alodinia mecânica induzida pelas células do tumor de Ehrlich. Em adição, esse efeito foi revertido pelo AM251 e prolongado pelo MAFP, ambos pré injetados pelas vias i.pl, e i.t. e i.SCPd.l. Somando a esses resultados, o ensaio de *Western Blot* demonstrou um aumento da expressão de receptores CB₁ após a aplicação da TENS, em ambas as frequências, em tecido subcutâneo de pata e em SCPd.l. após 3 horas da injeção de células de Erlinch. Resultado similar foi encontrado após a análise de imunofluorescência, onde verificou-se um aumento no número de receptores CB₁ após a estimulação com a TENS, em corno dorsal da medula espinal e SCPd.l. Assim, o presente estudo conclui que o sistema endocanabinóide pode estar envolvido no efeito antinociceptivo induzido pela TENS, tanto de baixa quanto de alta frequência, em níveis periférico e central e sugere que esse efeito ocorre pela ativação da via descendente inibitória da dor, principalmente pela liberação de endocanabinóides e a ativação dos receptores CB₁.

Palavras-chave: Endocanabinóide. TENS. Antinocicepção. Alodinia

ABSTRACT

The pathological pain affects 30% of the world population. Aiming their control, many interventions are used, which involving pharmacological and non-pharmacological treatments. Thus, a non-pharmacological strategy used has been Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation (TENS), a method that use the electric current to induce analgesia. However, the mechanisms involved in the antinociceptive effect induced by TENS are not fully elucidated. With the discovery of the endocannabinoid system and studies demonstrated that its system have an important role in the modulation of pain, the present study aimed to investigate the involvement of this system in TENS antinociceptive effect at central and peripheral levels. For such, male Swiss mice weighing 25 to 30g, were underwent to a pain model using tumor cells of Ehrlich, injected into the paw. After that, in order to evaluate the analgesic effect of low and high TENS frequency in the mechanical allodynia induced by the cells, the animals were stimulated for both frequencies for 20 minutes, which were applied by electrodes in the right hind paw. The nociceptive threshold was measured by the von Frey hairs test. To evaluate the involvement of the endocannabinoid system, were pre administered by intra plantar (i.pl.), intrathecal (i.t.) and intra dorsolateral Periaqueductal Gray Matter (i.d.l.PAG) via, the antagonist for cannabinoid receptors type 1 (CB₁), the AM 251 and the inhibitor of the enzyme responsible for the degradation of the endocannabinoid anandamide (AEA), the MAFF. Furthermore, were also used the Western blot analysis to investigate the expression of CB₁ receptors and immunofluorescence analysis to quantify and co-locate these receptors. Our results found that both frequencies used reverted significantly ($P < 0.05$) the mechanical allodynia induced by Ehrlich tumor cells. In addition, this effect was reversed by AM251 and prolonged by MAFF, both pre injected by i.pl., i.t. and i.d.l.PAG routes. In addition to these results, the Western Blot analysis showed an increase in expression of CB₁ receptors after the application of TENS, in both frequencies, in paw subcutaneous tissues and d.l.PAG, 3 hours after injection Erlinch cells. A similar result was found after immunofluorescence analysis, which found an increase in the number of CB₁ receptors after stimulation with TENS, in the dorsal horn of the spinal cord and d.l.PAG. Thus, this study concludes that the endocannabinoid system may be involved in the antinociceptive effect induced by TENS, in both low and high frequency, at central and peripheral levels and suggests that this effect occurs by the activation of the descending inhibitory pain pathway, mainly by release of endocannabinoids and activation of CB₁ receptors.

Key words: Endocannabinoids. TENS. Antinociception. Allodynia

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1- | Via ascendente da nocicepção..... | 21 |
| Figura 2- | Esquema representativo da teoria do portão modificada..... | 23 |
| Figura 3- | Via descendente inibitória da dor e principais áreas envolvidas no controle descente..... | 24 |
| Figura 4- | Ilustração dos possíveis caminhos ativados pela TENS de baixa frequência (TB) ou de alta frequência (TA)..... | 29 |
| Figura 5- | Representação esquemática do sistema endocanabinóide..... | 33 |
| Figura 6- | Administração intraplantar das drogas..... | 40 |
| Figura 7- | Via de administração intratecal..... | 41 |
| Figura 8- | Equipamento estereotáxico utilizado no experimento..... | 42 |
| Figura 9- | Posicionamento do camundongo para cirurgia estereotáxica..... | 43 |
| Figura 10- | Ilustração do atlas Franklin e Paxinos (1997) com a seta indicando a Substancia Cinzenta Periaquedutal dorso lateral..... | 45 |
| Figura 11- | Representação da injeção de azul de metileno na SCPd.I..... | 45 |
| Figura 12- | Teste de exclusão do corante Azul de Tripán. Visualização através de microscópio..... | 47 |
| Figura 13- | Aparelho de TENS Neurodyn II (IBRAMED®, Brasil)..... | 48 |
| Figura 14- | Imagem da aplicação da TENS, e o posicionamento dos animais na capela..... | 49 |
| Figura 15- | Teste de von Frey filamento: aparato utilizado para colocar os animais durante o experimento..... | 50 |
| Figura 16 | Cálculo usado para especificar a média do limiar mecânico de retirada da pata..... | 51 |
| Figura 17- | Esquema com a periodicidade da mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata..... | 52 |
| Figura 18- | Esquema com a periodicidade da mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata, após a aplicação da estimulação elétrica transcutânea do nervo..... | 52 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 19- | Esquema com a periodicidade da mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata, pós injeção da droga e a administração da estimulação elétrica transcutânea do nervo..... | 53 |
| Figura 20- | Imagens por imunofluorescência de receptores CB1, mostrando a expressão do receptor em neurônios na SCPd.I. e no corno dorsal da medula espinal..... | 71 |
| Figura 21- | Esquema do envolvimento do sistema endocanabinóide na antinocicepção induzida pela TENS de baixa frequência (TB) ou de alta frequência (TA), demonstrando esse efeito a partir da via descendente inibitória da dor, especificada pelos locais de atuação..... | 84 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Gráfico 1- | Efeito de diferentes concentrações de células tumorais de Ehrlich sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata avaliado pelo teste de filamentos de Von Frey..... | 57 |
| Gráfico 2- | Efeito da TENS de alta e baixa frequência sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata em gramas , avaliado filamento de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$ | 58 |
| Gráfico 3- | Efeito da TENS de baixa frequência (A) e alta frequência (B) após injeção i.pl. do AM251 sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata, pelo teste de filamentos de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$ | 60 |
| Gráfico 4- | Efeito da TENS de baixa frequência (A) e alta frequência (B) com a injeção intratecal (i.t.) do antagonista do receptor CB_1 (AM251), sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata, pelo teste de filamentos de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$ | 62 |
| Gráfico 5- | Efeito da TENS de baixa frequência (A) e alta frequência (B) com a injeção intra substância cinzenta periaquedutal dorso lateral (i.SCPd.l.) do antagonista do receptor CB_1 , AM251 sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata, pelo teste de filamentos de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$ | 63 |
| Gráfico 6- | Efeito da administração intraplantar (i.p.l) do MAFP (inibidor da enzima que degrada Anandamida) sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata, pelo teste de filamentos de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$ | 65 |
| Gráfico 7- | Efeito da administração intratecal (i.t.) do MAFP (inibidor da enzima que degrada Anandamida) sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata, pelo teste de filamentos de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$ | 67 |
| Gráfico 8- | Efeito da administração intra substância cinzenta periaquedutal dorso lateral (i.SCPd.l) do MAFP (inibidor da enzima que degrada Anandamida) sobre o limiar nociceptivo mecânico de | |

| | | |
|-------------------|---|----|
| | retirada da pata, pelo teste de filamentos de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$ | 68 |
| Gráfico 9- | Detecção por Western Blot da expressão de receptor CB1 a nível central (SCP e medula) e na periferia (pata) pós aplicação da TENS de alta ou baixa frequência..... | 69 |
| Gráfico10- | Co-localização através de ensaio de imunofluorescência de receptores CB ₁ a nível supra medular: substância cinzenta periaquedutal (SCP) e medular após a aplicação da TENS de alta ou baixa frequência..... | 71 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|---|
| AC | - Adenilil Ciclase |
| AEA | - Anandamida |
| AM 251 | - (N-(peperidina-1-il) -5-(4-iodofenil) -1-(2,4-diclorofenil) -4-metil-1H-pitazole-3-carboxamida) |
| AM 404 | - N- araquidonoilaminofenol |
| AMPC | - Monofosfato cíclico de adenosina |
| ASP | - Aspartato |
| ATP | - Trifosfato de Adenosina |
| CB1 | - Receptor para canabinóide do tipo 1 |
| CB2 | - Receptor para canabinóide do tipo 2 |
| CCQ | - Receptor de colecistoquinina |
| DAG | - Diacilglicerol |
| DAGL | - Enzima diacilglicerol lipase |
| DMSO | - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo |
| Ehr | - Tumor de Ehrlich |
| EPM | - Erro padrão da média |
| FAAH | - Ácido graxo amino hidrolase |
| g | - Gramas |
| GABA | - Ácido γ aminobutírico |
| GLU | - Glutamato |
| Hz | - Hertz |
| i.c.v. | - Intra cérebro ventricular |
| i.p. | - Intraperitoneal |

| | |
|-------------------|--|
| i.pl. | - Intraplantar |
| i.RVM | - Intra região rostro ventro medial |
| i.SCP.d.l. | - Intra Substancia Cinzenta Periaquedutal dorso lateral |
| i.t. | - Intratecal |
| i.v. | - Intra venoso |
| IASP | - Associação Internacional para o Estudo da Dor |
| LPS | - Lipopolissacarídeo |
| M | - Receptor muscarínicos |
| m/s | - Milissegundo |
| MAFP | - Ácido metil araquidonil fluorfosfano/ (5Z, 8Z, 11Z, 14Z) -5, 8, 11, 14-eicosatetraenil-metil ester fosfofluorídrico) |
| MB | - Medida basal |
| MGL | - Monoacilglicerol lipase |
| mL | - Mililitro |
| Mm | - Milímetro |
| RNA | - Ácido ribonucleico |
| mRNA | - RNA mensageiro |
| NAPE | - N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina diacilglicerol |
| NAPE-PLDN | - Fosfolipase D específica que hidrolisa N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina diacilglicerol |
| NMDA | - N-metil <i>D-Aspartato</i> |
| NRM | - Núcleo magno da rafe |
| NRPG | - Núcleo reticular paragigantocelular |
| PBS | - Tampão fosfato salino |
| PE | - Tubo de polietileno |
| PEA | - N-palmitoil-etanolamina |

| | |
|--|---|
| PFA | - Paraformaldeído |
| RIPA | - Radioimuno de precipitação |
| RVM | - Região bulbar rostro ventro medial |
| s.c. | - Subcutâneo |
| SNP | - Sistema nervoso periférico |
| SCP | - Substância Cinzenta Periaquedutal |
| SCPv.l. | - Substância cinzenta periaquedutal ventrolateral |
| SG | - Substância gelatinosa |
| SNC | - Sistema nervoso central |
| TENS | - Estimulação elétrica transcutânea do nervo |
| THC | - Δ^9 tetrahydrocannabinol |
| VEC | - Veículo |
| VPL | - Ventroposterolateral |
| α | - Alfa |
| β | - Beta |
| δ | - Delta |
| μ l | - Microlitro |
| μ g | - Micrograma |
| 2-AG | - 2-Araquidonilglicerol |
| 5HT | - Serotonina |
| 5-HT₂ / 5-HT₃ | - Receptores serotoninérgicos |
| 5HTAA | - Araquidonoil serotonina |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 20 |
| 2.1 | CONSIDERAÇÕES SOBRE A DOR..... | 20 |
| 2.2 | ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA DO NERVO (TENS)... | 25 |
| 2.3 | SISTEMA ENDOCANABINÓIDE..... | 30 |
| 2.3.1 | Sistema endocanabinóide na modulação da dor | 34 |
| 3 | OBJETIVOS | 37 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 37 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 37 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |
| 4.1 | ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO..... | 38 |
| 4.2 | DROGAS..... | 39 |
| 4.3 | ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS..... | 39 |
| 4.4 | INDUÇÃO DO MODELO DE DOR..... | 46 |
| 4.5 | ADMINISTRAÇÃO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA DO NERVO (TENS)..... | 47 |
| 4.6 | AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO..... | 49 |
| 4.7 | DELINEAMENTO DO ESTUDO..... | 51 |
| 4.8 | ANÁLISE DE WESTERN BLOT..... | 53 |
| 4.9 | IMUNOFLUORESCÊNCIA..... | 54 |
| 4.10 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 55 |
| 5 | RESULTADOS | 56 |
| 5.1 | EFEITO DA INJEÇÃO DO TUMOR DE EHRLICH SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO DE RETIRADA DE PATA..... | 56 |

| | | |
|-----|--|----|
| 5.2 | EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA TENS DE ALTA E BAIXA FREQUÊNCIA..... | 57 |
| 5.3 | EFEITO DO AM251 NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA TENS DE BAIXA E ALTA FREQUÊNCIA..... | 59 |
| 5.4 | EFEITO DO MAFP NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA TENS DE BAIXA E ALTA FREQUÊNCIA..... | 64 |
| 6 | DISCUSSÃO | 72 |
| 7 | CONCLUSÃO | 84 |
| | REFERÊNCIAS | 85 |

1 INTRODUÇÃO

A dor é um mecanismo adaptativo de caráter protetor que proporciona às diversas espécies garantirem a sobrevivência, uma vez que, são capazes de reconhecer estímulos nocivos e desencadear respostas fisiológicas e comportamentais adequadas de proteção (WALTERS, 2009). Por outro lado, quando esse sintoma se torna patológico, prejudica consideravelmente a qualidade de vida e estima-se que 30% da população de um país sofra com esse sintoma sendo necessário intervenções para controlá-la. Sendo assim, o tratamento farmacológico é atualmente o mais utilizado para minimizar os sintomas oriundos da dor, entretanto esse recurso provoca muitos efeitos colaterais, alguns medicamentos são de difícil acesso além de possuírem um alto custo financeiro. Nesse contexto, recursos não farmacológicos ganham destaque, uma vez que a grande maioria envolve baixo custo financeiro, boa eficácia analgésica e pouquíssimos efeitos colaterais. (PALCE et al., 2010),

Dentro desses recursos não farmacológicos, destaca-se a estimulação elétrica transcutânea do nervo, que devido a sigla derivada do nome em inglês (*Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation*) é conhecido popularmente como TENS. A TENS é um método não invasivo de fácil aplicabilidade e com resposta analgésica comprovada (DESANTANA et al., 2009). Além disso, a TENS consiste na aplicação de estímulo elétrico a partir de eletrodos próprios colocados sobre a pele e é comumente utilizado no tratamento de dores agudas e crônicas (DESANTANA et al., 2008).

Em relação a resposta analgésica proporcionada pela TENS, estudos sugerem que esse efeito está relacionado tanto a nível central quanto ao periférico e os mecanismos neurofisiológicos são evidenciados principalmente pela liberação de neurotransmissores endógenos e consequente ativação de seus respectivos receptores. (VANCE et al., 2014).

No entanto, apesar de diversos estudos salientarem a eficácia analgésica proporcionada pela TENS, os mecanismos envolvidos que explicam esse efeito antinociceptivo ainda não estão completamente esclarecidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os tópicos a seguir, apresentam o embasamento teórico e contextualizações referentes aos temas de maior relevância nesse estudo.

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A DOR

A ciência descreve a dor como uma modalidade sensorial importante na evolução do indivíduo, cuja principal função é a comunicação de danos estruturais ou funcionais do corpo, através de informações concernentes à localização e à intensidade dos estímulos nocivos e potencialmente lesivos, de forma que alguma reação de defesa possa ser tomada, evitando danos maiores e preservando a integridade do indivíduo (MILLAN, 1999).

Assim, a dor foi conceituada, em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), como “uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada com lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões” (MERSKEY, H.; BOGDUK, N, 1994).

Nesse sentido, essa reação pode ser considerada uma experiência subjetiva complexa, que não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo ambiental, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Nesse contexto, existe uma diferença conceitual quando utiliza-se os termos nocicepção e dor. O primeiro conceito consiste na recepção e decodificação do estímulo nocivo por estruturas altamente especializadas do sistema nervoso denominados: nociceptores. Essas estruturas consistem em terminações nervosas livres associadas a fibras aferentes primárias (carreiam estímulo nociceptivo da periferia à medula) com características distintas (limiar de ativação e sensibilidade) em relação a outras estruturas nervosas sensoriais. Entre essas fibras aferentes temos as do tipo C e A δ , que possuem um menor calibre e estão relacionadas à transdução e condução do estímulo nocivo, vale ressaltar que as fibras C são

amielinizadas (ausência de mielina, uma camada de revestimento rica em lipídios e proteínas que possuem nódulos de Ranvier o qual, proporcionam aumento da velocidade de condução do estímulo pela fibra) e as fibras A δ apresentam mielina e possuem uma maior velocidade de condução do impulso nervoso em relação a fibra C (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Na medula espinal, essas fibras aferentes primárias fazem sinapse com neurônios de segunda ordem, que por sua vez, ascendem a áreas supra-espinhais por meio tratos neuronais específicos, como por exemplo, o trato espinotalâmico. Assim, os neurônios de segunda ordem farão no tálamo uma segunda sinapse com neurônios de terceira ordem, os quais enviarão a informação nociceptiva até as áreas específicas do córtex cerebral, onde aspectos como intensidade, localização e duração do estímulo nociceptivo serão integrados e componentes afetivos e emocionais serão interpretados e contextualizados, proporcionando a percepção da dor (VANDERAH, 2007). Figura 1.

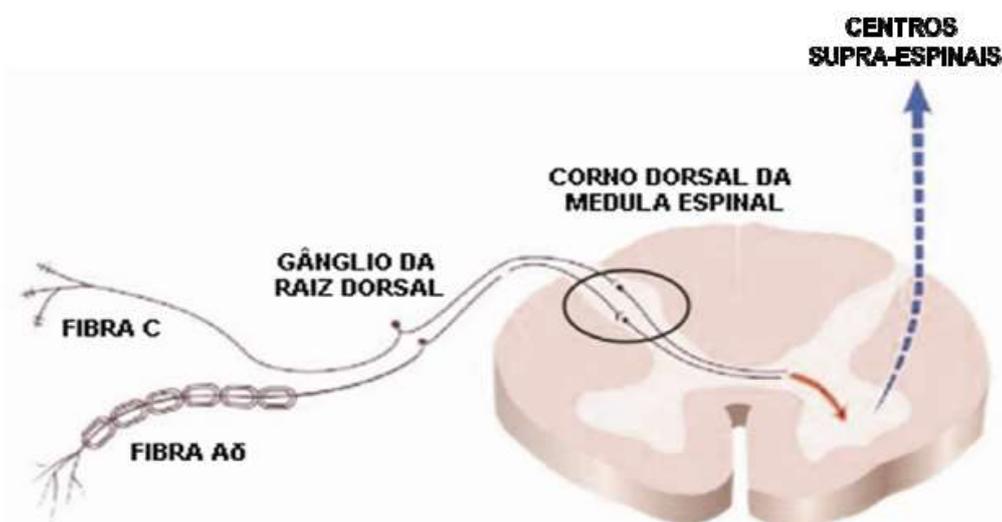


Figura 1- Via ascendente da nocicepção.

Fonte: Adaptado de LONG-BALINOT, 2010.

Nota: Os axônios das fibras aferentes primárias (C e A δ) que inervam as regiões periféricas transmitem o impulso nociceptivo até as lâminas do corno dorsal da medula espinal, onde neurônios de segunda ordem repassam a informação para tratos neurais ascendentes.

Existem também as fibras A β que são mielinizadas, mais calibrosas e detectam estímulos inócuos aplicados na pele, músculos e articulações e em condições fisiológicas não são relacionadas à transmissão dolorosa (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Em continuidade à contextualização da dor, de acordo com o protocolo de terminologia básica proposta pela IASP, existem terminologias que estão diretamente relacionadas com essa sintomatologia como a "hiperalgesia" que é um termo psicofísico utilizado para todas as condições que envolvem aumento da sensibilidade à dor. Como tal, essa definição correlaciona-se com o termo "sensibilização" que é uma redução no limiar nociceptivo e um aumento na resposta a diferentes estímulos supra limiares. É também importante ressaltar a terminologia "Alodínia", que é mediada pela ativação periférica de receptores táteis, que tornam-se processadas por características nociceptivas, sendo assim, há a percepção da dor em resposta a um estímulo periférico normalmente inócuo (LOESER, 2008).

Em adição, a dor também pode ser classificada como: dor inflamatória (envolve estruturas somáticas, caracterizada por intensa hipersensibilidade); dor visceral (caracterizada por ser profunda, mal localizada e, frequentemente referida a uma região cutânea) e dor neuropática (envolvendo lesões do sistema nervoso) (SCHAIBLE, 2006).

É importante também, a caracterização temporal da dor, fazendo distinção entre dor aguda, que tipicamente surge do trauma de tecidos moles ou inflamação e está relacionada com um processo adaptativo biológico para facilitar o reparo tecidual e cicatricial, ou dor crônica, que persiste além do período esperado de uma doença ou lesão e tem sido arbitrariamente definida como aquela com duração maior que 3 a 6 meses (LAMONT; TRANQUILLI, 2000).

O fenômeno da dor é dinâmico, uma vez que, ao longo de todo trajeto nervoso, as aferências nociceptivas recebem inúmeros estímulos excitatórios e inibitórios de diferentes mecanismos de modulação da dor que podem ocorrer no sistema nervoso periférico (SNP) pela ação de neuromoduladores como bradicinina, prostaglandina e serotonina, e no sistema nervoso central (SNC) pela transmissão de neurotransmissores como noradrenalina, serotonina, encefalina e dopamina (SOUZA, 2009).

Em relação à esses mecanismos de modulação da dor, existem teorias como a Teoria do Portão da Dor, (figura 2) a qual admite existir nos cornos posteriores da medula espinal um mecanismo neuronal que atua como "portão", podendo aumentar

ou diminuir impulsos provenientes de fibras aferentes nociceptivas periféricas às regiões supraespinais, ocorrendo então uma resposta reguladora, mesmo antes de acontecer a interpretação desse impulso como uma resposta dolorosa (MELZACK; WALL, 1965; MILLAN, 1999).

De acordo com essa teoria, Melzack e Wall (1965), explicam que a ativação de nociceptores periféricos e a consequente estimulação das fibras nociceptivas aferentes que levam esse estímulo até o corno dorsal da medula, mais especificadamente na lâmina II (substância gelatinosa- SG), pode ser inibida pela ativação de fibras táteis do tipo $A\beta$, as quais são muito mielinizadas e conduzem o estímulo mais rapidamente que as fibras nociceptivas até essa área da medula, onde irão ativar interneurônios inibitórios, que por sua vez, irão modular e regular a sinapse entre as fibras aferentes nociceptivas primarias e os neurônios de segunda ordem responsáveis pela transmissão do estímulo ao SNC, através do trato espinotalâmico. Dessa maneira, o estímulo aferente que anteriormente seria nociceptivo passa a ser minimizado e/ou inibido.

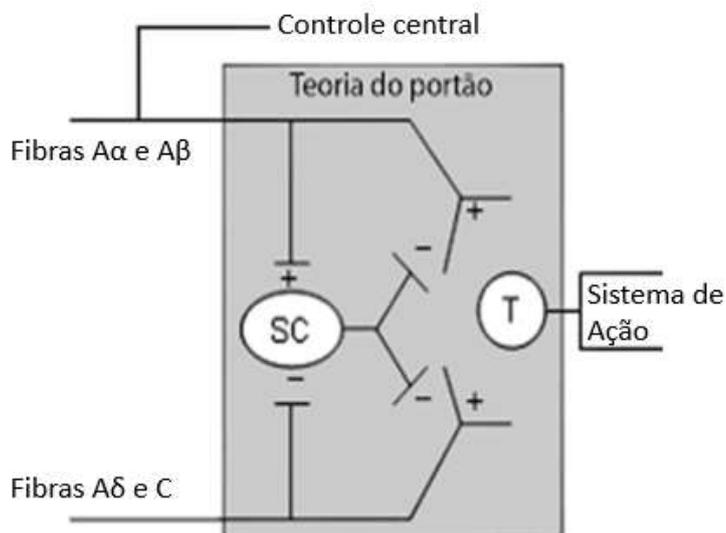


Figura 2- Esquema representativo da teoria do portão da dor.

Fonte: Adaptado MELZACK, 1999.

Nota: Observa-se as fibras não nociceptivas ($A\alpha$, $A\beta$) ativando interneurônios na substância gelatinosa (SG), os quais inibem os impulsos provenientes das fibras nociceptivas ($A\delta$ e C).

Outra teoria que enfatiza a modulação da dor está relacionada à ativação a nível central de uma via inibitória descendente a partir da Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP). Essa teoria foi inicialmente estudada por Reynolds (1969), o qual observou que a estimulação elétrica na substância cinzenta periaquedutal (SCP), produzia analgesia intensa em ratos *Wistar* (TOKADA et al., 2004).

Sendo assim, quando a SCP é estimulada, por meio dos próprios estímulos nocivos ascendentes oriundos também do trato espinomesencefálico, ativa um circuito que excita uma área do bulbo denominada região rosto ventro medial (RVM), que compreende o núcleo magno da rafe (NRM) e o núcleo reticular paragigantocelular (NRPG), a partir daí, por fibras que percorrem o funículo dorsolateral da medula espinal, formando conexões com interneurônios do corno dorsal na medula. Essas células nervosas atuam modulando estímulos nociceptores ascendentes através da liberação de neurotransmissores (figura 3), de modo que esse sistema inibitório descendente possa fazer parte de uma alça de retroalimentação reguladora, através da qual a transmissão pelo corno dorsal é controlada de acordo com os estímulos que alcançam a região do tálamo (MILLAN, 2002).

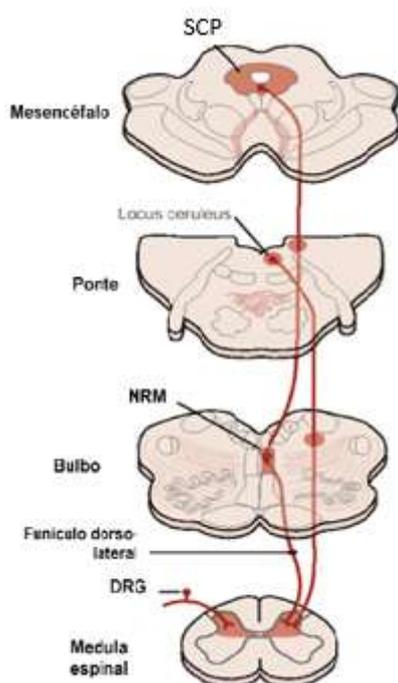


Figura 3- Via descendente inibitória da dor e principais áreas envolvidas no controle descente. SCP:

Fonte: adaptado de KANDEL, 2000.

Nota: SCP: substância cinzenta periaquedutal; NRM: núcleo magno da rafe; DRG: gânglio da raiz dorsal.

Além desses controles endógenos para a modulação da dor, existem também alternativas exógenas como a morfina, iniciada no século XIX, um alcalóide isolado a partir do ópio, que representou um significativo avanço dentro da terapia da dor. A partir desse advento, com o desenvolvimento de novos analgésicos, e após o surgimento da seringa e da agulha em 1846, essas drogas começaram a ser utilizadas para o controle da dor durante procedimentos cirúrgicos e não cirúrgicos. No entanto, devido aos inúmeros gastos econômicos e efeitos adversos oriundos da terapia farmacológica para o controle da dor, outros tipos de tratamentos, como os tratamentos não farmacológicos, tem obtido cada vez mais importância os quais destacam a cinesioterapia, hidroterapia, termoterapia e principalmente a estimulação elétrica transcutânea do nervo (BONICA; LOESER, 2001).

2.2 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA DO NERVO (TENS)

A utilização do estímulo elétrico para fins terapêuticos, é datada inicialmente em 2.500 A.C., onde há evidências de que os antigos egípcios usavam peixe eletrogênico para tratar doenças. Posteriormente, o médico romano *Scribonius Largus* é creditado como primeiro a documentar a utilização desses peixes eletrogênicos para esses fins em 46 D.C. Além disso, com o desenvolvimento de geradores eletrostáticos no século XVIII, as pesquisas envolvendo o recurso elétrico aumentaram. Em 1858, Francis, recebeu uma patente da Associação de estudo dos Cirurgiões Dentistas dos E.U.A, após desenvolver um instrumento magnético vibratório com corrente interrupta que propiciava analgesia em seus procedimentos odontológicos. Em seu trabalho ele descreveu 164 extrações de dente indolores realizadas juntamente com a aplicação dessa corrente. (KANE; TAUB, 1975).

Após um longo período sem grandes estudos a respeito do uso de energia elétrica para fins terapêuticos, esse tema volta a despertar interesse em 1965, suportado pela hipótese do mecanismo demonstrado por Melzack e Wall (1965), que idealizaram a teoria das portas. Essa teoria sugere a importância da estimulação de fibras não nociceptivas de maior calibre na modulação da dor. Nesse mesmo enfoque, Wall e Sweet (1967), usando uma estimulação elétrica percutânea de alta frequência (50-100 Hz), observaram o alívio da dor crônica em pacientes. Além disso,

Reynolds (1969), utilizou a corrente elétrica para estimular a SCP em ratos, concluindo que a estimulação somente nesse local induziu analgesia, sem que o estímulo fosse aplicado em todo o cérebro.

Atualmente, a TENS tem sido o estímulo elétrico mais utilizado clinicamente com objetivo de modular a dor. Esse recurso é definido pela “*American Physical Therapy Association*” como a aplicação de estímulos elétricos na superfície cutânea para controle algico. A TENS trata-se de um aparelho amplamente utilizado na prática clínica fisioterapêutica como terapia analgésica simples, o qual tem algumas vantagens como não ser um tratamento farmacológico e invasivo, além de possuir baixo custo financeiro. (SLUKA et al. 2003).

De acordo com Orange (2003), a TENS é um recurso seguro que modula a dor, favorecendo ao indivíduo a execução de suas atividades de via diária. Sua aplicabilidade consiste de um estimulador sensitivo, pelo qual os impulsos da corrente são transmitidos através da pele por meio de eletrodos com auxílio de gel a base de água para não haver interrupções nessa transmissão.

Segundo Claydon e colaboradores (2011), essa supressão da dor proporcionada pela TENS, pode ocorrer a nível periférico através de ativação de receptores noradrenérgicos do tipo $\alpha 2A$ ou de receptores opióides do tipo μ , os quais uma vez ativados podem modular a excitabilidade de fibras nociceptivas aferentes primárias.

Quando verificado a atuação da TENS a nível medular, após a aplicação, principalmente da alta frequência, há uma redução da liberação de neurotransmissores excitatórios como glutamato e substância P, em ratos com modelo de inflamação intra articular (joelho) por carragenina. A redução de glutamato é revertida pelo bloqueio espinal de receptores com a administração i.t de naltrindole (antagonista receptor δ opióides) (SLUKA et al., 2005). No entanto, a nível supra medular, a antinocicepção ocorre principalmente pela estimulação da via inibitória descendente da dor, com consequente ativação de receptores opióides, gabaérgico, serotoninérgicos e muscarínicos no corno dorsal da medula (VANCE et al., 2014);

Esse esclarecimento é elucidado com o bloqueio dos receptores μ opióides (DeSANTANA et al., 2009), dos receptores GABA, de serotonina (5-HT_{2A} e 5-HT₃) e dos receptores colinérgicos (M₁ e M₃), por meio da injeção i.t. na medula espinal de ratos, onde verificaram reversão do efeito antinociceptivo proporcionado pela TENS (RADHAKRISHNAN et al., 2003).

Sendo assim, umas das primeiras teorias mais vigentes para justificar o mecanismo de analgesia proporcionado pela TENS é a teoria das comportas. Em concordância com essa teoria, estudos sugerem que a TENS estimula as fibras sensoriais do tipo A β e proporciona analgesia através da ativação dos interneurônios inibitórios situados no corno dorsal da medula. Esse processo de redução ou minimização da transmissão da dor é conhecido como neuromodulação (YAKSH et al., 1994; SLUKA; WALSH, 2003).

Dando ênfase na analgesia proporcionada pela TENS pela ativação da teoria das comportas, Woolf e Thompson (1994), sugerem que as características eletrofisiológicas da TENS relacionam-se a parâmetros como a frequência utilizada, duração do pulso e tempo de aplicação. A alteração desses parâmetros pode ativar de maneira seletiva diferentes fibras nervosas, além de promover estímulos musculares que tendem a produzir resultados analgésicos de características temporais diferentes, principalmente por meio da ativação de fibras nervosas de maior diâmetro como A β e A α que têm baixo limiar de ativação a estímulos elétricos quando comparada com fibras de menor diâmetro (A δ e C) (WOOLF E THOMPSON, 1994).

Além da teoria das comportas, alguns estudos mostram que a TENS é capaz de ativar o sistema descendente inibitório da dor e modular a atividade dos neurônios envolvidos na transmissão de impulsos nociceptivos situados no corno dorsal da medula pela liberação de opióides endógenos (SLUKA et al., 2003; CARROL et al., 2005).

Para proporcionar esse efeito, a TENS possui parâmetros que são utilizados de acordo a especificidade do tratamento. Inicialmente, a TENS era classificada em quatro modalidades: convencional (apresentando baixa intensidade e alta frequência, entre 10 a 200 Hz), acupuntura (alta intensidade e baixa frequência, entre 2 a 4 Hz), burst (alta intensidade e frequência entre 70 e 100 Hz, com modulações de pulso de 0,5ms) e breve-intensa (alta intensidade e frequência entre 100 e 150 Hz). Atualmente, há uma tendência em classificá-la em apenas de baixa frequência (<10Hz) ou de alta frequência (>50Hz) (DESANTANA et al., 2008).

Em relação às essas frequências, estudos sugerem que quando é utilizada a alta frequência há uma atuação das fibras A β , com consequente ativação da teoria das comportas a nível medular (SLUKA et al., 2003). Estudo realizado por Lee e colaboradores (1985), investigou a inibição de células do trato espinotalâmico pela TENS em sete macacos anestesiados. As células desse trato eram ativadas por

estimulação do nervo fibular comum em uma intensidade supra limiar para fibras C. As respostas evocadas por essas fibras eram comparadas antes, durante e após a aplicação da TENS durante cinco minutos. Em quatorze células do trato espinotalâmico, alguns graus de inibição de fibras C ocorriam somente quando a intensidade da TENS excedia o limiar de fibras A δ . Para algumas intensidades de estímulo, “pulsos” de baixa frequência, eram mais efetivos que os de alta frequência. De acordo com esse trabalho, a TENS era mais efetiva quando aplicada dentro do campo receptivo dessas células e que a ativação de fibras do tipo C, registrada a partir do nervo periférico, não foi reduzida em magnitude, e não houve mudanças em sua latência devido a TENS. Com isso, a inibição da atividade de células do trato espinotalâmico não foi alterada apreciavelmente após injeção do cloridrato de naloxona. Esse estudo sugere que a TENS pode produzir inibição no sistema nervoso central (SNC), por ativarem fibras aferentes A δ e que os efeitos inibitórios da TENS nas células do trato espinotalâmico ocorreu devido a um mecanismo que não envolvesse liberação de substâncias opióides endógenas.

Abrangendo ainda a relação das frequências na analgesia proporcionada pela TENS, Salar e colaboradores (1981), demonstraram que a TENS de alta frequência aumenta a concentração de β endorfinas na corrente sanguínea e no líquido cefalorraquidiano e metionina-encefalina no líquido cefalorraquidiano, em humanos.

Além disso, antinocicepção produzida pela TENS de alta frequência foi inibida pelo bloqueio de receptores δ opióides, muscarínicos (M1 e M3) e receptores para GABA na medula espinal. Já, a redução da hiperalgesia pela TENS de baixa frequência foi inibida pelo bloqueio dos receptores μ opióides, GABA_A, serotoninérgicos (5-HT₃) e muscarínicos (M1 e M3) nesse mesmo local (DeSANTANA et al., 2009; RADHAKRISHNAN et al., 2003, KALRA et al., 2001, SLUKA et al., 1999).

Assim, esses estudos sugerem que a TENS alta e baixa frequência proporcionam seus efeitos antinociceptivos pela ativação dos receptores muscarínicos, δ e μ opióides e na medula e receptores δ e μ na RVM. Além disso, a TENS de baixa frequência liberta serotonina na medula espinal e ativa os receptores serotoninérgicos 5HT₂ e 5HT₃, e a TENS de alta frequência libera GABA que ativa receptores GABA_A. Contudo, ambas as frequências, reduziram a sensibilização neuronal no corno dorsal da medula e a consequente hiperalgesia (MA E SLUKA, 2001). Em suma, a TENS de alta e baixa frequência utilizam mecanismos opióides

para produzir analgesia pela ativação de neurônios na SCP, na RVM e na medula espinal (DeSANTANA et al., 2009) (Figura 4).

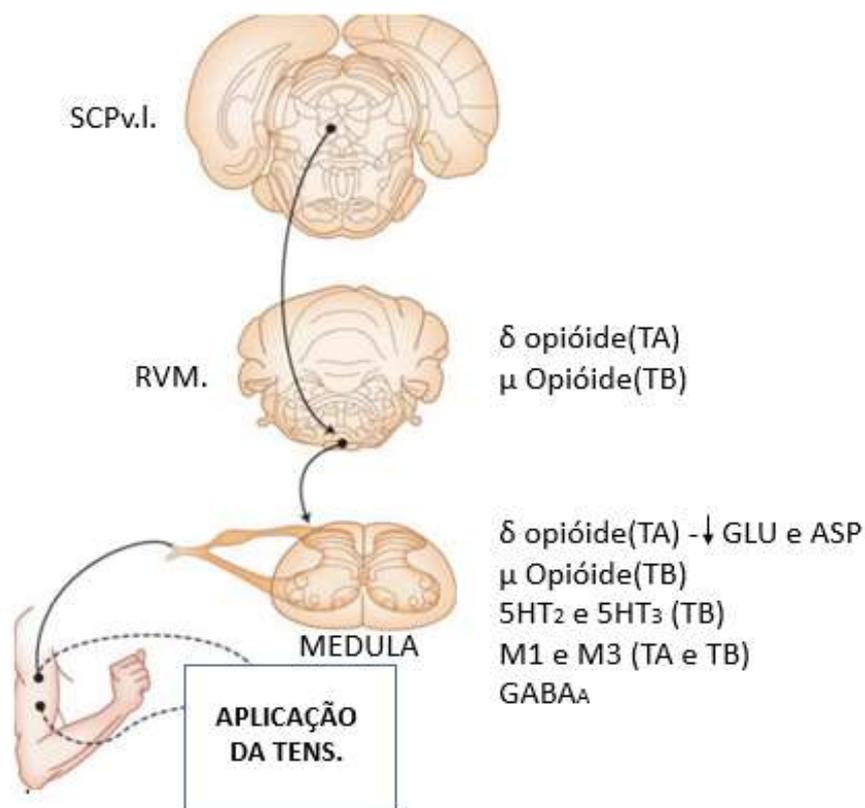


Figura 4 – Ilustração dos possíveis caminhos ativados pela TENS de baixa frequência (TB) ou de alta frequência (TA).

Fonte: Adaptado DESANTANA et al., 2009.

Nota: Projeções da substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (SCPv.I.) enviam informações para a medula rostro ventro medial (RVM), que por sua vez envia projeções para a medula espinal promovendo a modulação da nocicepção. Receptores envolvidos na antinocicepção produzida pela TENS são listados em cada local. 5HT- serotonina; ASP- aspartato; GABA - Ácido γ aminobutírico; Glu- glutamato; M receptor muscarínicos.

Entretanto, vale ressaltar que o bloqueio dos receptores serotoninérgicos ou noradrenérgicos na medula espinal não alterou a reversão da hiperalgesia produzida pela TENS de alta frequência (RADHAKRISHNAN et al., 2003).

Desse modo, novas vias envolvidas na antinocicepção proporcionada pela TENS poderão ainda ser descobertas. Seguindo esse raciocínio, o presente estudo objetivou

investigar a participação do Sistema Endocanabinóide no efeito antinociceptivo induzido pela TENS em modelo de dor inflamatória.

2.3 SISTEMA ENDOCANABINÓIDE

Um dos primeiros indícios do uso terapêutico de canabinóides foi descrito por *Carolus Linnaeus* em 1753, o qual relatou que a folha e a flor da *Cannabis sativa* eram utilizadas para uso medicinal há milhares de anos. A *Cannabis sativa* possui mais de 60 compostos terpenofenólicos denominados canabinóides, cujo, o principal princípio ativo é o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC). Esse princípio ativo possui uma característica lipofílica e por esse motivo acreditavam-se, a princípio, que seu mecanismo de ação seria proporcionado pela interação e modificação da fluidez da membrana plasmática. (WILSON; NICOLL, 2002).

No entanto, Howlett (1984), demonstrou que os canabinóides possuíam um outro meio de atuação. Através da cultura de neuroblastoma observou que havia uma diminuição da quantidade de AMPc (Adenosina Monofosfato Cíclico), um mediador intracelular caracterizado como um segundo mensageiro que regula muitos aspectos da função celular, incluindo enzimas envolvidas no metabolismo energético, divisão e diferenciação celular, transporte de íons etc. (HADLEY, 1988). Sugerindo assim, que a ação dos canabinóides fosse por meio de receptores acoplados a proteína G. (HOWLETTET al., 2004).

Novos estudos direcionaram para esse achado e a existência do sistema canabinóide endógeno foi inicialmente investigada em 1988, por meio da técnica de radioimunoensaio realizada em cérebros de ratos, que demonstrou a ligação consistente de um canabinóide exógeno a um receptor associado a um sistema de segundo mensageiro, por meio da proteína G. Além disso, a saturabilidade dessa ligação é consistente com valores reportados para canabinóides (DEVANE et al., 1988).

Logo em seguida, Matsuda e colaboradores (1990), relataram a clonagem e expressão de um DNA complementar, a partir do cérebro de ratos, que codificou um receptor acoplado a proteína G, o qual apresentava todas as propriedades direcionadas para canabinóides (natureza hidrofóbica, envolvimento com a proteína

G, e maior responsividade para canabinóides psicoativos). A partir dessa descoberta, sugeriu-se então, a relação de canabinóides com a superfamília dos receptores acoplados à proteína G, o qual é negativamente acoplado ao Adenilil Ciclase (AC), podendo inibir a conversão do ATP (Trifosfato de Adenosina) em Monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e, conseqüentemente, inibir a abertura de canais de cálcio voltagem-dependente (MATSUDA et al., 1990).

A partir de então, ocorreu a descoberta do primeiro receptor canabinóide, o qual foi descrito como receptor para canabinóide do tipo 1 (CB₁). Dogrul e colaboradores (2012), verificaram que a expressão do CB₁ é mais significativa no sistema nervoso central (SNC), principalmente nas regiões cerebrais envolvendo córtex, hipocampo, amígdala, gânglios basais, substância negra reticular, globo pálido e cerebelo. Além disso, são encontrados também em áreas que estão envolvidas na transmissão e modulação da dor, como na SCP, bulbo rostro ventromedial e no corno dorsal da medula.

No entanto, estudos mostram que há existência desses receptores também na periferia, mais precisamente na glândula adrenal, tecido adiposo, coração, fígado, pulmão, próstata, útero, ovário, testículo, medula óssea, timo e tal dispõem-se preferencialmente pré-sinápticamente nos axônios e terminais de neurônios, mediando a inibição da libertação de neurotransmissores (HOHMANN; HERKENHAM, 1999; GUINDON, 2009).

Com novos estudos e investigações desse sistema, foi descoberto posteriormente um segundo receptor para canabinóide (CB₂), localizado principalmente em regiões do sistema imune responsáveis pela produção e regulação de células imunes (mastócitos, células B, células T4 e T8, e macrófagos), como em baço, amígdalas e timo (PERTWEE; ROSS, 2002; VAN SICKLE et al 2005).

Além disso, estudos utilizando ferramentas farmacológicas e genéticas apontam para a existência de outros receptores canabinóides, entretanto são necessários mais trabalhos para sustentar essa hipótese. (DOGRUL et al., 2012).

Com a descoberta dos receptores canabinóides, questionamentos para possíveis ligantes endógenos ficaram em aberto. Nesse contexto, foi isolado o primeiro "endocanabinóide" a partir de tecido cerebral, descrito como Anandamida (AEA). Logo em seguida, outros endocanabinóides foram isolados, principalmente o 2-Araquidonilglicerol (2-AG). (DEVANE et al., 1992, MECHOULAM et al., 1995).

Ambos AEA e 2-AG se ligam aos receptores para canabinóides do tipo CB₁ e CB₂, apresentando diferentes afinidades e eficácias (HOWLETT, 2002).

Esses endocanabinóides são caracterizados como moléculas de sinalização para lípidos endógenos sintetizados na membrana celular (DI MARZO, 2008). Segundo Jin e colaboradores (2009), diferentes enzimas estão envolvidas na síntese de AEA e 2-AG. Estudos anteriores salientavam que a clivagem enzimática de endocanabinóides fosse somente de um precursor fosfolípide, o N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE), que quando hidrolisado por uma fosfolipase D específica (NAPE-PLD) originava a AEA. No entanto, camundongos *Knockout* NAPE-PLD não mostraram déficit na produção de AEA, sugerindo possivelmente que outras enzimas possam estar envolvidas na biossíntese desse endocanabinóide (LEUNG et al., 2006; LIU et al., 2008).

Em relação a biossíntese do 2-AG, esse é sintetizado a partir da hidrólise do seu precursor diacilglicerol (DAG) pela enzima diacilglicerol lipase (DAGL) (BISOGNO, 2003).

Esse processo de biogênese de endocanabinóides é regulado mediante fatores intrínsecos como a despolarização da membrana, aumento no nível de cálcio intracelulares e o estímulo nos receptores para canabinóides. (DI MARZO, 2008).

Em conjunto, os endocanabinóides possuem propriedades canabimiméticas e após sintetizados ligam ou ativam um ou mais subtipos de receptores (AEA preferencialmente a CB₁). Desse modo, eles estão envolvidos em diferentes funções fisiológicas, como a regulação da ingestão alimentar, imunomodulação, inflamação, analgesia, comportamentos e outras (DI MARZO; DE PETROCELLIS, 2006).

Em suma, a partir da sua síntese no neurônio pós-sináptico, os endocanabinóides são liberados na fenda sináptica de acordo com o aumento de cálcio intracelular. Logo em seguida, ativam os receptores CB₁ e CB₂ no neurônio pré-sinápticos, por meio de um mecanismo de sinalização retrograda, restringindo a atividade neuronal, com consequente inibição de alguns neurotransmissores, como o glutamato. Após ativarem seus receptores, a AEA e 2-AG são removidos da fenda sináptica e direcionadas para dentro do neurônio pós e pré-sináptico, por meio de uma proteína de membrana com função recaptadora (SAITO et al., 2010).

Depois de recapturados aos seus respectivos neurônios, os endocanabinóides serão metabolizados. O metabolismo desses endocanabinóides (AEA e 2-AG) ocorrem através de hidrólise enzimática, pela ação da ácido graxo amino hidrolase

(FAAH) e pela monoacilglicerol lipase (MGL) (GIUFFRIDA et al., 2001; KARLSSON et al., 1997) (Figura 5).

Em adição, estudos verificaram que a administração de inibidores da FAAH e de MGL, promoveu aumento da expressão de endocanabinóides (AEA e 2-AG respectivamente). Além da administração desses inibidores enzimáticos, antagonistas e agonistas de receptores para canabinóides podem auxiliar em estudos a respeito da ativação desse sistema e as diversas funções por ele desempenhada (HOWLETT, 2002).

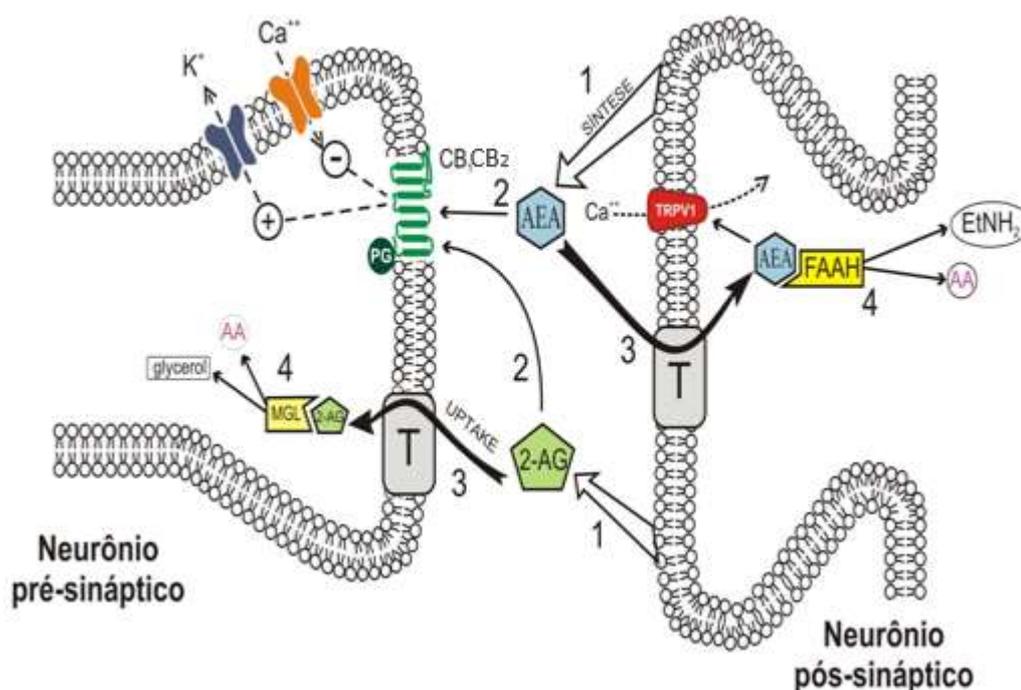


Figura 5 - Representação esquemática do sistema endocanabinóide.

Fonte: Adaptado de Sato et al., 2010.

Nota: AEA: Anandamida / 2-AG: 2-Araquidonilglicerol / FAAH: Ácido Graxo Aminohidrolase / MGL: Monoacilglicerol Lipase / TRPV1: Receptor Vanilóide de Potencial Transitório do Tipo 1 / CB1-CB2: Receptores canabinóides tipo 1 e tipo 2.

2.3.1 Sistema endocanabinóide na modulação da dor

Os receptores para canabinóides e endocanabinóides, bem como as enzimas que controlam sua síntese e degradação, estão localizados em vários níveis do neuro-eixo, envolvendo estruturas tanto da periferia quanto do SNC (Hohmann, 2002).

Sendo assim, Tsou e colaboradores (1998) descrevem a localização dos endocanabinóides e seus respectivos receptores na via de modulação da dor, principalmente em locais como como SCP, NMR, núcleo reticular paragigantocelular e corno dorsal da medula espinal.

A participação desse sistema nessas regiões também foi relatada por Martin e colaboradores (1996), após administrarem por via intravenosa, o agonista canabinóide WIN 55,212-2, que suprimiu a atividade de neurônios presentes no núcleo ventroposterolateral (VPL) do tálamo, evocada por estímulo nocivo mecânico aplicado de maneira gradual sobre a pata em ratos.

Além disso, a analgesia induzida por estresse, em um modelo de estímulo elétrico aplicado nas patas de ratos, foi correlacionada com o aumento da expressão de 2-AG e AEA, principalmente na SCP (HOHMANN et al., 2005).

Outras áreas de modulação do impulso nociceptivo, como o NMR e o núcleo paragigantocelular, têm demonstrado considerável importância na analgesia frente a agonistas canabinóides sintéticos, uma vez que, a administração direta desses agonistas nessas áreas, aumentou a latência da retirada da cauda no teste *tail-flick*, correlacionando esse efeito à antinocicepção. No entanto, a administração desses agonistas na região ventrolateral ou anterior da SCP não alterou a latência de retirada da cauda (MARTIN et al., 1998).

Em adição, estudos eletrofisiológicos também têm auxiliado a desvendar a participação dessas áreas no mecanismo da antinocicepção induzida por essas substâncias. Esses registros têm fornecido uma evidência direta que os canabinóides exógenos podem modular as células *ON– OFF*, situadas no bulbo rostral ventromedial (RVM) do tronco encefálico, as quais aumentam ou inibem o impulso nociceptivo (MENG; JOHANSEN, 2004).

Meng e colaboradores (1998), demonstraram também que a antinocicepção produzida em ratos após a administração i.v. de WIN55,212-2 (agonista do receptor canabinóide), foi bloqueada nos animais que receberam uma pré microinjeção na

RVM de muscimol (agonista do receptor GABA_A) quando comparado ao grupo controle, formado por animais que não receberam o muscimol. Sugerindo uma interação entre os sistemas gabaérgico e canabidinoidérgico na via descendente da dor, uma vez que quando ativado o sistema gabaérgico, não há atividade canabinoidérgica. Além disso, estudos tem demonstrado que os receptores CB₁ inibem a ação inibitória do GABA na SCP, facilitando a ativação da via descendente da dor.

A nível medular, quando investigado por meio de um ensaio de imunofluorescência, observou-se a presença expressiva do receptor CB₁, principalmente nas lâminas I e II da medula espinal, sugerindo a importância dessa área como um sítio de atuação dos endocanabinóides, com consequente função de modulação do processamento nociceptivo (FARQUHAR-SMITH et al., 2000).

Borsani e colaboradores (2007), sugerem que esse a AEA, assim como receptor CB₁, também estão envolvidos na modulação da dor a nível medular, uma vez que o aumento da expressão de c-fos (um marcador da ativação neuronal) no corno dorsal da medula, induzida pelo teste da formalina (teste algésimétrico caracterizado pela injeção de um agente álgico na pata de roedores, os quais respondem lambendo a pata testada), foi reduzido pelo pré-tratamento com o AM 404 (inibidor da recaptção de Anandamida).

Além disso, Petrosino e colaboradores, (2007), encontraram um aumento dos níveis de AEA e 2-AG tanto na medula espinal quanto em regiões supra medulares como o núcleo dorsal da rafe, SCP e RVM, após indução de neuropatia em ratos. Sugerindo que esses endocanabinóides são regulados positivamente durante uma constrição do nervo ciático.

Periféricamente, um estudo utilizando a técnica de imunohistoquímica, demonstrou a existência de receptores de canabinóides tanto CB₁ quanto CB₂ na pele humana, mais precisamente em algumas estruturas como: fibras nervosas da pele, mastócitos, glândulas sudoríparas e células sebáceas. Sugerindo a presença desse sistema a esse nível (STÄNDER et al., 2005).

Ao investigar antinocicepção, Mitirattanakul e colaboradores (2006) também evidenciaram o envolvimento do sistema endocanabinóide a nível periférico. Isso foi demonstrado após a indução de neuropatia em ratos, onde receptores para canabinóides e seus ligantes endógenos apresentaram uma maior expressão no gânglio da raiz dorsal dos nervos periféricos ipsilateral à lesão.

Romero e colaboradores (2013), demonstraram que endocanabinóides (AEA e N-palmitoil-etanolamina - PEA) promoveram antinocicepção periférica pela ativação de receptores CB₁ e CB₂. Além disso, os autores verificaram que esse efeito está relacionado com a ativação do sistema noradrenérgico endógeno, por meio da ativação de receptores adrenérgicos periféricos pela liberação de noradrenalina endógena. Para isso, foi demonstrado que, os antagonistas de adrenoceptores seletivos (α_{2C} – rauwolscine; β – propranolol) e não seletivos (α_2 - ioimbina; α_1 prazosina) promoveram um bloqueio dessa antinocicepção induzida pela AEA e PEA.

Assim, sabendo que o sistema endocanabinóide tem um papel importante na antinocicepção, esse estudo investigará a hipótese de sua participação na antinocicepção induzida pela TENS.

3 OBJETIVOS

Nesse capítulo delinearíamos os objetivos propostos para esse estudo

3.1 OBJETIVO GERAL:

- Investigar a participação do sistema endocanabinóides na antinocicepção induzida pela TENS de alta e baixa frequência em modelo de dor.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Investigar farmacologicamente a participação de receptores para canabinóides do tipo 1 e de endocanabinóides no efeito antinociceptivo induzido pela TENS de alta e baixa frequência;
- b) Avaliar a expressão de receptores canabinóides do tipo 1 ao nível periférico e central após a aplicação da TENS em modelo de hiperalgisia inflamatória;
- c) Verificar a co-localização de receptores canabinóides do tipo 1 ao nível periférico e central após a aplicação da TENS em modelo de hiperalgisia inflamatória.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado e conduzido de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) / Minas Gerais/ Brasil, sob o protocolo n°: 557/2014.

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para a realização dos experimentos utilizamos camundongos macho *Swiss*, pesando entre 25 e 30 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Esses animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, luzes acesas às 7:00h), com livre acesso à ração e água antes dos experimentos. Os animais foram transferidos do biotério para a sala de ambientação no mínimo dois dias antes dos experimentos e agrupados em um número máximo de 4 a 6 animais por caixa.

Os experimentos foram realizados aproximadamente entre 7:00 e 15:30 horas em sala silenciosa, mantendo o controle da temperatura a 23°C . Para isso, a medida basal do limiar nociceptivo era realizada às 8:00, em seguida administrado i.pl. o tumor de Ehrlich e após duas horas e meia os camundongos eram anestesiados para aplicação da TENS, por vinte minutos. Os limiares nociceptivos seguintes foram mensurados aproximadamente às 11:30, 13:30 e 15:30, que equivalem respectivamente à terceira, quinta e sétima hora após a injeção do modelo de dor.

Os animais foram divididos em grupos homogêneos e subdivididos em: Controles (caracterizado por injeção intraplantar (i.pl.) de salina ou veículo (VEC) e com Células (caracterizado pela injeção i.pl. do Tumor de Ehrlich conforme protocolo descrito adiante). Também foram utilizados grupos similares aos descritos anteriormente, porém estes receberam drogas pré-injetadas pelas vias; i.pl., intratecal, (i.t.), ou intra Substancia Cinzenta Periaquedutal dorso lateral (i.SCPd.l.), o antagonista do receptor para canabinóide do tipo 1 (CB_1) ou o inibidor do ácido graxo amino hidrolase (FAAH).

4.2 DROGAS

Para a investigação da participação de receptores canabinóides e endocanabinóides na antinocicepção induzida pela TENS foram utilizadas as seguintes drogas:

- **AM 251** (N-(peperidina-1-il) -5-(4-iodofenil) -1-(2,4-diclorofenil) -4-metil-1H-pitazole-3-carboxamida) (TOCRIS® - USA): Antagonista para o receptor CB₁. Diluído em solução salina (0,9%) com 2% de DMSO.

- 15; 30; 60 µl – (i.pl.);

- 0,5; 1,0; 2,0 µl – (i.t.);

- 0,5; 1,0; 2,0 µl - (i.SCPd.I.)

- **MAFP** (ácido metil araquidonil fluorfosfano/ (5Z, 8Z, 11Z, 14Z) -5, 8, 11, 14-eicosatetraenil-metil ester fosfofluorídrico) (TOCRIS® - USA): inibidor do ácido graxo amino hidrolase (FAAH). Diluído em salina (0,9%) com 3% de álcool.

- 0,5; 1,0; 2,0 µl – (i.pl.);

- 0,25; 0,50; 1,0 µl – (i.t.);

- 0,1; 0,2; 0,4 µl – (i.SCPd.I.)

4.3 ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS:

As drogas utilizadas nesse estudo foram administradas em três diferentes vias:

- Via intraplantar (i.pl.): Essa via foi utilizada para verificar a participação ao nível periférico do receptor CB₁ e endocanabinóides na antinocicepção induzida pela TENS. Para esse procedimento foi utilizada uma seringa hipodérmica com agulhas 13 x 0.4 mm (BD®, Brasil), pela qual as drogas foram injetadas na região plantar da pata direita do animal, no volume de 0,05 ml. Para os grupos controle, foram administrados solução salina (0.9%), ou seu respectivo veículo diluente, no mesmo volume. Para tal procedimento, os animais foram anestesiados com isoflurano 2%, por meio de um sistema de analgesia inalatória utilizando um vaporizador calibrado, a pata direita foi previamente limpa com álcool etílico (70%) e cuidadosamente posicionada para a administração da droga conforme demonstrado na figura 6:



Figura 6- Administração intraplantar das drogas.
Fonte: Do autor

- Via intratecal, (i.t.): Essa via foi utilizada para verificar o possível envolvimento de endocanabinóides e do receptor CB_1 na antinocicepção induzida pela TENS a nível medular. Previamente à administração das drogas, foi realizado tricotomia na região dorsal (lombar), então, os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano (2%) (CRISTÁLIA[®], Brasil), através de um sistema de analgesia inalatória utilizando um vaporizador calibrado. Para tal administração, os animais foram posicionados de forma que a palpação dos espaços intervertebrais fosse facilitada (figura 7). Logo em seguida, uma injeção no volume de 5 μ l, foi feita através de uma agulha 13 x 0,3 mm, acoplada a uma seringa hipodérmica (BD[®], Brasil) diretamente no espaço subaracnóide, entre a quinta e a sexta vértebra lombar (HYLDEN; WILCOX, 1980) Esse volume foi o mesmo administrado, tanto para as drogas quanto para seus respectivos veículos diluentes.

Previamente a esse procedimento e com o objetivo de assegurar a administração correta das drogas, foi realizado um treinamento prévio para o aprimoramento dessa técnica com a injeção de 0,5 μ l de lidocaína (2%). Como resposta positiva da administração i.t., observava-se a paralisia dos membros posteriores dos animais (RADHAKRISHNAN et al., 2003).



Figura 7 - Via de administração intratecal.

Fonte: Do autor

Nota: Mostrando o posicionamento do animal e o local da injeção de acordo com Hylden e Wilcox (1980).

- Via Intra Substancia Cinzenta Periaquedutal dorso lateral (i.SCPd.I.): A escolha dessa via foi com a finalidade de investigar o possível envolvimento supra-medular de endocanabinóides e do receptor CB1 na antinocicepção induzida pela TENS. Para tal, foi realizada uma neurocirurgia estereotáxica, que baseia-se inicialmente no deslocamento tridimensional de um ponto obedecendo coordenadas determinadas, que permitem a projeção espacial deste ponto (bregma), e a localização precisa de qualquer estrutura por ele representada. É usada quando se deseja atuar especificadamente sobre uma determinada estrutura encefálica. Para isso, a cirurgia foi realizada com auxílio de um aparelho estereotaxico digital (STOELTING CO, WOOD DALE, USA). (Figura 8)



Figura 8- Equipamento de estereotáxico utilizado no experimento

Fonte: do autor

Para a realização do procedimento cirúrgico (estereotaxia) e a microinjeção das drogas, os animais foram previamente anestesiados com uma solução contendo quetamina (0,5 ml), xilasina (0,25 ml) e salina (3,0 ml), injetadas intraperitonealmente (i.p.) em um volume de 0,1 ml/kg. Após confirmada anestesia, foi realizada uma tricotomia da região superior da cabeça do animal, que permanecia posicionado e fixado no estereotáxico por meio de duas barras auriculares (figura 9).

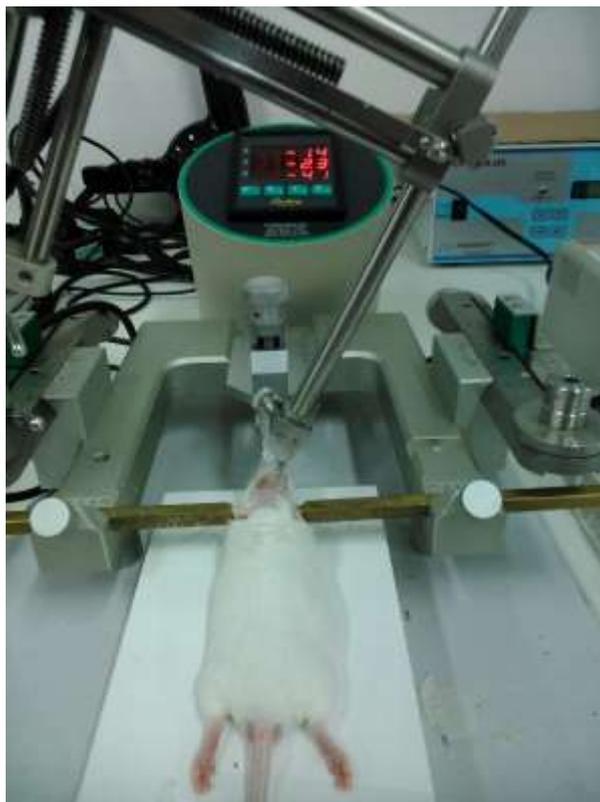


Figura 9- Posicionamento do camundongo para cirurgia estereotáxica.

Fonte: Do autor.

Nota: Lateralmente à cabeça em amarelo as barras auriculares de fixação

Após posicionados, os animais foram então submetidos a um implante craniano de cânula-guia (26-gauge) de 7 mm de comprimento, sendo essa posicionada com ângulo de 26°, SCPd.I. A cânula foi fixada ao crânio do animal por meio de um cimento acrílico auto polimerizante incolor clássico (JET- SÃO PAULO/ BRASIL). As coordenadas estereotáxicas para implantação da cânula-guia na SCPd.I. foram definidas de acordo com o Atlas de Franklin e Paxinos (1997) (figura 10): Antero posterior (AP)= - 4,1 mm; lateral (L)= -1,4 mm e ventral (V)= -2,3 mm, ao Bregma. Uma cânula de menor diâmetro (mandril) foi inserido dentro da cânula-guia para evitar problemas com obstrução e para reduzir contaminação.

Logo após a estereotaxia, os camundongos receberam administração de 0,1 ml, intra muscular (i.m) de pentabiótico® (17 mg / 1ml de salina) e cetoprofeno (0,1ml/10g) sub cutânea (s.c.) e foram devidamente colocados em caixas individuais até a recuperação total pós cirúrgica de cinco dias.

O procedimento de microinjeção das drogas i.SCPd.I. foi realizado no 5° ou 6° dia após o procedimento cirúrgico. A agulha de injeção (33-gauge), cujo comprimento ultrapassa em 1,0 mm a ponta da cânula-guia, foi inserida dentro da mesma para a infusão. A agulha de injeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10), à microseringa Hamilton Company® (EUA) de 5 µl. Em seguida foi injetado 0,2 µl durante um período de 45 segundos. O fluxo de infusão da droga foi confirmado pelo movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois da microinjeção (NUNES-DE-SOUZA et al, 2000).

Após o término do experimento todos os animais receberam injeção central de 0.2 µl de uma solução de 1% de azul de metileno, pelos mesmos procedimentos descritos para a injeção de drogas. Logo em seguida, os animais foram anestesiados com 1 ml de Tribromoetanol 2,5% (TBE), perfundidos transcardialmente com solução de formalina (10%) e em seguida decapitados. Seus cérebros foram removidos e colocados em recipientes contendo solução de formalina (10%) e posteriormente, utilizando o micrótomo (criostato SLEE - MNT), foram cortados em secções coronais ao longo do trajeto da cânula. A inspeção da localização correta da injeção foi realizada através visualização da dispersão do azul de metileno na área de interesse, que indica local correto da injeção central de drogas (Figura 11). Os animais cujo as injeções não atingiram a SCPd.I., de acordo com Atlas de Franklin e Paxinos (1997), foram excluídos do estudo.

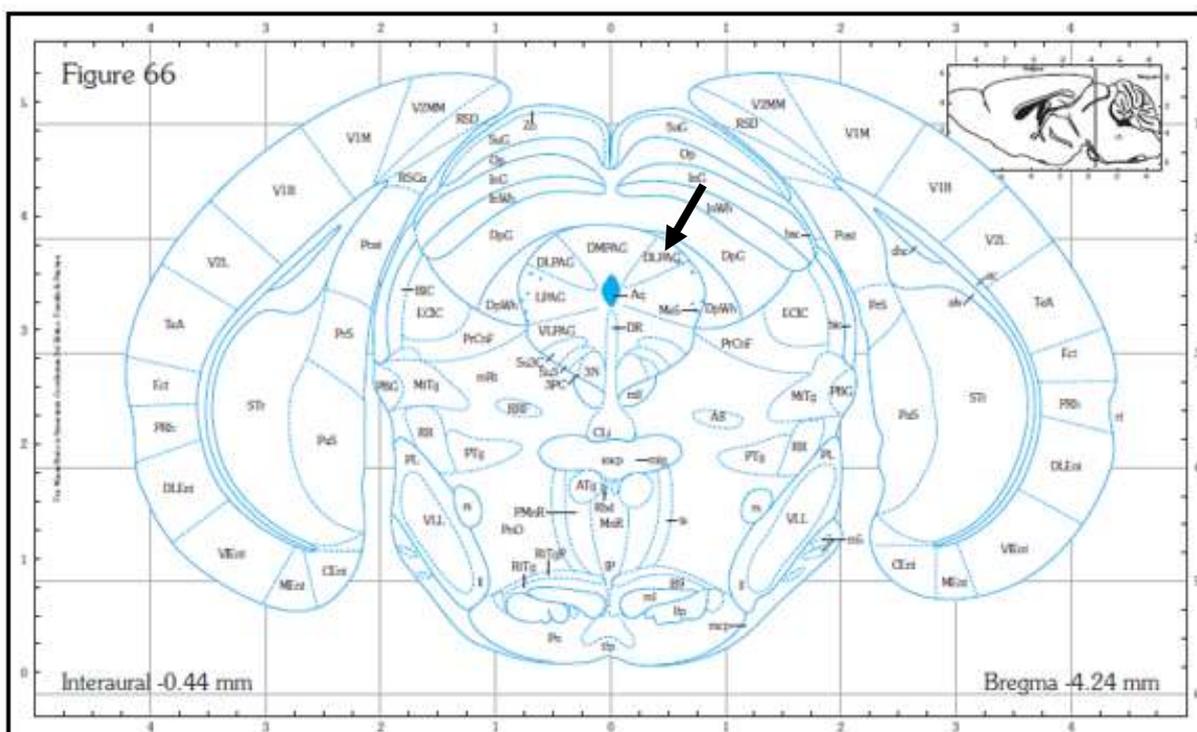


Figura 10- Ilustração do atlas Franklin e Paxinos (1997).

Fonte: Atlas FRANKLIN; PAXINOS (1997)

Nota: Seta indicando a Substancia Cinzenta Periaqueductal dorso lateral



Figura 11- Representação da injeção de azul de metileno na SCPd.I.

Fonte: Do autor

4.4 INDUÇÃO DO MODELO DE DOR

Para esse procedimento foi utilizado o tumor de Ehrlich, um carcinoma mamário de camundongo fêmea, caracterizado por ser uma neoplasia transplantável de origem epitelial maligna, transplantado pela primeira vez por Paul Ehrlich (EHRlich; APOLAND, 1905).

Esse tumor é bem utilizado em estudos experimentais *in vivo*. Para tal, é importante o conhecimento prévio da quantidade e características das células tumorais que serão inoculadas, a rapidez no desenvolvimento da neoplasia já que a forma ascítica atinge seu pico de proliferação no sétimo dia, enquanto na forma sólida seu pico ocorre no décimo quarto. Desse modo, tais características peculiares desse tumor proporcionam uma vantagem sobre os demais modelos utilizados. (SILVA, 2006).

O tumor de Ehrlich é induzido pelo transplante de células tumorais procedentes de outro animal com a neoplasia desenvolvida, podendo ser inoculado diretamente no peritônio do animal receptor, desenvolvendo a forma ascítica, ou diretamente por via subcutânea ou coxim plantar, desenvolvendo, assim, a forma sólida do tumor de Ehrlich (RAMALHO et al., 2010).

Para o preparo das células tumorais que foram utilizadas nesse trabalho, realizou-se primeiramente a lavagem e a contagem das células. O método de inoculação empregado foi proposto por Dagli e colaboradores (1992). Para tal, foram retirados 3,0 ml de fluido ascítico de um camundongo pré-inoculado a 7 dias com o tumor de Ehrlich na cavidade peritoneal. Esse fluido foi centrifugado até a obtenção de um líquido denso e claro, correspondente a uma suspensão celular com o mínimo de fibrina e hemácias. Seguiu-se, então, a contagem das células tumorais.

O número total de células foi determinado mediante contagem em microscópio óptico de campo claro, modelo NIKON® H550L, com auxílio de câmara de Neubauer. O teste de exclusão do Azul de Tripán determinou a viabilidade das células tumorais. Foram consideradas vivas as células que excluíram o corante (figura 12) . (RAMALHO et al. 2010).

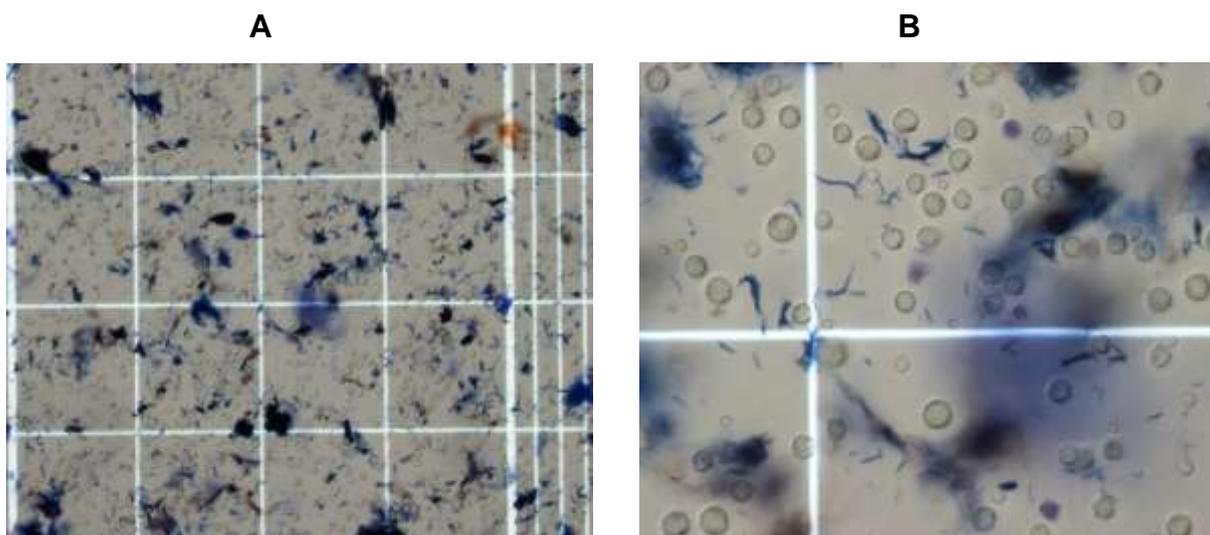


Figura 12- Teste de exclusão do corante Azul de Tripán através de microscópio.

Fonte: Do autor

Nota: A: utilizando objetiva 4X, observa-se o campo visual de um quadrante da câmara de Neubauer contendo as células (hipocoradas). B: imagem ampliada 20X evidenciando as células tumorais.

Após esse procedimento realizou-se a diluição das células para a injeção i.p.l., do padrão para crescimento sólido do tumor de Ehrlich na pata direita de cada animal avaliado, na concentração de $2,5 \times 10^6$ de células vivas em um volume de 0,05 ml.

A injeção das células ou veículo (salina estéril), foi realizada com animais anestesiados com isoflurano (2%), após a medida basal do limiar nociceptivo (método detalhado no item 3.7).

4.5 ADMINISTRAÇÃO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA TRANSCUTÂNEA DO NERVO (TENS)

A estimulação elétrica nas patas dos camundongos com a TENS foi realizada através de um aparelho da marca Neurodyn II (IBRAMED®, Brasil) figura 13.

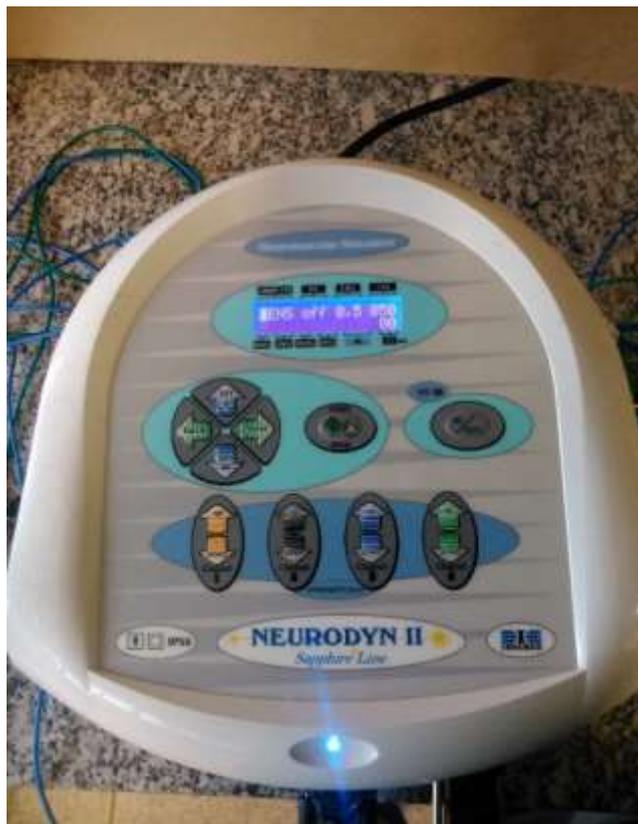


Figura 13- Aparelho de TENS Neurodyn II (IBRAMED®, Brasil).

Fonte : Do autor

Este aparelho foi previamente calibrado com os seguintes parâmetros: 130 Hz para a estimulação de alta frequência e 4 Hz para a estimulação de baixa, com duração do pulso de 100 μ s. (MA; SLUKA, 2001). O limite para a intensidade sensorial foi considerada imediatamente abaixo do limiar motor (SLUKA et al., 1998). O aparelho utilizado apresenta 4 pares de eletrodos, que permite uma estimulação em até 4 animais simultaneamente.

Para a aplicação da TENS, os animais foram levemente anestesiados com isoflurano (2%) e posicionados em uma capela, com sistema de anestesia por meio de um vaporizador calibrado. Previamente à estimulação elétrica, a pata direita foi lavada com álcool etílico (70%) para fixação de eletrodos autocolantes. O tempo de estimulação pela TENS foi de 20 minutos, a qual ocorreu por meio de dois eletrodos, especialmente adaptados (tamanho de 1 cm^2) sendo um fixado na região dorsal e outro na região plantar da pata direita (DESANTANA et al., 2009) (figura 14).

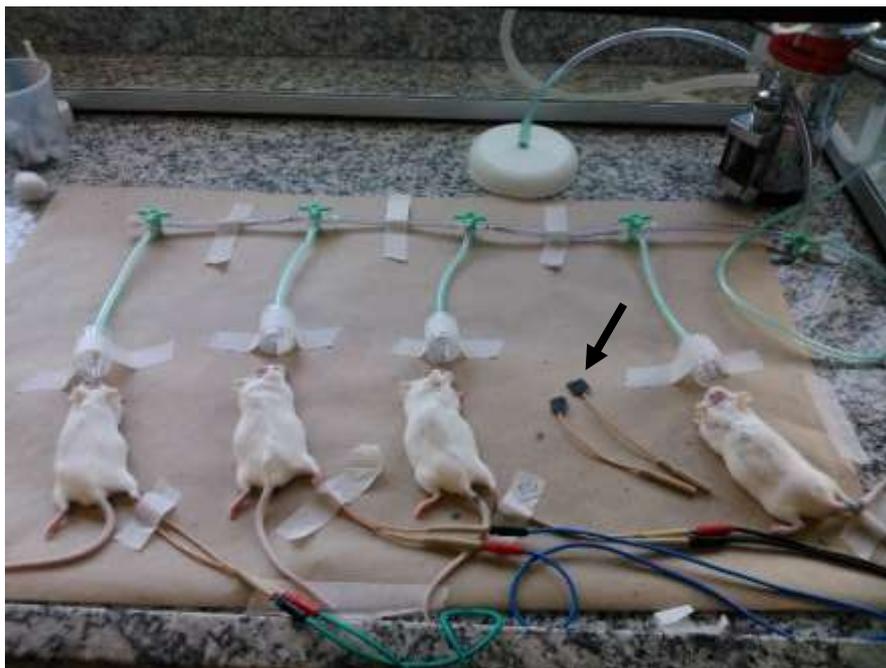


Figura 14- Imagem da aplicação da TENS, e o posicionamento dos animais na capela.

Fonte: Do autor.

Nota: Indicando pela seta, os eletrodos autocolantes especialmente adaptados

Imediatamente após a TENS, os animais foram colocados em suas respectivas divisórias do aparato de von Frey, por aproximadamente 15 min, antes do teste nociceptivo (SLUKA et al., 1998).

É importante ressaltar, que cada animal dos diferentes grupos foram submetidos ao mesmo tempo à TENS, assegurando que a mesma dosagem de anestésico fosse igual para cada grupos. Esse procedimento foi realizado três horas após a injeção do modelo de dor.

4.6 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO

O limiar nociceptivo foi avaliado durante a fase clara. Inicialmente, os animais foram mantidos nas suas caixas na sala de comportamento por 30 minutos para se ambientarem. Em seguida, foram colocados em caixas individuais de vidro, (figura 15A) posicionadas sobre uma grade de metal, a qual permitiu a avaliação do limiar nociceptivo mecânico (figura 15B).

Os limiares nociceptivos foram avaliados por meio do teste de von Frey filamento, o qual realiza uma pressão mecânica, por meio de filamentos de diferentes espessuras (figura 15C), aplicada de forma perpendicular com força suficiente para curvá-los, na superfície plantar da pata posterior direita de cada animal. Esse teste foi realizado com base no descrito por Chaplan et al (1994), porém com algumas modificações, como as espessuras de filamentos distintas. Nesse experimento, foram utilizados seis filamentos de forma crescente ou decrescente de: 0,07g, 0,16g, 0,4g, 0,6g, 1,0g, 1,4g e 2,0g.

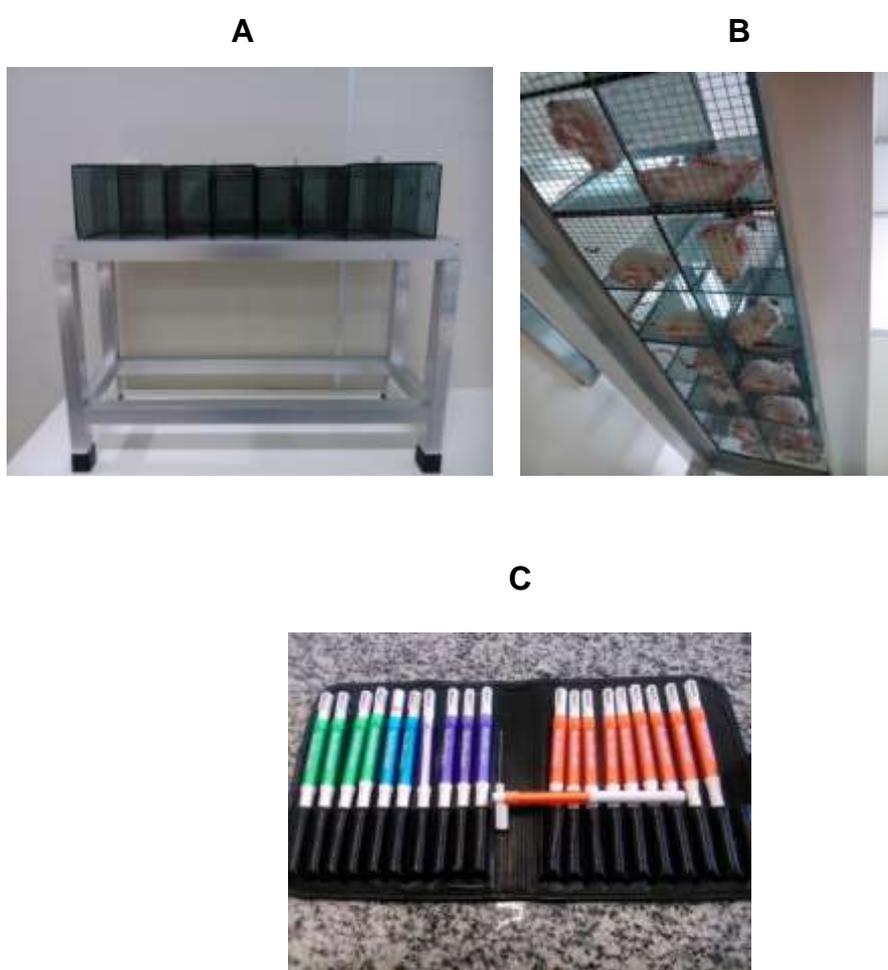


Figura 15- Teste de von Frey filamento.

Fonte: Do autor

Nota: A e B aparato utilizado para colocar os animais durante o experimento. A: visão completa das caixas dispostas sobre a mesa; B: visão inferior da grade de metal e posicionamento dos camundongos; C: os filamentos utilizados e em destaque uma amostra do posicionamento desse filamento durante a aplicação do estímulo.

Durante o teste, foram realizadas 3 medidas do limiar nociceptivo em cada animal, separadas por intervalos de 3 minutos e a média das 3 medidas foi descrita como o limiar mecânico de retirada de pata em gramas (g) (figura16).

$$\frac{I1+I2+I3}{3} = L \text{ onde:}$$

I1: primeiro limiar nociceptivo

I2: segundo limiar nociceptivo

I3: terceiro limiar nociceptivo

L: média do limiar mecânico de retirada da pata em gramas (g)

Figura 16: Cálculo usado para especificar a média do limiar mecânico de retirada da pata

Fonte: Do Autor

Em cada animal, o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado antes da injeção i.pl. do tumor de Ehrlich, descrita como medida basal (MB) e, em seguida nos intervalos de 3, 5, 7 e 24 horas após a injeção das células.

4.7 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Inicialmente, com o intuito de selecionar a melhor concentração de células do tumor de Ehrlich que melhor reproduziria alodinia mecânica, foi realizado um experimento com 3 concentrações diferentes dessas células (1.25×10^6 , 2.5×10^6 , 5.0×10^6 .)

Antes da injeção i.pl. das células, os animais foram submetidos a uma medida basal (MB). O limiar nociceptivo de retirada da pata foi mensurado na primeira hora após a indução i.pl. das células até o decimo quinto dia que corresponde a 360 horas conforme figura 17.

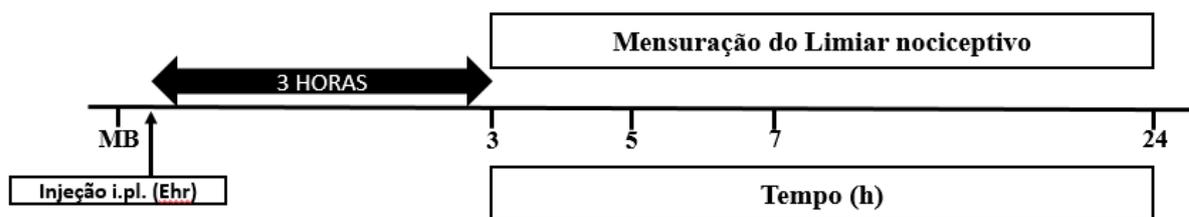


Figura 17 – Esquema com a periodicidade da mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata.

Fonte: Do autor

Nota: MB: medida basal; i.pl.: injeção intra plantar; Ehr: Tumor de Ehrlich

Posteriormente, com a concentração escolhida de $2,5 \times 10^6$ células, foi realizado o experimento para verificar o efeito da TENS na antinocicepção. Duas horas e meia após a injeção, os animais foram anestesiados e mantidos com isoflurano a 2%, colocados em uma capela e os eletrodos fixados diretamente na pata para a aplicação da TENS por 20 minutos. Após esse procedimento, os camundongos foram transferidos para caixas individuais de vidro, posicionadas sobre uma grade de metal onde permaneceram por quinze minutos para aclimatação e em seguida foi realizada a avaliação do limiar nociceptivo mecânico de acordo com Sluka et al., (1998). As medidas subsequentes foram realizadas 5, 7 e 24 horas após a indução i.pl. do tumor de Ehrlich conforme figura 18.

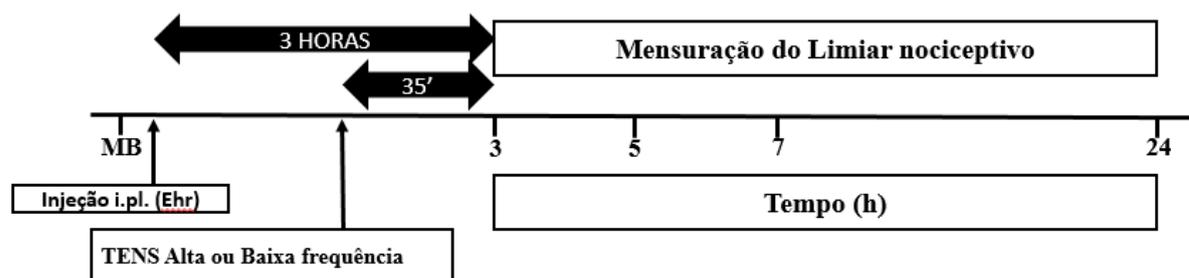


Figura 18- Esquema com a periodicidade da mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata.

Fonte: Do autor

Nota: Após a aplicação da estimulação elétrica transcutânea do nervo. MB: medida basal; i.pl.: injeção intra plantar; Ehr: Tumor de Ehrlich; TENS: Estimulação elétrica transcutânea do nervo.

Seguindo o protocolo utilizado anteriormente, foi investigado o envolvimento do sistema endocanabinóide na antinocicepção induzida pela TENS por meio da administração via i.pl. ou i.t. ou i.SCPd.I. de AM251 ou MAFP. Para a injeção i.pl., a

drogas foram administradas 20 minutos antes do início da TENS. Já, para as administrações i.t. ou i.SCPd.l., as drogas foram injetadas imediatamente antes do início da aplicação da TENS. Na sequência foram avaliados os limiares nociceptivos na quinta, sétima e vigésima quarta hora após a indução do tumor de Ehrlich conforme, figura 19:

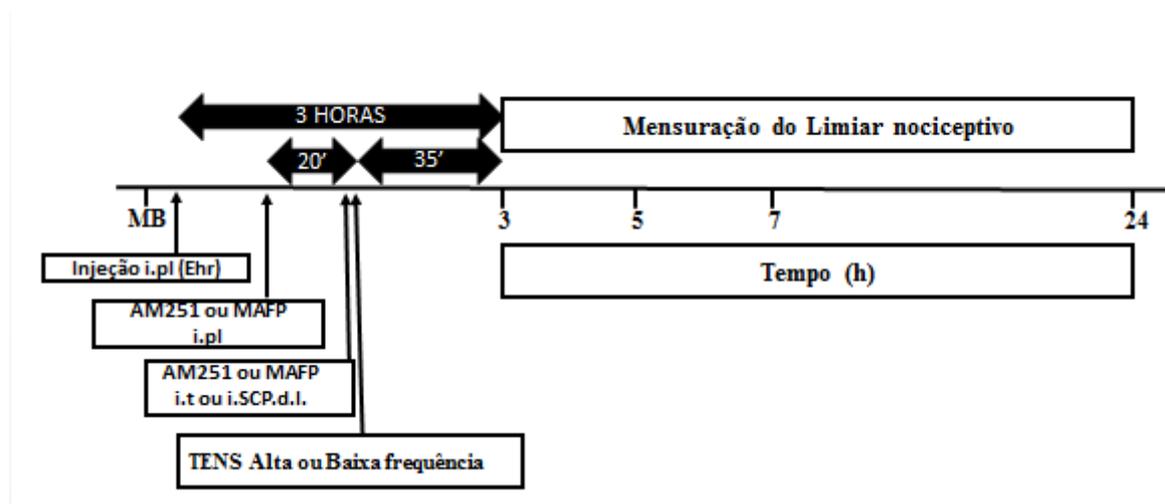


Figura 19 – Esquema com a periodicidade da mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata (g),
Fonte: Do autor.

Nota: Após injeção da droga e a administração da estimulação elétrica transcutânea do nervo. MB: medida basal; i.pl. injeção intra plantar; Ehr: Tumor de Ehrlich; TENS: Estimulação elétrica transcutânea do nervo; AM251: antagonista CB1; MAFP: inibidor da FAAH.

4.8 ANÁLISE DE WESTERN BLOT

Esse procedimento foi utilizado para determinar a expressão de receptores CB₁ após a aplicação da TENS. Para tanto, os animais ainda anestesiados foram sacrificados por decaptação e seus respectivos cérebros, medulas e patas, foram retirados e homogeneizados em homogeneizador de tecidos tipo Turrax (MARCONI®, Brasil) em tampão RIPA de lise e um *cocktail* de inibidores de proteases (SIGMA FAST®, Sigma). Então, foi utilizada a proporção de aproximadamente 0,0200 g de SCP isolada, 0,0030 g de tecido medular (região lombar) e 0,0500 g de tecido da região plantar da pata direita para 200 µl de tampão de lise enriquecido. Após o processamento, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi aliquoteado em tubos de polipropileno (1,5 ml, EPPENDORF®,

BRASIL) e congelado a -80°C para posterior utilização. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

Posteriormente, as amostras foram então diluídas em tampão de amostra (4X TRIS HCl/SDS pH=6.8, 3% Glycerol, 1% SDS, 0.6% β -mercaptoetanol, Azul de Bromofenol). Para a separação, foram aplicados 50 μg de proteína em gel de SDS-PAGE (sodio dodecil (lauril) sulfato-poliacrilamida). Para o gel de separação, é utilizado poliácridamida em concentração de 7,5% e 4%.

Desse modo, após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (MILLIPORE[®], USA) com poro de 0,45 μm de diâmetro. A qualidade da transferência é monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em água miliqui e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1% com 2,5% de leite em pó desnatado). Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* com o anticorpo primário específico: CB₁ (N-15): sc- 10066 (SANTA CRUZ[®], USA).

Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0.3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (1:2000 anti-rabbit IgG-HRP, SANTA CRUZ[®], EUA). Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). Então, as bandas proteicas de interesse (53-60 kDa) foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (kit ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) de acordo com a intensidade da densidade óptica de imunorreatividade através de um software. Foram utilizados no processo de corrida e transferência o sistema Mini Protean III-Tetracell e Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, ambos da BIO-RAD[®], USA.

4.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Com a finalidade de mostrar a presença da localização de receptores CB₁, a nível central, após a aplicação da TENS, foi realizado ensaio de imunofluorescência em secções da região medular lombar e SCP.

Duas horas após a TENS, os animais foram anestesiados i.p. com Tribromoetanol 2,5% (TBE) - (0,1ml/kg) e perfundidos transcardialmente com solução

salina seguida por 4% de paraformaldeído (PFA) em tampão fosfato 0,1 M (PBS, pH 7,4). Os cérebros, as medulas, foram removidos e pós-fixados durante 2 h, em PFA a 4% e armazenada durante 48 h em 30% de sacarose para crioproteção.

Secções coronais (40 μ m) das amostras foram obtidas num criostato e lavadas em PBS 0,1 M. Logo após, foram incubadas em glicina 0,1 M, e novamente lavadas e incubadas durante 1 h em 5% de soro bovino (BSA, Sigma) e PBS 0,1 M, pH 7,4 contendo 0,4% de Triton X-100. Em seguida, as secções foram incubadas durante 24 horas em uma mistura anticorpo primário policlonal de cabra anti-CB1 (diluído 1:200, SANTA CRUZ®, USA) diluída em PBS + BSA a 5% + 0,4% de Triton. Após incubação no anticorpo primário, as secções de tecido foram lavadas em PBS e incubou-se sequencialmente com Alexa 488 donkey anti-goat IgGs (1:1000; Invitrogen®) por 1 h (CASAROTTO et al., 2012).

Após o processo de imunofluorescência, as secções foram lavadas em PBS. Subsequentemente, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e cobertas com lamelas usando Fluoromount®. As secções foram analisadas por microscópio de fluorescência e as imagens capturadas pela câmera digital (both from Zeiss). A contagem, apesar de serem realizadas com o auxílio do software de análise de imagem computadorizada, foi realizada manualmente.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados com a média + EPM. Para o tratamento estatístico dos dados oriundos dos experimentos comportamentais, foi utilizada a análise de variância *Two way* (ANOVA) e para os dados oriundos dos experimentos biomoleculares (imunofluorescência e western blot), foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA), ambos teste foram seguidos pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas, sendo considerados estatisticamente significativos valores de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Nesse capítulo descrevemos os resultados encontrados com os experimentos comportamentais e com os ensaios moleculares.

5.1 EFEITO DA INJEÇÃO DO TUMOR DE EHRLICH SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO DE RETIRADA DE PATA

Inicialmente, utilizamos três concentrações diferentes de células tumorais de Ehrlich com a finalidade de escolher aquela que melhor reproduz uma resposta nociceptiva.

De acordo com o gráfico 1, observa-se que as três concentrações pré-determinadas de células ($1,25 \times 10^6$ ou $2,5 \times 10^6$ ou $5,0 \times 10^6$) promoveram uma alodinia mecânica, a qual perdurou por mais de 360 horas. Entretanto, somente a concentração de $2,5 \times 10^6$ promoveu alodinia nas primeiras 72 horas iniciais. Entre as horas iniciais que equivale às mensurações da primeira até a vigésima quarta hora, não houve significância estatística em relação à intensidade da alodínia mecânica entre elas.

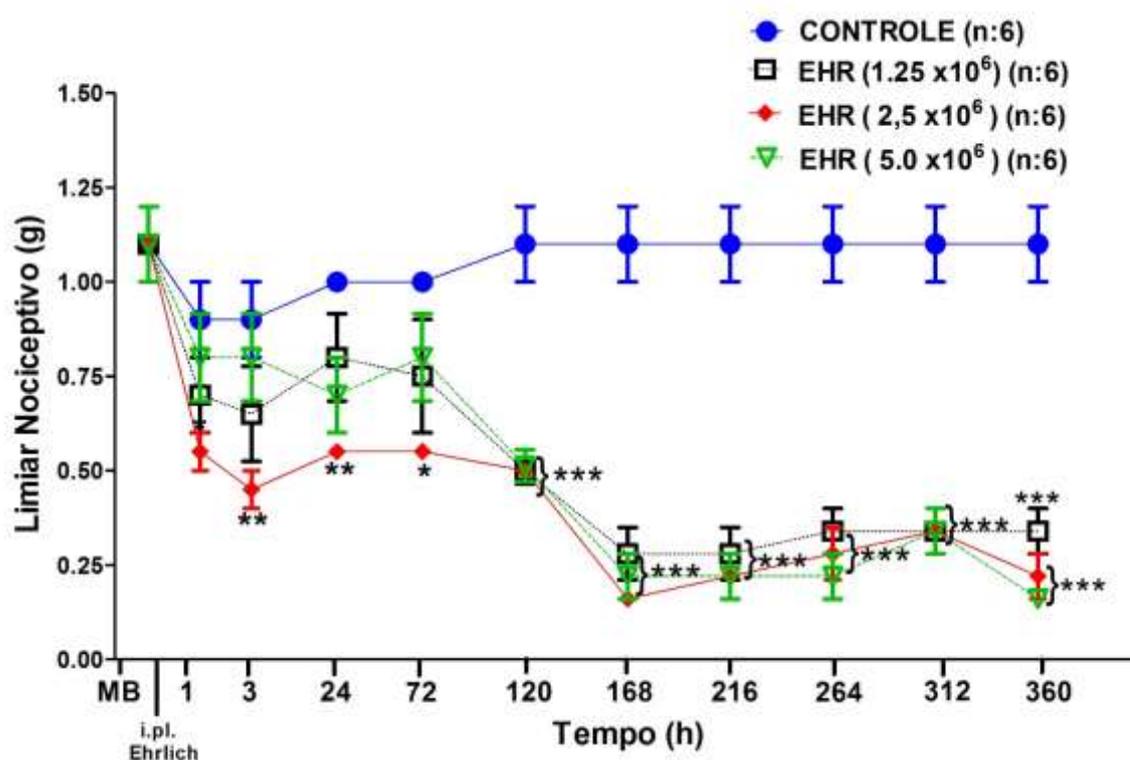


Gráfico 1 – Efeito de diferentes concentrações de células tumorais de Ehrlich sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata, avaliado pelo teste de filamentos de Von Frey.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. MB: medida basal do limiar nociceptivo; i.p.l.: injeção intraplantar de 0,05 ml; EHR: EHRlich; CONTROLE: injeção de salina 0.9%; h: horas. Representações de significância: ***($P < 0,001$), ** ($P < 0,01$), * ($P < 0,05$) entre o grupo CONTROLE e EHR. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

5.2 EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA TENS DE ALTA E BAIXA FREQUÊNCIA

Após padronizado a concentração de células tumorais de Ehrlich que melhor reproduziu alodinia mecânica em nosso modelo experimental, verificamos então, o possível efeito antinociceptivo da TENS, de baixa e alta frequência, sobre essa alodinia.

Sendo assim, o gráfico 2 demonstra que a TENS de baixa frequência reverteu significativamente a alodinia mecânica induzida pelas células tumorais de Ehrlich na terceira ($P < 0,001$) e na quinta ($P < 0,01$) hora após a injeção das células. Um efeito similar foi encontrado com a TENS de alta frequência, a qual também reverteu a alodinia tanto na terceira ($P < 0,05$) quanto na quinta hora ($P < 0,01$). Nos grupos

compostos por animais que receberam injeção de salina e a TENS, verificou-se que nem a TENS de baixa ou a alta frequência não alteraram o limiar nociceptivo. Vale salientar que na sétima e vigésima quarta hora não houve significância estatística entre os grupos que receberam a TENS de alta ou baixa frequência e o grupo que recebeu as células de Ehrlich e a TENS desligada.

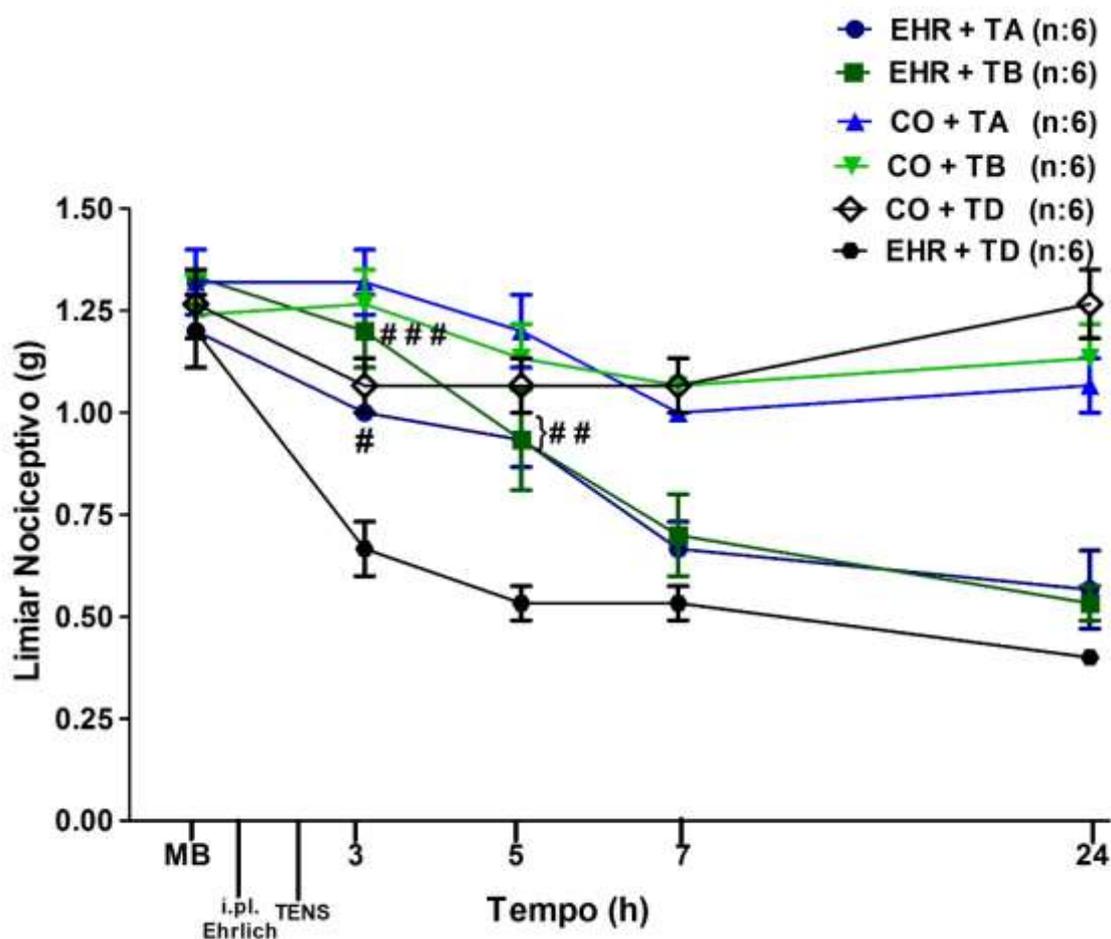


Gráfico 2 – Efeito da TENS de alta e baixa frequência sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata, avaliado filamento de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. MB: medida basal do limiar nociceptivo; i.p.l: injeção intraplantar de 0,05 ml; EHR: EHRlich; CO: controle - injeção de salina 0.9%; TA: TENS de alta frequência; TB: TENS de baixa frequência; TD: TENS desligado; h: horas. Representações de significância: ### ($P < 0,001$), ## ($P < 0,01$), # ($P < 0,05$) entre os grupos EHR+TD e EHR+TA ou EHR+TB. *Two way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

5.3 EFEITO DO AM251 NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA TENS DE BAIXA E ALTA FREQUÊNCIA:

O AM251, caracteriza-se por ser um antagonista do receptor de canabinóide do tipo 1. Sendo assim, os dados abaixo mostram o efeito dessa droga na resposta antinociceptiva induzida pela TENS.

O efeito antinociceptivo induzido pela TENS de baixa frequência foi revertido de maneira significativa pela administração i.pl. de AM251, nas doses de 30 µg e 60 µg tanto na terceira ($P < 0,001$) quanto na quinta hora ($P < 0,001$) (Gráfico 3A). A dose de 15 µg reverteu ($P < 0,05$) a antinocicepção induzida pela TENS de baixa frequência apenas na quinta hora (Gráfico 3A).

Em relação a TENS de alta frequência, observa-se que houve também uma reversão da antinocicepção na terceira ($P < 0,001$) e na quinta hora ($P < 0,001$) em todas as dosagens utilizadas (Gráfico 3B).

Em ambos os gráficos (3A ou 3B), o veículo (salina) ou TENS desligado não alteraram o limiar nociceptivo.

Esses resultados sugerem o envolvimento dos receptores CB₁ na participação da antinocicepção induzida pela TENS a nível periférico.

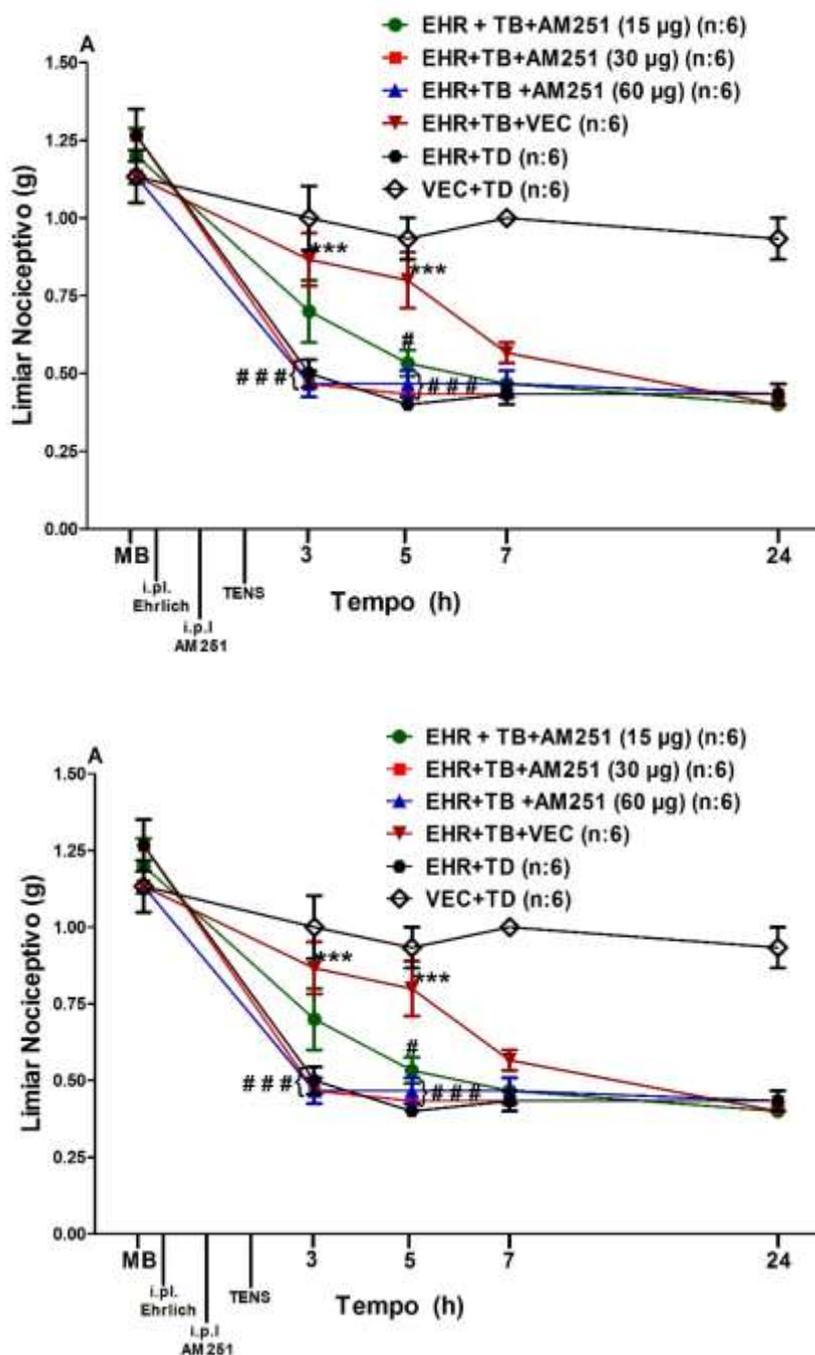


Gráfico 3- Efeito da TENS de baixa frequência (A) e alta frequência (B) após a a injeção i.pl. do AM251 sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata, pelo teste de filamentos de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. MB: medida basal do limiar nociceptivo; i.pl.: injeção intraplantar de 0,05 ml; EHR: EHRlich; VEC: DMSO 2%; TA: TENS de alta frequência; TB: TENS de baixa frequência; TD: TENS desligado; AM251: antagonista receptor CB_1 ; h: horas. Representações de significância: ### ($P < 0,001$), ## ($P < 0,01$), # ($P < 0,05$) entre os grupos EHR+TA+VEC e EHR+TA+AM251 ou EHR+TB+VEC e EHR+TB+AM251. Entre os grupos EHR+TD e EHR+TA+VEC ou EHR+TB+VEC, temos as representações de significância *** ($P < 0,001$). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Com o intuito de avaliar o envolvimento dos receptores CB₁, na participação da antinocicepção induzida pela TENS a nível central, foram realizadas administrações do AM251 via i.t. ou via i.SCPd.l..

O efeito antinociceptivo induzido pela TENS de baixa frequência, o qual perdurou por sete horas, também foi revertido de maneira significativa pela administração i.t de AM251 (Gráfico 4 A e B). Essa reversão foi similar pelas 3 doses utilizadas (0,5 µg, 1,0 µg e 2,0 µg, $P < 0.001$). No entanto, na dose de 0,5 µg a reversão foi menos pronunciada na terceira hora ($P < 0.05$) (Gráfico 4A).

Resultados similares foram encontrados quando utilizado a alta frequência, na qual a antinocicepção que perdurou também por sete horas, foi revertida de maneira significativa ($P < 0.001$) pelas doses de 1,0 e 2,0 µg. A dose de 0,5 µg também reverteu esse efeito, porém após a terceira ($P < 0,05$) e a sétima hora ($P < 0,001$) (Gráfico 4B).

Quando administrado i.SCPd.l., o AM251 promoveu também uma reversão do efeito antinociceptivo induzido pela TENS de baixa e alta frequência (Gráfico 5 A e B). Essa reversão foi encontrada na terceira hora para as dosagens de 0,5 ($P < 0,01$), 1,0 ($P < 0,001$) e 2,0 µg ($P < 0,001$). Em adição, na quinta hora essa reversão também apresentou significância estatística ($P < 0,001$) para todas as dosagens, mantendo-se até a sétima hora (0,1 µg, $P < 0.05$; 0,2µg, $P < 0,01$ e 0,4 µg, $P < 0.001$) (Gráfico 5A).

Esse resultado sugere o envolvimento dos receptores CB₁, na antinocicepção induzida pela TENS a níveis medular e supra medular.

Vale ressaltar que nos grupos que receberam veículo e a TENS desligada não foi verificada alteração no limiar nociceptivo.

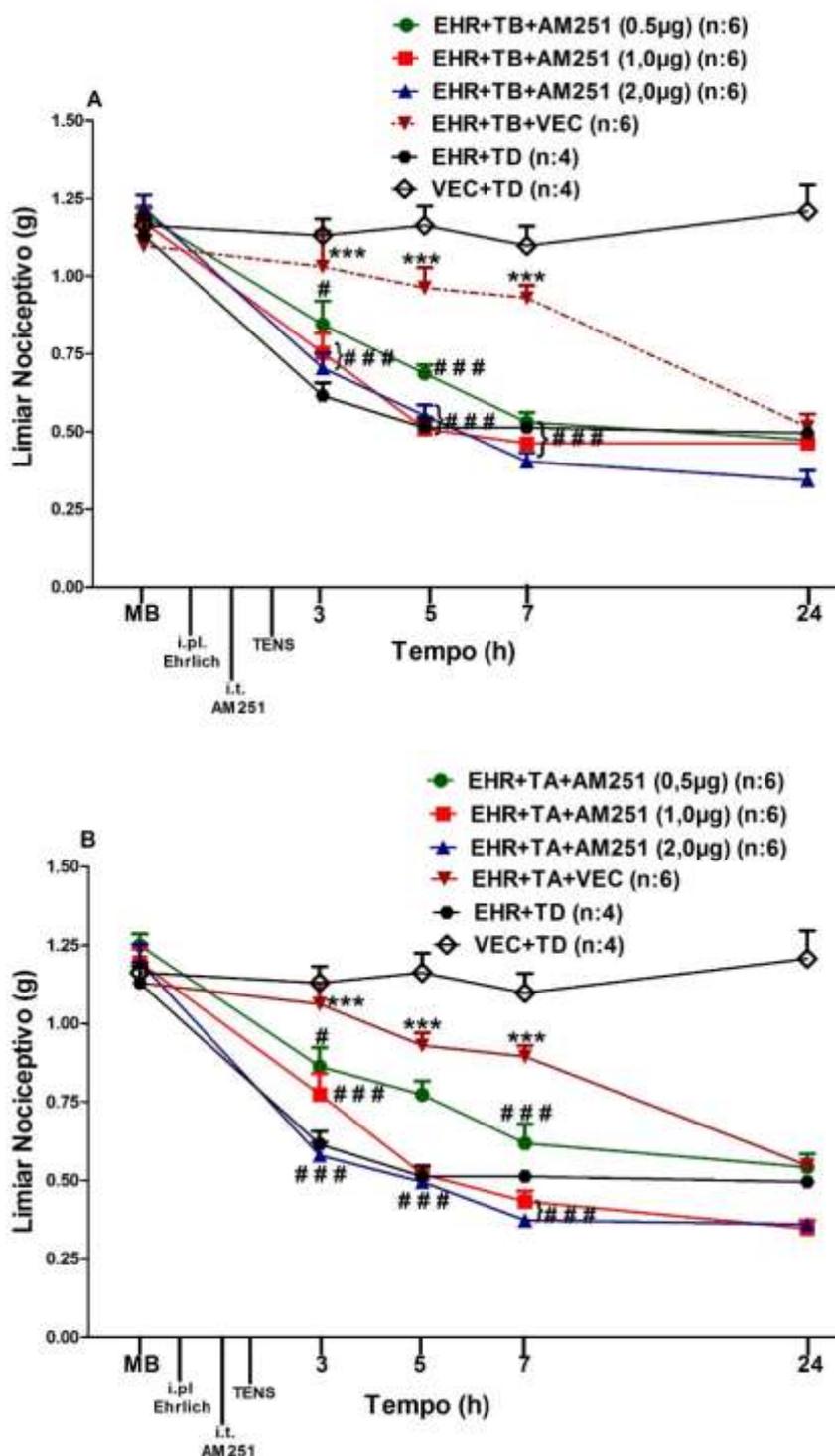


Gráfico 4- Efeito da TENS de baixa frequência (A) e alta frequência (B) com a injeção intratecal (i.t.) do antagonista do receptor CB_1 , AM251 sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata, pelo teste de filamentos de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. MB: medida basal do limiar nociceptivo; i.p.l: injeção intraplantar de 0,05 ml; EHR: EHRlich; VEC: DMSO 2%; TA: TENS de alta frequência; TB: TENS de baixa frequência; TD: TENS desligado; AM251: antagonista receptor CB_1 . Representações de significância: ### ($P < 0,001$), # ($P < 0,05$) entre os grupos EHR+TA+VEC e EHR+TA+AM251 ou EHR+TB+VEC e EHR+TB+AM251. Entre os grupos EHR+TD e EHR+TA+VEC ou EHR+TB+VEC, *** ($P < 0,001$). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

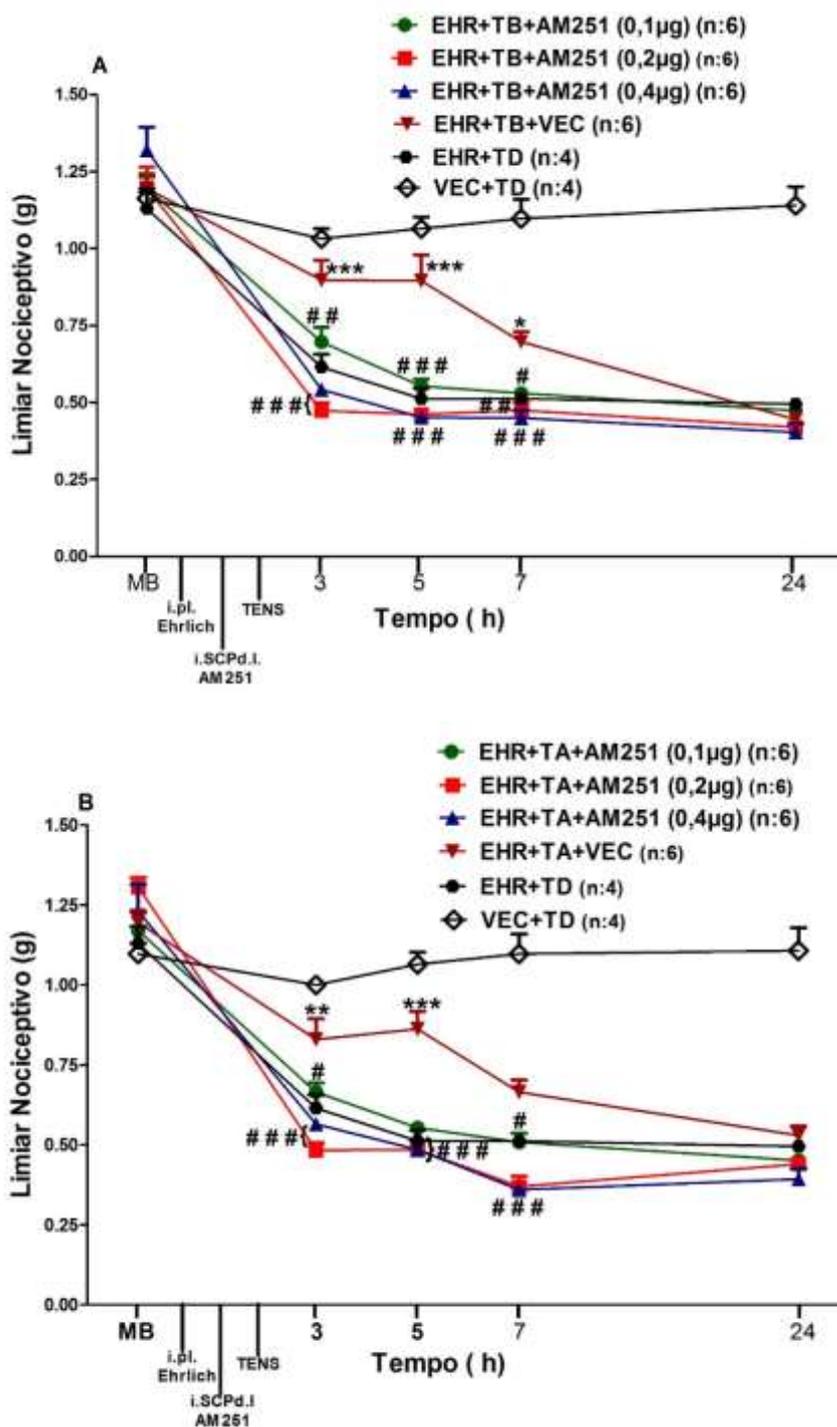


Gráfico 5: Efeito da TENS de baixa frequência (A) e alta frequência (B) com a injeção intra substância cinzenta periaquedutal dorso lateral (i.SCPd.l.) do antagonista do receptor CB_1 , AM251 sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata, pelo teste de filamentos de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. MB: medida basal do limiar nociceptivo; i.p.l: injeção intraplantar de 0,05 ml; EHR: EHRlich; VEC: DMSO 2%; TA: TENS de alta frequência; TB: TENS de baixa frequência; TD: TENS desligado; AM251: antagonista receptor CB_1 ; Representações de significância: ### ($P < 0,001$), ## ($P < 0,01$), # ($P < 0,05$) entre os grupos EHR+TA+VEC e EHR+TA+AM251 ou EHR+TB+VEC e EHR+TB+AM251. Entre os grupos EHR+TD e EHR+TA+VEC ou EHR+TB+VEC *** ($P < 0,001$), ** ($P < 0,01$). Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

5.4 EFEITO DO MAFP NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA TENS DE BAIXA E ALTA FREQUÊNCIA.

O MAFP é farmacologicamente utilizado com o objetivo de inibir a enzima (FAAH) responsável principalmente pela degradação da AEA. Com isso, essa droga tem apresentado resultados que evidenciam alguns efeitos antinociceptivos em modelos animais (ATES et al., 2003). No entanto, o MAFP foi utilizado nesse estudo com o intuito de investigar o envolvimento da AEA na antinocicepção proporcionada pela TENS.

Nos gráficos 6A e 6B, verifica-se que a pré-injeção i.pl. de MAFP na dose de 2,0 µg, promoveu um prolongamento do efeito antinociceptivo induzido pela TENS, tanto na TENS de alta quanto na de baixa frequência, de 5 horas para sete horas ($P < 0,05$), já que o grupo veículo (EHR+TA/TB+VEH), apresentou um limiar nociceptivo diminuído nesse momento do estudo. As doses de 0,5 e 0,1 não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo que recebeu as células e a TENS de baixa frequência.

Esse resultado sugere o envolvimento de endocanabinóides, especificadamente AEA, na participação da antinocicepção induzida pela TENS a nível periférico.

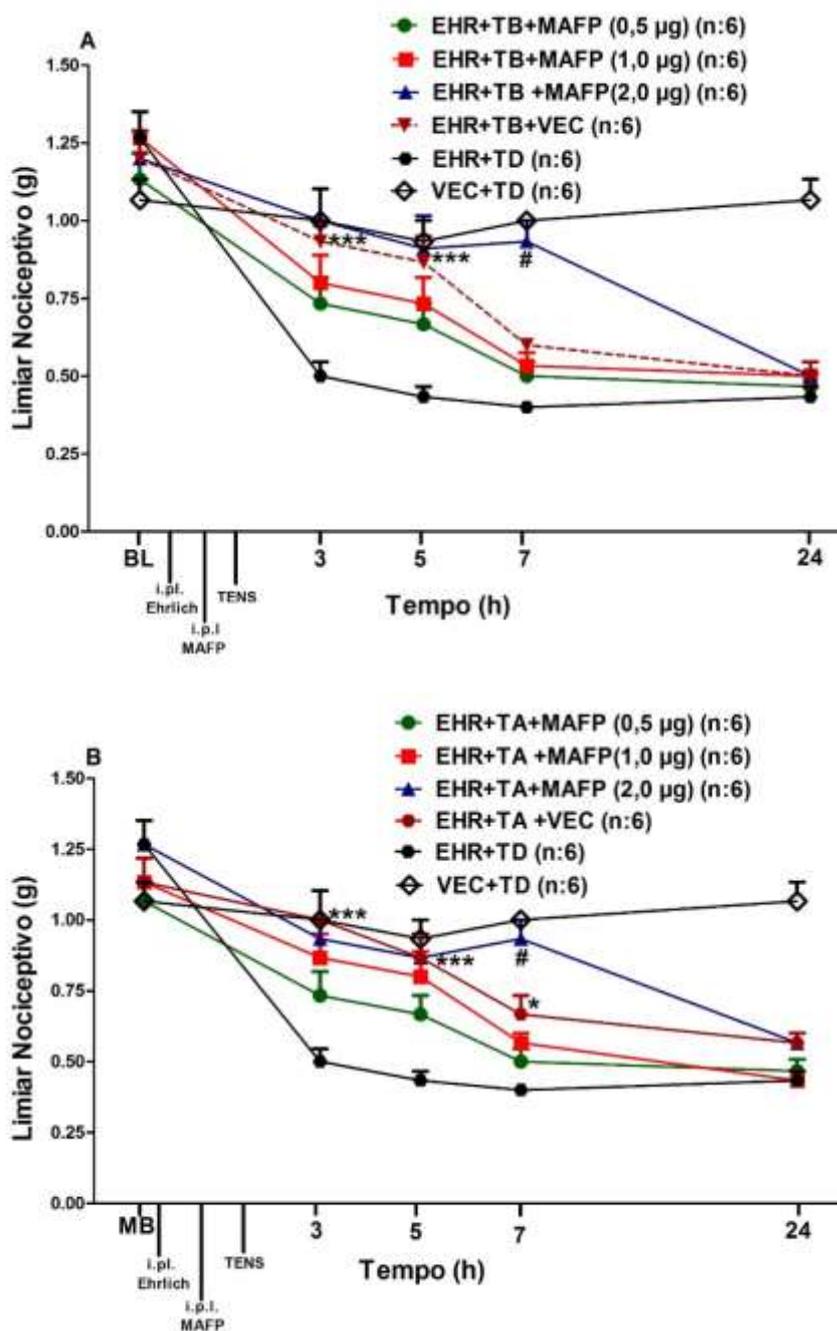


Gráfico 6- Efeito da administração intraplantar (i.p.l.) do MAFP (inibidor da enzima que degrada Anandamida) sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata, pelo teste de filamentos de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. MB: medida basal do limiar nociceptivo; I.P.L: injeção intraplantar de 0,05 ml; EHR: EHRlich; VEC: álcool 3%; TA: TENS de alta frequência; TB: TENS de baixa frequência; TD: TENS desligado; h: horas. Representações de significância: # ($P < 0,05$) entre os grupos EHR+TA+VEC e EHR+TA+AM251 ou EHR+TB+VEC e EHR+TB+AM251. Temos também a representação de significância *** ($P < 0,001$), * ($P < 0,05$) entre os grupos EHR+TD e EHR+TA+VEC ou EHR+TB+VEC. *Two way ANOVA* seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Com a finalidade de verificar a participação de endocanabinóides, na antinocicepção induzida pela TENS a nível medular e supra medular, foram realizadas administrações do MAFP pelas vias i.t. e iSCPd.l.

Os gráficos 7A e 7B, mostram que o efeito antinociceptivo induzido pela TENS foi também potencializado na sétima hora ($P < 0,05$) pela administração i.t. de MAFP na dosagem de 1,0 μg , tanto para a TENS de baixa frequência (gráfico 7A), quanto para o de alta frequência (gráfico 7B).

Quando foi micro injetado iSCPd.l., o MAFP nas doses de 0,2 μg e 0,4 μg ($P < 0,01$) potencializou significativamente o efeito antinociceptivo produzido pela TENS de baixa frequência e prolongou ($P < 0,01$) a duração do efeito da TENS de alta, que era de até 5 horas para 7 horas (Gráficos 8A e 8B).

Portanto, o envolvimento de endocanabinóides na antinocicepção induzida pela TENS é também sugerida por esses resultados, os quais evidenciaram esse efeito a nível central.

Vale ressaltar que as doses i.t. de 0,25 e 0,5 μg e iSCPd.l. de 0,1 μg , não alteraram o efeito proporcionado pela TENS. Além disso, o veículo e a TENS desligada não alteraram o limiar nociceptivo.

Em todos os experimentos em que os animais foram canulados para receberem drogas ou veículo pela via iSCPd.l., a canulação não influenciou na resposta nociceptiva, como verificado pela não alteração tanto do limiar basal quanto dos limiares nociceptivos, mensurados após a injeção dos veículos.

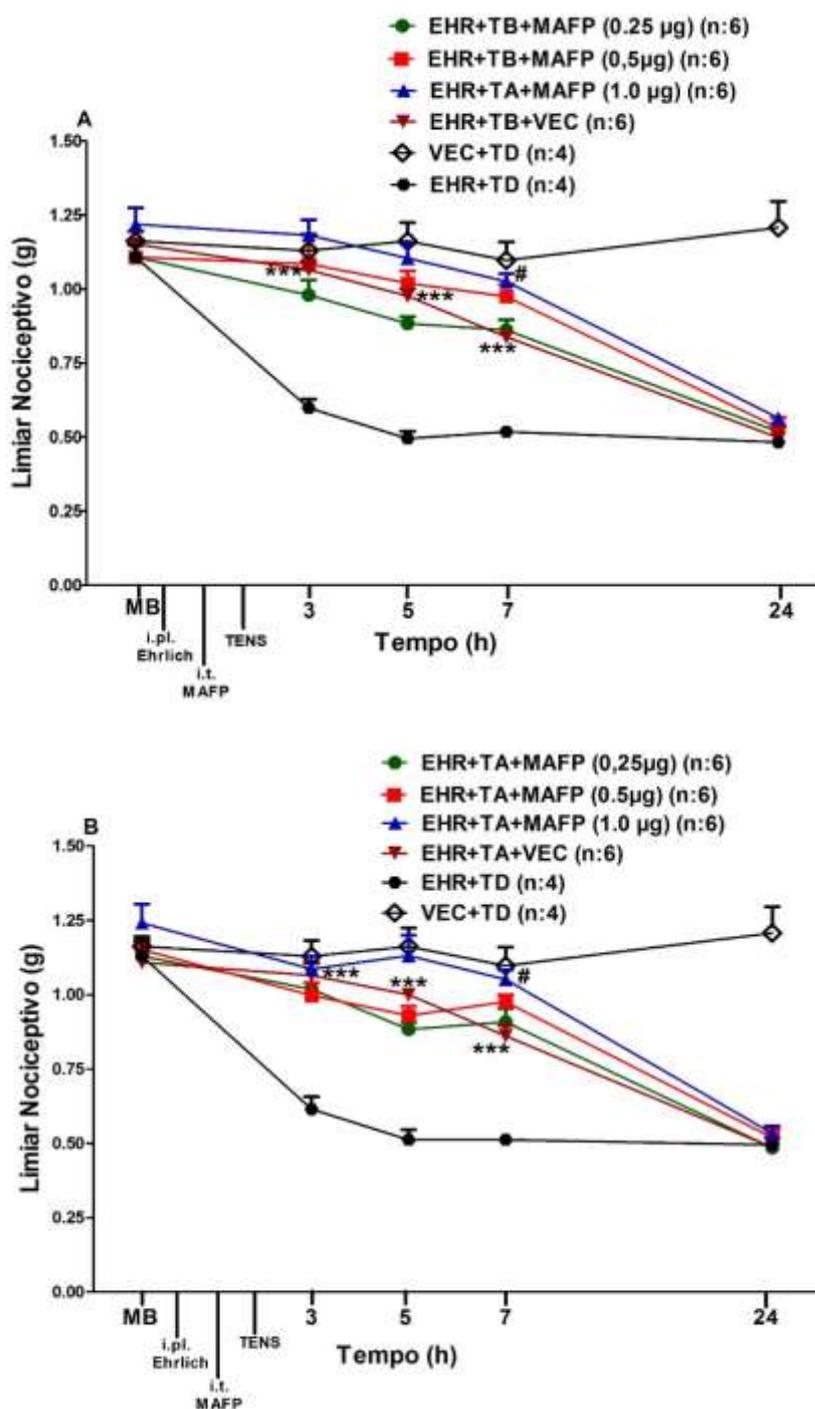


Gráfico 7- Efeito da administração intratecal (i.t.) do MAFP (inibidor da enzima que degrada Anandamida) sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata, pelo teste de filamentos de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$.

Nota: Os dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. MB: medida basal do limiar nociceptivo; i.pl.: injeção intraplantar de 0,05 ml; EHR: EHRlich; VEC: álcool 3%; TA: TENS de alta frequência; TB: TENS de baixa frequência; TD: TENS desligado; h: horas. Representações de significância: # ($P < 0,05$) entre os grupos EHR+TA+VEC e EHR+TA+AM251 ou EHR+TB+VEC e EHR+TB+AM251. Representação de significância *** ($P < 0,001$), entre os grupos EHR+TD e EHR+TA+VEC ou EHR+TB+VEC. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

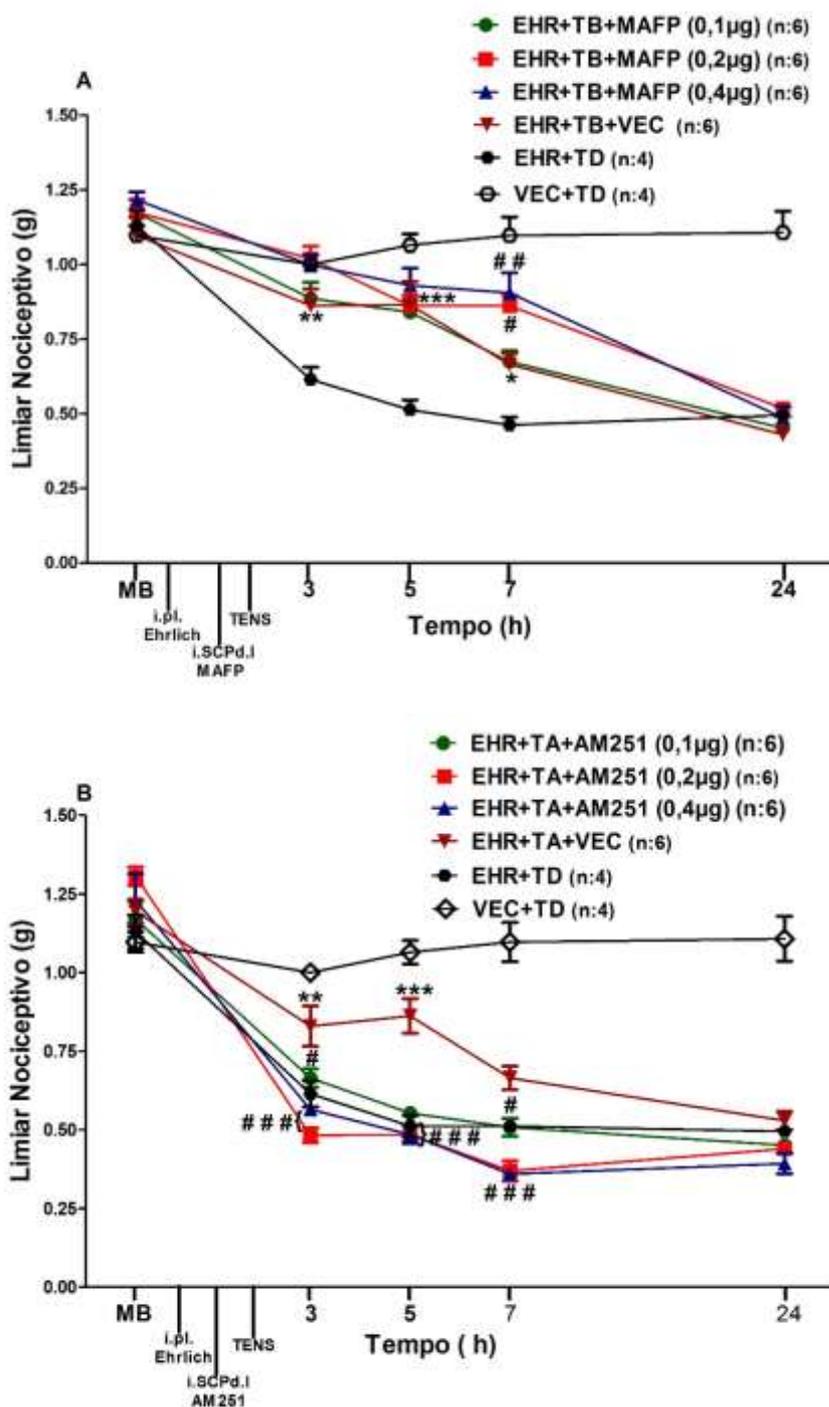


Gráfico 8- Efeito da administração intra substância cinzenta periaquedotal dorso lateral (i.SCPd.l) do MAFP (inibidor da enzima que degrada Anandamida) sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada da pata, pelo teste de filamentos de Von Frey após inoculação do tumor sólido de Ehrlich na concentração de $2,5 \times 10^6$.

Nota: Dados representam a média \pm E.P.M. da medida do limiar nociceptivo. MB: medida basal do limiar nociceptivo; i.pl.: injeção intraplantar de 0,05 ml; EHR: EHRlich; VEC: álcool 3%; TA: TENS de alta frequência; TB: TENS de baixa frequência; TD: TENS desligado; h: horas. Representações de significância: ##(P<0,01) #(P<0,05) entre os grupos EHR+TA+VEC e EHR+TA+AM251 ou EHR+TB+VEC e EHR+TB+AM251. Temos também a representação de significância *** (P<0,001), ** (P<0,01), * (P<0,05) entre os grupos EHR+TD e EHR+TA+VEC ou EHR+TB+VEC. Two way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

O gráfico 9 representa a análise por Western Blot da expressão de receptores CB₁ em SCP (A), tecido subcutâneo da pata posterior direita (B) e medula (C), após 3 h da injeção de células tumorais de Ehrlich. Observa-se que tanto após a estimulação com a TENS de alta quanto de baixa frequência, 3 horas após a injeção das células tumorais de Ehrlich, ocorreu um aumento da expressão de receptores CB₁ na substância cinzenta periaquedutal, no tecido subcutâneo de pata, e na medula (pela administração da Tens de alta frequência), quando comparado aos grupos controle, formado por animais que receberam a injeção de salina e a aplicação dos eletrodos da TENS desligada e quando comparado ao grupo que recebeu somente as células tumorais. Lembrado que, a expressão de receptores CB₁ em SCP foi maior após a administração da TENS de baixa frequência, porém em tecido subcutâneo de pata essa expressão foi maior após TENS de alta frequência, já no tecido medular não houve expressão de CB₁ quando aplicado a tens de baixa intensidade. (gráfico 9).

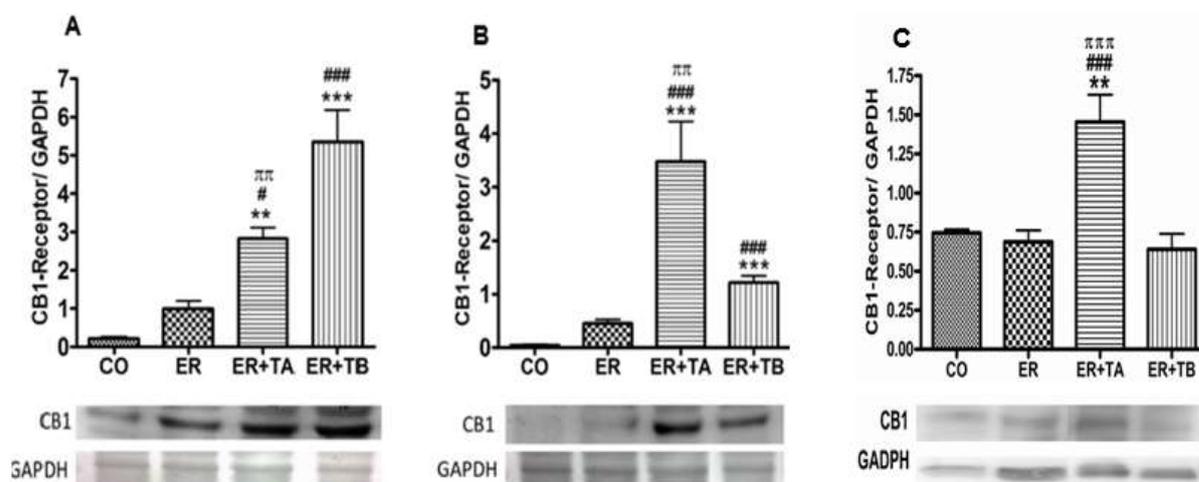


Gráfico 9 – Investigação por Western Blot da expressão de receptor CB₁: A: a nível central (SCP), B: nível periférico (pata), C: nível medular, pós aplicação da TENS de alta ou baixa frequência.

Nota: Os animais receberam injeção i.pl. do tumor de Ehrlich e três horas após foi aplicado a TENS durante 20 minutos. Imediatamente a esse procedimento procedeu-se as coletas. Os dados representam a média \pm E.P.M. da expressão de CB₁. ER: injeção de $2,5 \times 10^6$ células do tumor de Ehrlich; EHR+TA: grupo formado por animais que receberam a injeção de células do tumor de Ehrlich e a aplicação da TENS de alta frequência; EHR+TB: grupo formado por animais que receberam a injeção de células do tumor de Ehrlich e a aplicação da TENS de baixa frequência. Representações de significância: ***($P < 0,001$), ** ($P < 0,01$), entre os grupos: CO e ER+TA ou ER+TB; ###($P < 0,001$), #($P < 0,05$), entre os grupos ER e ER+TA ou ER+TB; π ($P < 0,01$) entre os grupos EHR+TA ou EHR+TB. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. n:4.

Após verificar a expressão dos receptores CB₁ a níveis central e periférico, induzida pela TENS, o próximo passo do presente estudo foi avaliar o efeito dessa estimulação na co-localização e no aumento do número desses receptores no corno dorsal da medula espinal e SCPd.I., por meio da técnica de imunofluorescência (Gráficos 10 A e B e figura 20). Assim, os resultados demonstram que tanto a TENS de alta quanto a de baixa frequência foram responsáveis por promoverem um aumento da expressão de receptores CB₁ no corno dorsal da medula espinal ($P < 0,05$) e na SCPd.I. ($P < 0,05$), quando comparados ao grupo controle que recebeu a TENS desligada. No entanto, no corno dorsal da medula espinal, quando comparado ao grupo que recebeu as células do tumor de Erlinch e a TENS desligada, somente a TENS de alta frequência promoveu aumento da expressão ($P < 0,05$) desses receptores.

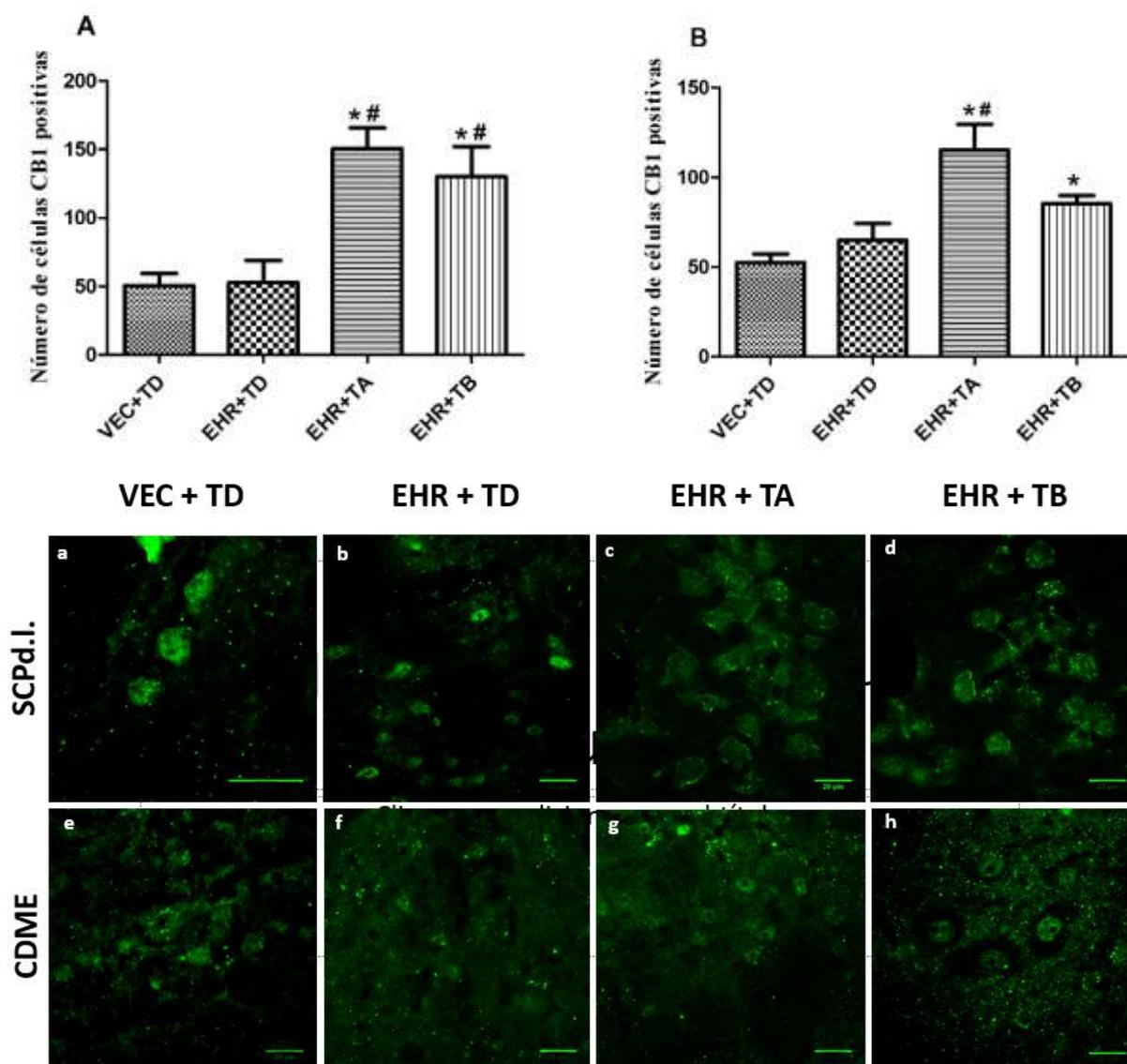


Gráfico 10 – Co-localização de receptores CB₁ a nível supra medular: substância cinzenta periaquedutal dorsoateral (SCPd.I.) e em corno dorsal da medula espinal (CDME), após a aplicação da TENS de alta ou baixa frequência.

Nota: Os animais receberam injeção i.p.l do tumor de Ehrlich (EHR) e três horas após foi aplicado a TENS durante 20 minutos. A: números de células positivas para receptores CB₁ em SCPd.I.; B: números de células positivas para receptores CB₁ em CDME. **Figura 20:** imagens por imunofluorescência de receptores CB₁ (green, Alexa Fluor 488) mostrando a expressão do receptor em neurônios na SCPd.I. (a-d) e no CDME (e-f), revelado por microscópio confocal. Barras de escala: 20 μm. EHR+TD: grupo que recebeu a injeção de células do tumor de Ehrlich e a aplicação da TENS desligada; VEC+TD: animais que receberam injeção i.p.l. do veículo salina e aplicação da TENS desligada; EHR+TA: grupo formado por animais que receberam a injeção de células do tumor de Ehrlich e a aplicação da TENS de alta frequência; EHR+TB: grupo formado por animais que receberam a injeção de células do tumor de Ehrlich e a aplicação da TENS de baixa frequência. Representações de significância: ^{*}(P<0,05) entre o grupo VEC+TD e EHR+TA ou EHR+TB e [#] (P<0,05) entre o grupo EHR+TD e EHR+TA ou EHR+TB. One way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. n = 6.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos inicialmente a alodinia mecânica causada pelo tumor de Ehrlich injetado i.pl. em três diferentes concentrações (1,25; 2,5; 5,0 x10⁶), estabelecendo assim a qual expressou a maior intensidade e melhor representaria esse modelo de dor. De acordo com o resultado, quando comparamos as concentrações utilizadas não houve significância estatística entre elas, porém a que melhor representou uma alodínia mecânica principalmente nas primeiras horas foi a de 2,5x10⁶, sendo então utilizada nesse trabalho.

A partir desse resultado, os dados obtidos mostraram que essa alodinia está relacionada ao tempo pós inoculação do tumor na pata, uma vez que, houve uma diminuição progressiva (quando comparado a terceira e a vigésima quarta hora) do limiar nociceptivo mecânico mensurado com o filamento de von Frey.

Nesse mesmo contexto, Calixto e colaboradores (2013), demonstraram por meio da administração i.pl. do tumor de Ehrlich, em diferentes concentrações, uma manifestação de hiperalgesia mecânica de maneira progressiva avaliada pelo teste nociceptivo von Frey eletrônico, após a administração i.pl. das células tumorais. Nesse mesmo estudo, foram utilizadas diferentes concentrações (1x10⁴-10⁷) do tumor de Ehrlich e a que melhor representou a resposta nociceptiva foi a que especificava a relação 10⁶, corroborando com a relação utilizada no presente estudo para esse modelo de dor.

Após a verificação da concentração do tumor a ser utilizada, observamos que o período que corresponde da terceira à vigésima quarta hora após a injeção i.pl. do tumor de Ehrlich reproduzia a alodinia mecânica. Esse intervalo de tempo pós indução do modelo de dor, abrange um período de infiltrado inflamatório com características aguda (KUMAR et al., 2005). Além disso, esse período está de acordo com estudos patológicos que classificam a inflamação em aguda e crônica, sendo que as principais características morfológicas observadas da inflamação aguda são a exsudação de fluido e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos. Já a inflamação crônica está associada com a presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, necrose tissular, e fibrose (KUMAR et al., 2005).

Em adição, Dagli (1992), utilizando a técnica de histologia em patas de camundongos, especificou que até a décima segunda hora pós inoculação do tumor de Ehrlich, há um infiltrado inflamatório composto principalmente por neutrófilos polimorfonucleares e também algumas células mononucleadas (linfócitos T, linfócitos B, células natural killer, monócitos, macrófagos e células dendríticas), e que o percentual dessas células são comparados quando foi realizado histologia das patas vinte e quatro horas, no segundo, sétimo e décimo quinto dias após inoculação. Além disso, Calixto e colaboradores (2013), também por meio de análise histológica realizada no décimo segundo dia após injeção das células do tumor de Ehrlich, observaram que além das células inflamatórias citadas acima, há também, nesse período a presença da destruição de cartilagem óssea, extensiva área de necrose e a presença de células com núcleos e mitoses atípicas, caracterizando propriedades neoplásicas tumorais.

Esses dados suportam o nosso direcionamento quanto à característica aguda do modelo de dor utilizado, uma vez que, não preconizamos às propriedades neoplásicas oriundas do tumor de Ehrlich e sim um modelo de dor inflamatória para a investigação do efeito da TENS, já que, o processo de deterioração e necrose verificado na fase mais tardia pós injeção das células promovem uma dessensibilização local, por meio de lesão de terminais aferentes, influenciando na transmissão do estímulo proporcionado pela TENS. Já, a hipersensibilização encontrada nas primeiras horas após a administração das células de Ehrlich evidencia um processo inflamatório agudo, o qual é bem caracterizada por Julius e Basbaum (2001), como uma redução no limiar nociceptivo e um aumento na capacidade de resposta das extremidades dos nociceptores, favorecendo a um baixo limiar dos neurônios sensoriais periféricos.

Diante disso, o efeito da TENS foi então avaliado em até vinte e quatro horas de alodinia mecânica aguda promovida após a injeção do tumor de Ehrlich. Para tal, foi estabelecido um tempo de aplicação da estimulação elétrica de 20 minutos conforme preconizado por DeSantana (2009) e Sluka e colaboradores (2000). Logo em seguida, verificou-se que a TENS foi eficaz em reverter essa alodinia até a quinta hora, em experimentos investigando a participação do sistema endocanabinoide a nível periférico e sétima hora, na investigação a nível central, após a aplicação das células responsáveis por induzir nocicepção.

Vale ressaltar que, previamente à aplicação da TENS foram ajustadas a frequência e a intensidade do estímulo elétrico. Em relação às frequências utilizadas nesse estudo, ajustamos para 130 Hz (alta frequência) ou 4 Hz (baixa frequência), conforme sugerido por Ainsworth e colaboradores (2006) e Sluka e colaboradores (2006), os quais preconizam alta frequência à uma estimulação maior que 50 Hz e baixa frequência uma estimulação menor que 10 Hz. No caso da intensidade, essa foi ajustada abaixo do limiar motor, de acordo com Sluka (1998) e Vance e colaboradores (2014). Tais autores sugerem ainda que a utilização da alta ou baixa frequência, propiciam analgesia, especialmente quando aplicado a uma intensidade não dolorosa.

Quanto ao tempo de duração do efeito antinociceptivo produzido pela TENS, o presente estudo não encontrou diferenças estatísticas entre as frequências utilizadas.

Resultado similar foi encontrado por Resende e colaboradores (2004), os quais verificaram que a TENS tanto de baixa quanto de alta frequência revertem completamente a hiperalgesia induzida após a terceira hora de injeção i.pl. de carragenina em ratos. Em adição, outro estudo desse mesmo grupo demonstrou que a TENS reverteu a hiperalgesia na pata de ratos induzida por carragenina, sendo que, na TENS de alta frequência esse efeito foi encontrado da terceira a quarta hora e na TENS de baixa frequência até a sexta hora após a injeção da droga (RESENDE et al., 2006).

Gopalkrishnan e Sluka (2000), também encontraram esse efeito antinociceptivo da TENS por meio do filamento de von Frey em ratos após injeção i.pl. de carragenina. Entretanto, somente a TENS de alta frequência apresentou efeito significativo nas primeiras horas, comparada a TENS de baixa frequência que proporcionou um efeito mais duradouro.

Desse modo, sugerimos que diversos fatores experimentais como o local de estimulação no corpo do animal, o tipo de animal utilizado, a marca do aparelho ou a própria modulação da frequência escolhida podem influenciar na duração do efeito.

Além disso, alguns autores defendem que a TENS de alta ou baixa frequência, proporcionam respostas distintas quanto à duração do efeito antinociceptivo por ativarem diferentes mecanismos endógenos. Sluka e colaboradores (2000), defendem que a TENS de alta frequência ativa fibras nervosas aferentes de diâmetros maiores que projetam para o corno dorsal da medula atuando na Teoria das comportas idealizada por Melzack e Wall (1965). Outro mecanismo proposto é que a TENS tanto de alta quanto de baixa frequência produzem efeitos antinociceptivos através da

liberação de opióides endógenos (SLUKA et al., 2000). Já Resende e colaboradores (2006), sugerem que o efeito antinociceptivo produzido pela TENS de alta e baixa frequência é proporcionado pela ativação de receptores δ e μ opióides, respectivamente. Conforme esses autores, após induzem tolerância à morfina em ratos, e em seguida aplicar e estimulação elétrica, somente a TENS de baixa frequência não proporcionou antinocicepção nesse grupo, sendo justificado pela tolerância cruzada nos receptores μ induzida pela administração diária da morfina.

Em adição, Sluka e colaboradores (1999) demonstraram que o efeito antinociceptivo produzido pela TENS de alta frequência é impedido pelo bloqueio de receptores de δ opióides na medula espinal e, a antinocicepção obtida pela TENS de baixa frequência é revertida pelo bloqueio dos receptores μ opióide na medula.

Com relação a esse efeito proporcionado pela TENS tanto de alta quanto de baixa frequência, Chandran e Sluka (2003), demonstraram que a aplicação diária da TENS resulta em uma diminuição da antinocicepção no quarto dia de tratamento, sendo então, caracterizando uma tolerância analgésica proporcionada pela TENS.

Apartir desse estudo, DeSantana e colaboradores (2010), demonstraram que essa tolerância pode ser inibida a partir do bloqueio dos receptores de colecistoquinina em ratos com inflamação do joelho por carragenina. Para isso, foi administrado i.t. antagonistas seletivos para os receptores de colecistoquinina CCQ_A (impede tolerância cruzada a receptores de δ opióide) ou CCQ_B (impede tolerância cruzada a receptores de μ opióides), os quais bloquearam o desenvolvimento de tolerância ao TENS de alta e baixa frequência, respectivamente. Esse bloqueio seletivo associado à frequências, corrobora com estudos anteriormente citados a respeito dos mecanismos pelos quais a TENS de alta ou baixa frequência utilizam para proporcionar antinocicepção.

Apesar de diversos trabalhos demonstrarem que a TENS ativa a SCP, poucos estudos tem elucidado os mecanismos pelo qual a TENS promove essa ativação com consequente estimulação da via descendente inibitória da dor. De acordo com Low e Reed (2001), a estimulação elétrica de baixa frequência e alta intensidade, proporciona o estímulo de fibras aferentes nociceptivas do tipo A δ e C, e também de fibras motoras, ativando a via ascendente nociceptiva e, conseqüentemente a modulação da dor pela ativação da via descendente inibitória. No entanto, em nosso estudo, administramos a TENS, com uma intensidade sensorial, ou seja, que não proporciona a ativação de fibras motoras e por meio disso sugerimos que a

estimulação da via descendente inibitória, pode ser devido a ativação de aferências sensoriais de menor intensidade que também estimula a via ascendente nociceptiva, a qual poderá ativar estruturas corticais que por meio de eferências que ativam a SCP e propiciam a liberação de neurotransmissores a nível medular que irão modular os impulsos nociceptivos.

É importante ressaltar em concordância com Resende e colaboradores (2004), que o possível estresse durante a manipulação dos animais no momento da aplicação dos eletrodos da TENS poderia ser um fator que interfere na resposta antinociceptiva fornecida pela estimulação. Assim, para excluir essa hipótese, nossos resultados demonstraram que não houve nenhuma alteração do limiar nociceptivo mecânico nos animais que receberam a TENS desligada.

Além dos mecanismos endógenos citados anteriormente, muitos trabalhos têm demonstrado outros meios que explicam o efeito antinociceptivo proporcionado pela TENS.

Nesse sentido, King e colaboradores (2005) encontraram, mensurando o limiar nociceptivo frente a um estímulo térmico, que o efeito antinociceptivo periférico induzido pela TENS de alta e baixa frequência foi reduzido em camundongos geneticamente modificados com ausência do receptor α_2 adrenérgico, quando comparados aos animais não modificados. Em adição, a administração intra-articular (joelho) de um antagonista seletivo para o receptor α_2 adrenérgico, promoveu uma reversão da antinocicepção induzida pela TENS. Entretanto, esse efeito não foi revertido quando esse antagonista foi injetado i.t. ou i.c.v. Com isso, esses autores demonstraram que os receptores α_2 adrenérgicos participam da antinocicepção induzida pela TENS, principalmente a nível periférico.

Ainda a esse nível, Sabino e colaboradores (2008), demonstraram que o com a administração i.pl. de naltrexona (antagonista de receptores opióides) reverteu o efeito antinociceptivo da TENS de baixa frequência mas não pela alta frequência, sugerindo que receptores opióides periféricos também podem desempenhar um papel na analgesia produzida pela TENS de baixa frequência.

Além da periferia, a TENS atua na modulação da dor por mecanismos centrais que envolvem as regiões medulares e supra medulares. Portanto o nosso trabalho tem como base, estudos que sugerem a atuação da TENS tanto de alta quanto de baixa frequência, nesses níveis, na modulação da dor.

Um estudo utilizando a técnica de imunofluorescência demonstrou que a TENS de alta frequência, aplicada em joelho inflamado de ratos, aumentou a concentração extracelular do neurotransmissor inibitório GABA na região do corno dorsal, um importante local de controle da nocicepção (MAEDA et al., 2006). Além disso, outro estudo verificou que TENS de alta frequência, reduziu as concentrações de glutamato e aspartato, neurotransmissores excitatórios, no corno dorsal da medula espinal também em ratos com inflamação intra articular de joelho, quando comparados com os níveis naqueles sem o processo inflamatório (SLUKA et al., 2006).

Em adição, Sluka e colaboradores (2005) demonstraram que as concentrações de serotonina a nível espinal foram aumentadas imediatamente após o tratamento com tens de baixa frequência. Além disso, esse mesmo estudo demonstrou que a administração i.t. de um antagonista para o receptor δ opióide impediu a liberação de glutamato e aspartato por TENS de alta frequência. Sugerindo que a nível espinal a TENS de baixa frequência pode controlar a transmissão nociceptiva por meio da liberação de serotonina e que a TENS de alta frequência promove esse efeito via liberação de opióides endógenos, com consequente ativação de receptores δ opióides, que por sua vez, inibirão a liberação de neurotransmissores excitatórios.

Quando investigado os mecanismos supra espinhais na antinocicepção induzida pela TENS, DeSantana e colaboradores (2009), verificaram que o aumento do limiar nociceptivo de retirada da pata em ratos após a aplicação da TENS de alta ou baixa frequência, mensurado pelo teste nociceptivo de von Frey filamento, foi minimizado pela pré-injeção de Cloreto de Cobalto intra substância cinzenta periaquedutal ventro lateral (i.SCPv.l.). Esse estudo foi o primeiro a descrever o envolvimento dessa estrutura na antinocicepção induzida pela TENS. Além disso, por meio desse achado, esses autores descrevem que o efeito antinociceptivo da TENS se dá pela ativação da via descendente inibitória da dor, sugerindo que a i.SCPv.l. apresenta projeções nervosas até a RVM e à medula espinal, para proporcionar antinocicepção mediada por opióides endógenos (DESANTANA et al., 2009).

Corroborando com esse achado, Wang e Wessendorf (2002), demonstraram a expressão de receptores δ e μ opióide por meio de hibridação *in situ* em neurônios de projeção da SCP à RVM, verificando um aumento principalmente na SCPd.l., sugerindo que os opióides são susceptíveis à exercer efeitos direto sobre esses neurônios por meio de ambos receptores.

A ativação dessas estruturas que correspondem a via descendente inibitória da dor é caracterizada por inibir a excitabilidade nociceptiva aferente do trato espinotalâmico principalmente através da liberação de serotonina e pela redução da liberação de glutamato, por meio da liberação de GABA e encefalinas (SLUKA et al., 2006; MAEDA et al., 2007), que irá resultar na diminuição do estímulo dos neurônios do corno dorsal e consequente modulação do estímulo nociceptivo (DESANTANA et al., 2008).

Ainda de acordo com DeSantana e colaboradores (2009), a antinocicepção induzida pela TENS, foi inibida pela injeção de Cloreto de Cobalto (inibidor de sinapses) i.SCPv.I., demonstrando que esse efeito seria via opióide uma vez que estudos demonstram a presença de opióides nessa área. No entanto, quando microinjetado o Cloreto de Cobalto i.SCPd.I., não houve a inibição em relação ao efeito antinociceptivo proporcionado pela TENS, sugerindo que essa região possa não ser mediada por opióides e deixando em aberto outros possíveis mecanismos endógenos para esse efeito.

Com a descoberta do sistema endocanabinóide, diversos estudos têm demonstrado a participação de receptores para canabinóides na via de modulação da dor. Nesse sentido, Hohmann (2002), salienta em sua revisão que sistema endocanabinóide compreendendo os receptores para canabinóides, endocanabinóides e as enzimas que controlam, a síntese e degradação estão localizados em vários níveis do neuro eixo, da periferia ao sistema nervoso central, onde podem modular a nocicepção.

A partir dessa evidência, o presente estudo investigou a participação do sistema endocanabinóide nessa antinocicepção induzida pela TENS, principalmente o envolvimento dos receptores CB₁ e de endocanabinóides, através da administração de um antagonista do receptor CB₁ (AM251) e de um inibidor da enzima responsável pela degradação da AEA (MAFP), a nível periférico, medular e supra medular (iSCPd.I).

Assim, quando investigado a participação desse sistema a nível supra medular, por meio da micro injeção de AM251 ou MAFP na SCPd.I., obtivemos resultados que demonstraram a participação de receptores CB₁ e endocanabinóides à esse nível na antinocicepção induzida pela TENS.

Um estudo anterior demonstrou que a injeção iSCPd.I. de um antagonista para o receptor CB₁ reduziu significativamente a analgesia induzida por estresse devido a

presença de um agente nociceptivo (choque nas patas), sugerindo o envolvimento dessa região e uma função importante para o sistema endocanabinóide na modulação do comportamento relacionado à analgesia endógena a partir da ativação na SCPd.I. OLANGO et al., (2012),

Reforçando esse achado, Hohmann e colaboradores (2005), demonstraram que a analgesia induzida pelo estresse é mediada não somente pela liberação de opióides, mas também de endocanabinóides. Em suma, eles aplicaram um choque elétrico contínuo na pata de ratos e quantificaram o limiar nociceptivo por meio do teste de retirada da calda, que encontrou um efeito antinociceptivo que não foi alterado por injeção intraperitoneal (i.p.) do antagonista opióide naltrexona. No entanto, a antinocicepção foi abolida pela administração i.SCPd.I. de um antagonista CB₁ (SR141617A), sugerindo novamente a participação dessa região e do receptor CB₁ na analgesia induzida pelo estresse.

Corroborando também com nossos resultados e reforçando a hipótese da atuação dos endocanabinóides na antinocicepção a nível supra medular, Suplita e colaboradores (2005) sugerem que a inibição da FAAH por meio da administração i.SCPd.I. de Araquidonoil serotonina (5HTAA), aumentou a antinocicepção induzida pelo estresse (choque na pata). Ainda nesse estudo, a co-administração do antagonista CB₁ (Rimonabant) i.SCPd.I. e i.RVM, reduziu latência de retirada da pata pós estresse.

Condizendo com a antinocicepção proporcionada pela TENS, agora a nível medular, os resultados obtidos nesse estudo demonstram a participação desse sistema nesse efeito proporcionado pela TENS, uma vez que houve uma reversão da antinocicepção induzida pela estimulação elétrica quando administrado i.t. o antagonista do CB₁ e um prolongamento desse efeito quando administrado i.t. o MAFP.

Estudos em roedores com administração i.t. de agonistas CB₁, demonstram efeito antinociceptivos frente a estímulos térmicos avaliado pelo teste de retirada de cauda e da placa quente (SMITH; MARTIN, 1992; YAKSH 1981).

Além disso, Hama e Sagem (2007), verificaram que o WIN 55212-2 (agonista receptor CB₁) administrado via subcutânea (s.c.) reduziu a nocicepção induzida pelo modelo de compressão de medula espinal em ratos avaliado pelo teste von Frey filamento. Nesse mesmo estudo a injeção s.c. de AM251 reverteu o efeito antinociceptivo proporcionado pelo agonista. Estes dados sugerem que a

administração de agonista seletivo para CB₁ pode ser uma possível forma de amenizar o processo nociceptivo oriundo da compressão da medula espinal.

O papel dos receptores para canabinóide do tipo 1 assim como de AEA, também foram demonstrados nesse trabalho a nível periférico, onde também obtivemos uma reversão do efeito antinociceptivo proporcionado pela TENS, quando administrado o AM 251, principalmente nas maiores doses utilizadas. Além disso, quando administrado o MAFP houve um prolongamento, da quinta para a sétima hora, do efeito da TENS de alta e baixa frequência.

Um Estudo investigando o efeito antinociceptivo a nível periférico do sistema canabinóide realizados por Calignano e colaboradores (1998), verificaram uma diminuição do tempo de lambadura de pata, avaliado pelo teste nociceptivo de formalina, após a administração i.pl. de AEA exógena em camundongos. Sendo que, a pré-administração i.v. de antagonistas para os receptores canabinóides reverteu esse efeito. Ainda nesse mesmo estudo, utilizando a técnica de cromatografia gasosa/espectrometria de massa, foi encontrado aumento dos níveis de AEA na pele (em quantidades que equivalem aos encontrados no cérebro e plasma de rato). Esses dados suportam a possibilidade de que os canabinóides endógenos, além de atuarem aos níveis espinhais e supra espinhais, podem também participar da modulação da dor em locais com lesão tecidual a periférico.

Adicionalmente, a administração i.pl. do agonista WIN 55212-2 reduziu a hiperalgesia induzida pela capsaicina em pata de ratos, mensurada por testes nociceptivos mecânico e térmico (JOAHANEK et al.,2001) .

Booker e colaboradores (2012), demonstraram que a administração i.pl. de um inibidor da FAAH, reduz respostas à dor induzida por LPS (Lipopolissacarídeo) mensurada pelo método de Von frey filamentos. Nesse mesmo estudo, por meio de espectroscopia de massa, foi observado, o aumento dos níveis de AEA na pata, no entanto, não houve alterações nos níveis dos tecidos cerebrais e da medulares, reforçando nossa hipótese do envolvimento do sistema endocanabinóide na antinocicepção a nível periférico

Além de resultados experimentais farmacológicos que demonstraram a participação do sistema endocanabinóide na antinocicepção induzida pela TENS, verificamos também a expressão e o aumento dos níveis do receptor CB₁ por meio das técnicas de *Western Blot* e imunofluorescência. Nessa primeira técnica, obtivemos uma expressão significativa de CB₁ tanto para a TENS de alta quanto para

a TENS de baixa nas regiões supra medular (SCPd.I.) e periférica. Quanto aos resultados obtidos pelo ensaio de imunofluorescência, também ficou demonstrado que há um aumento do número de receptores CB₁ a nível central.

Siegling e colaboradores (2001) relatam também que após axoniotomia unilateral do nervo ciático em ratos há uma aumento da expressão de receptores CB₁ a nível talâmico, sugerindo uma possível modulação da nocicepção desse sistema a nível central.

Em adição, Farquhar-Smith (2000), analisaram por meio de ensaio imunohistoquímico, a distribuição do CB₁ em medula espinal de ratos, verificando a presença dessa expressão, principalmente na região do funículo dorsolateral e lâmina dorsal superficial.

Estudos *in vitro* também evidenciaram a expressão de receptores CB₁ no gânglio da raiz dorsal em ratos, por meio de análise de imunofluorescência, demonstrando uma localização anatômica desses receptores, que participam da modulação da nocicepção por canabinóides a nível periférico (AHLUWALIA et al., 2000; HOHMANN; HERKENHAM 1999).

Outro estudo *in vitro* demonstrou por Western Blot e imunohistoquímica, que amostras com células cancerosas orais humanas, expressavam receptores para canabinóides, e quando administrado antagonistas exógenos, reduzia significativamente a viabilidade e a proliferação das células de câncer. Nesse mesmo trabalho, ficou especificado por meio da mensuração do limiar nociceptivo (von Frey) que a administração (s.c.) sistêmica de canabinóide sintético atenuou o efeito nociceptivo induzido pela injeção i.pl. em ratos desse modelo de dor (SAGHAFI et al., 2011).

O aumento da expressão de receptores CB₁ a nível supra medular foi demonstrado, pela técnica de *Western Blot*, por Galdino et.al (2014 b), que após coletar cérebros de ratos exercitados, o qual, observou um aumento significativo desse receptor nessa região. Além disso avaliaram a expressão, ativação e co-localização desses receptores nas regiões da SCPd.I. e SCPv.I., por dupla marcação, demonstrando que esses receptores foram significativamente aumentados nos neurônios dessas regiões quando comparado com o controle, indicando que a expressão do receptor CB₁ na SCPd.I. e SCPv.I. foram ativados pelo exercício e participam de alguma forma do mecanismo de antinocicepção, uma vez que essas regiões tem funções importantes no controle descendente da dor (Martin et.al 1995).

Em adição, Tsou et al., (1998), por meio de *hibridização in situ*, demonstrou a existência de mRNA de receptores CB₁ na SCP. Sendo assim, conforme estudos previamente comentados, sugerimos que a ativação de receptores para canabinóides neste local por seus ligantes endógenos proporciona antinocicepção uma vez que há estimulação de neurônios que projetam pra a RVM.

Além da expressão de receptores para canabinóides em regiões centrais, Garcia-Ovejero e colaboradores (2008), demonstraram também expressão relacionada aos canabinóides endógenos. Segundo esse estudo, com a realização de espectrometria de massa, no primeiro dia pós a contusão medular (por meio de compressão) há um aumento dos níveis de AEA e somente no sétimo dia houve um aumento expressivo de 2-AG. Esse resultado sugere uma função do sistema endocanabinóide em um possível restauração do tecido medular ou a reativação de vias descendentes inibitória em diferentes fases do reparo.

Como demonstrado em nosso estudo a AEA e o CB₁, são expressos positivamente e participam da antinocicepção mediada pela TENS de alta ou baixa frequência em relação ao tumor de Ehrlich.

Outros estudos também encontraram aumento da expressão desse tipo de receptor no hipocampo e no estriato após treinamento aeróbico crônico em ratos (SILVA, G. et al., 2010; HILL et al., 2010). Já Wang e colaboradores (2009) demonstraram que esse aumento em cérebro de ratos pode ocorrer de forma aguda, após 30, 60 e 120 minutos de uma sessão de eletroacupuntura (no ponto GV20, na região do bregma).

Além disso, Hayakawa e colaboradores (2008) demonstraram que a expressão desses receptores no hipocampo e no hipotálamo também foi aumentada, após o intervalo de 1 hora da injeção intraperitoneal de Δ 9-THC e canabidiol

Embora os mecanismos sobre a rápida expressão de receptores CB₁ não tenham sido bem elucidados, esses estudos citados previamente dão suporte aos resultados apresentados no presente estudo, em que a expressão de receptores CB₁ pode ter aumentado, após aproximadamente 20 min da aplicação da TENS

Nesse contexto sugerimos que a alta expressão desses receptores se deve ao aumento de endocanabinóides induzido pela TENS alta ou baixa frequência, propiciando um aumento na expressão do receptor que poderia estar internalizado, e ainda que a transcrição desse receptor pode ocorrer de forma rápida, podendo ser ativado com o período utilizado nesse estudo para a aplicação da TENS.

Além da TENS, outros trabalhos que utilizam técnicas não farmacológicas também demonstraram o envolvimento do sistema endocanabinóide na modulação da nocicepção. De acordo com Galdino e colaboradores (2014 a, b), a realização de uma única sessão de exercício de aeróbico e força em ratos propiciou uma antinocicepção, quando comparada a um grupo composto por animais não exercitados. Além disso, esse efeito também foi revertido pela pré-administração do antagonista de AM 251 e prolongado e potencializado pelo MAFP. Em adição, o exercício resistido também produziu um aumento na expressão e ativação de receptores CB₁ a nível supra espinal mais precisamente nas regiões da SCPd.I e SCPv.I.

Tais resultados corroboram com a hipótese do presente estudo que defende a eficácia da TENS tanto de alta quanto de baixa frequência, em ativar a via descendente inibitória da dor. Uma vez que o estímulo elétrico aplicado na pele, estimula receptores táteis e ativa fibras aferentes primárias principalmente A β , que enviam estímulos sensitivos para os centros superiores, estimulando assim o sistema analgésico endógeno, utilizando em parte os opióides endógenos, que atuam em seus respectivos receptores presentes a nível supra-medular na SCPv.I., para proporcionar antinocicepção (DeSantana e colaboradores, 2009)

No entanto, a existência de receptores para canabinóides na SCP, principalmente na região dorso lateral, desempenham um papel vital na mediação da antinocicepção, sendo essa reforçada pela inibição farmacológica de suas enzimas degradativas (FAAH e MGL), como demonstrado por registros eletrofisiológicos *in vitro*, por Lau e colaboradores (2014), a partir de cortes contendo neurônios da SCP, o qual administraram endocanabinóides exógenos, que proporcionou uma redução da inibição gabaérgica em neurônios da SCP, e ainda que essa redução da ação gabaérgica foi reforçada quando administrado os inibidores das enzimas degradativas. Ou seja, em situações fisiológicas a SCP, mantém-se inibida pela atividade gabaérgica.

Com a participação de sistemas modulatórios da dor, dentre eles o endocanabinóide, há ativação da SCP pela inibição da ação gabaérgica, permitindo a SCP enviar impulsos para a região bulbar RVM, por meio de projeções neurais, que a partir daí, transmitem impulsos que chegarão para a região do corno dorsal da medula espinal, com conseqüente liberação de neurotransmissores que irão modular o estímulo nociceptivo, conforme descrito por Vaughan e colaboradores (2000).

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o receptor CB_1 e endocanabinóides, (principalmente AEA) estão envolvidos na antinocicepção induzida pela TENS, tanto de baixa quanto de alta frequência. Esse efeito pode ser devido à ativação da via descendente inibitória da dor, visto que, além dos resultados obtidos no estudo farmacológico, os receptores para canabinóides do tipo 1 também foram expressos a níveis periférico, medular e supra medular (SCPd.I.). Sendo assim, sugerimos que TENS de alta e baixa frequência, proporciona o efeito antinociceptivo pela ativação do sistema endocanabinóide a nível periférico e central (Figura 21).

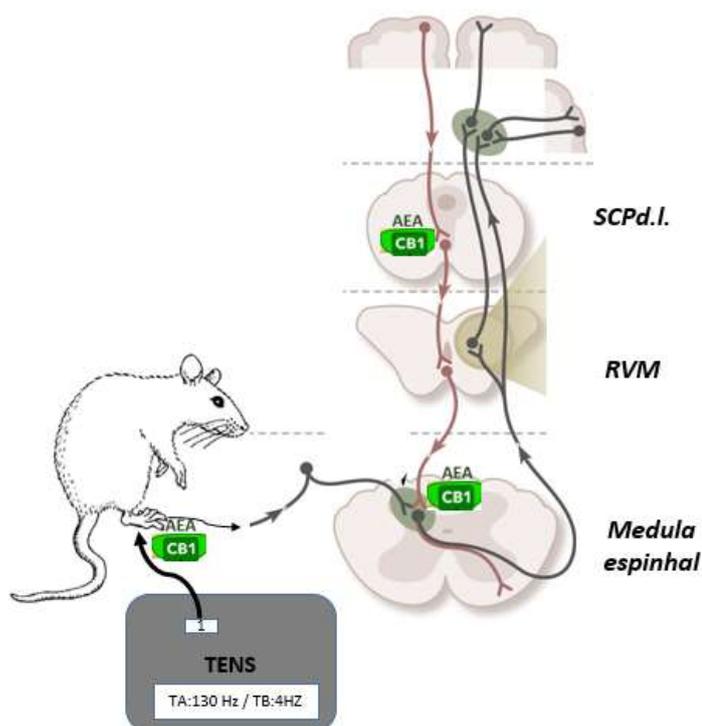


Figura: 21- Esquema do envolvimento do sistema endocanabinóide na antinocicepção induzida pela TENS de baixa frequência (TB) ou de alta frequência (TA).

Fonte: Do autor

Nota: Ilustrando esse efeito a partir da via descendente inibitória da dor, especificada pelos locais de atuação. Substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (SCPd.I.) região rostro ventro medial (RVM).

REFERÊNCIAS

AHLUWALIA, J. L. et al. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. **Neuroscience**, v. 100, n. 4, p. 685-688, 2000.

AINSWORTH, L. et al. A. Transcutaneous electrical nerve Stimulation (TENS) reduces chronic hyperalgesia induced by muscle inflammation. **Pain**, v. 120, p. 182-187, 2006.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT S.; TUFIK S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v.12, n.1000(1-2), p.40-56, Mar 2004

ATES, M. et al. Intrathecally applied flurbiprofen produces an endocannabinoid-dependent antinociception in the rat formalin test. **Eur J Neurosci**, v.17, p. 597-604, 2003.

BISOGLIO T, et al. Cloning of the first sn1-DAG lipase points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. **J Cell Biol**, v.163, p.463–468, 2003.

BONICA, J. J.; LOESER, J. D. - History of Pain Concepts and Therapies, em: **Loeser J. D. - Bonica's Management of Pain** – 3. Ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2001; p. 3-16.

BOOKER, L. al. The fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor PF-3845 acts in the nervous system to reverse LPS-induced tactile allodynia in mice. **Br J Pharmacol**, v.165, n.8, p.2485-2496, 2012..

BORSANI, E. et al. AM404 decreases Fos-immunoreactivity in the spinal cord in a model of inflammatory pain. **Brain Res**, v.1152, p.87-94, 2007.

CALIGNANO, A. et al. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. **Nature**, v.394,p. 277-81, 1998

CALIXTO, C.C. et al., “The Ehrlich Tumor Induces Pain-Like Behavior in Mice: A Novel Model of Cancer Pain for Pathophysiological Studies and Pharmacological Screening. **Biomed Res Int**, v. 2013, p.12, 2013.

CARROL, D. et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for chronic pain. **Cochrane Database Syst Rev**, v.20, 2005.

CASAROTTO, P.C. et al. Opposing Roles for Cannabinoid Receptor Type-1 (CB₁) and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel **Neuropsychopharmacology**, v. 37, p.478-486, 2012.

CHANDRAN, P.; SLUKA, K.A. Development of opioid tolerance with repeated transcutaneous electrical nerve stimulation administration. **Pain**, v.102, p. 195-201, 2003.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v. 53, p. 55-63, 1994.

CLAYDON, L.S.; et al. Dose-specific effects of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on experimental pain: a systematic review. **Clin J Pain**, v. 27, p. 635-47, 2011.

DAGLI, M.L.Z.; GUERRA, J.L.; SALDIVA, P.H.N. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.29, n.1, p.97-103, 1992.

DESANTANA, J.M; DA SILVA, L.F.; SLUKA, K.A. Cholecystokinin receptors mediate tolerance to the analgesic effect of TENS in arthritic rats. **Pain**, v.148, n.1, p.84-93, 2010.

DESANTANA, J.M. et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation at both high and low frequencies activates ventrolateral periaqueductal grey to decrease mechanical hyperalgesia in arthritic rats. **Neuroscience**, v.163, p. 1233-1241, 2009.

DESANTANA, J.M. et al. Effectiveness of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation for Treatment of Hyperalgesia and Pain. **Curr Rheumatol Rep**, v.10, n.6, p.492-499, 2008

DEVANE, W.A et al.. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v.258, p.1946- 1949,1992.

DEVANE, W.A. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Mol Pharmacol**, v. 34, p.605-13, 1988.

DI MARZO, V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? **Nat. Rev Drug Discov**, v.7, p.438–455, 2008.

DI MARZO, V.; DE PETROCELLIS, L. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. **Annu Rev Med**, v. 57, p.553–574, 2006.

DOGRUL, A. et al. Involvement of descending serotonergic and noradrenergic pathways in CB1 receptor-mediated antinociception. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 2, n. 38, p.97-105, 2012.

EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen uber maligne mausentumoren. **Berlin Klin Wochenschr**, v.42, p.871-874, 1905.

FARQUHAR-SMITH, W.P. et al. Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. **Mol Cell Neurosci**, v.15, p.510–21, 2000.

FRANKLIN, K.B.; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 4. ed. Academic Press. California, USA, 1997.

GALDINO, G. et al. Acute resistance exercise induces antinociception by activation of the endocannabinoid system in rats. **Anesth Analg**, v.119, n.(3), p.702-715, 2014 a.

GALDINO, G. et al. The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. **Neuropharmacology**, v. 77, p. 313-24, 2014 b.

GARCIA, O. D. et al. The endocannabinoid system is modulated in response to spinal cord injury in rats. **Neurobiol Dis**, v.33, p. 57–71, 2009.

GIUFFRIDA, A.; BELTRAMO, M.; PIOMELLI, D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 298, p. 7-14, 2001.

GOPALKRISHNAN, P.; SLUKA, K.A. Effect of varying frequency, intensity, and pulse duration of transcutaneous electrical nerve stimulation on primary hyperalgesia in inflamed rats. **Arch Phys Med Rehabil**, v.81, n.7, p.984-90, 2000.

GUINDON, J.; HOHMANN, A.G. The Endocannabinoid System and Pain. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v.8, n.6, p. 403-421, 2009.

HADLEY, M. E. General mechanisms of hormone action. In: **Endocrinology**. 2. ed. New Jersey (US): Editora Prentice Hall. 1988, Cap. 4, p. 56-84.

HAYAKAWA, K., et al. Cannabidiol potentiates pharmacological effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol via CB(1) receptor-dependent mechanism. **Brain Res**, v.1188, p. 157-164, 2008.

HAMA, A.; SAGEN, J. Sustained antinociceptive effect of cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 over time in rat model of neuropathic spinal cord injury pain. **J Rehabil Res Dev**, v.46, n.1, p.135-143, 2009.

HERZBERG, U. et al. The analgesic effects of *R* (1) WIN 55,212-2 mesylate, a high affinity cannabinoid agonist, in a rat model of neuropathic pain. **Neurol Lett**, v. 221, p.157–160, 1997.

HILL, M. N. et al. Endogenous cannabinoid signaling is required for voluntary exercise-induced enhancement of progenitor cell proliferation in the hippocampus. **Hippocampus**, v. 20, p. 513-523, 2010

HOHMANN, A.G.; HERKENHAM, M. Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. **Neuroscience**, v. 90, n. 3, p.923-31,1999.

HOHMANN, A.G. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. **Chem Phys Lipids**, v. 31, n.121(1-2), p.173-190, 2002.

HOHMANN, A.G.et al. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, v. 435, p.1108-1112, 2005.

HOHMANN, A.G.et al. An enocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, v. 435, p. 1108-1112, 2005.

HOWLETT, A.C. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 345-358, 2004.

HOWLETT, A.C. International union of pharmacology. Xxvii. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacol Rev**, v. 54, n. 2 ,p.161-202, 2002.

HOWLETT, A.C. Inhibition of neuroblastoma adenylate cyclase by cannabinoid and nantradol compounds. **Life sci**, v. 35, n.17, p.1803-1810, 1984.

HYLDEN, J.L.K.; WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **Eur J Pharmacol**, v. 67, p.313-316, 1980.

JIN, X.H. DNA cloning and characterization of human and mouse Ca(2+) independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferases. **Biochim Biophys Acta**, v.1791, p.32–38, 2009.

JOHANEK, L.M. Cannabinoids attenuate capsaicin-evoked hyperalgesia through spinal and peripheral mechanisms. **Pain**, v. 93,p. 303-315, 2001.

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

KALRA, A.; URBAN, M.O.; SLUKA, K.A. Blockade of opioid receptors in rostral ventral medula prevents antihyperalgesia produced by transcutaneous electrical nerve Stimulation (TENS). **J Pharmacol Exp**, n. 298, p. 257–263, 2001.

KANDEL, E.R. et al. **Principles of neural science**. McGraw-Hill. 3. ed. Nova York. 2000.

KANE, K.; TAUB, A. A history of local electrical analgesia. **Pain**, n.1, p.125-138,1975.

KARLSSON, M. et al. DNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. **J Biol Chem**, v. 272,p 27218- 27223, 1997.

KING, E.W. Transcutaneous electrical nerve stimulation activates peripherally located alpha-2A adrenergic receptors. **Pain**, v. 115, p. 364-73, 2005.

KUMAR, V.; et al. **Patologia estrutural e funcional**. Ed. Elsevier. 7. ed. Rio de Janeiro. 2005.

LAU, B.K. et al. Endocannabinoid modulation by FAAH and monoacylglycerol lipase within the analgesic circuitry of the periaqueductal grey. **Br J Pharmacol**. v.171, n.23, p.5225-5236, 2014.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J. Physiology of Pain. In: **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. Philadelphia: Saunders, v.30, n.4, p. 703-728, 2000.

LEUNG, D. et al. Inactivation of N acylphosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. **Biochemistry**, v.45, p.4720-4726, 2006.

LEE, K.H.; CHUNG, J.M.; WILLIS, W.D. Inhibition of primate spinothalamic tract cells by TENS. **J Neurosurg**, v.62, n. 2, p. 276-87, 1985.

LIU, J. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. **Neuropharmacology**, v.54, p.1-7, 2008.

LONGHI-BALBINOT, D.T. **Análise dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do triterpeno 3,6,16-tridroxilup-20 (29)-eno (TTHL) isolado de Combretum leprosum**. 2009,106 f. Tese (Doutorado em Biologia) -Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina. 2009.

LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol IASP Pain Terminology Basic. **Pain**, 2008.

LOWRY, O.H. et al.. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v.193, p. 265-75,1951.

MA, Y.T.; SLUKA, K.A. Reduction in inflammation-induced sensitization of dorsal horn neurons by transcutaneous electrical nerve Stimulation in anesthetized rats. **Exp Brain Res**, v.137, p. 94-102,2001.

MAEDA, Y. et al. Release of GABA and activation of GABA_A in the spinal cord mediates the effects of TENS in rats. **Brain res**, v.1136, n. 1, p.43-50, 2007.

MARTIN, B. R.; LICHTMAN, A. H. Cannabinoid transmission and pain perception. **Neurobiol Dis**, n.5, p. 447-461, 1988.

MARTIN, W.J.; TSOU, K.; WALKER, J.M. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of the rat tail-flick reflex after microinjection into the rostral ventromedial medulla. **Neurosci Lett**, v. 242,p. 33-36, 1998.

MARTIN, W.J. et al. An examination of the central sites of action of cannabinoid-induced antinociception in the rat. **Life Sci**, v.56, p.2103-2109, 1995.

MATSUDA, L.A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, p. 561-564, 1990.

MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochem Pharmacol**, v.50, p. 83-90, 1995.

MELZACK, R. From the gate to the neuromatrix. **Pain**, v. 6 -S, p.121-6, 1999.

MELZACK, R.;WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v.150, p. 971-979, 1965.

MENG, I. D.; JOHANSEN, J. P. Antinociception and modulation of rostral ventromedial medulla neuronal activity by local microinfusion of a cannabinoid receptor agonist. **Neuroscience**, v.124, p. 685-693, 2004.

MENG, I.D.et al. An analgesia circuit activated by cannabinoids. **Nature**, v. 395, p. 381-383, 1998.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. eds Classification of chronic pain. In: **IASP Task Force on Taxonomy**. IASP press, Seattle, 1994, pp. 209-214.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, p. 355-474, 2002.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v.57, p.1-164, 1999.

MITRIRATTANAKUL, S. et al. Site-specific increases in peripheral cannabinoid receptors and their endogenous ligands in a model of neuropathic pain. **Pain**, v.126, p.102–114, 2006.

NUNES-DE-SOUZA, R.L. et al. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intraamygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**, v. 150, p. 300–310, 2000.

OLANGO, W. et al. The endocannabinoid system in the rat dorsolateral periaqueductal grey mediates fear-conditioned analgesia and controls fear expression in the presence of nociceptive tone. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 8, p.2549-2560, 2012.

ORANGE, F.A.; AMORIM, M.M.R.; LIMA, L. Uso da Eletroestimulação Transcutânea para alívio de dor durante o trabalho de parto em uma maternidade-escola: ensaio clínico controlado. **Rev Bras Ginecol e obstet** v. 25, n.1, p.45- 52,2003.

PALCE, J.A.; et al. **Cancer Pain: From molecules to suffering**. Seattle, WA: IASP press; 2010

PERTWEE, R.G.,ROSS, R.A. Cannabinoid receptors and their ligands. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.66, p.101-121, 2002.

PETROSINO, S. et al. Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. **Neuropharmacology**, v.52, p.415–422, 2007.

RADHAKRISHNAN, R. et al. Spinal 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors mediate low, but not high, frequency TENS-induced antihyperalgesia in rats. **Pain**, v.105, n.1-2, p.205-213,2003.

RAMALHO, R.T.; AYDOS, R.D.; CEREDA, M.P. Evaluation of acetone cyanohydrin effect in “*in vitro*” inactivation of the Ehrlich ascites tumor cells. **Acta Cir Bras**, v. 25, n.1, p.111-116, 2010.

RESENDE, M.A. et al. Redução do efeito analgésico da estimulação elétrica nervosa transcutânea de baixa frequência em ratos tolerantes à morfina. **Rev Bra fisioter.**, v. 10, n. 3, p. 291-296, 2006.

RESENDE, M. A. et al. Electrical stimulation (TENS) Transcutaneous Local effects in experimental edema and inflammatory pain. **Eur J Pharmacol** v.504, n.3, 19, p. 217-222, 2004.

ROMERO, T.R. et al. CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonists induce peripheral antinociception by activation of the endogenous noradrenergic system. **Anesth Analg**. V.116,n.2, p.463-72, 2013.

REYNOLDS, D.V. Surgery in the Rat during Electrical Analgesia Induced by Focal Brain Stimulation. **Science**, v.164 n. 3878, p. 444-445 , abril 1969.

SABINO, G.S. et al. Release of endogenous opioids following transcutaneous electrical stimulation in an experimental model of acute inflammatory pain. **J Pain**, v.9, p.157-163, 2008.

SAGHAFI, N.;LAM, D. K. SCHMIDT, B. L. Cannabinoids Attenuate Cancer Pain and Proliferation in a Mouse. **Neurosci Lett**, v.488, p.247–251, 2011.

SAITO, V. M.; WOTJAK, C.T.; MOREIRA F. A. Pharmacological exploitation of the endocannabinoid system: new perspectives for the treatment of depression and anxiety disorders?. **Rev Bra de Psiquiatr**, v.32, s.1 ,2010.

SALAR, G. et al. Effect of transcutaneous electrotherapy on CSF beta-endorphin content in patients without pain problems. **Pain**, v.10, p.169-172,1981.

SCHAIBLE, H. G. Pathophysiology of pain. **Orthopade**, v. 36, n. 1, p. 8-16, 2006.

SIEGLING A. et al. Cannabinoid CB 1 receptor upregulation a model of chronic neuropathic pain mouse. **Eur J Pharmacol**, v. 415, n.1, p. R5R7,2001.

SILVA, A.E.; SANTOS, F.G.A.; CASSALI, G.D. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.58, n.4, p.658-661, 2006.

SILVA, G.et al., Physical exercise in adolescence changes CB1 cannabinoid receptor expression in the rat brain. **Neurochem Int**, v.57, p.492-496, 2010.

SLUKA, K.A; LISI, T.L.; WESTLUND, K.N. Increase in serotonin release in the spinal cord at low but not high, transcutaneous electrical nerve stimulation frequency in mice with inflammation of joints. **Arch Phys Med Rehabil**, v.87, p.1137-1140, 2006.

SLUKA, K.A.; VANCE. C.;G, LISI. T.L. High frequency, but not low frequency transcutaneous electrical nerve stimulation reduces the release of aspartate and glutamate in the dorsal horn of the spinal cord. **J Neurochem**, v.95, p.1794-1801, 2005.

SLUKA, K.A.; WALSH, D. Transcutaneous electrical nerve stimulation; basic science, mechanisms and clinical effectiveness. **J. Pain**, v.4, p.109-121, 2003.

SLUKA, K.A. et al. Low frequency TENS is less effective than high frequency TENS at reducing inflammation-induced hyperalgesia in morphine-tolerant rats. **Eur J Pain**, v. 4, p.185-193, 2000.

SLUKA, K.A. et al. Spinal blockade of opioid receptors prevents the analgesia produced by TENS in arthritic rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 289, n. 2, p.840-6, 1999.

SLUKA K.A. et al. Treatment with either high or low frequency TENS reduces the secondary hyperalgesia observed after injection of kaolin and carrageenan into the knee joint. **Pain**, v.77, p.97–102, 1998.

SMITH, P.B.; MARTIN, B.R. Spinal mechanisms of delta 9 tetrahydrocannabinol-induced analgesia. **Brain Res**, v.578, n. 1-2, p.8-12, 1992.

SOUZA, R. R. et al. Evaluation of Receptor 5HT₃ In the Modulation of Analgesia Induced by TENS . **Rev Neurocienc**, v.21, n.4, p.537-541, 2013.

SOUZA, J.. Poderia a atividade física induzir analgesia em pacientes com dor crônica? **Rev Bras Med Esporte** [online], v.15, n.2, p. 145-150, 2009.

STÄNDER, S. et al. Distribution cannabinoid receptor 1 (CB₁) and 2 (CB₂) in sensory nerve fibers associated structures and in human skin. **J Dermatol Sci**, v.38, p.177-188, 2005.

SUPLITA, R.L. et al. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase enhances cannabinoid stress-induced analgesia: sites of action in the dorsolateral periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. **Neuropharmacol**, v.49, p.1201-1209, 2005.

TODAKA, H. et al. Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. **J Biol Chem**, v.279, p. 35133- 35138, 2004.

TSOU, K. et al. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience**, v. 83, p. 393-411, 1998.

UEDA, M. et al. Cannabinoid receptor type 1 antagonist, AM251, attenuates mechanical allodynia and thermal hyperalgesia after burn injury. **Anesthesiology**, n. 121, v. 6, p.:1311-1329, 2014.

VAN, S.M.D. et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. **Science**, v. 310, p. 329-332, 2005.

VANCE, C.G. et al. Using TENS for pain control: the state of the evidence. **Pain Manag**, v. 4, n. 3, p.197-209, 2014.

VANDERAH, T.W. Pathophysiology of Pain. **Med Clin North Am**, v..91, p.1-12, 2007.

VAUGHAN, C.W.et al. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. **Mol Pharmacol**, v.57, n.2, p.:288-95, 2000.

WALL, P.D.; Sweet, W.H. Temporary Abolition of Pain in Man. **Science**, v.155, p.108-109, 1967.

WALTER, C.; LÖTSCH, J. Meta-analysis of the relevance of the OPRM1 118A>G genetic variant for pain treatment. **Pain**, v146, n.3, p.270-275, 2009. .

WILSON, R.I.; NICOLL, R.A. Endocannabinoid signaling in the brain. **Science**, v.296, p.678-682, 2002.

WOOLF, C.; THOMPSON, J. Segmental afferent fibreinduced analgesia: transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) and vibration. In: Wall, P, Melzack, R (eds) **Textbook of Pain**, Churchill Livingstone, New York, 1994, p.1191-1208.

YAKSH, T.L.; MALMBERG, A.B., Central pharmacology of nociceptive transmission, In: Wall, P.; Melzack, R. (eds) **Textbook of Pain**, Churchill Livingstone, New York 1994, p. 165-200.

YAKSH, T. L. The Antinociceptive Effects of Intrathecally Administered Levonantradol and Desacetyllevonantradol in the Rat. **J Clin Pharmacol**, n.21, p.334S–340S, 1981.

WALL, P.D.; MELZACK, R.; BONICA, J.J. **Textbook of pain**, Edinburgh: Churchill Livingstone. 1994, p.165 -96.

WANG, H.; WESSENDORF, M. W. μ and δ -opioid receptor mrnas are expressed in periaqueductal gray neurons projecting to the rostral ventromedial medula. **Neuroscience**, v. 109, n. 3, p. 619-634, 2002

WANG, Q. et al. Pretreatment with electroacupuncture induces rapid tolerance to focal cerebral ischemia through regulation of endocannabinoid system. **Stroke**, 40, 2157-64, 2009.

WILLIAM, J. M.; HOHMANN, A. G. WALKER, J. M. Suppression of Noxious Stimulus-Evoked Activity in the Ventral Posterolateral Nucleus of the Thalamus by a Cannabinoid Agonist: Correlation between Electrophysiological and Antinociceptive Effects. **J Neurosc**, v16, n.20,p.6601-6611,1996.