

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

Mara Aparecida Pereira de Ávila

**PARTICIPAÇÃO DE CANAIS DE  $K^+$ <sub>ATP</sub>  
NA RESPOSTA ANTINOCICEPTIVA  
PERIFÉRICA DA VIA  
HEME-OXIGENASE/MONÓXIDO DE CARBONO**

Alfenas/MG  
2013

Mara Aparecida Pereira de Ávila

**PARTICIPAÇÃO DE CANAIS DE  $K^+$ <sub>ATP</sub>  
NA RESPOSTA ANTINOCICEPTIVA  
PERIFÉRICA DA VIA  
HEME-OXIGENASE/MONÓXIDO DE CARBONO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós -  
Graduação em Ciências Fisiológicas, no Instituto de Ciências  
Biológicas, da Universidade Federal de Alfenas, como requi-  
sito para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Giovani de O. Nascimento

Alfenas/MG  
2013

Ávila, Mara Aparecida Pereira de.

Participação de canais de  $K^+_{ATP}$  na resposta antinociceptiva  
periférica na via da heme-oxigenase/monóxido de carbono / Mara  
Aparecida Pereira de Ávila. - 2013.

74 f. -

Orientador: Carlos Giovani de O. Nascimento.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade  
Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Heme Oxigenase (Desciclizante). 2. Monóxido de Carbono. 3.  
Analgésicos. 4. Canais  $K_{ATP}$ . I. Nascimento, Carlos Giovani de O. II.  
Título.

CDD: 615



Mara Aparecida Pereira de Ávila

**PARTICIPAÇÃO DE CANAIS DE  $K^+$ <sub>ATP</sub>  
NA RESPOSTA ANTINOCICEPTIVA  
PERIFÉRICA DA VIA  
HEME-OXIGENASE/MONÓXIDO DE CARBONO**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em:

Profº Dr.

Instituição:

Assinatura:

Profº Dr.

Instituição:

Assinatura:

Profº Dr.

Instituição

Assinatura:

**Dedico esta dissertação àqueles que sempre se dedicaram a mim:  
meus pais Antônio e Zélia, por me guiarem nos caminhos da vida,  
sempre me incentivando e apoiando na luta por meus sonhos.**

**Vocês são o que de melhor existe em mim...**

## **AGRADECIMENTOS**

Nada seria possível, nenhum objetivo atingido, nenhuma meta alcançada, se não fossem as colaborações e assim agradeço:

Primeiramente a Deus, o primeiro a acreditar em mim, sempre se fazendo presente nos grandes e pequenos acontecimentos.

À minha família, meus pais e queridos irmãos, por todo apoio e incentivo; o meu motivo para ir além.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Giovani de Oliveira do Nascimento pela paciência e apoio, aceitando o desafio de me orientar e contribuindo assim, para a concretização deste sonho.

Aos membros da banca examinadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi e Prof. Dr. Luiz Guilherme Branco, pela disponibilidade em participar da banca, pelo tempo despendido na leitura deste trabalho e pelas contribuições pessoais acerca desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva, pela disposição em ajudar, enriquecendo este trabalho com seu conhecimento e sendo um exemplo como cientista.

Aos demais professores da UNIFAL, que mesmo não diretamente ligados a esta dissertação de mestrado contribuíram para minha formação pessoal e acadêmica.

Aos colegas de pós-graduação, pelo incentivo e por terem compartilhado comigo tantas expectativas, angústias e conhecimentos.

Aos doutorandos do laboratório: Ana Laura, Vanessa e Michael, pela amizade e ajuda.

Aos velhos amigos por compreenderem os momentos de ausência e aos novos

amigos, conquistados na caminhada científica (“os queridos respiratórios” e tantos outros, que provavelmente seria injusta ao tentar citar nomes): a jornada se torna mais leve e divertida ao lado de vocês.

Aos amigos da “Vila do Chaves”, uma família linda que Alfenas me concedeu.

Aos funcionários da fisiologia: Marina, Antonieta e José pela ajuda e momentos de descontração.

Ao Biotério Central da UNIFAL, em especial ao João, por ter fornecido os animais que foram essenciais para a execução deste trabalho.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À UNIFAL por permitir a realização deste trabalho, me proporcionando a cada dia um novo conhecimento.

E por fim, mas não menos importante, aos animais que prestimosamente contribuíram para a realização deste estudo oferecendo inocentemente sua vida: o meu eterno respeito e agradecimento.



***“...E nunca considerem seu estudo como uma obrigação,  
mas como uma oportunidade invejável de aprender,  
sobre a influência libertadora da beleza no domínio do espírito,  
para seu prazer pessoal e para o proveito da  
comunidade à qual pertencerá o seu trabalho futuro”.***

*Albert Einstein*

## RESUMO

O monóxido de carbono (CO) é uma das moléculas mais antigas encontradas na atmosfera, sendo popularmente associado à asfixia por sua alta taxa de ligação à hemoglobina. Contudo, estudos também demonstram seu envolvimento em diversas funções fisiológicas através da produção endógena pela enzima heme-oxigenase (HO), que catalisa o metabolismo do grupo heme em quantidades equimolares de CO, biliverdina e ferro. Destes, o CO é um de seus produtos mais ativos, podendo atuar como neurotransmissor e neuromodulador do sistema nervoso, molécula de sinalização cardiovascular com propriedades vasoativas e com potencial participação em processos nociceptivos. Inúmeras pesquisas associam os mecanismos de ação da via da HO/CO com a ativação da enzima guanilato ciclase, GMPc ou modulação direta de canais de potássio, sendo este último, amplamente conhecido pelo seu envolvimento em respostas antinociceptivas, em especial sua classe sensível ao ATP ( $K^+_{ATP}$ ). Assim, nosso objetivo neste estudo, foi verificar o possível envolvimento de  $K^+_{ATP}$ , na antinocicepção desencadeada pela via da HO/CO após indução de hiperalgisia pela administração de carragenina e exposição aos testes nociceptivos de Von Frey eletrônico e Randall Selitto. Os resultados obtidos em nossos experimentos demonstram que a aplicação intraplantar de hemina (substrato da HO) ocasionou ação antinociceptiva, sendo excluída através do tratamento contralateral a ocorrência de mecanismos sistêmicos, frente à manipulação periférica da via. Por sua vez, a administração do inibidor da via da HO (tin protoporphyrin IX dichloride) potencializou a hiperalgisia ocasionada pela carragenina. Efeitos similares não foram observados frente à administração dos demais subprodutos, biliverdina e ferro (sulfato ferroso), sugerindo o CO como sendo o mais ativo subproduto da via na modulação de processos nociceptivos. Já a administração conjunta de glibenclamida (bloqueador de  $K^+_{ATP}$ ) e hemina, acarretou o bloqueio da ação antinociceptiva ocasionada pela hemina, sendo que a administração conjunta da menor dose efetiva de diazoxide (ativador de canais de potássio) e hemina evidenciou uma ação sinérgica entre as drogas potencializando a resposta antinociceptiva do substrato da via. Também observamos que o efeito antinociceptivo da hemina não foi alterado pela administração de naloxone (antagonista opióide), sugerindo assim, a exclusão da participação do sistema

opióide na resposta antinociceptiva da via da HO/CO. Neste contexto, os resultados apresentados em nosso estudo sugerem fortemente que a ação antinociceptiva periférica da via HO/CO, pode estar relacionada com a ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP.

**Palavras-chave:** Heme Oxigenase (Desciclizante). Monóxido de Carbono. Analgésicos. Canais KATP.

## ABSTRACT

Carbon monoxide (CO) is one of the oldest molecules found in the atmosphere, being popularly associated to asphyxia by its high binding to hemoglobin. However, studies have also demonstrated its involvement in various physiological functions through the endogenous production by the enzyme heme-oxygenase (HO), which catalyzes the metabolism of heme in equimolar amounts of CO, biliverdin and iron. Of these, the CO is one of its most active and may act as a neurotransmitter and neuromodulator nervous system, cardiovascular signaling molecule with vasoactive properties and potential involvement in nociceptive processes. Numerous research associate of the mechanisms of action of the HO/CO pathway by activation of the enzyme guanylate cyclase, cGMP or direct modulation of potassium channels, the latter being widely described as involved in various nociceptive mechanisms in particular its class ATP-sensitive ( $K^+_{ATP}$ ). Thus, our goal in this study was to investigate the possible involvement of  $K^+_{ATP}$  in an antinociceptive via triggered by the HO/CO after hyperalgesia induced by administration of carrageen and exposure to electronic Von Frey and Randall Selitto. The results obtained in our experiments suggest that i.pl. treatment with the substrate of HO (hemin) caused a dose-dependent antinociception, and the possible systemic action was excluded by treating contralateral paw via. In turn, the administration HO pathway inhibitor (Tin protoporphyrin IX dichloride) increased the hyperalgesia caused by carrageen. Similar effects were not observed by the administration of the other two products, biliverdin, iron, showing the CO as the more active pathway in the modulation of nociceptive processes. Since the joint administration of glibenclamide (blocker of  $K^+_{ATP}$ ) and hemin, caused the blockage of antinociceptive action caused by hemin, and the joint administration of the lowest dose-response diazoxide (potassium channel activator) and hemin caused a synergistic action between drugs, and potentiate the antinociceptive response to the pathway substrate. We also observed that the antinociceptive effect of hemin was not altered by the administration of naloxone (opioid antagonist), suggesting the exclusion of the opioid system in the antinociceptive response of the HO/CO. Thus, the results presented in this study strongly suggest that the peripheral antinociceptive action via the HO/CO may be related to the activation of potassium channels sensitive to ATP.

**Key words:** Heme oxygenase. Carbon monoxide. Analgesics. Channels KATP.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AC</b>	– Adenilato ciclase
<b>AMPC</b>	– Adenosina 3,5 - monofosfato cíclico
<b>ATP</b>	– Adenosina 5´ - trifosfato
<b>Bili</b>	– Biliverdina
<b>Ca<sup>++</sup></b>	– Cálcio
<b>Cav 1.2</b>	– Canais de cálcio do tipo L
<b>Cg</b>	– Carragenina
<b>CO</b>	– Monóxido de carbono
<b>COHb</b>	– Carboxi-hemoglobina
<b>D</b>	– Direita
<b>E</b>	– Esquerda
<b>ENaC</b>	– Canal de sódio sensível à amilorida
<b>EPM</b>	– Erro padrão médio
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	– Íon ferroso
<b>Fent</b>	– Fentanil
<b>GC</b>	– Guanilato ciclase
<b>GIRK ou Kir3</b>	– Canal de potássio de retificadores regulados pela proteína G
<b>Gli</b>	– Glibenclamide
<b>GMPc</b>	– Guanosina 3,5 - monofosfato cíclico
<b>Graf.</b>	– Gráfico
<b>GTP</b>	– Guanosina 5'-trifosfato
<b>He</b>	– Hemina
<b>HO</b>	– Heme-oxigenase
<b>HO-1</b>	– Heme-oxigenase 1
<b>HO-2</b>	– Heme-oxigenase 2
<b>HO-3</b>	– Heme-oxigenase 3
<b>IASP</b>	– Sociedade Internacional para o Estudo da Dor
<b>ICV</b>	– Intracerebroventricular
<b>Inib HO</b>	– Inibidor da HO
<b>i.pl.</b>	– Intraplantar

<b>K<sup>+</sup></b>	– Potássio
<b>K<sup>+</sup><sub>ATP</sub></b>	– Canal de potássio sensível ao ATP
<b>K<sub>Ca</sub><sup>++</sup></b>	– Canal de potássio sensível ao cálcio
<b>K<sub>ir</sub></b>	– Canal de potássio de retificadores de influxo
<b>K<sub>v</sub></b>	– Canal de potássio dependente de voltagem
<b>K2P</b>	– Canal de potássio de dois poros
<b>MAP</b>	– Proteína ativada por mitógeno
<b>mmol</b>	– Milimol
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	– Carbonato de Sódio
<b>NADPH</b>	– Fosfato dinocliotídeo de nicotinamida e adenina
<b>Nalox</b>	– Naloxone
<b>NGF</b>	– Tirosina quinase
<b>NMDA</b>	– N-metil-D-aspartato
<b>NO</b>	– Óxido nítrico
<b>O<sub>2</sub></b>	– Oxigênio
<b>Salina/ Sal</b>	– Solução fisiológica 0,9% estéril
<b>SNC</b>	– Sistema nervoso central
<b>Sulf Fe</b>	– Sulfato ferroso
<b>SUR</b>	– Receptor sulfoniluréia
<b>TREK 1</b>	– Canal de K <sup>+</sup> relacionado ao TWIK
<b>Veíc</b>	– Veículo
<b>ZnDPBG</b>	– Inibidor da HO
<b>µg</b>	– Micrograma
<b>µL</b>	– Microlitro
<b>Δ</b>	– Delta
<b>λ</b>	– Lambda
<b>&lt;</b>	– Menor
<b>&gt;</b>	– Maior
<b>±</b>	– Mais ou menos

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Catabolismo do grupamento heme pela enzima heme-oxigenase...	19
Gráfico 1A	– Efeito da administração de hemina sobre a hiperalgesia induzida por Cg, pelo método de Von Frey eletrônico .....	44
Gráfico 1B	– Efeito da administração de hemina sobre a hiperalgesia induzida por Cg, pelo método de Randall Selitto.....	44
Gráfico 2	– Efeito da administração do inibidor da HO sobre a hiperalgesia induzida por Cg, através do método de Von Frey eletrônico.....	45
Gráfico 3	– Efeito da administração do inibidor da HO sobre a hiperalgesia induzida por Cg, pelo teste de Randall Selitto.....	46
Gráfico 4A	– Efeito da administração de sulfato ferroso sobre a hiperalgesia induzida por Cg, pelo método de Von Frey eletrônico.....	47
Gráfico 4B	– Efeito da administração de sulfato ferroso sobre a hiperalgesia induzida por Cg, pelo teste de Randall Selitto.....	47
Gráfico 5A	– Efeito da administração de biliverdina sobre a hiperalgesia induzida por Cg, através do método de Von Frey eletrônico.....	47
Gráfico 5B	– Efeito da administração de biliverdina sobre a hiperalgesia induzida por Cg, através do teste de Randall Selitto.....	47
Gráfico 6A	– Efeito da administração contralateral (pata esquerda) de hemina sobre a hiperalgesia induzida por Cg, pelo Von Frey eletrônico.....	48
Gráfico 6B	– Efeito da administração contralateral (pata esquerda) de hemina	



	sobre a hiperalgesia induzida por Cg, pelo Randall Selitto .....	48
Gráfico 7A	– Efeito do bloqueio de canais de $K^+_{ATP}$ (glibenclamide) sobre a resposta antinociceptiva induzida pela administração de hemina, através do Von Frey eletrônico.....	49
Gráfico 7B	– Efeito do bloqueio de canais de $K^+_{ATP}$ (glibenclamide) sobre a resposta antinociceptiva induzida pela administração de hemina, através do teste de Randall Selitto.....	49
Gráfico 8A	– Efeito da administração do ativador de canais de $K^+$ (diazoxide) sobre a hiperalgesia induzida por Cg, através do método de Von Frey eletrônico.....	50
Gráfico 8B	– Efeito da administração do ativador de canais de $K^+$ (diazoxide) sobre a hiperalgesia induzida por Cg, no teste de Randall Selitto .....	50
Gráfico 9A	– Efeito da administração do ativador de canais de $K^+$ (diazoxide) sobre a resposta antinociceptiva induzida pela administração de hemina, no teste de Von Frey eletrônico.....	51
Gráfico 9B	– Efeito da administração do ativador de canais de $K^+$ (diazoxide) sobre a resposta antinociceptiva induzida pela administração de hemina, através do teste de Randall Selitto .....	51
Gráfico 10A	– Efeito do tratamento com antagonista do sistema opióide (naloxone) sobre a resposta antinociceptiva induzida pela administração de Fentanil, pelo método de Von Frey eletrônico.....	52
Gráfico 10B	– Efeito da administração do antagonista do sistema opióide (naloxone) sobre a resposta antinociceptiva induzida pela administração de Fentanil, pelo teste de Randall Selitto.....	53

- Gráfico 11A – Efeito da administração do antagonista do sistema opióide (naloxone) sobre a resposta antinociceptiva induzida pela administração de hemina, pelo método de Von Frey eletrônico..... 54
- Gráfico 11B – Efeito da administração do antagonista do sistema opióide (naloxone) sobre a resposta antinociceptiva induzida pela administração de hemina, pelo teste de Randall Selitto..... 54

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Heme-oxigenase</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>Monóxido de Carbono</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3</b>	<b>Monóxido de Carbono e nocicepção</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4</b>	<b>Monóxido de Carbono e Canais Iônicos</b> .....	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Animais</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Drogas e Veículos utilizados</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3</b>	<b>Procedimentos/ Protocolos Experimentais</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3.1</b>	<i>Hipernocicepção mecânica induzida pela administração de Cg</i> .....	<b>30</b>
<b>3.3.2</b>	<i>Testes para mensuração da hipernocicepção mecânica</i> .....	<b>31</b>
<b>3.3.2.1</b>	Von Frey eletrônico .....	<b>31</b>
<b>3.3.2.2</b>	Randall Selitto .....	<b>32</b>
<b>3.3.3</b>	<i>Grupos Experimentais</i> .....	<b>33</b>
<b>3.3.3.1</b>	Experimento 1: Ação da via HO/CO e dos demais subprodutos liberados..	<b>33</b>
<b>3.3.3.2</b>	Experimento 2: Verificação de mecanismos sistêmicos .....	<b>37</b>
<b>3.3.3.3</b>	Experimento 3: Avaliação da participação dos canais de potássio .....	<b>38</b>

3.3.3.4	Experimento 4: Exclusão da participação do sistema opióide.....	40
4	<b>ANÁLISE DOS RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
5	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
5.1	<b>Efeito antinociceptivo da via HO/CO e exclusão da participação dos demais subprodutos liberados pela via.....</b>	<b>44</b>
5.2	<b>Exclusão da ocorrência de efeitos sistêmicos frente à administração periférica de hemina 65 µg .....</b>	<b>48</b>
5.3	<b>Efeito do bloqueio (glibenclamida) ou abertura (diazóxido) de canais de K<sup>+</sup> sobre a resposta antinociceptiva periférica da via HO/CO.....</b>	<b>48</b>
5.4	<b>Exclusão da participação do sistema opióide na resposta antinociceptiva periférica da via HO/CO .....</b>	<b>52</b>
6	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Embora seja amplamente conhecido como um gás nocivo, o monóxido de carbono (CO) também exerce importantes ações como mediador gasoso através de sua produção endógena pela enzima heme-oxigenase (HO), podendo atuar na sinalização celular e participar de uma série de funções fisiológicas como neurotransmissor e neuromodulador do sistema nervoso, substância vasoativa importante na sinalização cardiovascular, com ação anti-inflamatória e com potencial participação em processos nociceptivos, tanto periféricos quanto centrais.

Os primeiros relatos que demonstram a atuação do CO nas respostas nociceptivas são recentes, com estudos publicados em meados da década de 90, porém ainda é escasso o conhecimento acerca dos mecanismos pelos quais este gás pode exercer seu papel na modulação de tais processos.

A compreensão dos mecanismos de ação do CO na modulação nociceptiva é relevante, visto que os processos dolorosos podem acarretar importante redução na qualidade de vida e são descritos pela Sociedade Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma experiência sensitiva emocional desagradável, associada à lesão tecidual ou descrita em tais termos (MERSKEY; BOGDUK, 1994).

A origem dos fenômenos nociceptivos ocorre pela transformação de estímulos ambientais intensos em potenciais de ação que são transferidos das fibras nervosas periféricas até o sistema nervoso central (TEXEIRA, 1990). Neste processo ocorre o envolvimento de canais iônicos e estudos sustentam a hipótese de que a abertura dos canais de potássio atuaria como um mediador de antinocicepção, estando estes canais, principalmente sua classe de retificadores de influxo (Kir), como os sensíveis ao ATP, particularmente envolvidos nas respostas nociceptivas (Lohmann; Welch, 1999b).

Pesquisas realizadas por meio de manipulações farmacológicas apontam para a ativação da guanilato ciclase (GC) e da guanosina 3,5-monofosfato cíclico (GMPc) como mecanismos envolvidos na modulação nociceptiva pelo CO em modelos experimentais de dor; no entanto, ainda não existem relatos sobre a possível participação dos canais de potássio sensíveis ao ATP ( $K^+_{ATP}$ ) neste processo, sendo demonstrado apenas o envolvimento de canais de potássio na ação vasoativa do CO.

Neste contexto, frente às exposições apresentadas acima, este estudo procurou investigar possíveis evidências da participação de canais  $K^+_{ATP}$  na ação antinociceptiva desencadeada pela via heme-oxigenase/monóxido de carbono.

### 1.1 Heme-oxigenase

A primeira descrição da enzima heme-oxigenase foi em 1968, quando Tenhunen e colaboradores descobriram sua existência ao estudar os mecanismos envolvidos no catabolismo do grupo heme (TENHUNEN; MARVER; SCHMID, 1968).

O heme é formado por uma estrutura anelar complexa, a protoporfirina IX, contendo no centro um átomo de ferro no estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ). Presente nos eritrócitos, esta molécula é um complexo essencial na formação de todas as células aeróbicas, estando envolvida em diversas funções fisiológicas como a síntese de proteínas responsáveis pelo transporte de oxigênio, respiração mitocondrial, metabolismo de drogas, biossíntese de esteroides, nas defesas celulares antioxidantes e diferenciação celular, entre outras (ABRAHAM, et al., 1988; PONKA, 1999, 1997).

Embora o grupo heme tenha grande importância fisiológica, o acúmulo excessivo de sua forma livre, dissociado de proteínas, se torna nocivo para o organismo, podendo gerar estresse oxidativo e lesionar diretamente membranas lipídicas e organelas celulares (KNIGHT, et al., 2004). Assim, uma série de mecanismos fisiológicos são desencadeados para minimizar esses efeitos tóxicos; em mamíferos, o heme livre na circulação liga-se a proteínas plasmáticas como a haptoglobina e a albumina, reduzindo sua reatividade e facilitando seu transporte e captação pelas células (KNIGHT, et al., 2004). Já no ambiente intracelular, o principal mecanismo de detoxificação do grupo heme é a enzima mitocondrial heme-oxigenase (HO) (STEINER; RESTE; BRANCO, 2003).

A HO ocorre amplamente na natureza, desde algas azuis-verdes até plantas e mamíferos, e sua atividade pode ser fortemente acentuada diante de estímulos de diversas naturezas (FORESTI; MOTTERLINI, 1999).

A enzima HO é encontrada no retículo endoplasmático de diferentes células e tecidos, sendo descrita como uma enzima taxa-limitante do catabolismo do grupo

heme, que catalisa a reação de quebra do anel da molécula heme na presença de uma molécula de oxigênio e de citocromo P450 redutase, o qual transfere elétrons de fosfato dinoclotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) para o heme (MAINES, 1988, 1992). Catalisando assim, a estéreo específica degradação deste grupo, o que leva a formação equimolar de biliverdina, ferro livre e monóxido de carbono, como subprodutos da via (ABRAHAM; KAPPAS, 2008) (Figura 1).

A biliverdina formada nesta reação é rapidamente convertida em bilirrubina, pela ação da enzima citosólica biliverdina redutase e após ser formada, a bilirrubina é subseqüentemente conjugada pela enzima UDP-glicuronil-transferase e excretada na bile. Cerca de 80 a 85% da bilirrubina formada em vivo é derivada da hemoglobina liberada no envelhecimento ou de eritrócitos danificados (SCHACTER, 1988). Este montante representa a alta atividade basal da HO dentro dos tecidos ricos em células retículo endoteliais, tais como o baço e medula óssea, com atividade presente em diferentes tipos celulares, incluindo hematopoiético, células-tronco, medula óssea e em diversos órgãos (ABRAHAM, et al., 1988, 1989; ABRAHAM, 1991).

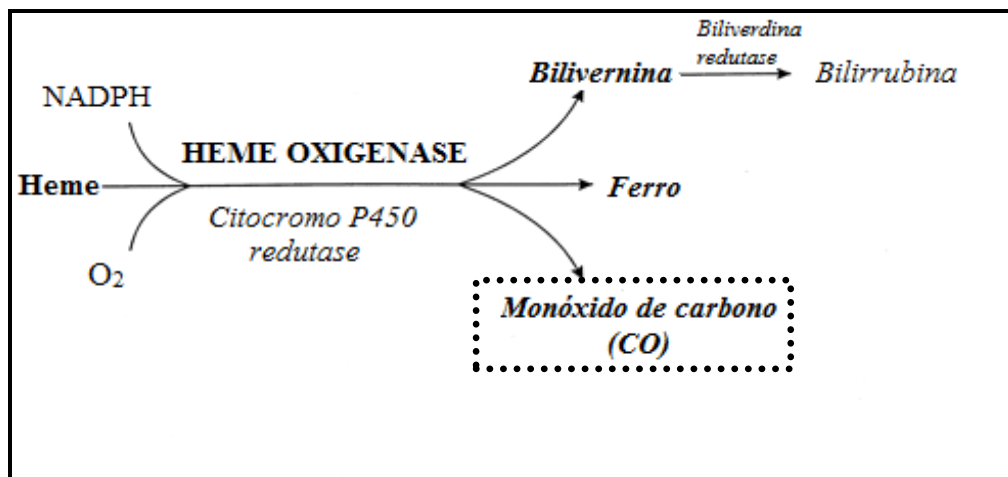


Figura 1 – Catabolismo do grupamento heme pela enzima heme-oxigenase.

Fonte: MARKS, et al.(1991), adaptado.

Além de seu papel na regulação dos níveis celulares de heme, a HO também é responsável pela reciclagem do ferro de senescentes glóbulos vermelhos e células extra-hematopoiéticas, tais como células do fígado.

Existem três isoenzimas distintas da HO: a HO-1, HO-2 e HO-3. Estas são produtos de diferentes genes e seus padrões de expressão variam amplamente nos

tecidos.

- HO-1: chamada de isoforma indutiva, é altamente induzível em tecidos como coração, rim, fígado, baço, pulmão e outros. Evidências experimentais sugerem a elevação do seu nível e atividade frente a determinados fatores e eventos, tais como: metais pesados, choque térmico, estresse oxidativo, radiação ultravioleta, hipóxia, endotoxinas bacterianas, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, óxido nítrico e prostaglandinas (RYTER, et al., 2002). Sugere-se que, paralelamente à degradação do grupo heme, esta isoforma possa exercer função vital na manutenção da homeostase celular diante de situações de estresse, sendo considerada um modulador das respostas adaptativas e protetoras celular na presença de lesão oxidativa e inflamatória (MARILENA, 1997; FORESTI; MOTTERLINI, 1999).

- HO-2: é chamada de isoforma constitutiva e desempenha papel de regulador fisiológico da função celular (WATANABE, et al., 2005). É constitutivamente encontrada no endotélio e nas camadas média e adventícia dos vasos sanguíneos, testículos, encéfalo, fígado, baço, no plexo mioentérico, neurônios receptores olfativos e células quimiorreceptoras do corpo carotídeo sensíveis ao teor sanguíneo de oxigênio (MARILENA, 1997; SNYDER; JAFFREY; ZAKHARY, 1998; RYTER, et al., 2002; RYTER; OTTERBEIN, 2004). Sua atividade pode ser aumentada pela ativação da fosfolipase C, desencadeada por receptores de membrana acoplados a proteínas G, pela despolarização em neurônios (SNYDER; JAFFREY; ZAKHARY, 1998) e também por glicocorticóides (FORESTI; MOTTERLINI, 1999; MORSE; SETHI; CHOI, 2002).

- HO-3: foi descrita mais recentemente no encéfalo por McCoubrey, et al. (1997 a,b). Possui baixa atividade biológica, sendo a isoforma menos conhecida (FORESTI; MOTTERLINI, 1999). Também é descrita como uma isoforma constitutiva da HO (MCCOUBREY, et al., 1997b), sugerindo-se que a HO-3 pode ser derivada da retro-transposição do gene da HO-2, visto que o gene da HO-3 não contém íntrons (SCAPAGNINI, et al., 2002).

Existe uma alta homologia da HO-1 e HO-2 em humanos, ratos e camundongos que chega a ser de cerca de 90 a 80%. (ALAM; DEN, 1992). Estas isoformas são as mais estudadas e apresentam semelhanças quanto à especificidade de um substrato e necessidade de um cofator para que ocorra a atividade enzimática. Elas também possuem aproximadamente 40% de homologia em suas sequências de aminoácidos (MÜLLER; TAGUCHI; SHIBAHARA, 1987; MCCOUBREY; EWING;



MAINES, 1992; MCCOUBREY; MAINES, 1994), apresentando diferenças marcantes em seus mecanismos regulatórios (STEINER; BRANCO, 2001).

## 1.2 Monóxido de Carbono

O monóxido de carbono (CO), uma das moléculas mais antigas encontradas na superfície terrestre, é amplamente reconhecido como um gás tóxico, resultado da oxidação ou combustão de materiais orgânicos como madeira, tabaco, carvão e gás natural (RYTER; OTTERBEIN, 2004).

Com base em seu potencial tóxico, em 1850, o fisiologista francês Claude Bernard reconheceu a ligação reversível do CO com a hemoglobina como uma potente reação capaz de causar asfixia (BERNARD, 1857). Desta forma, sua toxicidade é proveniente da alta taxa de ligação à hemoglobina (com afinidade 245 vezes maior do que o próprio oxigênio), o que leva à formação da carboxi-hemoglobina (COHb), que por sua vez não apenas impede a ligação da hemoglobina ao oxigênio nos capilares pulmonares, como também inibe a liberação do oxigênio previamente ligado à hemoglobina e ambos os fatores resultam em hipóxia tecidual.

Embora ao longo de muitos anos o CO tenha sido visto apenas como um gás prejudicial à saúde, nas últimas décadas uma nova faceta desta molécula vem sendo revelada pelo meio científico, através da descoberta de sua produção endógena.

As primeiras indicações da produção endógena do CO foram feitas por Saint-Martin e Nicloux em 1898; contudo, apenas em 1950 foram demonstradas evidências experimentais da possível existência deste gás em nosso organismo (SJÖSTRAND, 1950, 1951a, 1951b, 1952; COBURN; WILLIAMS; KAHN, 1966). No final da década de 60, a força motriz para a produção endógena do CO começou a ser atribuída à ação da enzima heme-oxigenase (TENHUNEN, et al., 1968, 1969, 1970; LANDAW; CALLAHAN; SCHMID, 1970).

Nos sistemas biológicos o CO pode advir de duas fontes (RODGERS, et al., 1994): uma é a heme dependente (80%) e outra é independente de heme (20%) (ABRAHAM; KAPPAS, 2008). A HO dependente é resultado da degradação do grupo heme pela enzima heme-oxigenase, sendo o rápido aumento das emissões de CO *in vivo* devido à indução de HO-1 ou da isoforma constitutiva HO-2

(ABRAHAM, et al., 1983). A forma HO independente é proveniente da foto-oxidação e auto-oxidação de moléculas orgânicas, fenóis e flavonóides e peroxidação dos lipídios, como resultado de estresse grave, que não pode ser alcançada em condições fisiológicas.

Com a descoberta de sua produção endógena, o CO passou a ganhar importância fisiológica no controle da homeostase, e desta forma um grande número de publicações relacionadas à fisiologia e farmacologia deste gás vieram aumentar as contribuições acerca do conhecimento de que, juntamente com outros gases endógenos, como o óxido nítrico (NO), o CO é um membro de uma nova classe fisiologicamente importante denominada de “gasotransmissores” (WANG, 2002).

Dentre suas ações como agente endógeno, o CO pode ser denominado como sinalizador celular capaz de exercer uma série de ações fisiológicas. O processo de sinalização celular é a modulação das atividades das células de um organismo através da liberação de moléculas, chamadas genericamente de ligantes, e sua interação com outras células através de moléculas específicas denominadas receptores, o que inclui processos bem descritos, como a transmissão sináptica e a ação hormonal, e outros apenas parcialmente conhecidos, como a modulação local entre células de um mesmo tecido ou órgão (PINA; FURLAN, 2007).

Neste contexto, um número cada vez maior de estudos indicam o CO como um gás biologicamente ativo (MAINES, 1992; VERMA, et al., 1993) que age como neurotransmissor e neuromodulador do sistema nervoso (DAWSON; SNYDER, 1994), como molécula de sinalização cardiovascular e com propriedades vasoativas (DAWSON; SNYDER, 1994; JOHNSON; KOZMA; COLOMBARI, 1999), substância capaz de liberar neuropeptídios (WEBER; EKE; MAINES, 1994; MANCUSO, et al., 1997), envolvido no aprendizado e memória (STEVENS; WANG, 1993; ZHUO, et al., 1993), em diversas atividades neuronais (CAO; BLUTE; ELDRED, 2000; XUE, et al., 2000), capaz de produzir efeitos antiproliferativos, antiapoptóticos, anticoagulantes e com ação anti-inflamatória por meio da inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias sob circunstâncias indutoras, como hiperóxia (OTTERBEIN, et al., 2000). Também, pesquisas apontam e descrevem sua capacidade modulatória sobre respostas nociceptivas.

Em todas as circunstâncias em que os mecanismos de ação do CO foram identificados, seus efeitos foram citados como decorrentes de três fatores: ativação da enzima GC, ativação da via das MAP quinases, ou por meio da modulação direta

de canais de potássio.

Desta forma, o CO, por suas propriedades lipossolúveis, é capaz de se difundir através da bicamada fosfolipídica das membranas celulares das células-alvo, podendo se ligar a enzima citosólica GC, o que por sua vez estimula a produção do segundo mensageiro GMPc a partir de guanosina 5'-trifosfato (GTP) (MARILENA, 1997; MORSE; SETHI; CHOI, 2002).

A ação da GC na produção de GMPc é semelhante à ação da adenilato ciclase (AC) na produção de adenosina 3,5-monofosfato cíclico (AMPc); no entanto, a ativação da GC não é dependente da interação do CO com um receptor de membrana acoplado à proteína G, diferentemente dos sinalizadores que ativam a AC e o fazem por intermédio de receptores acoplados à proteína G (ALBERTS, et al., 1994). Assim, a ação do CO sobre a GC é direta, de forma que a GC é, ao mesmo tempo, receptor e efetor enzimático das ações intracelulares do CO, sendo esse mecanismo de ação compartilhado por outro importante sinalizador gasoso, o NO.

Vários fatores de crescimento, importantes no controle da expressão gênica e proliferação celular, exercem seus efeitos nas células-alvo através de receptores enzimáticos (ALBERTS, et al., 1994). A sequência de enzimas ativadas pela interação entre ligante e receptor envolve um conjunto especial de proteínas intracelulares, denominadas MAP quinases (proteínas quinases ativadas por mitógenos, sendo esses agentes que induzem a proliferação celular por mitose). As MAP quinases fosforilam muitas outras proteínas intracelulares, levando à resposta celular. CO influencia, direta ou indiretamente, a cascata de fosforilação das MAP quinases (MORSE; SETHI; CHOI, 2002) e muitos dos efeitos celulares atribuídos ao CO resultam exclusivamente desse mecanismo de ação, sem a participação do GMPc (MORSE; SETHI; CHOI, 2002; RYTER, et al., 2002).

### **1.3 Monóxido de Carbono e nocicepção**

O componente sensorial da dor nomeado nocicepção é definido como uma sensação variável, formada por várias vias que ligam componentes do sistema nervoso central (SNC) e periférico de maneira hierárquica. Desta forma, estímulos noci-

vos como calor, frio, compressão intensa e alguns agentes químicos, ativam terminações nervosas livres e periféricas de fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A $\delta$ , denominadas nociceptores (RUSSO; BROSE, 1998; BESSON, 1999; D'MELLO; DICKENSON, 2008). Após esta estimulação, os nociceptores carregam estímulos nocivos periféricos ao SNC, ativando várias respostas afetivo-emocionais e discriminatório-sensoriais.

Existem muitos fatores envolvidos na determinação do tipo de dor e das respostas protetoras atuando ao nível da medula espinhal e de estruturas cerebrais superiores envolvidas na integração e sinalização de sinais nociceptivos. A transdução neuroquímica da dor pode envolver mecanismos de interação entre mediadores inflamatórios como canais iônicos tipo voltagem-dependente (canais de sódio, potássio e cálcio), operados por receptor (receptor NMDA, receptor colinérgico nicotínico) ou canais com receptores associados à tirosina quinase (NGF) (ALBERTS, et al., 1994; CARVALHO, et al., 1997).

A transdução nociceptiva envolvendo a atuação dos mediadores inflamatórios ocorre sobre receptores específicos que se encontram acoplados a sistemas efetores, o que exige algumas vezes a intermediação de uma terceira proteína denominada proteína G, que quando devidamente ativados promovem a formação de segundo mensageiro, como o AMPc e GMPc, sendo estes responsáveis pela ativação de proteínas quinases intracelulares, ou de terceiros mensageiros, como o canal de cálcio (Ca<sup>++</sup>), que vai interferir em outras proteínas celulares e na regulação de canais iônicos.

Experimentos demonstram a expressão de altos níveis de GC em numerosas regiões cerebrais, que possuem neurônios expressando HO-2 (VERMA, et al., 1993; VICENTE; DAS; MAINES, 1994) e indícios apontam o CO como um dos maiores reguladores dos níveis GMPc no cérebro (RATTAN; CLAKDER, 1993). Além disso, evidências experimentais sugerem que a atuação do CO sobre as respostas nociceptivas também é relacionado com o envolvimento do sistema GC/GMPc (DAWSON; SNYDER, 1994; MAINES, 1997; NASCIMENTO; BRANCO, 2007; CARVALHO; BRANCO; LEITE- PANISSI, 2011).

A participação do CO nos processos nociceptivos é descrita por muitos autores, contudo, as informações ainda são contraditórias e não estabelecem de forma clara, se a ação da via da HO/CO se dá de forma hiper ou antinociceptiva.

As primeiras pesquisas verificando a participação da via HO/CO sobre respostas nociceptivas sugeriram a possível ação hipernociceptiva desta via. Como apresentado nestes experimentos, a administração do inibidor da HO, seja de forma central ou periférica, demonstrou-se como agente redutor da hiperalgesia mecânica (MELLER; DYKSTRA; GEBHART, 1994; YAMAMOTO; NOZAKI-TAGUGHI, 1995). Também a administração do inibidor da HO foi apontada como capaz de amenizar o comportamento doloroso em modelos de dor inflamatória (LI; CLARK, 2000a, 2001a; LIANG, LI; CLARK, 2004b), incisional (LI; CLARK, 2000b) e neuropática (LI; CLARK, 2000b, 2003).

Contribuindo para esses achados, experimentos com animais nocaute para HO-2 demonstraram redução da quantidade de lambidas e de expressão de Fos (HUNT; PINI; EVAN, 1987; BULLITT, 1990; PRESLEY, et al., 1990) e outros genes relacionados à dor na medula espinhal após a injeção de formalina (LI; CLARK, 2000a, LI, et al., 2004). Além disso, a hiperalgesia evocada pela administração crônica de opióides foi reduzida após a administração do inibidor da HO (LI; ANGST; CLARK, 2001). Estudos também evidenciaram o aumento da expressão e atividade da HO-2 em tecidos da medula espinhal de animais com tolerância a morfina (LI; CLARK, 2000c).

Por outro lado, achados divergentes em publicações recentes apontam que a administração local ou intratecal do CO ou substrato da HO na pata de animais em diferentes modelos de dor inflamatória é capaz de desempenhar papel antinociceptivo no sítio periférico da dor inflamatória (STEINER, et al., 2001; NASCIMENTO; BRANCO, 2007, 2008), sendo observada também uma ação sinérgica com a administração do substrato da HO em diferentes vias (local e intratecal) acarretando potencialização da resposta antinociceptiva no teste de formalina (NASCIMENTO; BRANCO, 2009). Estas hipóteses também são sustentadas por diversos estudos, nos quais o uso de indutores da HO foi capaz de acarretar a melhora da resposta nociceptiva dos animais quando expostos ao teste de formalina (ROSA, et al., 2008; EGEEA, et al., 2009).

Além destes achados, a administração intracerebroventricular de heme-lisinato (substrato da HO), também acarretou um papel chave na resposta nociceptiva dos animais após exposição ao teste de Tail Flick (CARVALHO; BRANCO; LEITE- PANISSI, 2011), apontando o CO como um agente capaz de atuar na promoção da antinocicepção.

## 1.4 Monóxido de Carbono e Canais Iônicos

Evidências experimentais sugerem que canais de potássio dependentes de cálcio ( $K_{Ca^{++}}$ ) também estão envolvidos no potencial de ação do CO, sendo apontados como um importante mecanismo do seu papel vasodilatador (WANG; WU, 1997, 2003; WANG, 1998). Seguindo esta hipótese, pesquisas apontam que a ação vasoativa do CO não tem ação dependente do GMPc, podendo ser estimulada pela ativação de canais  $K_{Ca^{++}}$  (BARKOUDAH; JAGGAR; LEFFLER, 2004) ou abolida por seus bloqueadores (LEFFLER, et al., 1999).

O envolvimento de canais iônicos em diversas atividades do organismo já é bem conhecido. Dentre estas atividades, podemos citar as resposta nociceptivas, com numerosos estudos demonstrando a capacidade de agonistas de vários receptores acoplados à proteína G em estimular a abertura de canais de potássio (NORTH, 1989), processo envolvido na produção de antinocicepção (OCAÑA, et al., 1990).

Os primeiros indícios de apoio a esta hipótese foram publicados na década de 90. Ao final desta mesma década, novas estratégias experimentais para identificação dos canais de potássio envolvidos na antinocicepção começaram a ser propostas e, conseqüentemente, estes canais começaram a se tornar alvo para o desenvolvimento de novas drogas antinociceptivas, quando diversos estudos demonstraram o envolvimento da ativação de canais de potássio nos mecanismos de ação de diversos fármacos e apontaram sua participação em modelos de dor aguda e crônica (OCAÑA, et al., 2004).

A abertura dos canais de potássio é regulada por uma grande variedade de estímulos tais como alterações na permeabilidade da membrana ou ação de pequenas moléculas e proteínas (por exemplo:  $K_{Ca^{++}}$ , ATP, AMPc ou subunidades de proteína G) (MACKINNON, 2003; ROOSILD; LE; CHOE, 2004). São citados quatro diferentes tipos de canais de  $K^+$ , sendo estes conhecidos como: canais de potássio dependentes da voltagem (Kv), canais de potássio sensível ao cálcio ( $K_{Ca^{++}}$ ), retificadores de influxo (Kir) e canais de potássio de dois poros (K2P). Dentre estas subdivisões, duas famílias da classe dos Kir são particularmente citadas como importantes para a nocicepção, sendo elas o canal de potássio regulado pela proteína G (GIRK ou Kir3) e o sensível ao ATP ( $K^+_{ATP}$ , formado com Kir6).

Os canais  $K^+_{ATP}$ , alvo de nosso estudo, são constituídos por duas subunidades funcionais: o canal Kir6 e a subunidade SUR (receptor sulfoniluréia) (AGUILAR-BRYAN, et al., 1998). A proteína SUR permite o bloqueio dos canais  $K^+_{ATP}$  por sulfoniluréias e sua abertura por vários abridores  $K^+$  (cromacalim, pinacidil, minoxidil, nicorandil) (AGUILAR-BRYAN, et al., 1998). A atividade desta classe de canais pode ser regulada por intermédio de proteínas G (WADA, et al., 2000), que por sua vez podem ativar proteínas quinase do GMPc, canais iônicos e receptores.

Embora seja amplamente reconhecida a participação de canais iônicos nas respostas nociceptivas, não existem estudos que excluam ou estabeleçam o envolvimento destes canais na modulação nociceptiva da HO/CO.

## 2 OBJETIVOS

Diante das exposições apresentadas nosso estudo apresentou como objetivos:

### 2.1 Geral

Verificar o envolvimento de canais de potássio sensíveis ao ATP na resposta antinociceptiva da via da HO/CO.

### 2.2 Específicos

I – Analisar a ação antinociceptiva da via da HO/CO através da administração do substrato da HO (hemina) ou de seu inibidor (tin protoporphyrin IX dichloride), após a indução de hiperalgisia pelo tratamento com Cg;

II – Avaliar a participação dos demais subprodutos liberados pela via da HO na resposta nociceptiva dos animais, através da administração de sulfato ferroso ou biliverdina;

III – Verificar a ocorrência de mecanismos de ação sistêmicos a partir da manipulação periférica da via da HO/CO;

IV – Identificar a possível participação de canais de  $K^+_{ATP}$ , na resposta antinociceptiva da via da HO/CO, através da administração do bloqueador de canais de  $K^+_{ATP}$ , glibenclamida ou do ativador de canais de  $K^+$ , diazoxide;

V – Analisar o efeito do antagonista de receptor opióide, naloxone, na resposta antinociceptiva acarreta pela administração de hemina.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL.

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 348 ratos *Wistar*, com peso de 180 a 200 gramas, em número de seis animais por grupo experimental, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno, cobertas com grades metálicas em número máximo de cinco por caixa e tratados com ração comercial e água “*ad libitum*”. Estas caixas foram mantidas em sala com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro de 12-12 horas (luz 07:00-19:00). Todos os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas– UNIFAL (Protocolo nº: 390/2012).

#### 3.2 Drogas e Veículos utilizados

Solução fisiológica estéril 0,9% - Veículo utilizado na diluição das drogas.

Carbonato de sódio “ $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ” (Dinâmica, Brasil) - Solução tampão utilizada como veículo, diluída em solução fisiológica estéril 0,9% na concentração de 50 mmol.

Carragenina  $\lambda$  (Sigma, USA) - Estímulo inflamatório. Suspensão preparada em solução fisiológica estéril 0,9% na concentração de 100 $\mu\text{g}$ , administrados 40 $\mu\text{L}$ /pata.

Hemina (Sigma, USA) - Potente indutor da via da heme-oxigenase, diluído em solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (50 mmol) e administrado nas concentrações de 19.5, 65 ou 195 $\mu\text{g}$ , no volume de 30 $\mu\text{L}$ /pata.

Tin protoporphyrin IX dichloride (Tocris, St Louis MO) - Inibidor da via da heme-oxigenase, diluído em solução de carbonato de sódio (50 mmol) e administrado nas

concentrações de 37.5, 150 ou 300µg, no volume de 40 µL/pata.

Biliverdina (Frontier Scientific, Logan, UT)- Um dos produtos finais liberados pela via da heme-oxigenase, utilizado nas concentrações de 18, 60 ou 180µg, diluído em solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mmol) e administrado 30µL/pata.

Sulfato ferroso (Isofar, Brasil) - Sendo o ferro um dos produtos finais da degradação do grupo heme pela enzima heme-oxigenase, o sulfato ferroso foi utilizado como controle deste subproduto liberado pela via nas concentrações de 8.4, 28 ou 84µg, diluído em solução fisiológica estéril 0,9% e administrado 30µL/pata.

Glibenclamide (Sigma, USA) - Sulfoniluréia bloqueadora de canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>, diluída em Tween 80 (2% em salina) e administrada nas concentrações de 40, 80 ou 160µg, no volume de 40µL/pata.

Diazoxide (Sigma, USA)- Ativador de canais de K<sup>+</sup>, utilizado nas concentrações de 20, 60 ou 120µg, diluído em Tween 80 (2% em salina) e administrado 30µL/pata.

Naloxone (Cristália, Brasil) - Antagonista de receptores opióides. Utilizado nas concentrações de 5, 10 e 20µg, diluído em solução fisiológica estéril 0,9% e administrado 30µL/pata.

Fentanest Citrato de Fentanil 0,05 mg “Fentanil” (Cristália, Brasil)- Potente agonista opióide utilizado como controle da ação do naloxone na concentração de 1,5µg em 30µL/pata e diluído em solução fisiológica estéril 0,9%.

### **3.3 Procedimentos/ Protocolos Experimentais**

Os protocolos para indução da dor de origem inflamatória foi realizada através da administração intraplantar de carragenina e avaliação das respostas nociceptivas dos animais por meio dos testes de Von Frey Eletrônico e Randall Selitto.

#### *3.3.1 Hipernocicepção mecânica induzida pela administração de Cg*

A indução da hipernocicepção de origem inflamatória foi realizada através da injeção intraplantar (i.pl.) de carragenina (Cg). Desde a década de 60, a Cg é

utilizada em experimentos como um polissacarídeo sulfatado extraído de algas marinhas (*Chondrus crispus*) capaz de provocar reação inflamatória aguda (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962; RESENDE, et al., 2004) e conseqüentemente ação hiperalgésica, sendo útil para o estudo do efeito analgésico de drogas e de recursos terapêuticos (FERREIRA; LORENZETTI; CORREA, 1978; STEINER, et al., 2001).

Existem várias classes de Cg e estas são definidas conforme seu teor de sulfato e configuração estrutural, onde as formas puras podem ser designadas pelas letras gregas: *kappa*, *lambda* e *iota*. A classe *lambda* da Cg é composta quase totalmente de D-galactose sulfatada. Esta possui características que parecem induzir, mais ativamente, as respostas inflamatórias agudas e crônicas, sendo então considerada a mais eficiente (DI ROSA, 1972) e a classe de escolha para nosso estudo.

### 3.3.2 Testes para mensuração da hipernocicepção mecânica

Os modelos de testes nociceptivos propostos para avaliação dos animais foram selecionados com base em suas finalidades e princípios de atuação, sendo estes amplamente aceitos pela comunidade científica.

Durante todos os experimentos, animais dos grupos tratados (drogas) e controle (veículos) foram mesclados para exposição aos testes nociceptivos e todas as exposições aos testes executadas pelo mesmo examinador, com o intuito de aumentar a confiabilidade da avaliação e dos resultados obtidos.

#### 3.3.2.1 Von Frey eletrônico

O limiar nociceptivo mecânico foi mensurado através do teste de pressão crescente na pata, conhecido como método de Von Frey eletrônico (Insight, Ribeirão Preto-SP, Brasil), que avalia a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico (VIVANCOS, et al., 2004). Este método é bem difundido em experimentos com a finalidade de avaliar a influência de drogas sobre a sensibilidade nociceptiva.

Animais de cada protocolo experimental (grupos tratados e controles) foram alojados em sala silenciosa, com controle de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e mantidos individualmente no interior de uma câmara acrílica transparente (12 x 12 x 17) com fundo composto de grade metálica, sendo aclimatizados por três dias, 30 minutos/dia antes da exposição ao teste. No dia da realização dos experimentos os animais foram alocados às caixas acrílicas 30 minutos antes da mensuração basal. O teste consistiu em evocar um reflexo de retirada da pata induzida pela força de um transdutor adaptado e conectado a uma ponteira. Desta forma, a ponta do transdutor foi pressionada de encontro à planta da pata posterior direita de modo que a pressão exercida foi lentamente aumentada e assim realizado o registro da força necessária para a reação de retirada ou *flinching* do membro estimulado. Para facilitar a visualização da face plantar da pata posterior dos animais um espelho inclinado foi alocado abaixo das caixas acrílicas. O teste foi realizado em triplicata e a resposta do animal para cada tempo foi determinada como a média das análises obtidas. As medidas foram realizadas antes e após os tratamentos, conforme definido para cada protocolo experimental e os resultados obtidos expressos pela diferença do valor basal (média das medidas sem tratamento) e resposta da mensuração pós-tratamento (média das medidas pós-tratamento) sendo assim, obtido o valor de " $\Delta$ " (delta).

### 3.3.2.2 Randall Selitto

A hiperalgesia ocasionada pela administração i.pl. de carragenina foi mensurada através de uma modificação do método originalmente descrito por Randall e Selitto (1957). Essa técnica é capaz de mensurar a hiperalgesia fundamentada no princípio de que a inflamação é capaz de ocasionar um aumento na sensibilidade ao estímulo mecânico e que essa sensibilidade aumentada pode ser amenizada por recursos analgésicos. A resposta a estímulos dolorosos mecânicos é utilizada em modelos de dor aguda há décadas, sendo uma importante metodologia para a triagem da eficácia de agentes farmacológicos (SLUKA; WALSH, 2003).

Durante três dias antes da exposição ao teste, os animais foram manipulados

e aclimatizados à situação experimental com o intuito de minimizar possíveis interferências comportamentais de estresse sobre as respostas obtidas. No dia do experimento cada animal foi cuidadosamente mantido na posição vertical com o ventre voltado para o aparelho (Insight, Ribeirão Preto-SP, Brasil). A pata posterior direita foi colocada na parte compressora do aparelho de forma que na pequena elevação plana, foi comportada a planta da pata e a porção cônica do aparelho foi responsável por exercer a pressão sobre a superfície dorsal da pata do animal. A intensidade da pressão foi estabelecida através da inserção de um disco de peso de 68 gramas, sendo os resultados obtidos multiplicados por 10 sobre o valor obtido na escala da régua do aparelho. Este peso foi alocado através da compressão de um pedal que evoca o aumento da força de uma forma constante (não atingindo mais que 300 gramas, para evitar qualquer dano tecidual à pata). A resposta hiperalgésica foi caracterizada pelo comportamento de retirada (total ou parcial) da pata do aparelho, sendo o valor expresso na escala do analgesímetro registrado (SUMMER; DINA; LEVINE, 2007). No presente estudo, considerou-se que quanto maior a hiperalgesia apresentada, menor foi o peso necessário para reação de retirada ou *freezing* apresentados pelo animal. Através dos resultados obtidos foi considerada a diferença do valor basal (média das medidas sem tratamento) e a resposta da mensuração pós-tratamento (média das medidas pós-tratamento) sendo assim, obtido o valor de “ $\Delta$ ” (delta).

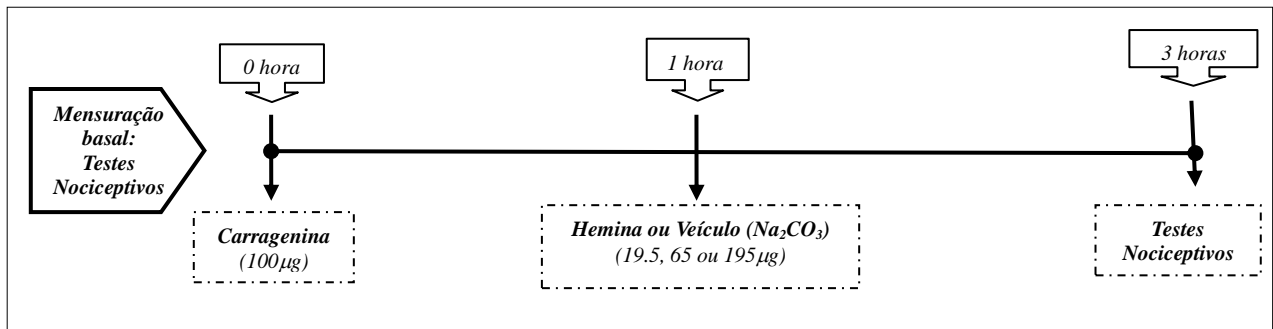
### 3.3.3 Grupos Experimentais

#### 3.3.3.1 Experimento1: Ação da via HO/CO e dos demais subprodutos liberados sobre as respostas nociceptivas

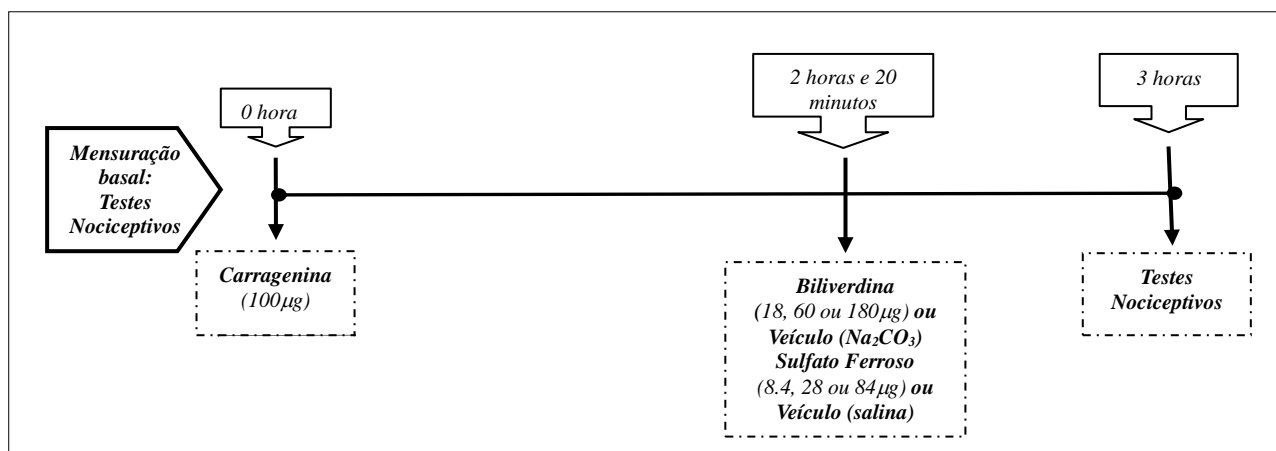
A hemina (19.5, 65 ou 195 $\mu$ g/30 $\mu$ L) potente indutor da via HO, foi administrada 1 hora após o agente algogênico e a hipersensibilidade mecânica mensurada no pico de ação deste agente (3 horas após sua administração) (STEINER, et al., 2001). Também foram realizados grupos controle da ação do CO com substituição da administração de hemina, por biliverdina (18, 60 ou 180 $\mu$ g/30 $\mu$ L) ou sulfato

ferroso (8,4, 28 ou 84 $\mu$ g/30 $\mu$ L), outros dois subprodutos liberados pela via da HO, sendo este grupo experimental baseado no estudo de Nascimento e Branco (2007), que também simularam a participação destes subprodutos na resposta antinociceptiva da via da HO.

- Protocolo hemina



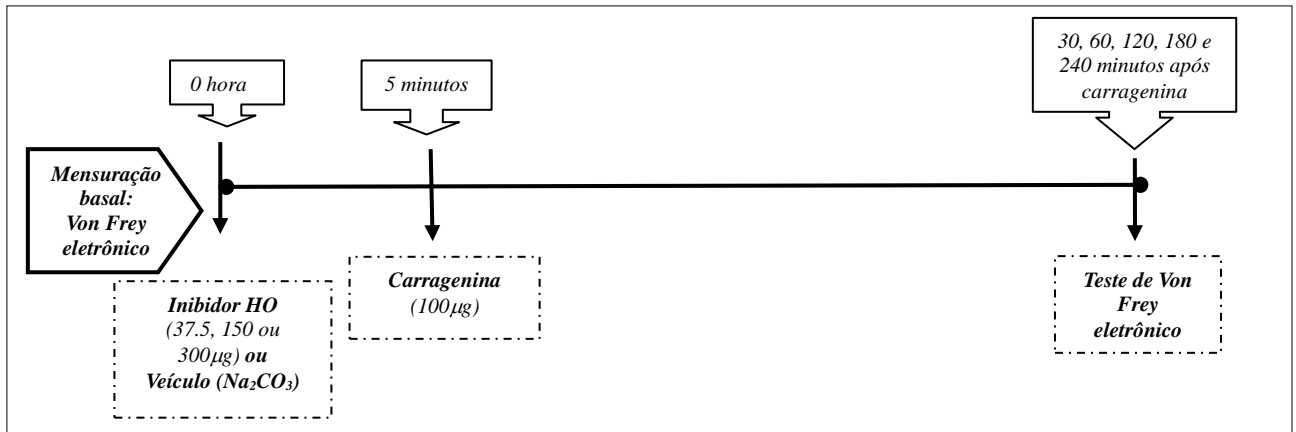
- Protocolo biliverdina ou sulfato ferroso



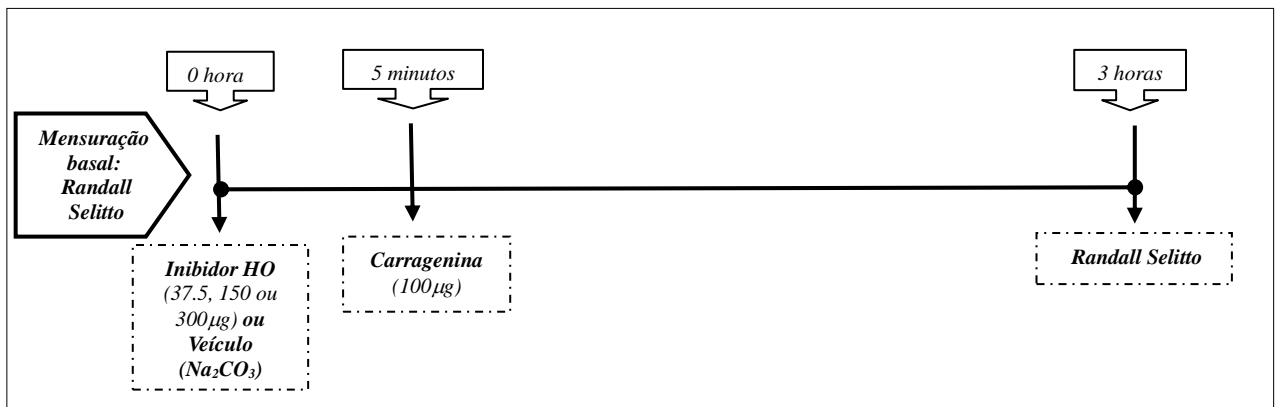
O potente inibidor da via da HO, Tin protoporphyrin IX dichloride, teve sua administração realizada cinco minutos antes do agente algogênico (STEINER, et al., 2001), sendo os animais expostos aos testes nociceptivos, na hora basal e com 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a administração de Cg no Von Frey eletrônico e com mensurações na hora basal e com 180 minutos no Randall Selitto (STEINER, et al., 2001).

- Protocolo Tin protoporphyrin IX dichloride:

- Von Frey eletrônico

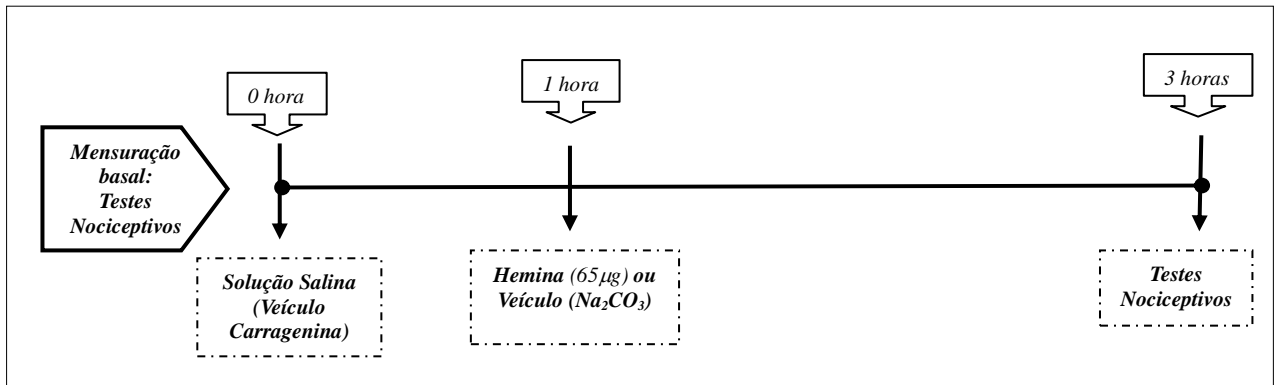


- Randall Selitto

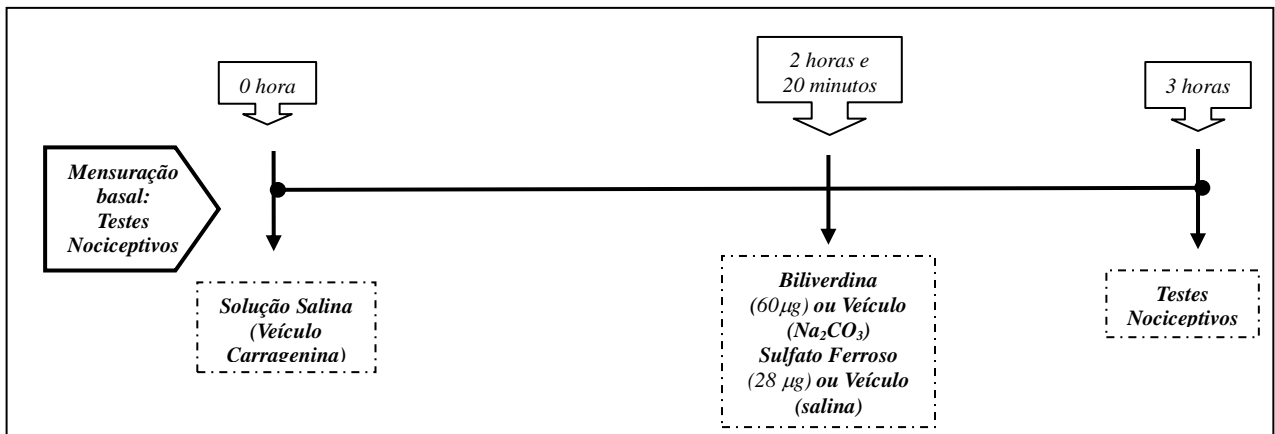


Para todos os grupos experimentais foram realizados grupos controles com a substituição das drogas por seus respectivos veículos, além de substituição da carragenina por solução salina, sendo a dose das drogas utilizada definida de acordo com a resposta obtida (melhor dose-resposta) ou diante da ausência de respostas significantes, a dose de escolha foi a intermediária.

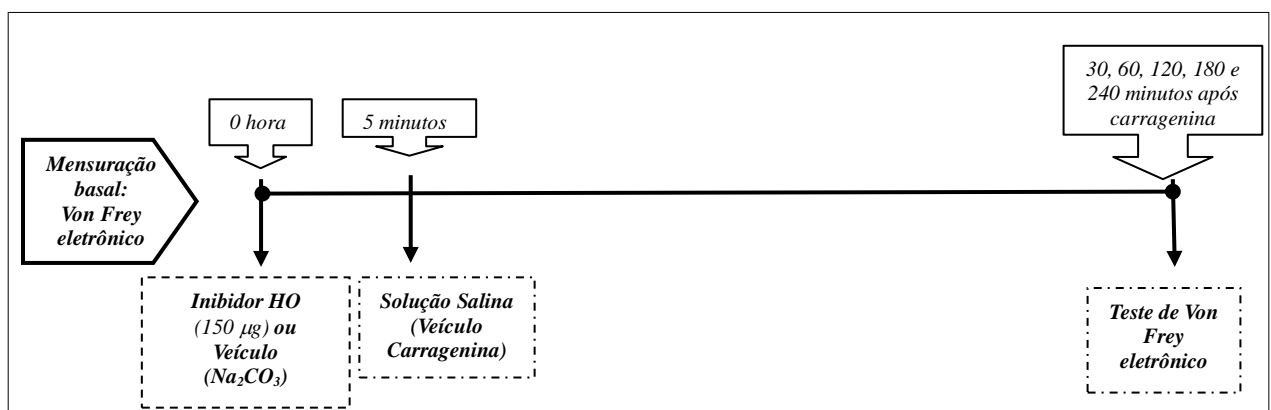
- Protocolo hemina (controle carragenina):



- Protocolo biliverdina ou sulfato ferroso (controle carragenina):

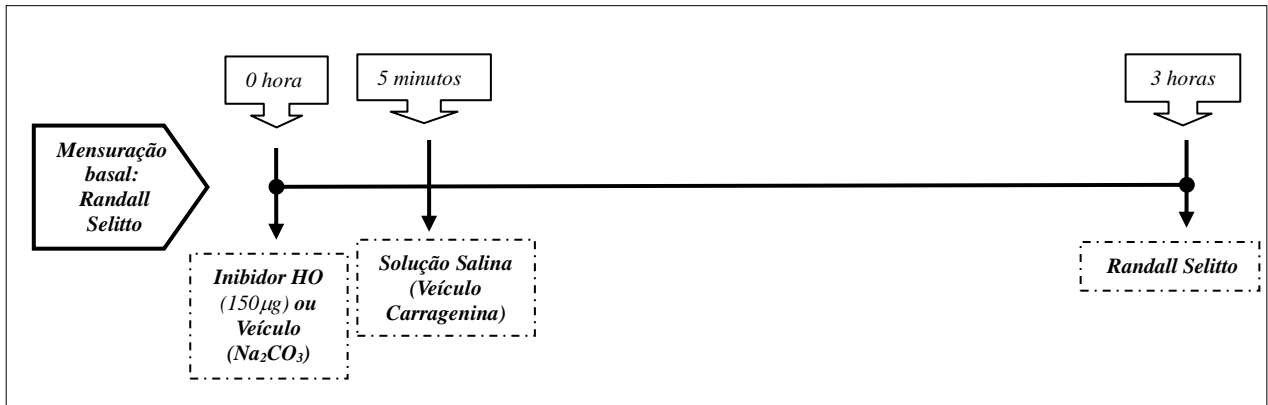


- Von Frey eletrônico





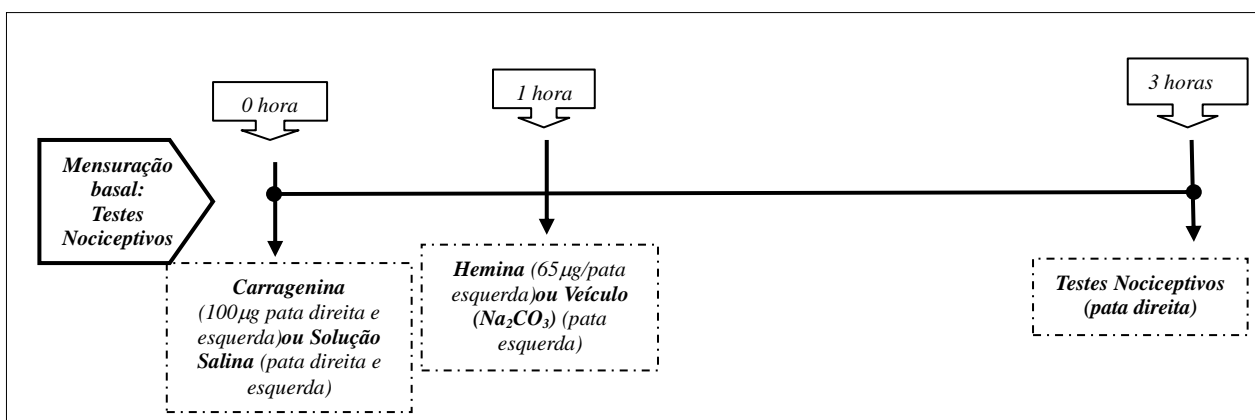
## - Randall Selitto

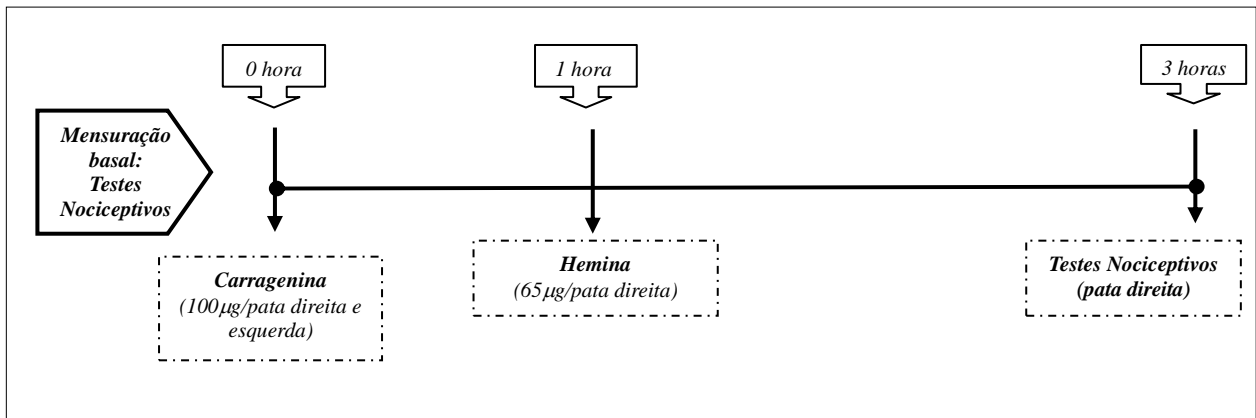


## 3.3.3.2 Experimento2: Verificação da ocorrência de mecanismos sistêmicos

Para excluir o envolvimento de mecanismos de ação sistêmica após administração periférica das drogas, o substrato da via (hemina 65µg) ou seu veículo (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 50mmol), foram administrados na pata contralateral (pata esquerda) e após esta administração os animais foram submetidos aos testes nociceptivos na pata direita, sendo a administração de Cg realizada na pata D e E, com o intuito de expor ambas as patas a situações experimentais semelhantes (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; RODRIGUES; DUARTE, 2000; ALVES, et al., 2004b).

- Protocolo Controle da ação periférica

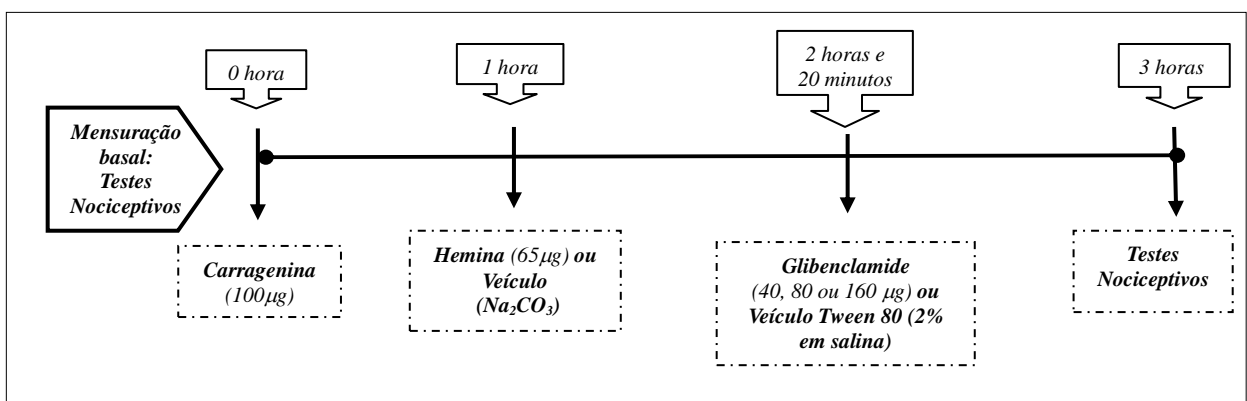




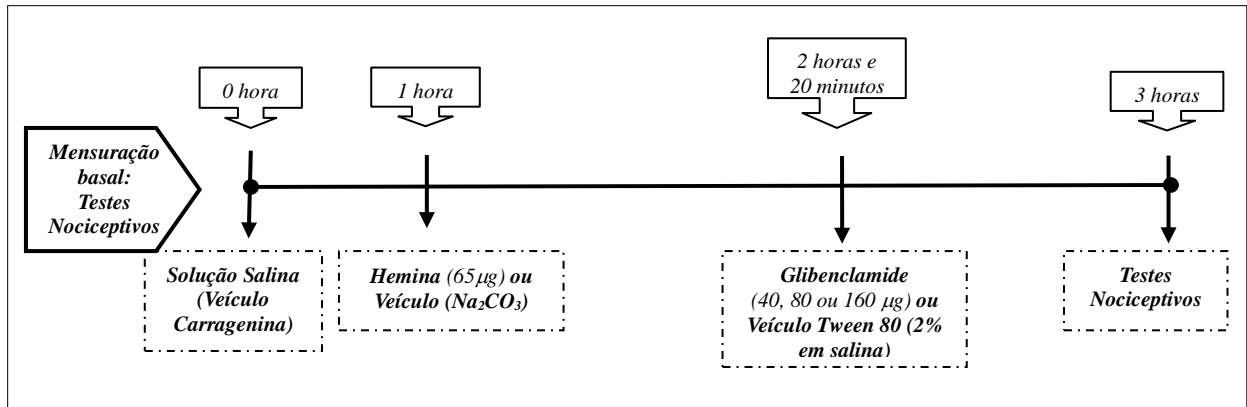
### 3.3.3.3 Experimento 3: Avaliação da participação dos canais de potássio

GLIBENCLAMIDE (40, 80 ou 160 µg/30 µL), fármaco especificamente responsável pelo bloqueio dos canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP, foi administrado 1 hora e 20 minutos após o substrato da via (hemina 65 µg) e os testes nociceptivos foram realizados 3 horas após a administração i.pl. de carragenina, verificando o possível envolvimento desta classe de canais na resposta antinociceptiva dos animais frente à indução da via da HO/CO (RODRIGUES, et al., 2005).

- Protocolo glibenclamide

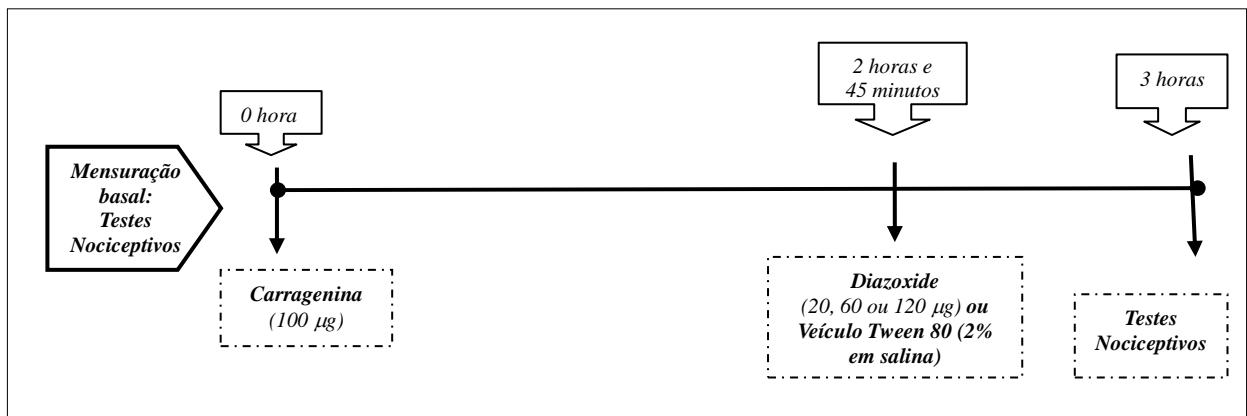


- Protocolo glibenclamide (controle carragenina)



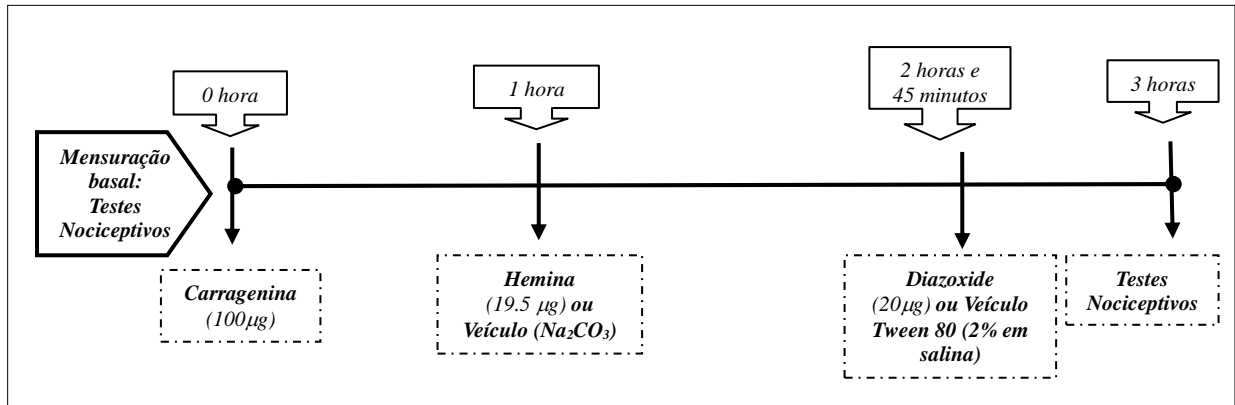
O diazoxide, ativador dos canais de K<sup>+</sup>, também foi administrado para verificar a participação do canal de K<sup>+</sup> na antinocicepção da via HO/CO. Desta forma, após definida a dose-resposta após a administração de diferentes concentrações do diazoxide (20, 60 ou 120 µg/30 µL), foi estabelecida a menor dose efetiva do fármaco (ALVES, et al., 2004a).

- Protocolo dose-resposta diazoxide

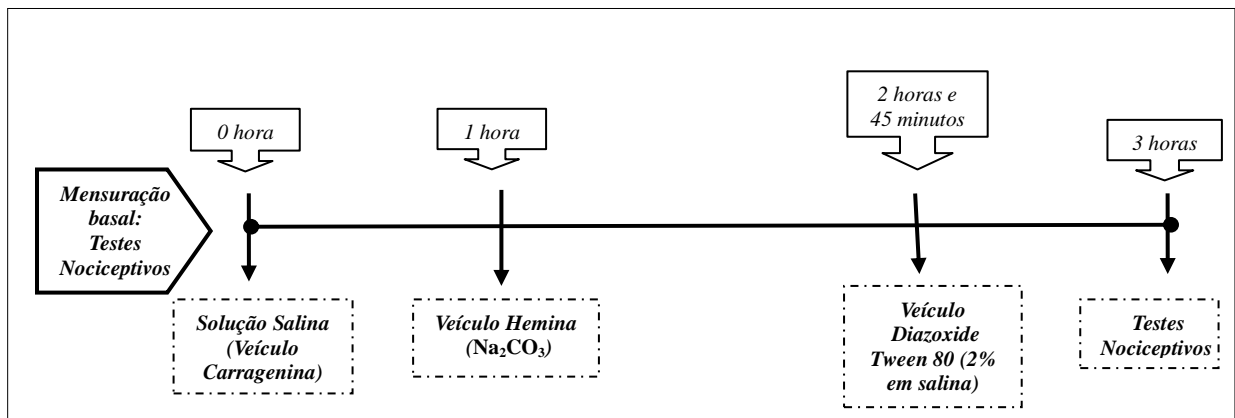


Uma vez estabelecida a menor dose efetiva do diazoxide (20 µg), esta foi administrada juntamente com a hemina (19.5 µg) após indução de hipersensibilidade pela Cg, procurando verificar uma possível ação sinérgica entre as drogas (ALVES, et al., 2004a).

- Protocolo diazoxide + hemina



- Protocolo diazoxide + hemina (controle carragenina)

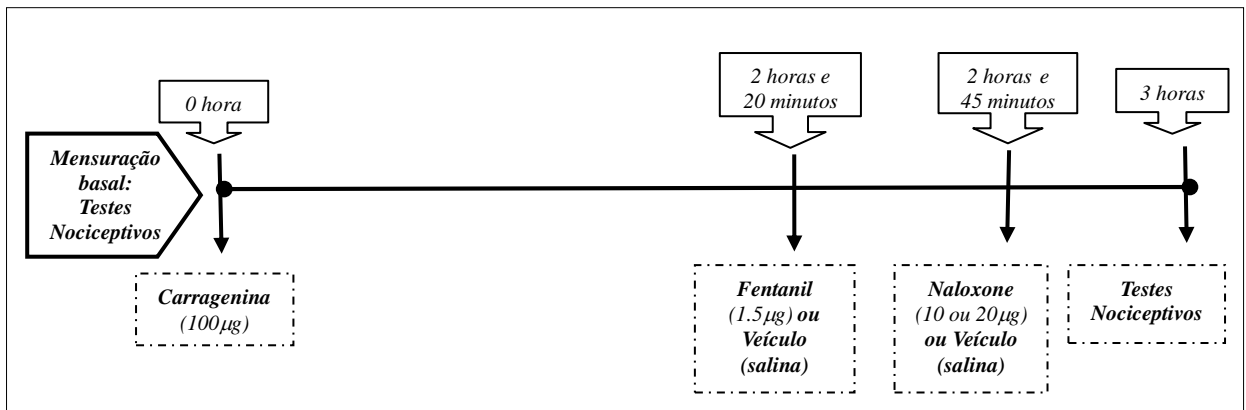


### 3.3.3.4 Experimento 4: Exclusão da participação do sistema opióide

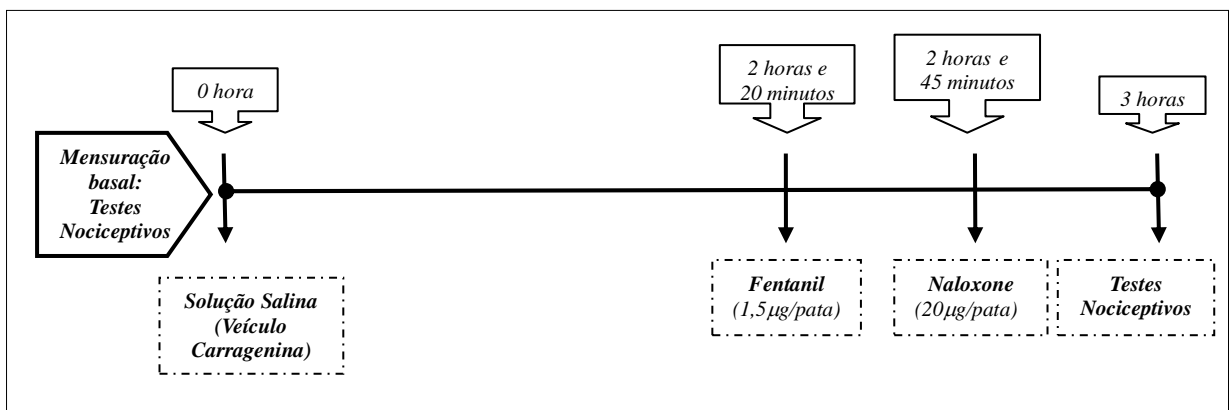
A partir do conhecimento do envolvimento de canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> na resposta analgésica pelo sistema opióide, foi realizado um protocolo experimental controle para verificação do envolvimento do sistema opióide na antinocicepção da via da HO/CO, através da administração do antagonista opióide naloxone.

Inicialmente foi comprovada a eficácia da ação antagonista do naloxone nas concentrações de 10 e 20µg, pela administração do agonista do sistema opióide Fentanil (1.5µg/30µL) (RODRIGUES, et al., 2005). Posteriormente, foi realizada a administração conjunta do naloxone e do substrato da via da HO, hemina.

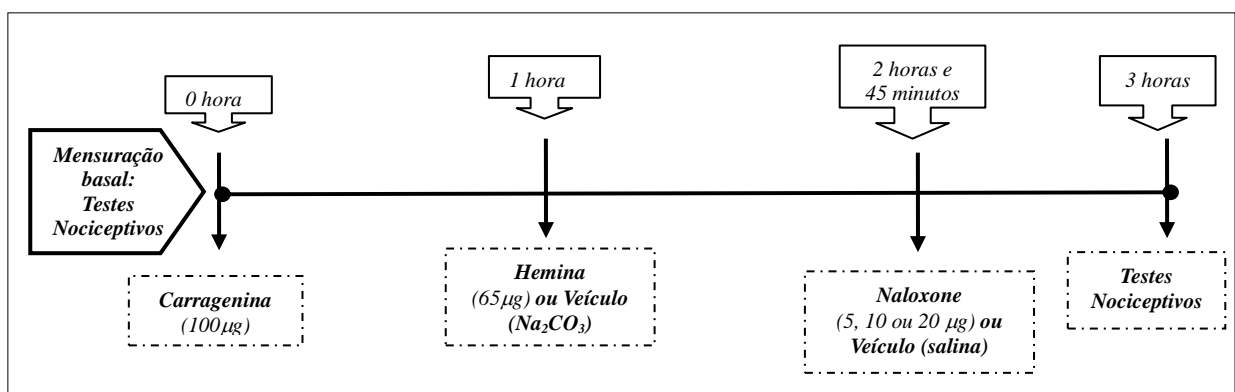
- Protocolo ação antagonista do naloxone sobre o sistema opióide (naloxone + fentanil)



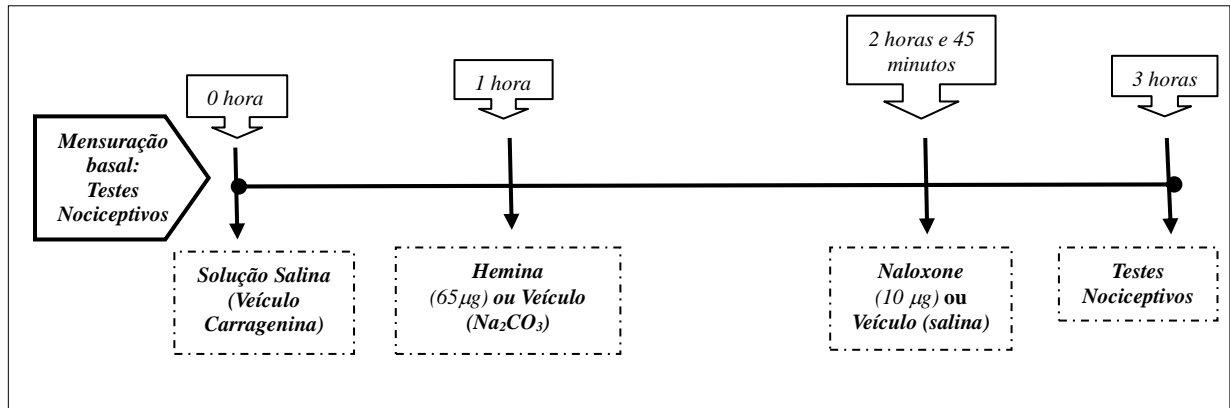
- Protocolo antagonismo do naloxone sobre o sistema opióide (naloxone + fentanil - controle carragenina)



- Protocolo naloxone + hemina



- Protocolo naloxone + hemina (controle carragenina)



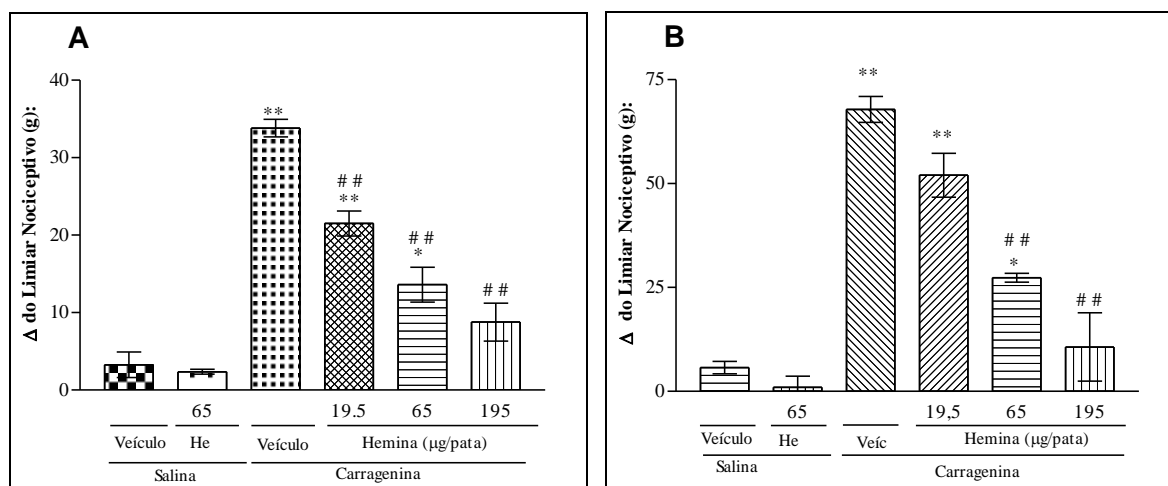
## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram apresentados como média e erro padrão da média e analisados, considerando-se dentro de cada protocolo, sempre a coerente relação entre os grupos experimentais e seus respectivos controles. Os dados foram confrontados através dos testes estatísticos indicados para cada protocolo, como a Análise de Variância “one-way analysis of variance” ou “two-way analysis of variance” (ANOVA) utilizada para comparar diferenças entre os grupos experimentais, com posterior uso do pós-teste de *Tukey* para 3 ou mais médias. Foram considerados estatisticamente diferentes valores de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito antinociceptivo da via HO/CO e exclusão da participação dos demais subprodutos liberados pela via

Os resultados apresentados nos gráficos 1A e 1B demonstram que a administração de Cg provocou hiperalgesia quando comparada aos grupos que receberam salina (Graf. 1A:  $F_{5,35}= 48,97$ ;  $p<0.01$  e  $p<0.001$ ; Graf. 1B:  $F_{5,35}= 38,18$ ;  $p<0.05$  e  $p<0.001$ ); esta resposta foi revertida pelo tratamento com o substrato da via em comparação ao seu veículo, com respostas estatisticamente significantes no teste de Von Frey eletrônico nas doses de 19.5, 65 e 195 $\mu$ g (Graf. 1A:  $p<0.001$ ) e no teste de Randall Selitto nas doses de 65 e 195 $\mu$ g (Graf. 1B:  $p<0.001$ ). Também podemos observar que o pós-tratamento com hemina nos animais pré-tratados com salina, não foi capaz de alterar a intensidade de nocicepção mecânica dos animais.



Gráficos 1A e 1B – Efeito da administração de hemina ou veículo ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) sobre a hiperalgesia induzida por Cg. A avaliação mecânica da intensidade de hipernocicepção ( $\Delta$  do limiar de retirada, em gramas) foi realizada pelo método de Von Frey eletrônico (gráfico A) e pelo teste de Randall Selitto (gráfico B), 3 horas após a administração de Cg (média  $\pm$  EPM). \* $p<0.05$  ou \*\* $p<0.001$  comparado Sal/Veíc; ##  $p<0.001$  comparado Cg/Veíc (One-way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey).

Fonte: Da autora.

A análise estatística do gráfico 2 aponta a ocorrência de respostas estatisticamente significantes nas variáveis tempo ( $F_{5,25}= 266,4$ ;  $P<0.0001$ ) e limiar nocicep-



tivo ( $F_{5,25} = 565,8$ ;  $P < 0.0001$ ) além da interação entre estas variáveis ( $F_{5,25} = 40,63$ ;  $P < 0.0001$ ).

Como podemos observar, a administração de Cg foi capaz de promover resposta hipernociceptiva a partir do tempo de 60 minutos ( $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ ), sendo esta resposta potencializada nos grupos tratados com o inibidor da HO nas concentrações de  $150\mu\text{g}$  e  $300\mu\text{g}$  ( $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ ), com ausência de significância estatística na dose de  $37.5\mu\text{g}$ , quando comparado ao tratamento com o veículo ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). O tratamento com o inibidor da HO nos animais tratados com salina não foi capaz de produzir nenhum tipo de alteração significativa na intensidade de nocicepção mecânica dos animais.

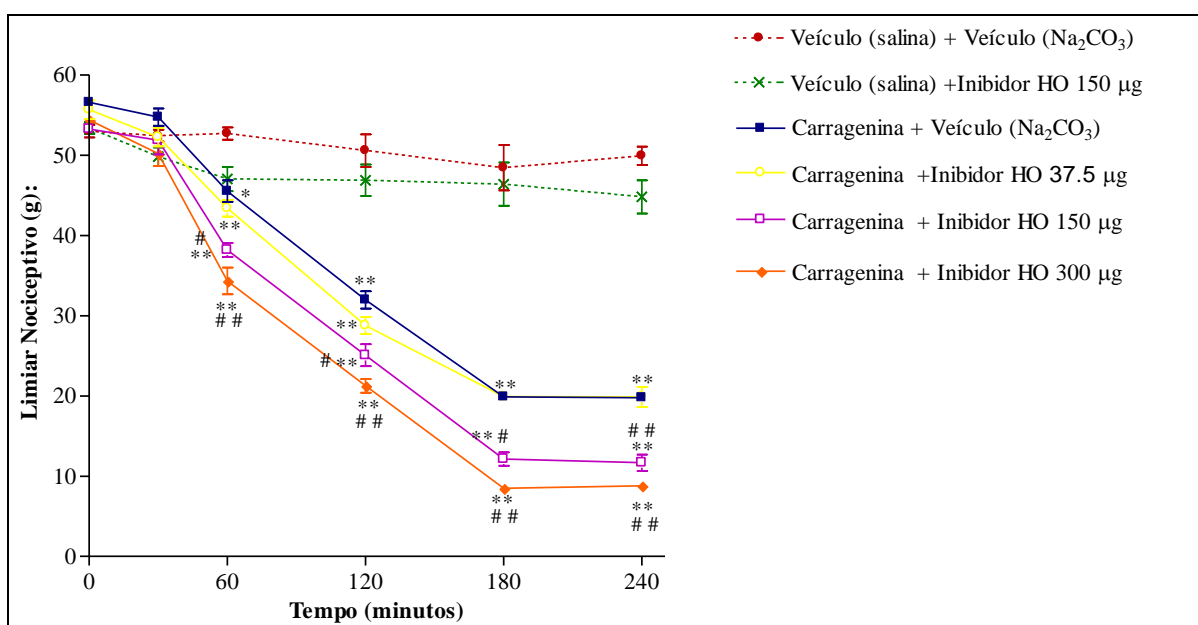


Gráfico 2 – Efeito da administração do inibidor da HO ou veículo ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) sobre a hiperalgesia induzida por Cg. A avaliação mecânica da intensidade de hipernocicepção foi realizada através do método de Von Frey eletrônico, na hora basal (antes da administração das drogas) e com 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a administração de Cg (média  $\pm$  EPM). \* $p < 0.05$  ou \*\* $p < 0.001$  comparado Sal/Veic; # $p < 0.05$  ou ## $p < 0.001$  comparado Cg/Veic (Two-way ANOVA, seguido de pós- teste Tukey).

Fonte: Da autora.

Como observado no gráfico 3, a exposição dos animais ao teste de Randall Selitto revelou que a administração de Cg produziu resposta hipernociceptiva quando comparado ao tratamento com salina ( $F_{5,35} = 27,27$ ;  $p < 0.001$ ) e que a administração do inibidor da via potencializou a hiperalgesia ocasionada pela Cg nos animais tratados na dose de  $300\mu\text{g}$  ( $p < 0.05$ ), não sendo observada significância estatística nas doses de  $37.5\mu\text{g}$  e de  $150\mu\text{g}$ , quando comparado ao tratamento com veículo

( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Também o pré-tratamento com o inibidor da HO nos animais tratados com salina, não induziu nenhum tipo de alteração significativa na intensidade de nocicepção mecânica dos animais.

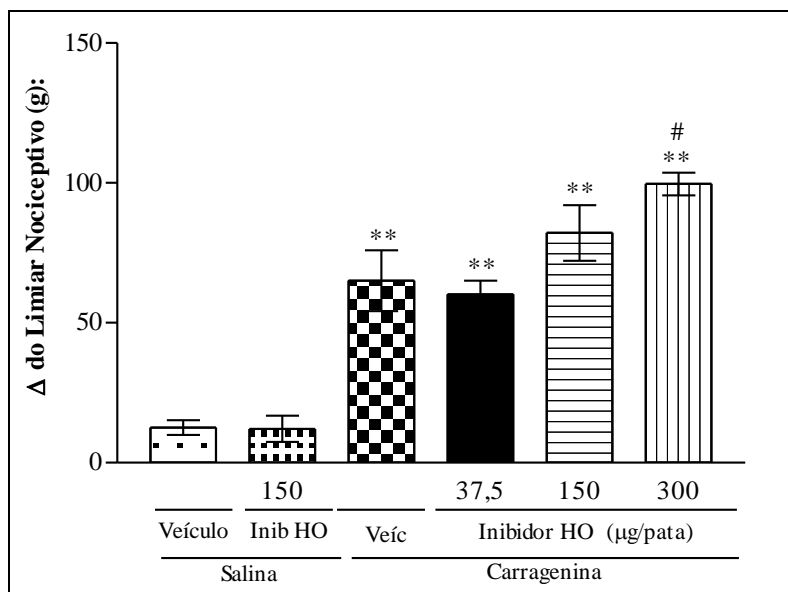
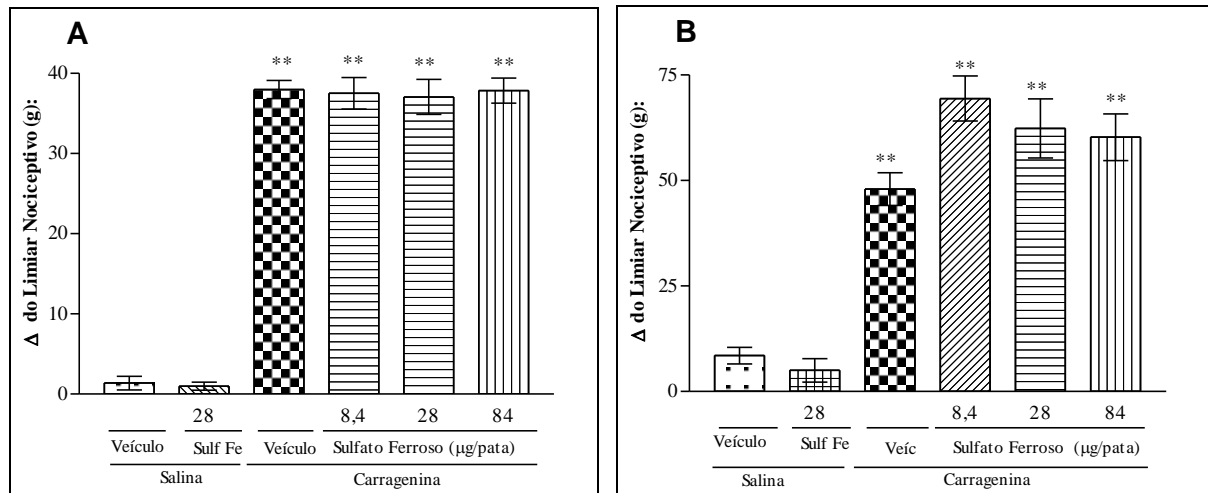


Gráfico 3 – Efeito da administração do inibidor da HO ou veículo ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) sobre a hiperalgisia induzida por Cg. A avaliação mecânica da intensidade de hipernocicepção ( $\Delta$  do limiar de retirada, em gramas) foi realizada pelo teste de Randall Selitto, 3 horas após a administração de Cg (média  $\pm$  EPM). \*\* $p < 0.001$  comparado Sal/Veic; #  $p < 0.05$  comparado Cg/Veic (One-way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey).

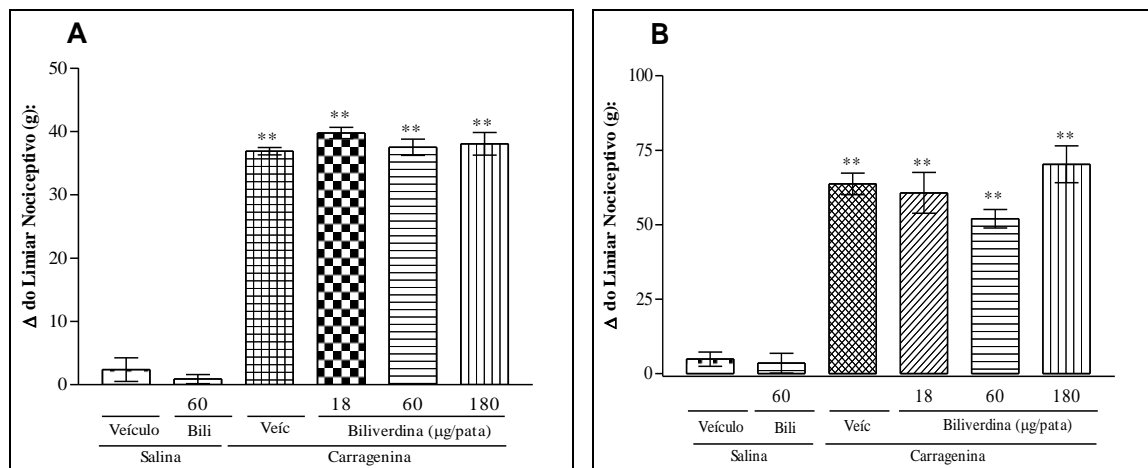
Fonte: Da autora.

Como podemos observar nos gráficos abaixo (4A, 4B e 5A, 5B) a pré-administração com Cg provocou aumento da intensidade de hipernocicepção (Graf. 4A:  $F_{5,35} = 159,5$ ;  $p < 0.001$ ; Graf. 4B:  $F_{5,34} = 35,88$ ;  $p < 0.001$ ; Graf. 5A:  $F_{5,35} = 212,3$ ;  $p < 0.001$ ; Graf. 5B:  $F_{5,35} = 44,05$ ;  $p < 0.001$ ) em comparação aos grupos que foram pré-tratados com salina. Já o tratamento com sulfato ferroso ou biliverdina, tanto no método de Von Frey eletrônico como no teste de Randall Selitto, não foi capaz de induzir modificações estatisticamente significantes sobre a resposta hipernociceptiva dos animais. Também o pós-tratamento com sulfato ferroso ou biliverdina nos animais pré-tratados com salina, não acarretou nenhum tipo de alteração significativa na intensidade de nocicepção mecânica dos animais.



Gráficos 4A e 4B – Efeito da administração de sulfato ferroso ou veículo (salina) sobre a hiperalgesia induzida por Cg. A avaliação mecânica da intensidade de hipernocicepção ( $\Delta$  do limiar de retirada, em gramas) foi realizada pelo método de Von Frey eletrônico (gráfico A) e pelo teste de Randall Selitto (gráfico B), 3 horas após a administração de Cg (média  $\pm$  EPM). \*\* $p < 0.001$  comparado Sal/Veic (One-way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey).

Fonte: Da autora.

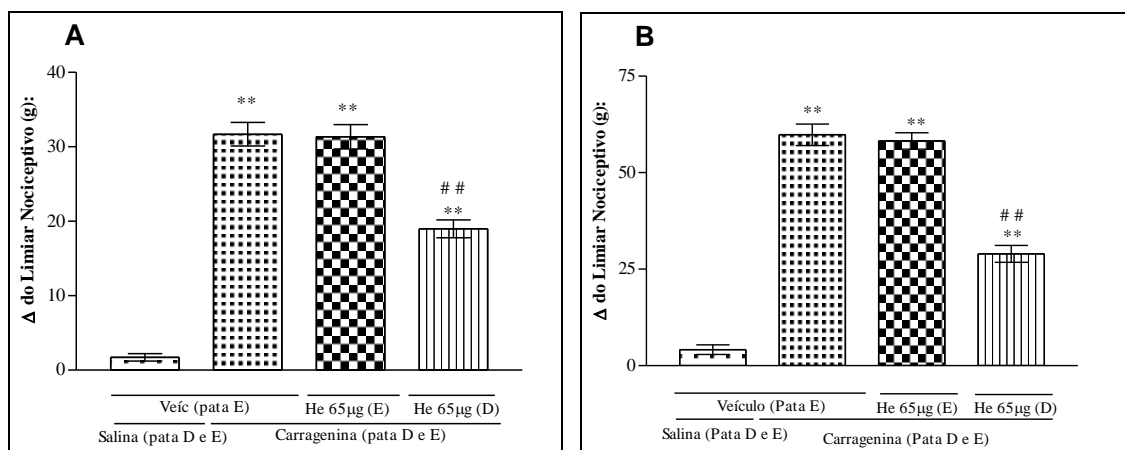


Gráficos 5A e 5B – Efeito da administração de biliverdina ou veículo ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) sobre a hiperalgesia induzida pela Cg. A avaliação mecânica da intensidade de hipernocicepção ( $\Delta$  do limiar de retirada, em gramas) foi realizada pelo método de Von Frey eletrônico (gráfico A) e pelo teste de Randall Selitto (gráfico B), 3 horas após a administração de Cg (média  $\pm$  EPM). \*\* $p < 0.001$  comparado Sal/Veic (One-way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey).

Fonte: Da autora.

## 5.2 Exclusão da ocorrência de efeitos sistêmicos após a administração periférica de hemina 65 $\mu\text{g}$

Os gráficos 6A (Von Frey eletrônico) e 6B (Randall Selitto), mostram que os animais que foram pré-tratados com Cg e pós-tratados com veículo apresentaram aumento da intensidade de hipernocicepção (Graf. 6A:  $F_{3,21} = 101,0$ ;  $p < 0.001$ ; Graf. 6B:  $F_{3,22} = 154,6$ ;  $p < 0.001$ ), quando comparados aos grupos pré-tratados com salina e pós-tratados com veículo. Também podemos observar que o tratamento contralateral (pata esquerda) com hemina 65 $\mu$ g, não exerceu nenhum tipo de influência sobre a hiperalgesia ocasionada pelo tratamento com Cg na pata direita. Já a administração do substrato da HO na pata direita reduziu a hiperalgesia acarretada pela administração de hemina 65  $\mu$ g na mesma pata ( $p < 0.001$ ).



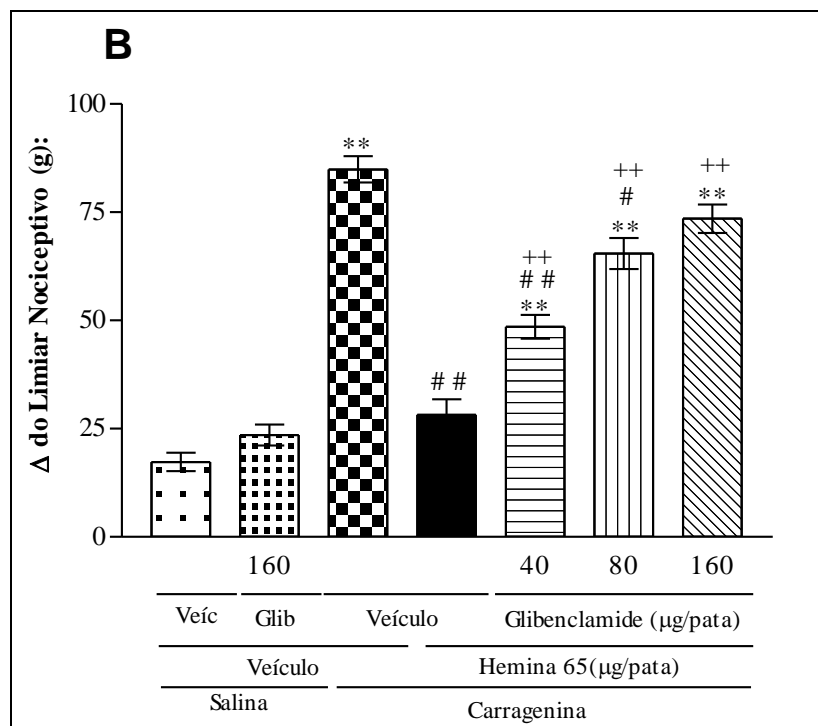
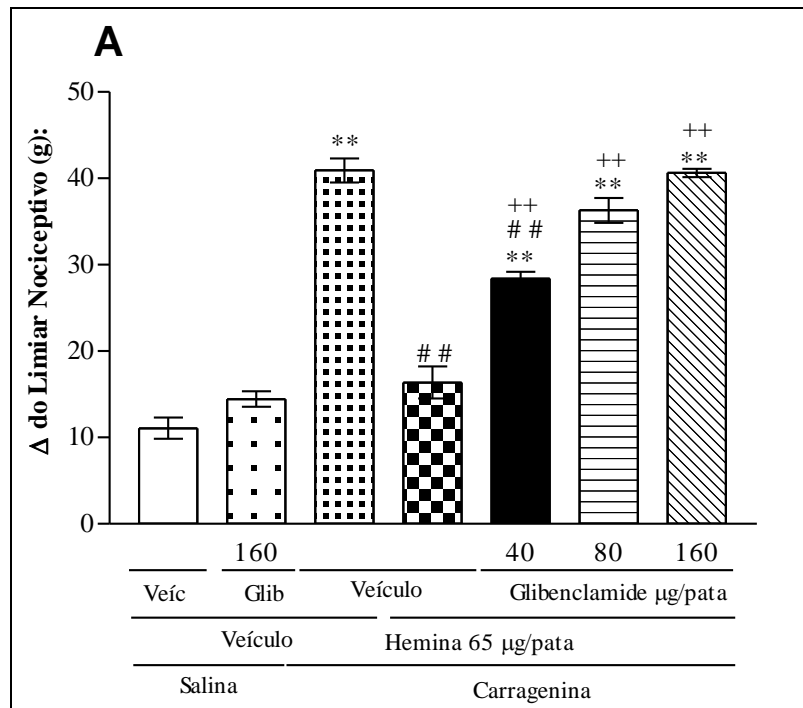
Gráficos 6A e 6B – Efeito da administração contralateral (pata esquerda) de hemina 65  $\mu$ g sobre a hiperalgesia induzida por Cg na pata direita. A avaliação mecânica da intensidade de hipernocicepção ( $\Delta$  do limiar de retirada, em gramas) foi realizada pelo método de Von Frey eletrônico (gráfico A) e pelo teste de Randall Selitto (gráfico B), 3 horas após a administração de Cg (média  $\pm$  EPM). \*\* $p < 0.001$  comparado Sal/Veic; # #  $p < 0.001$  comparado Cg/Veic (One-way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey).

Fonte: Da autora.

### 5.3 Efeito do bloqueio (glibenclamida) ou abertura (diazóxido) de canais de $K^+$ sobre a resposta antinociceptiva periférica da via HO/CO

Os resultados apresentados nos gráficos 7A e 7B demonstram que o pós-tratamento dos animais com o bloqueador de canais de  $K^+_{ATP}$  (glibenclamida) foi capaz de antagonizar (Graf. 7A:  $F_{6,41} = 109,0$ ;  $p < 0.001$ ; Graf. 7B:  $F_{6,41} = 77,93$ ;  $p < 0.001$ ) a resposta antinociceptiva provocada pelo tratamento com o substrato da via da HO (Graf. 7A:  $p < 0.001$ ; Graf. 7B:  $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ ), após a indução de hiperalgesia pe-

lo pré-tratamento com Cg i.pl. ( $p < 0.001$ ). Já o pós-tratamento com glibenclamide nos animais pré-tratados com salina e veículo, não ocasionou nenhum tipo de alteração na intensidade de nocicepção mecânica dos animais.

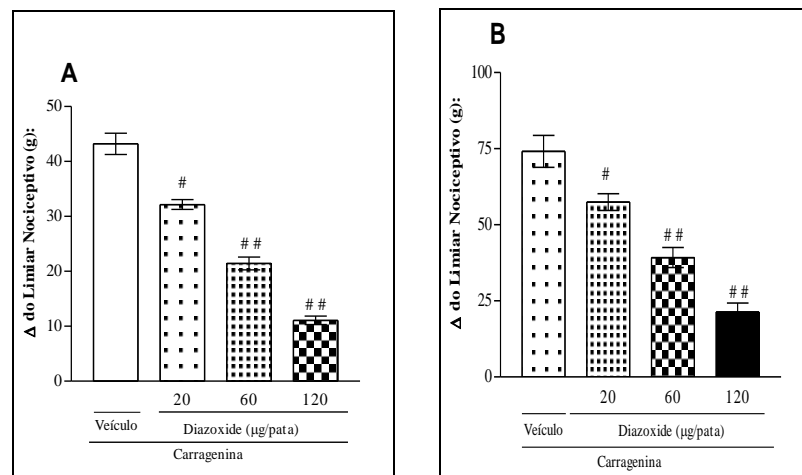


Gráficos 7A e 7B – Efeito da administração do bloqueador de canais de  $K^+$  ATP (glibenclamide) ou veículo (Tween 80- 2% em salina) sobre a resposta antinociceptiva induzida pela administração de hemina, após a indução de hiperalgesia pela Cg. A avaliação

mecânica da intensidade de hipernocicepção ( $\Delta$  do limiar de retirada, em gramas) foi realizada através do método de Von Frey eletrônico (gráfico A) e pelo teste Randall Selitto (gráfico B), 3 horas após a administração de Cg (média  $\pm$  EPM). \*\* $p < 0.001$  comparado Salina/Veíc/Veíc; #  $p < 0.05$  ou ##  $p < 0.001$  comparado Cg/Veíc/Veíc; ++ $p < 0.001$  comparado Cg/He/Veíc (One-way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey).

Fonte: Da autora.

Como podemos observar nos gráficos 8A e 8B, o pós-tratamento com diazoxide provocou redução da resposta hipernociceptiva ocasionada pela Cg (Graf. 8A:  $F_{3,23} = 118,0$ ;  $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ ; Graf. 8B:  $F_{3,23} = 38,35$ ;  $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ ), sendo que em ambos os testes a dose de 20 $\mu$ g apresentou menor efetividade ( $p < 0.05$ ), quando comparada as doses de 80 ou 120 $\mu$ g ( $p < 0.001$ ).

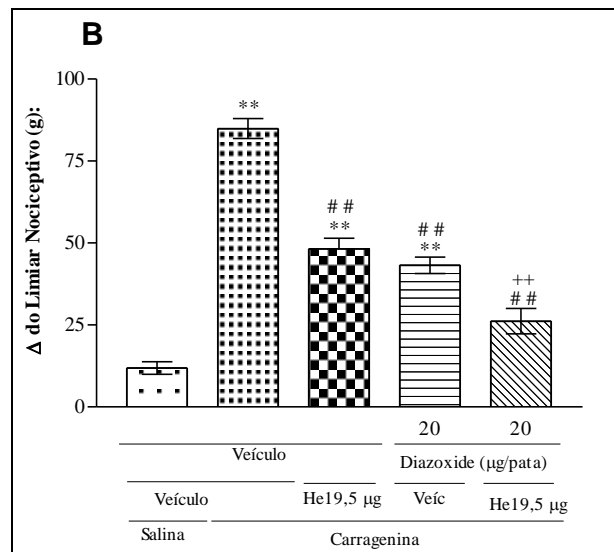
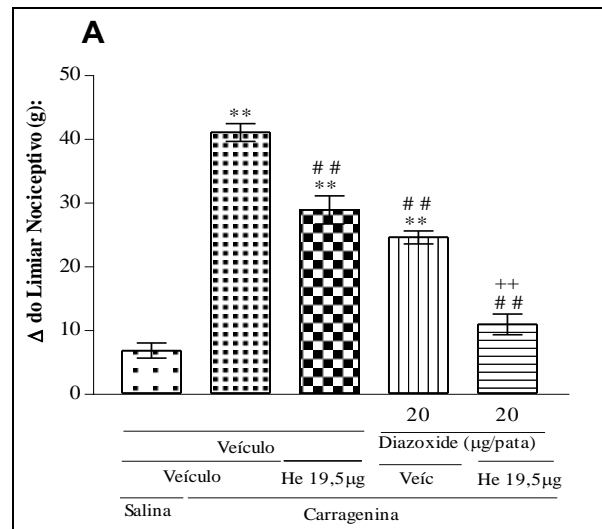


Gráficos 8A e 8B – Efeito da administração do ativador de canais de  $K^+$  (diazoxide) ou veículo (Tween 80-2% em salina) sobre a hiperalgesia induzida por Cg. A avaliação mecânica da intensidade de hipernocicepção ( $\Delta$  do limiar de retirada, em gramas) foi realizada através do método de Von Frey eletrônico (gráfico A) e pelo teste de Randall Selitto (gráfico B), 3 horas após a administração de Cg (média  $\pm$  EPM). #  $p < 0.05$  ou ##  $p < 0.001$  comparado Cg/Veíc (One-way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey).

Fonte: Da autora.

Os gráficos 9A (Von Frey eletrônico) e 9B (Randall Selitto), demonstram que os animais que foram pré-tratados com Cg e pós-tratados com veículo, apresentaram aumento da intensidade de hipernocicepção (Graf. 9A:  $F_{4,29} = 80,90$ ;  $p < 0.001$ ; Graf. 9B:  $F_{4,29} = 84,22$ ;  $p < 0.001$ ), quando comparados aos grupos pré-tratados com salina e pós-tratados com veículo. Nestes gráficos, também estão representados os efeitos antinociceptivos que a administração do ativador de canais de  $K^+$  (diazoxide 20  $\mu$ g) ou do substrato da via da HO (hemina 19.5  $\mu$ g) (Graf. 9A e 9B:  $p < 0.001$ ) acarretam sobre a resposta hipernociceptiva da Cg, sendo observado

que a administração conjunta destas drogas potencializou o efeito antinociceptivo da hemina em ambos os testes ( $p < 0.001$ ).

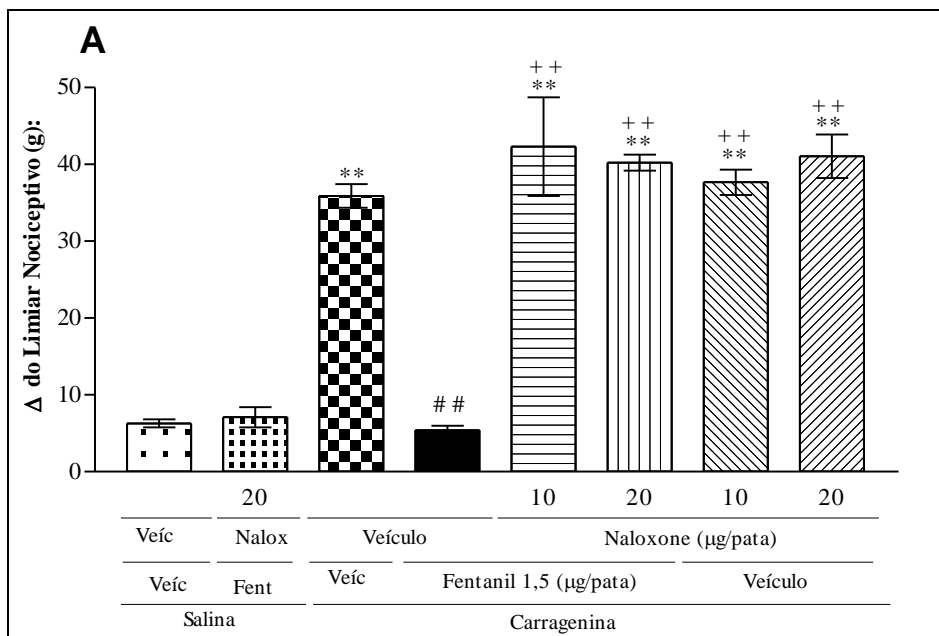


Gráficos 9A e 9B – Efeito da administração do ativador de canais de  $K^+$  (diazoxide) ou veículo (Tween 80- 2% em salina) sobre a resposta antinociceptiva induzida pela administração de hemina após a indução de hipernocicepção pela Cg. A avaliação mecânica da intensidade de hipernocicepção ( $\Delta$  do limiar de retirada, em grammas) foi realizada pelo método de Von Frey eletrônico (gráfico A), e pelo teste Randall Selitto (gráfico B), 3 horas após a administração de Cg (média  $\pm$  EPM). \*\* $p < 0.001$  comparado Salina/Veíc/Veíc; ##  $p < 0.001$  comparado Cg/Veíc/Veíc; ++ $p < 0.001$  comparado Cg/He/Veíc (One-way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey).

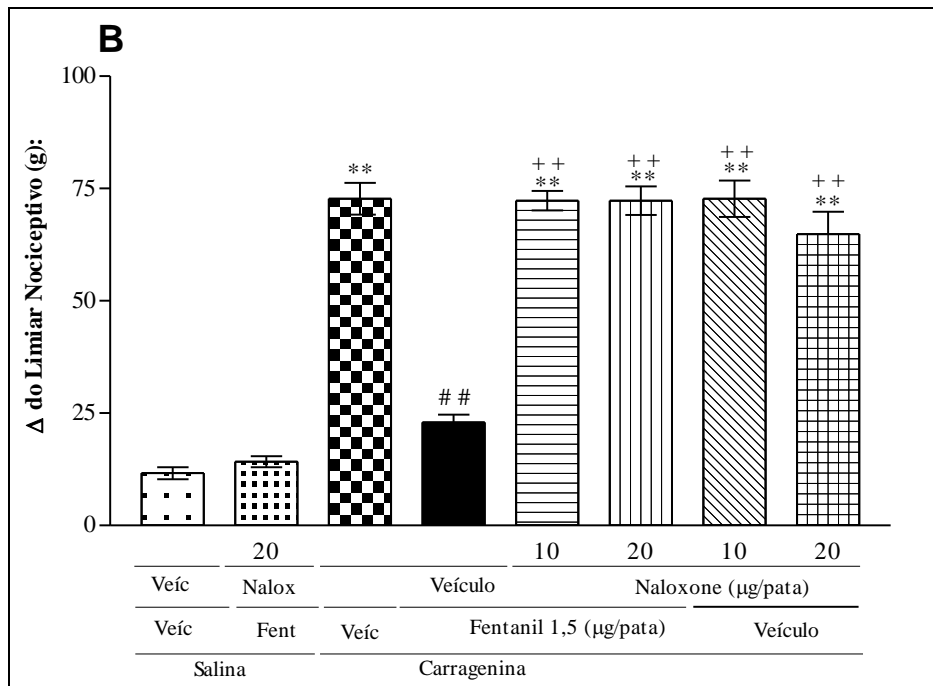
Fonte: Da autora.

#### 5.4 Exclusão da participação do sistema opióide na resposta antinociceptiva periférica da via HO/CO

Os gráficos 10A e 10B demonstram que a administração do bloqueador de receptores opióides, naloxone, foi eficiente em antagonizar (Graf. 10A:  $F_{7,47} = 41,49$ ;  $p < 0.001$ ; Graf. 10B:  $F_{7,47} = 87,92$ ;  $p < 0.001$ ) de forma estatisticamente significativa a resposta antinociceptiva acarretada pela administração de fentanil 1,5  $\mu\text{g}$  (agonista opióide) ( $p < 0.001$ ), após a indução de hiperalgesia pela pré-administração com Cg ( $p < 0.001$ ) em ambos os testes.



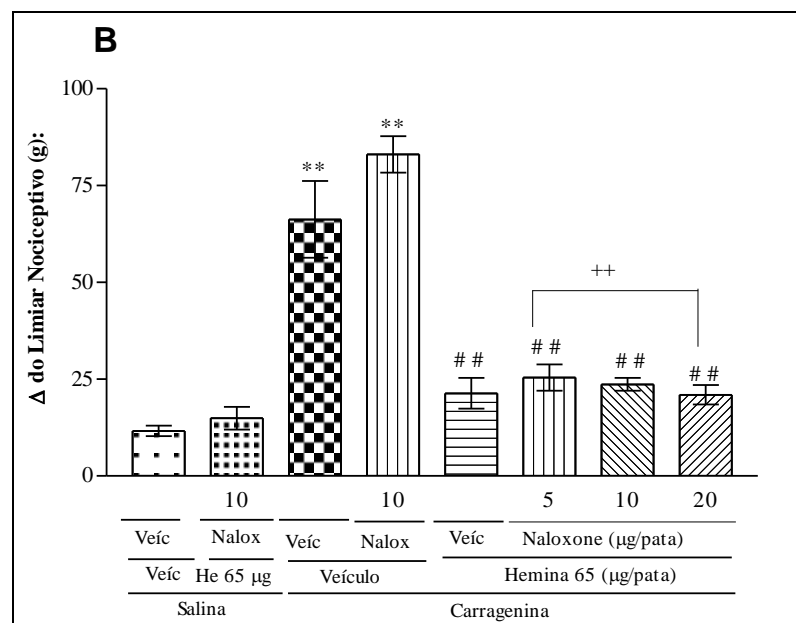
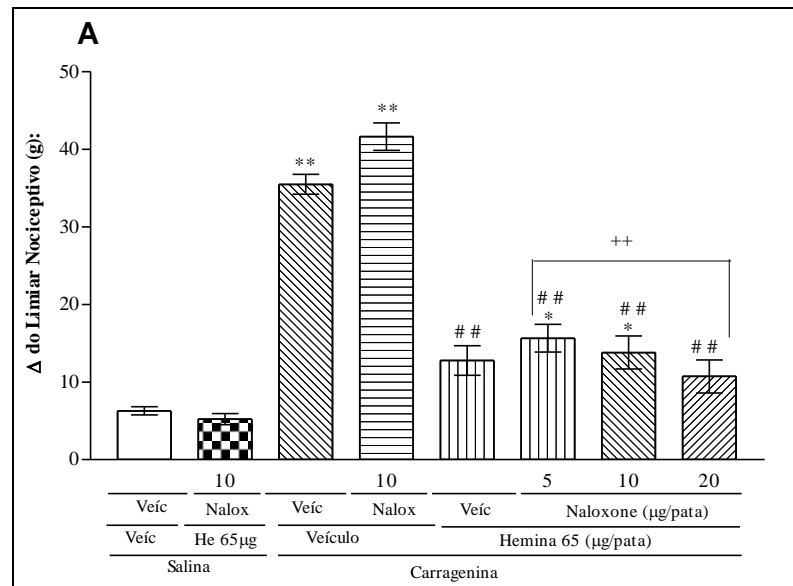




Gráficos 10A e 10B – Efeito da administração de naloxone sobre a resposta antinociceptiva do fentanil, após indução de hipernocicepção pelo pré-tratamento com Cg. A avaliação mecânica da intensidade de hipernocicepção ( $\Delta$  do limiar de retirada, em grammas) foi realizada pelo método de Von Frey eletrônico (gráfico A) e pelo teste Randall Selitto (gráfico B), 3 horas após a administração de Cg (média  $\pm$  EPM). \*\* $p < 0.001$  comparado Salina/Veic/Veic; ##  $p < 0.001$  comparado Cg/Veic/Veic; ++ $p < 0.001$  comparado Cg/Fent/Veic (One-way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey).

Fonte: Da autora.

Os gráficos 11A e 11B demonstram que o bloqueio dos receptores opióides através da administração de naloxone não modificou (Graf. 11A:  $F_{7,47} = 67,71$ ;  $p > 0.05$ ; Graf. 11B:  $F_{7,47} = 32,80$ ;  $p > 0.05$ ) a resposta antinociceptiva acarretada pela administração de hemina ( $65\mu\text{g}$ ) ( $p < 0.001$ ) sobre à hiperalgesia provocada pelo pré-tratamento com Cg (Graf. 11A:  $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ ; Graf. 11B:  $p < 0.001$ ).



Gráficos 11A e 11B – Efeito da administração do naloxone sobre a resposta antinociceptiva induzida pela administração de hemina, após indução de hipernociceção pela Cg. A avaliação mecânica da intensidade de hipernociceção ( $\Delta$  do limiar de retirada, em gramas) foi realizada pelo método de Von Frey eletrônico (gráfico A) e pelo teste Randall Selitto (gráfico B), 3 horas após a administração de Cg (média  $\pm$  EPM). \* $p < 0.05$  ou \*\* $p < 0.001$  comparado Salina/Veic/Veic; ##  $p < 0.001$  comparado Cg/Veic/Veic; ++ $p > 0.05$  comparado Cg/He/Veic (One-way ANOVA, seguido de pós-teste Tukey).

Fonte: Da autora.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo fornecem evidências acerca do possível envolvimento de canais de potássio sensíveis ao ATP na resposta antinociceptiva periférica da via da HO/CO.

Os efeitos antinociceptivos do CO, produto da degradação do grupo heme pela enzima HO, foram avaliados através do modelo de resposta hipernociceptiva de origem inflamatória, sendo utilizado como agente promotor de hipernocicepção a Cg. A Cg é um agente inflamatório amplamente utilizado em ratos e camundongos para quantificar a atividade anti-inflamatória ou antihiperalgésica de diferentes substâncias (HENRIQUES, et al., 1987). Sua administração é capaz de ocasionar lesão tecidual gerando um complexo processo envolvendo diferentes mediadores inflamatórios, que por sua vez, são capazes de sensibilizar nociceptores presentes nas fibras nervosas aferentes primárias, acarretando o estado de hipernocicepção.

Neste contexto, podemos observar nos resultados apresentados que a Cg injetada na pata dos animais na concentração de 100 µg foi eficiente em acarretar resposta hiperalgésica, com o pico desta ação observado na 3ª hora após sua administração; este tempo foi estabelecido para a exposição dos animais aos testes nociceptivos de acordo com estudos anteriores, que também utilizaram a Cg como estímulo para induzir reação inflamatória aguda e consequente hiperalgesia (LORENZETTI; FERREIRA, 1995; STEINER, et al., 2001; FRANCISCHI, et al., 2002; RESENDE, et al., 2004).

A avaliação da intensidade da resposta nociceptiva dos animais foi realizada através dos testes mecânicos que permitem medir experimentalmente o aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodínia) ou nocivos (hiperalgesia). Em nossos experimentos, os animais foram submetidos aos testes de Von Frey eletrônico e Randall Selitto.

Podemos observar que os resultados obtidos em nosso estudo estão em concordância com estudos realizados por Steiner, et al. (2001) e Nascimento e Branco (2007, 2008) acerca dos efeitos antinociceptivos desencadeados pela ativação da via da HO/CO, diante da exposição ao modelo experimental de dor inflamatória.

Nossos resultados suportam esta ideia, apontando que a hiperalgesia

inflamatória ocasionada pela administração de carragenina i.pl. é significativamente amenizada através do tratamento com o substrato da enzima heme-oxigenase (hemina). Em contrapartida, o tratamento prévio com o potente inibidor da enzima HO (Tin protoporphyrin IX dichloride) promoveu efeito hipernociceptivo, potencializando a resposta hiperalgésica ocasionada pelo tratamento com Cg.

Em colaboração aos nossos achados, estudos farmacológicos demonstraram que o bloqueio da enzima HO através da administração de ZnDPBG leva ao aumento da hipersensibilidade mecânica após a administração de diversos agentes inflamatórios (STEINER, et al., 2001) e resposta hipernociceptiva, após o tratamento com formalina intrapodal (NASCIMENTO; BRANCO, 2007). Nestes mesmos estudos, a administração do substrato da enzima HO, heme-lisinato, ou a direta aplicação de CO i.pl. acarretaram resposta antinociceptiva, reforçando as evidências acerca do possível papel antinociceptivo desencadeado pelo CO (STEINER, et al., 2001; NASCIMENTO; BRANCO, 2007). Recentes publicações também demonstraram que a administração intracerebroventricular (ICV) do substrato da enzima HO, apresenta efeito antinociceptivo diante da exposição dos animais ao teste de retirada de cauda (Tail Flick) (CARVALHO; BRANCO; LEITE- PANISSI, 2011).

Contrastando com nossos achados, em meados da década de 90, os primeiros relatos descrevendo a possível participação da via HO/CO em processos nociceptivos, sugeriam que a administração do inibidor da via era um agente promotor de antinociceção (MELLER; DYKSTRA; GEBHART, 1994; YAMAMOTO; NOZAKI-TAGUCHI, 1995). Outros autores também demonstraram que a administração sistêmica do inibidor HO seria capaz de reduzir o comportamento de dor, em variados modelos experimentais (LI; CLARK, 2000a, 2001a, 2004b; LIANG; LI; CLARK, 2000b, 2003). Além disso, a administração isolada ICV do inibidor não acarretou nenhum tipo de alteração na resposta nociceptiva dos animais após a exposição ao teste Tail Flick (CARVALHO; BRANCO; LEITE- PANISSI, 2011).

Diante desta divergência de resultados em relação aos nossos experimentos, é necessário ressaltar que tais achados experimentais foram obtidos por variadas formas de administração do fármaco em estudo, ou seja, a ativação, inibição ou simples ausência de ação demonstrada, foram obtidos em diferentes vias de administração da droga. Esta possível diferença do efeito do inibidor da via da HO em diferentes vias de administração, já foi apresentado por Steiner, Colombari e Branco (1999), no controle da resposta febril. Neste estudo, os autores demonstraram que

o tratamento ICV com ZnDPBG bloqueou a resposta febril que acompanha o estresse agudo, enquanto a administração intraperitoneal da mesma droga, não foi capaz de estimular qualquer tipo de resposta sobre o comportamento febril.

Outra justificativa plausível para as variadas respostas obtidas pode estar relacionada aos diversos modelos experimentais utilizados, os quais envolvem distintos mecanismos de dor como a indução de dor inflamatória, pelo uso de diferentes agentes hiperalgésicos (zimosan, N-metil-D-aspartato “NMDA” ou formalina) ou exposição a diferentes modelos de dor (incisional, neuropática ou aguda diante de um estímulo térmico nocivo) (MELLER, et al., 1994; LI; CLARK, 2000b, 2003; CARVALHO; BRANCO; LEITE- PANISSI, 2011).

Nossos resultados também demonstraram a exclusão da participação dos demais subprodutos liberados pela via da HO na resposta antinociceptiva. Como pôde ser observado, o pós-tratamento dos animais com biliverdina ou sulfato ferroso (sal que contém ferro em sua composição), não provocou nenhuma alteração sobre a ação hiperalgésica da Cg, em consonância com experimentos realizados por Nascimento e Branco (2007), que também não obtiveram nenhum tipo de alteração na resposta dos animais tanto na 1ª como na 2ª fase do teste de formalina, após o tratamento com biliverdina ou deferoxamine (quelante de ferro). Desta maneira, podemos sugerir que dentre os três subprodutos liberados pela enzima heme-oxigenase, o mais ativo e capaz de desempenhar algum envolvimento sobre as respostas nociceptivas é o CO, sendo que a biliverdina e o sulfato ferroso se mostraram incapazes de desenvolver qualquer ação sobre estas respostas.

Nossos resultados também sugerem que a ação antinociceptiva ocasionada pela administração intraplantar do substrato da HO na concentração de 65µg é periférica, sem o envolvimento de mecanismos sistêmicos. Um grande número de estratégias experimentais podem ser adotadas para exclusão dos efeitos sistêmicos de drogas (STEIN, 1993). No presente estudo, nós optamos pela estratégia de avaliação dos efeitos do substrato da via diretamente sobre o sítio de administração da Cg (pata direita) versus os efeitos de sua administração na pata contralateral (pata esquerda); na abordagem experimental adotada neste estudo, a administração de Cg foi realizada na pata direita e esquerda, com o intuito de simular as mesmas condições experimentais em ambas as patas (processo inflamatório), sendo a rota e o sítio adotados os mesmos, amenizando assim, possíveis variáveis experimentais (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; ALVES, et al., 2004b).

Desta forma, com o limiar nociceptivo sempre mensurado na pata direita, nós observamos que o tratamento com hemina (65  $\mu\text{g}$ ) foi ineficiente quando administrada contralateralmente, sugerindo assim que esta dose tem apenas ação em sítio periférico, não sendo capaz de desencadear mecanismos de ação sistêmicos.

Evidências experimentais apontam que a atuação do CO em diversos processos, inclusive os ligados à nocicepção, pode ocorrer pela alteração de GMPc intracelular, sendo esta alteração mediada por meio da ativação da GC. Além da ativação da GC e dos níveis de GMPc, estudos associam a ação do CO à ativação de canais iônicos, com experimentos demonstrando que o CO pode desempenhar um importante papel na função cardiovascular (WANG; WU, 1997) e detecção de  $\text{O}_2$  (WILLIAMS, et al., 2004, 2008) através da ativação de canais de potássio sensíveis ao cálcio. Outros canais iônicos também foram demonstrados na modulação pelo CO, tal como canais de cálcio do tipo L (Cav1.2) (SCRAGG, et al., 2008), TREK-1 (DALLAS; SCRAGG; PEERS, 2008), canais de ENaC (ALTHAUS, et al., 2009) e  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  (FORESTI, et al., 2004).

Além disso, evidências experimentais sugerem que os rápidos aumentos de GMPc pelo CO pode provocar alterações da função de canais iônicos (MORITA, et al., 1995; LIANG; LI; CLARK, 2004a, b; NASCIMENTO; BRANCO, 2007). E estudos apontam que a síntese de GMPc pelo NO (gasotransmissor semelhante ao CO), é capaz de promover a abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP (SOARES, et al., 2000; SOARES; DUARTE, 2001).

Sabe-se que estes gasotransmissores (CO e NO) possuem propriedades semelhantes durante a ativação da GC e regulação de GMPc (DAWSON; SNYDER, 1994; MAINES, 1997; PONG; ELDRED, 2009). Já tendo sido demonstrado que o CO pode atuar para potenciar ou inibir a ativação de GC mediada pelo NO in vitro e assim, influenciar as concentrações endógenas de GMPc (INGI; CHENG; RONNETT, 1996). Neste contexto, estudos também apontam que estes gasotransmissores nem sempre funcionam de forma independente, de forma que um pode modular a atividade do outro, agindo em conjunto em uma associação complexa, dinâmica e adaptável (PONG; ELDRED, 2009).

É bem conhecido que a abertura de canais de  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  pela morfina induz hiperpolarização da célula bem como redução dos níveis de cálcio intracelular e liberação de neurotransmissores, contribuindo assim para analgesia (LOHMANN; WELCH, 1999; OCAÑA, et al., 2004). Além disso, a abertura de canais de  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ , localizados

nos neurônios aferentes primários produz antinocicepção e representa uma importante fase do efeito antinociceptivo de algumas drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (BEIRITH, et al., 1998). Embora um grande número de relatos acerca do envolvimento de canais de  $K^+_{ATP}$  em respostas nociceptivas seja descrito na literatura, ainda não existem evidências capazes de excluir ou propor o possível envolvimento desta classe de canais na antinocicepção acarretada pela via HO/CO.

Em modelos experimentais para averiguação da participação de  $K^+_{ATP}$  na ação antinociceptiva das drogas, o glibenclamide é um fármaco amplamente utilizado, por sua capacidade de bloquear especificamente canais de  $K^+_{ATP}$ , sem qualquer efeito sobre canais de potássio dependentes do  $Ca^{++}$  ( $K_{Ca^{++}}$ ) ou canais de  $K^+$  dependentes da voltagem (AMOROSO, et al., 1990; NICHOLS; LEDERER, 1991; EDWARDS; WESTON, 1993). Esta propriedade o torna capaz de atestar ou excluir a participação desta classe de canais iônicos no mecanismo de ação de diferentes drogas analgésicas, tornando-se assim a droga de escolha para investigar o possível envolvimento de canais de  $K^+_{ATP}$  na resposta antinociceptiva da via HO/CO, no nosso estudo.

Podemos observar nos resultados aqui apresentados que o tratamento com esta sulfoniluréia não causou qualquer tipo de efeito hiperalgésico ou antinociceptivo quando administrada isoladamente. Esta ausência de efeito do bloqueador de canal de  $K^+$ , numa concentração conhecidamente capaz de impedir a antinocicepção acarretada pela hemina, pode indicar que canais de  $K^+$  de neurônios aferentes primários envolvidos na modulação da nocicepção não são ativados tonicamente, sendo o efeito hiperalgésico ocasionado por sua administração conjunta à hemina, decorrente do bloqueio da ação antinociceptiva acarretada pelo substrato da HO sobre a ação hiperalgésica da Cg, e não de qualquer efeito único do glibenclamide. Assim, nossos resultados demonstram que o bloqueio dos canais  $K^+_{ATP}$  pelo glibenclamide reverteu significativamente a resposta antinociceptiva acarretada pela administração de hemina em ambos os testes realizados.

Corroborando com este achado, Foresti e colaboradores em 2004, demonstraram que a ação vasorelaxante do CO libertado pela CORM-3 em tecidos da aorta previamente contraídos com fenilefrina, foi significativamente reduzida após incubação dos tecidos com glibenclamide, apontando desta forma, uma possível participação de canais  $K^+_{ATP}$  na ação do CO.

Nossos estudos também apontam que a administração do abridor de canais de potássio diazoxide, acarretou diminuição da resposta hipernociceptiva acarretada pela Cg, sendo observada na administração conjunta da menor dose efetiva de diazoxide e hemina a potencialização da resposta antinociceptiva ocasionada pelo substrato da via da HO, na ação hiperalgésica da Cg, sugerindo uma ação sinérgica entre o abridor de canais de potássio e o substrato da HO. Juntos, estes achados sugerem evidências acerca do possível envolvimento de canais de  $K^+_{ATP}$  na resposta antinociceptiva desencadeada pela via HO/CO.

A ação analgésica do sistema opióide pode ocorrer através da ativação de canais de  $K^+_{ATP}$  e diversos experimentos demonstrando o antagonismo gerado pela administração de naloxone sobre a ação antinociceptiva da morfina (agonista opióide) (AMOROSO, et al., 1990; OCAÑA, et al., 1990; SCHMID-ANTOMARCHI, et al., 1990). Estudos realizados através da administração i.pl. também apontam que o naloxone é plenamente capaz de antagonizar o efeito antihiperalgésico da morfina diante desta via de administração (RODRIGUES; DUARTE, 2000).

A partir deste conhecimento, com o objetivo de verificar a possível participação do sistema opióide na resposta antinociceptiva da via da HO/CO, o antagonista de receptores opióide, naloxone, foi administrado após o pré-tratamento com hemina, para investigar se o bloqueio de receptores opióides seria capaz de prejudicar a resposta da antinociceptiva da via HO/CO.

A realização do tratamento com fentanil, fármaco opióide 150 vezes mais potente que a morfina (OTERO, 2005), foi utilizado como um controle positivo da ação do naloxone, onde demonstramos a reversão da analgesia ocasionada pelo fentanil após administração do antagonista opióide, estando este achado em concordância com estudos anteriores (RODRIGUES, et al., 2005). Contudo, o tratamento i.pl. com naloxone não foi capaz de modificar o efeito antinociceptivo ocasionado pela administração de hemina, sugerindo desta forma a exclusão da possível participação do sistema opióide na resposta antinociceptiva desencadeada pela via HO/CO.

Diante dos dados fornecidos por nosso estudo, podemos sugerir o possível envolvimento de canais de potássio sensíveis ao ATP na resposta antinociceptiva do CO liberado pela HO. Este achado apresenta novas evidências acerca dos mecanismos envolvidos em sua ação e pode contribuir para maior compreensão de como e onde o CO participa dos eventos de sinalização. Além disso, este é um estudo pioneiro que investigou a hipótese da possível participação de canais de  $K^+_{ATP}$  na res-



posta antinociceptiva desencadeada pela via HO/CO e possivelmente contribuirá no embasamento de investigações futuras.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente aos resultados experimentais obtidos na presente investigação, podemos concluir que o CO liberado pela degradação do grupo heme através da enzima HO induziu resposta antinociceptiva frente à hiperalgesia acarretada pela administração de Cg. A administração contralateral do substrato da HO (hemina 65 $\mu$ g) não interferiu na resposta hipernociceptiva da Cg administrada na pata direita, sugerindo a ausência de mecanismos sistêmicos frente à manipulação periférica da via. A administração dos demais subprodutos da via, biliverdina ou ferro, não alterou a intensidade de hipernocicepção mecânica dos animais, sugerindo o CO como o mais efetivo subproduto da HO sobre as repostas nociceptivas. A ação antinociceptiva da via da HO/CO pode ocorrer através do envolvimento de canais de  $K^+_{ATP}$ , sendo este fato evidenciado pela reversão da ação antinociceptiva da hemina, através do bloqueador de canais de  $K^+_{ATP}$ , glibenclamida. A administração do ativador de canais de  $K^+$ , diazoxide, demonstrou-se capaz de potencializar a resposta antinociceptiva da hemina, sugerindo uma ação sinérgica entre as drogas. A administração do antagonista de receptores opióides, naloxone, não exerceu nenhum tipo de influência sobre a ação da hemina, indicando a exclusão da participação do sistema opióide na atividade antinociceptiva da via HO/CO.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, N.G. et al. Erythropoietin controls heme metabolic enzymes in normal human bone marrow culture. **Exp Hematol**, v. 17, p. 908-913, 1989.

ABRAHAM, N.G. et al. Expression of heme oxygenase in hemopoiesis. **Adv Exp Med Biol**, v. 241, p. 97-116, 1988.

ABRAHAM, N.G.; FRIEDLAND, M.L.; LEVERE, R.D. Heme metabolism in hepatic and erythroid cells, in *Progress in Hematology* (Brown E ed). New York. **Grune and Stratton**, p. 75-130, 1983.

ABRAHAM, N.G., KAPPAS, A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. **Pharmacol**, v. 60, p. 79-127, 2008.

ABRAHAM, N.G. Molecular regulation-biological role of heme in hematopoiesis. **Blood Rev**, v. 5, p.19-28, 1991.

AGUILAR-BRYAN, L. et al. Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. **Physiol Rev**, v. 78, p. 227- 245, 1998.

ALAM, J.; DEN, Z. Distal AP-1 binding sites mediate basal level enhancement and TPA induction of the mouse heme oxygenase-1 gene. **J Biol Chem**, v. 267, p. 21894-21900, 1992.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Publishing, 1994.

ALTHAUS, M. et al. Carbon monoxide rapidly impairs alveolar fluid clearance by inhibiting epithelial sodium channels. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 4, p. 639-650, 2009.

ALVES, D.P. et al. Additive antinociceptive effect of the combination of diazoxide, an activator of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, and sodium nitroprusside and dibutyl-*g*mp. **Eur J of Pharmacology**, v. 489, p. 59-65, 2004a.

ALVES, D.P. et al. Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels activation. **Life Sciences**, v. 74, p. 2577–2591, 2004b.

AMOROSO, S. et al. Glucose, sulphonylureas and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **Science**, v. 247, p. 852-854, 1990.

BARKOUDAH, E.; JAGGAR, J.H.; LEFFLER, C.W. The permissive role of endothelial NO in CO-induced cerebrovascular dilation. **Am J Physio Heart CircPhysiol**, v. 287, p. H1459-H1465, 2004.

BEIRITH, A. et al. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**, v. 345, p. 233-245, 1998.

BERNARD, C. Lecons sur les effets des substances toxiques et medicamenteuses. **Bailliere**, Paris, 1857.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.

BULLITT, E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. **J Comp Neurol**, v. 296, p. 517-530, 1990.

CAO, L.; BLUTE, T.A.; ELDRED, W.D. Localization of heme oxygenase-2 and modulation of cGMP levels by carbon monoxide and/or nitric oxide in the retina. **Vis Neurosci**, v. 17, p. 319-329, 2000.

CARVALHO, P.G.; BRANCO, L.G.S.; LEITE- PANISSI, C.R.A. Involvement of the heme oxygenase-carbon monoxide-cGMP pathway in the nociception induced by acute painful stimulus in rats. **Brain Research**, v. 1385, p. 107-113, 2011.

CARVALHO, W.A. et al. Biologia Molecular dos Receptores Farmacológicos e Seus Sistemas Efetores de Interesse em Anestesiologia. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 47, p. 152-167, 1997.

COBURN, R.F.; WILLIAMS, W.I.; KAHN, S.B. Endogenous carbon monoxide production in patients with hemolytic anemia. **J Clin Investig**, v. 45, p.460-468, 1966.

DALLAS, M.L.; SCRAGG, J.L.; PEERS, C. Modulation of hTREK-1 by carbon monoxide. **Neuro Report**, v. 19, p. 345-348, 2008.

DAWSON, T.M., SNYDER, S.H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J Neurosci**, v. 14, p. 5147-5159, 1994.

DI ROSA, M. Biological Properties Of Carrageenan. **J Pharm Pharmac**, v. 24, p. 89-102, 1972.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, p. 8-16, 2008.

EDWARDS, G.; WESTON, A.H. The pharmacology of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 33, p. 597–637, 1993.

EGEA, J. et al. Haeme oxygenase-1 overexpression via nAChRs and the transcription factor Nrf2 has antinociceptive effects in the formalin test. **Pain**, v. 146, p. 75–83, 2009.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; CORREA, F. M. A. Central and peripheral action of aspirin-like drugs. **Eur J Pharmacol**, v. 53, p. 39-48, 1978.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. I-Prostaglandin hiperalgesia, a cAMP/Ca<sup>+</sup> + dependent process. **Prostaglandins**, v. 18, p. 179–190, 1979.

FORESTI, R.; MOTTERLINI, R. The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. **Free Rad Res**, v. 31, p. 459-475, 1999.

FORESTI, R. Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. **Br J Pharmacol**, v. 142, p. 453-460, 2004.

FRANCISCHI, J.N. et al. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 137, p. 837-844, 2002.

HENRIQUES, M.G. et al. Mouse Paw edema. A new model for inflammation. **Braz J of Medicine and Biol Research**, v. 20, p. 243-249, 1987.

HUNT, S.P.; PINI, A.; EVAN, G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature**, v. 328, p. 632-634, 1987.

INGI, T.; CHENG J.; RONNETT, G.V. Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. **Neuron**, v. 16, p. 835–842, 1996.

JOHNSON, R.A.; KOZMA, F.; COLOMBARI, E. Carbon monoxide: from toxin to endogenous modulator of cardiovascular functions. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, p. 1-14, 1999.

KNIGHT, P.R. et al. Development of a sensitive microarray immunoassay and comparison with standard enzyme-linked immunoassay for cytokine analysis. **Shock**, v. 1, p. 26-30, 2004.

LANDAW, S.A.; CALLAHAN, E.W.; SCHMID, R. Catabolism of heme in vivo: comparison of the simultaneous production of bilirubin and carbon monoxide. **J Clin Invest**, v. 49, p. 914-925, 1970.

LEFFLER, C.W. et al. Carbon monoxide and cerebral microvascular tone in newborn pigs. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 276, p. H1641-H1646, 1999.

LIANG, D.Y.; LI, X.; CLARK, J.D. Formalin-induced spinal cord calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II alpha expression is modulated by heme oxygenase in mice. **Neurosci Lett**, v.360, p. 61-64, 2004b.

\_\_\_\_\_. Increased expression of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin- dependent protein kinase II alpha during chronic morphine exposure. **Neuroscience**, v. 123, p. 769-775, 2004a.

LI, X., ANGST, M.S., CLARK, J.D. A murine model of opioid-induced hyperalgesia. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 86, p. 56-62, 2001.

LI, X., CLARK, J.D. Chronic morphine exposure and the expression of heme oxygenase type 2. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 75, p. 179-184, 2000c.

\_\_\_\_\_. Heme oxygenase inhibitors reduce formalin-induced Fos expression in mouse spinal cord tissue. **Neuroscience**, v. 105, p. 949-956, 2001.

\_\_\_\_\_. Heme oxygenase type 2 plays a role in formalin-induced nociception. **Pain**, v. 86, p. 75-80, 2000a.

\_\_\_\_\_. Heme oxygenase type 2 participates in the development of chronic inflammatory and neuropathic pain. **J Pain**, v. 4, p. 101-107, 2003.

\_\_\_\_\_. The role of heme oxygenase in neuropathic and incisional pain. **Anesth. Analg**, v. 90, p. 677-682, 2000b.

LI, X. et al. Alterations in spinal cord gene expression after hindpaw formalin injection. **J Neurosci Res**, v. 78, p. 533-541, 2004.

LOHMANN, A.B.; WELCH, S.P. ATP- gated K (+) channel openers enhance opioid antinociception: indirect evidence for the release of endogenous opioid peptides. **Eur J Pharmacol**, v. 385, p. 119-127, 1999.

LORENZETTI. B.B.; FERREIRA, S.H. Mode of analgesic action of dipyrrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**, v. 114, p. 375-381, 1985.

MACKINNON, R. Potassium channels. **FEBS Lett**, v. 555, p. 62-65, 2003.

MAINES, M.D. Heme oxygenase: Clinical Applications and Functions. Florida. **CRC Press**, 1992.

\_\_\_\_\_. Heme oxygenase: Function, multiplicity, regulatorus mechanisms, and clinical applications. **Faseb J**, v. 2, p. 2557-2568, 1988.

\_\_\_\_\_. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 37, p. 517-554, 1997.

MAINES, M.D., MARK, J.A., EWING, J.F. Heme oxygenase, a likely regulator of cGMP production in the brain: induction of in vivo of HO-1 compensates for depression in NO synthase activity. **Mol Cell Neurosci**, v. 4, p. 398-405, 1993.

MANCUSO, C. et al. The role of carbon monoxide in the regulation of neuroendocrine function. **Neuroimmunomodulation**, v. 4, p. 225-229, 1997.

MARILENA, G. New physiological importance of two classical residual products: carbon monoxide and bilirubin. **Biochem Molec Med**, v. 61, p.136-142, 1997.

MARKS, G. et al. Does carbon monoxide have a physiological function? **Trend Pharmacol Sci**, v. 12, p. 185-188, 1991.

MCCOUBREY, W.K.JR.; EWING, J.F.; MAINES, M.D. Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. **Arch Biochem Biophys**, v. 295, p. 13-20, 1992.

\_\_\_\_\_. Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. **J Biol Chem**, v. 272, p. 12568-12574, 1997a.

MCCOUBREY, W.K.JR.; HUANG, T.J.; MAINES, M.D. Isolation and characterization of a cDNA from the cat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **Eur J Biochem**, v. 247, p. 725-732, 1997b.

MCCOUBREY, W.K. JR.; MAINES, M.D. The structure, organization and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2. **Gene**, v. 139, p. 155-161, 1994.

MELLER, S.T.; DYKSTRA, C.L.; GEBHART, G.F. Investigations of the possible role for carbon monoxide (CO) in thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. **Neuroreport**, v. 5, p. 2337-2341, 1994.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2<sup>a</sup> ed. Seattle: IASP Press, 1994, 209-214. Disponível em: < <http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>>. Acesso em: 29 July 2012.

MORITA, T. et al. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p.1475- 1479, 1995.

MORSE, D.; SETHI, J.; CHOI, A. M. K. Carbon monoxide- dependent signaling. **Crit Care Med**, v. 30, p. S12- S17, 2002.

MÜLLER, R.M.; TAGUCHI, H.; SHIBAHARA, S. Nucleotide sequence and organization of the rat heme oxygenase gene. **J Biol Chem**, v. 262, p. 6795-6802, 1987.

NASCIMENTO, C.G.; BRANCO, L.G. Antinociception synergy between the peripheral and spinal sites of the heme oxygenase-carbon monoxide pathway. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, p.141-147, 2009.

\_\_\_\_\_. Role of the peripheral heme oxygenase carbon monoxide pathway on the nociceptive response of rats to the formalin test: evidence for a cGMP signaling pathway. **Eur J Pharmacol**, v. 556, p. 55-61, 2007.

\_\_\_\_\_. Role of the spinal cord heme oxygenase-carbon monoxide-cGMP pathway in the nociceptive response of rats. **Eur J Pharmacol**, v. 581, p. 71-76, 2008.



NICHOLS, C.G.; LEDERER, J.W. Adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology**, v. 261, p.H1675-H1690, 1991.

NORTH, R.A. Drug receptors and the inhibition of nerve cells. **Br J Pharmacol**, v. 98, p. 13-28, 1989.

OCAÑA, M. et al. An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. **Eur J Pharmacol**, v. 186, p. 377-378, 1990.

OCAÑA, M. et al. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **Eur J Pharmacol**, v. 500, p. 203-19, 2004.

OTERO, P.E. Manejo da dor e a medicina veterinária. In OTERO, P.E. Dor: avaliação e tratamento em pequenos animais. São Paulo. **Interbook**, p. 2-5, 2005.

OTTERBEIN, L.E. et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. **Nat Med**, v. 6, p. 422-428, 2000.

PINA, R.Z.; FURLAN, M.M.D.P. Monóxido de carbono: uma nova molécula de sinalização celular. **Arq Mudi**, v.11, p. 20-28, 2007.

PONG, W.W.; ELDRED, W.D. Interactions of the gaseous neuromodulators nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the salamander retina. **J Neurosci Res**, v. 87, p. 2356–2364. 2009.

PONKA, P. Cell biology of heme. **Am J Med Sci**, v. 318, p. 241-256, 1999.

\_\_\_\_\_. Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. **Blood**, v. 89, p. 1-25, 1997.

PRESLEY, R.W. et al. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. **J Neurosci**, v. 10, p. 323-335, 1990.

RANDALL, L.O.; SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. **Arch Internationales de Pharmacodynamie et de Therapies**, v. 111, p. 409-419, 1957.

RATTAN S.; CHAKDER S. Inhibitory effect of CO on internal anal sphincter: heme oxygenase inhibitor inhibits NANC relaxation. **Am J Physiol**, v. 265, p. G799-804, 1993.

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

RODRIGUES, A.R.A.; DUARTE, I.D.G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 110-114, 2000.

RODRIGUES, A.R.A. et al. Participação de ATP-sensível K<sup>+</sup> canais no efeito antinociceptivo do fentanil periférica em ratos. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, p.91-97, 2005.

RODGERS, P.A. et al. Sources of carbon monoxide (CO) in biological systems and applications of CO detection technologies. **Semin Perinatol**, v.18, p. 2-10, 1994.

ROOSILD, T.P.; LE, K.T.; CHOE, S. Cytoplasmic gatekeepers of K<sup>+</sup>- channel flux: a structural perspective. **Trends Biochem Sci**, v. 29, p. 39-45, 2004.

ROSA, A.O. et al. Nrf2-mediated haeme oxygenase-1 up-regulation induced by cobalt protoporphyrin has antinociceptive effects against inflammatory pain in the formalin test in mice. **Pain**, v. 137, p. 332-339, 2008.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, v. 49, p. 123-33, 1998.

RYTER, S.W. et al. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. **Molec Cell Biochem**, v. 234, p. 246-263, 2002.

RYTER, S.W.; OTTERBEIN, L.E. Carbon monoxide inbiology and medicine. **Bioessays**, v. 26, p. 270-280, 2004.

SCAPAGNINI, G. et al. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. **Mol Pharmacol**, v.61, p. 554–561, 2002.

SCHACTER, B.A. Heme catabolism by heme oxygenase: physiology, regulation, and mechanism of action. **Semin Hematol**, v. 25, p. 349-369, 1988.

SCHMID-ANTOMARCHI, H. et al. K<sup>+</sup> channel openers activate brain sulfonylurea-sensitive K<sup>+</sup> channels and block neurosecretion. **Proc Natl Acad Sci**, v. 87, p. 3489–3492, 1990.

SCRAGG, J.L. Carbon monoxide inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> channels via redox modulation of key cysteine residues by mitochondrial reactive oxygen species. **J Biol Chem**, v. 283, p. 24412-24419, 2008.

SJÖSTRAND, T. A preliminary report on the in vitro formation of carbon monoxide in blood. **Acta Physiol Scand**, v. 22, p. 142-143, 1951a.

\_\_\_\_\_. Endogenous formation of carbon monoxide. **Acta Physiol Scand**, v. 22, p. 137-141, 1950.

\_\_\_\_\_. Endogenous formation of carbon monoxide: the CO concentration in the inspired and expired air of hospital patients. **Acta Physiol Scand**, v. 22, p. 137-141, 1951b.

\_\_\_\_\_. The formation of carbon monoxide by the decomposition of haemoglobin in vivo. **Acta Physiol Scand**, v. 26, p. 338, 1952.

SLUKA, K.A.; WALSH, D. Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation: Basic Science Mechanisms and Clinical Effectiveness. **J Pain**, v. 4, p. 109-121, 2003.

SNYDER, S.H.; JAFFREY, S.R.; ZAKHARY, R. Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. **Brain Res Rev**, v. 26, p.167-175, 1998.

STEIN, C. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Anesthesia and Analgesia**, v. 76, p. 182-191, 1993.

STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.S. Carbon monoxide is the heme oxygenase product with a pyretic action: evidence for a cGMP signaling pathway. **J Physiol**, v. 280, p. R448-R457, 2001.

STEINER, A.A.; COLOMBARI, E.; BRANCO, L.G.S. Carbon monoxide as a novel mediator of the febrile response in the central nervous system. **Am J Physiol**, v. 277, p. R499-R508, 1999.

STEINER, A.A. et al. Role of the haeme oxygenase/carbon monoxide pathway in mechanical nociceptor hypersensitivity. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, p. 1673-1682, 2001.

STEINER, A.A.; RESTE, G.; BRANCO, L.G.S. Role of the brain heme oxygenase carbon monoxide pathway in stress fever in rats. **Neurosci Lett**, v. 341, p. 193-196, 2003.

STEVENS, C.F.; WANG, Y. Reversal of long-term potentiation by inhibitors of haem oxygenase. **Nature**, v. 364, p. 147-149, 1993.

SOARES, A.C.; DUARTE, I.D. Dibutyl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the rat PGE<sub>2</sub>-induced hyperalgesic paw. **Br J Pharmacol**, v. 134, p. 127– 131, 2001.

SOARES, A.C. et al. Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. **Eur J Pharmacol**, v. 400, p. 67– 71, 2000.

SUMMER, G.J.; DINA, A.O.; LEVINE, J.D. Enhanced inflammatory hyperalgesia after recovery from burn injury. **Burns**, v. 33, p. 1021-1026, 2007.

TENHUNEN, R.; MARVER, H.S.; SCHMID, R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. **J Biol Chem**, v. 244, p. 6388–6394, 1969.

\_\_\_\_\_. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. **J Lab Clin Med**, v. 75, p. 410-421, 1970.

\_\_\_\_\_. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 61, p.748–755, 1968.

TEXEIRA, M.J. **A lesão do trato de Lissauer e do corno posterior da substância cinzenta da medula espinhal e a estimulação elétrica do sistema nervoso central para o tratamento da dor desafiadação**. 1990. 256 f. Tese (Doutorado em Neurologia) em São Paulo Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

VERMA, A. et al. Carbon monoxide: a putative neural messenger. **Science**, v. 259, p. 381-384, 1993.

VINCENT, S.R.; DAS, S.; MAINES, M.D. Brain heme oxygenase isoenzymes and nitric oxide synthase are co-localized in select neurons. **Neuroscience**, v. 63, p. 223-231, 1994.

VIVANCOS, G.G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, p. 391-399, 2004.

WADA, Y. et al. A region of the sulfonylurea receptor critical for a modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by G-protein  $\alpha$ -subunits. **EMBO J**, v. 19, p. 4915-4925, 2000.

WANG, R. Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 76, p.1-15, 1998.

\_\_\_\_\_. Two's company, three's a crowd: Can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? **FASEB J**, v. 16, p. 1792-1798, 2002.

WANG, R.; WU, L. Interaction of selective amino acid residues of K<sub>Ca</sub> channels with carbon monoxide. **Exp Biol Med**, v. 228, p. 474-480, 2003.

\_\_\_\_\_. The chemical modification of K<sub>Ca</sub> channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells. **J Biol Chem**, v. 272, p. 8222-8226, 1997.

WATANABE, M. et al. Acute renal failure: the heme oxygenase system. **J Bras Nefrol**, v. 4, p. 179-183, 2005.

WEBER, C.M.; EKE, B.C.; MAINES, M.D. Corticosterone regulates heme oxygenase-2 and NO synthase transcription and protein expression in rat brain. **J Neurochem**, v. 63, p. 953-962, 1994.

WILLIAMS, S.E. et al. A structural motif in the C-terminal tail of slo1 confers carbon monoxide sensitivity to human BK Ca channels. **Pflugers Arch**, v. 456, p. 561-572, 2008.

WILLIAMS, S.E. et al. Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. **Science**, v. 306, p. 2093-2097, 2004.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carragenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WU, L.; WANG, R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. **Pharmacol Rev**, v. 57, p. 585-630, 2005.

XUE, L. et al. Carbon monoxide and nitric oxide as neurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 97, p. 1851-1855, 2000.

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N. Zinc protoporphyrin IX, an inhibitor of the enzyme that produces carbon monoxide, blocks spinal nociceptive transmission evoked by formalin injection in the rat. **Brain Res**, v. 704, p. 256-262, 1995.

ZHUO, M. et al. Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. **Science**, v. 260, p. 1946-1950, 1993.