

ELAYNE VIEIRA DIAS

**“PAPEL DOS RECEPTORES DE DOPAMINA DO NÚCLEO
ACCUMBENS NA HIPERALGESIA CRÔNICA DE ORIGEM
INFLAMATÓRIA”**

**CAMPINAS,
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ELAYNE VIEIRA DIAS

**“PAPEL DOS RECEPTORES DE DOPAMINA DO NÚCLEO
ACCUMBENS NA HIPERALGESIA CRÔNICA DE ORIGEM
INFLAMATÓRIA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da TESE defendida pela candidata

Elayne Vieira Dias

e aprovada pela Comissão Examinadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para obtenção
do Título de Doutora em Biologia
Funcional e Molecular, na área de
FISIOLOGIA.



Orientador: Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

CAMPINAS,
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

D543p Dias, Elayne Vieira, 1975-
Papel dos receptores de dopamina do Núcleo Accumbens na hiperalgesia crônica de origem inflamatória / Elayne Vieira Dias. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Carlos Amilcar Parada.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hiperalgesia. 2. Núcleo accumbens. 3. Dopamina. 4. Modulação da dor. I. Parada, Carlos Amilcar, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The role of Nucleus Accumbens dopamine receptors in inflammatory chronic hyperalgesia

Palavras-chave em inglês:

Hyperalgesia

Nucleus accumbens

Dopamine

Pain modulation

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Amilcar Parada [Orientador]

Camila Squarzoni Dale

Cristiane Flora Villarreal

Fábio Rogério

Celina Monteiro da Cruz Lotufo

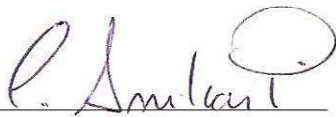
Data de defesa: 22-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

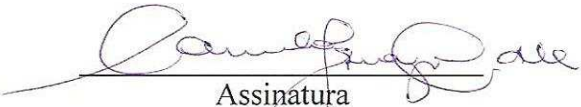
Campinas, 22 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

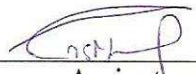
Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada (orientador)


Assinatura

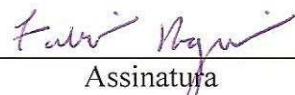
Profª. Dra. Camila Squarzon Dale


Assinatura

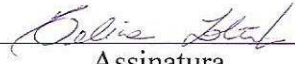
Profª. Dra. Cristiane Flora Villarreal


Assinatura

Prof. Dr. Fabio Rogerio


Assinatura

Profª. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo


Assinatura

Profª. Dra. Luana Fischer

Assinatura

Prof. Dr. Edson Antunes

Assinatura

Prof. Dr. Anderson Luiz Ferreira

Assinatura

ABSTRACT

DIAS, E. V. The role of Nucleus Accumbens dopamine receptors in inflammatory chronic hyperalgesia, 2013.

Pain is a subjective and unpleasant experience with a sensory-discriminative component that allows to identify and to locate the painful stimulus, and an affective-motivational component that involves learning, memory and reward. The protective role of pain is well established, however pain is maladaptive when becomes chronic. The neural plasticity in the pain pathways probably plays a key role in the chronification of pain. It has been suggested that the dopaminergic neurotransmission in the nucleus Accumbens (NAcc) modulates the activity of the pain pathways. Therefore, the present study evaluated the role of NAcc dopaminergic pathway in the chronification of inflammatory hyperalgesia induced by administration of PGE₂ (100ng/50µL) in rats hindpaw. Electronic von Frey anesthesiometer was used to assess the mechanical nociceptive threshold. The persistent hyperalgesia was induced by PGE₂ administration in the hindpaw during 14 consecutively days, and evaluated 7 days after the end of the treatment. Our findings demonstrated that the increase of dopamine in the NAcc by administration of GBR12909 (0.5nmol/0.25µL), a dopamine reuptake inhibitor, blocked the PGE₂-induced acute hyperalgesia. This blockade was prevented by dopamine D2 receptor antagonist (raclopride 10nmol/0.25µL), impaired by dopamine D3 receptor antagonist (U99194A 10nmol/0.25µL) but not changed by D1 receptor antagonist (SCH23390 3nmol/0.25µL), administered in the NAcc. In contrast, the induction of persistent hyperalgesia was facilitated by continuous infusion of GBR12909 in the NAcc (0.02nmol/0.5µL/h) during 7 days of PGE₂ treatment. The development of persistent hyperalgesia was prevented by SCH23390 (0.125nmol/0.5µL/h), impaired by raclopride (0.416nmol/0.5µL/h) but not changed by U99194A (0.416nmol/0.5µL/h), administered continuously in the NAcc during 7 days. In addition, the long term PGE₂ treatment in the hindpaw increased dopamine D1 receptor mRNA in the NAcc. Taken together, our data suggested that the chronification of pain involves the plasticity of dopaminergic neurotransmission in the NAcc, which switches its modulatory role from antinociceptive to pronociceptive.

Keywords: Hyperalgesia, Nucleus Accumbens, Dopamine, Pain modulation

RESUMO

DIAS, E. V. **Papel dos receptores de dopamina do Núcleo Accumbens na hiperalgesia crônica de origem inflamatória**, 2013

A dor é uma experiência subjetiva e desagradável com um componente sensório-discriminativo, que permite identificar e localizar o estímulo doloroso, e um componente afetivo-motivacional que envolve aprendizagem, memória e recompensa. Apresenta um caráter protetor bem definido, porém perde seu papel adaptativo quando se torna crônica. A cronificação da dor envolve alterações plásticas em estruturas neurais das vias responsáveis pelo seu processamento. Tem sido sugerido que a neurotransmissão dopaminérgica no Núcleo Accumbens (NAcc) modula a atividade das vias da dor. Portanto, o presente estudo avaliou o papel da via dopaminérgica do NAcc na cronificação da hiperalgesia inflamatória induzida pela administração de PGE₂ na pata traseira de ratos. Von Frey eletrônico foi utilizado para avaliar o limiar nociceptivo mecânico. A hiperalgesia persistente foi induzida pela administração de PGE₂ (100 ng/50µL) na pata durante 14 dias consecutivos, e avaliada 7 dias após o fim do tratamento. Os nossos resultados mostraram que o aumento da dopamina no NAcc pela administração de GBR12909 (0,5nmol/0,25µL), um inibidor de recaptação de dopamina, bloqueou a hiperalgesia aguda induzida por PGE₂ na pata. Este bloqueio foi impedido pelo antagonista do receptor de dopamina D2 (raclopride), prejudicado pelo antagonista do receptor de dopamina D3 (U99194A), mas não foi alterado pelo antagonista do receptor de dopamina D1 (SCH 23390), administrados no NAcc. Em contraste, a indução da hiperalgesia persistente foi facilitada pela infusão contínua de GBR12909 no NAcc (0,02nmol/0,05µL/h) durante 7 dias consecutivos de tratamento com PGE₂ na pata. Os antagonistas dos receptores de dopamina D1 e D2, administrados continuamente por 7 dias (0,125 e 0,416nmol/0,05µL/h, respectivamente), prejudicaram a instalação da hiperalgesia persistente. Além disso, o tratamento de longo prazo com PGE₂ na pata aumentou a expressão do RNAm do receptor de dopamina D1 no NAcc. Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que a cronificação da dor envolve a plasticidade da neurotransmissão dopaminérgica no NAcc, que muda o seu papel modulatório de antinociceptivo para pronociceptivo.

Palavras-chave: Hiperalgesia, Núcleo Accumbens, Dopamina, Modulação da dor

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	As Vias da Dor	3
1.2	Estimulação das Vias Nociceptivas e Processamento da Dor	8
1.3	Modulação da Dor	11
1.4	Dor e o Sistema de Recompensa	14
1.5	Hiperalgesia Persistente	17
2.	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivos Específicos	23
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Sujeitos	27
3.2	Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas	27
3.2.1	Adaptação da cirurgia para implante de um sistema de microinfusão para liberação sustentada de drogas no NAcc	30
3.3	Teste nociceptivo comportamental	30
3.4	Administração de drogas	32
3.5	Teste para verificação da atividade motora: Teste da barra giratória - Rotarod	33
3.6	Confirmação do local de injeção	34
3.7	Drogas	34
3.8	Protocolo Experimental	35
3.9	Imunofluorescência: Análise microscópica dos receptores de dopamina D1 e D2	37
3.10	Extração de RNAm e Proteínas	39
3.11	Análise molecular dos receptores de dopamina D1 e D2 por Western blotting	39
3.12	Análise da expressão do RNAm por qPCR em tempo real	40

3.13	Análises estatísticas	41
4.	RESULTADOS	43
4.1	Procedimento cirúrgico para implante de cânulas não alterou o limiar mecânico	45
4.2	Aumento de dopamina no NAcc reduziu a hiperalgesia inflamatória	48
4.3	O efeito anti-hiperalgésico do aumento de dopamina no NAcc não é mediado pelo receptor D1	49
4.4	A administração do antagonista seletivo de receptor D1, SCH23390, no NAcc não alterou a resposta nociceptiva induzida por PGE ₂	50
4.5	O efeito anti-hiperalgésico do aumento de dopamina no NAcc é bloqueado pela co-administração de raclopride	51
4.6	O antagonista do receptor de dopamina D2 intra NAcc favoreceu a resposta nociceptiva induzida por PGE ₂	52
4.7	O antagonista do receptor D3 reduz parcialmente o efeito anti-hiperalgésico induzido pelo aumento de dopamina no NAcc	53
4.8	Antagonista seletivo de receptor D3, U99194A, administrado no NAcc não alterou a resposta nociceptiva induzida por PGE ₂	54
4.9	Administração de PGE ₂ no tecido periférico por 14 dias induziu hiperalgesia persistente	55
4.10	Procedimento cirúrgico para implante de cânulas não alterou a indução e manutenção da hiperalgesia inflamatória persistente	57
4.11	Hiperalgesia persistente é favorecida pelo aumento de dopamina no NAcc	57
4.12	A administração sustentada do antagonista seletivo do receptor D1, SCH23390, no NAcc alterou a resposta nociceptiva persistente induzida por PGE ₂	60
4.13	Raclopride intra-NAcc atenuou a resposta nociceptiva persistente induzida por PGE ₂	61

4.14	Antagonista seletivo de receptor D3, U99194A, administrado cronicamente no NAcc não alterou a resposta nociceptiva induzida por PGE ₂	62
4.15	A hiperalgesia persistente de origem inflamatória não alterou a expressão dos receptores de dopamina na NAcc avaliada por imunofluorescência.....	63
4.16	Hiperalgesia persistente de origem inflamatória não alterou a expressão de receptores de dopamina no NAcc avaliada por Western blotting	66
4.17	A expressão do RNAm do receptor de dopamina D1 no NAcc, mas não do receptor D2, está alterada na hiperalgesia persistente de origem inflamatória.....	67
5.	DISCUSSÃO	69
6.	CONCLUSÃO.....	83
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8.	ANEXO	97

*“Se quer seguir-me, narro-lhe; não uma aventura,
mas experiência, a que me induziram,
alternadamente, séries de raciocínios e
intuições. Tomou-me tempo, desânimos, esforços.
Dela me prezo, sem vangloriar-me.
Surpreendo-me, porém, um tanto à parte de todos,
penetrando conhecimento que os outros ainda ignoram.
Reporto-me ao transcendente. Tudo, aliás,
é a ponta de um mistério. Inclusive, os fatos. Ou a ausência deles. Duvida?
Quando nada acontece, há um milagre que não estamos vendo.”*

“Eu quase que nada não sei, mas, desconfio de muita coisa.”

Guimarães Rosa

Agradecimentos

Aos meus pais, Agnaldo e Tereza, e aos meus irmãos, Nadinho, Ban e Lucinho, que estiveram incondicionalmente ao meu lado, nas minhas dúvidas e escolhas, na minha vida.

À Profa. Elenice A. de Moraes Ferrari, que me apresentou ao mundo acadêmico e me permitiu conhecer e me apaixonar pela pesquisa e pela ciência.

Ao meu orientador, Prof. Carlos Amílcar Parada, que me acompanhou ao longo desse trabalho com paciência e disponibilidade. Muito obrigada pelo apoio e pelo incentivo.

Ao Prof. Howard Fields, que me recebeu em seu laboratório para o estágio doutoral, contribuindo de forma significativa para meu amadurecimento acadêmico.

Aos professores que fizeram parte da banca de qualificação, Prof. Fábio Rogério, Profa. Maria Cláudia Oliveira Fusaro e Profa. Dora Grassi Kassisse pelas considerações e sugestões.

Aos professores componentes da banca de defesa, Profa. Camila Dale, Profa. Celina Lotufo, Profa. Cristiane Villarreal e Prof. Fábio Rogério, que aceitaram prontamente meu convite. Muito obrigada pela atenção e pela disponibilidade.

À Profa. Cláudia Herrera Tambeli, pelas contribuições, apoio e amizade.

Aos amigos André Vieira, Maria Carolina Athiê, Dionéia Araldi e Raffaella Ignarro, minha família estendida, por estarem sempre comigo, dentro e fora do laboratório, compartilhando tempo, conhecimento, esforços e desânimos. Muito obrigada por tudo.

Ao amigo César Sartori, pelas discussões de sempre, que me ajudaram muito ao longo do meu trabalho. Obrigada.

Ao meu amigo Peter Fong, pela atenção e pelo carinho, por fazer eu me sentir em casa no tempo em que estive longe.

À Paula Marião, minha “filha”, pelas ajudas, pelas conversas, pelas risadas. Não teria sido tão divertido sem você.

Às amigas, Juliana Maia e Lilian Calili, pela convivência, pelo apoio e pelo carinho.

Aos meus colegas de laboratório, Gilson Gonçalves, Amanda Neves, Ivan Bonet, Filipe Prado, Luiz Manzo, Lilian Wunch e Kiko Pagliusi.

Aos meus amigos e familiares, que entenderam minhas ausências e sempre estiveram presentes. Obrigada.

Agradecimento Institucional

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pela concessão da bolsa de doutorado e pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do meu trabalho (processo 2009/50881-8).

Lista de Figuras

Figura 1. Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guia pelo método convencional (A) e pelo método adaptado (B).	29
Figura 2. Desenho experimental para hiperalgesia aguda.	35
Figura 3. Desenho experimental para hiperalgesia persistente.	36
Figura 4. Desenho experimental para hiperalgesia persistente.	37
Figura 5. Limiar mecânico da pata de ratos submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guia.	45
Figura 6. Desenho esquemático e foto de um corte coronal de cérebro.	46
Figura 7. Cortes histológicos de pele	47
Figura 8. Cortes histológicos longitudinais do osso do crânio	48
Figura 9. Efeito da administração no NAcc do inibidor da recaptação de dopamina, GBR12909, sobre a hiperalgesia mecânica induzida por PGE ₂	49
Figura 10. Efeito da administração do antagonista do receptor D1 sobre a analgesia induzida pelo aumento de dopamina no NAcc	50
Figura 11. Efeito do antagonista do receptor D1 de dopamina, SCH23390, sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂	51
Figura 12. Efeito da administração do antagonista do receptor D2 sobre a analgesia induzida pelo aumento de dopamina no NAcc	52
Figura 13. Efeito do antagonista do receptor D2 de dopamina, raclopride, sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂	53
Figura 14. Efeito da administração do antagonista do receptor D3 sobre o efeito anti-hiperalgésico induzido pelo aumento de dopamina no NAcc	54
Figura 15. Efeito do antagonista do receptor D3 de dopamina, U99194A, sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂	55
Figura 16. Indução e Manutenção da hiperalgesia persistente	56

Figura 17. Efeito do procedimento cirúrgico estereotáxico sobre a indução e manutenção da hiperalgesia persistente.....	57
Figura 18. Efeito do procedimento para implante de mini bombas osmóticas sobre a resposta comportamental de ratos.....	58
Figura 19. Efeito do aumento de dopamina no NAcc sobre o limiar mecânico	59
Figura 20. Efeito do aumento de dopamina no NAcc na indução e manutenção da hiperalgesia persistente.	60
Figura 21. Efeito do antagonista do receptor D1 de dopamina, SCH23390, sobre a hiperalgesia persistente induzida por PGE ₂	61
Figura 22. Efeito do antagonista do receptor D2 de dopamina, raclopride, sobre a hiperalgesia persistente induzida por PGE ₂	62
Figura 23. Efeito do antagonista do receptor D3 de dopamina, U99194A, sobre a hiperalgesia persistente induzida por PGE ₂	63
Figura 24. Efeito da administração de PGE ₂ na pata por 14 dias sobre a expressão do receptor D1 de dopamina no NAcc de ratos	64
Figura 25. Fotos representativas da marcação do receptor D1 no NAcc, em maior aumento (40X), mostrando os neurônios imunomarcados.	64
Figura 26. Efeito da administração de PGE ₂ na pata por 14 dias sobre a expressão do receptor D2 de dopamina no NAcc de ratos	65
Figura 27. Fotos representativas da marcação do receptor D2 no NAcc, em maior aumento (40X), mostrando os neurônios imunomarcados.	65
Figura 28. Expressão do receptor D1 de dopamina no NAcc de ratos com hiperalgesia persistente induzida pela administração crônica de PGE ₂ na pata.....	66
Figura 29. Expressão do receptor D2 de dopamina no NAcc de ratos com hiperalgesia persistente induzida pela administração crônica de PGE ₂ na pata.....	67
Figura 30. Expressão do RNAm do receptor D1 de dopamina no NAcc de ratos com hiperalgesia persistente induzida pela administração crônica de PGE ₂ na pata.....	68

Figura 31. Expressão do RNAm do receptor D2 de dopamina no NAcc de ratos com hiperalgesia persistente induzida pela administração crônica de PGE₂ na pata..... 68

Lista de Abreviaturas

<i>AMPC</i>	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> (Monofosfato cíclico de adenosina)
AP	Antero-posterior
<i>ATP</i>	<i>Adenosine Triphosphate</i> (Trifosfato de adenosina)
CA	Comissura Anterior
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
COX	Ciclooxigenase
cm	Centímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
D1	Receptor de dopamina D1
D2	Receptor de dopamina D2
D3	Receptor de dopamina D3
D4	Receptor de dopamina D4
D5	Receptor de dopamina D5
EP (1-4)	Receptores de prostaglandina E ₂ (EP1, EP2, EP3 e EP4)
EPM	Erro Padrão da Média
g	Gramma
G	Gauge
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GBR	GBR12909 (inibidor da recaptação de dopamina)
gf	Gramma-força
GRD	Gânglio da raiz dorsal
G _i	Proteína G inibitória
G _s	Proteína G estimulatória
h	Hora
H&E	Hematoxilina e Eosina

<i>IASP</i>	<i>International Association for Studies of Pain</i> (Associação Internacional para estudos da dor)
IL-1 β	Interleucina-1 β
ip	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
L	Lateral
m	Metro
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mm	Milímetro
Na ⁺	Íon sódio
NAcc	Núcleo Accumbens
NaCl	Cloreto de sódio
Nav1.8	Canal de sódio voltagem-dependente 1.8
ng	Nanograma
<i>NGS</i>	<i>Normal Goat Serum</i> (Soro normal de cabra)
nmol	Nanomol
<i>NO</i>	<i>Nitric Oxide</i> (Óxido Nítrico)
<i>PAG</i>	<i>Periaqueductal gray</i> (Substância cinzenta periaquedutal)
<i>PB</i>	<i>Phosphate Buffer</i> (Tampão Fosfato)
<i>PBS</i>	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampão Fosfato Salina)
<i>PET</i>	<i>Positron Emission Tomography</i> (Tomografia por emissão de pósitrons)
PFA	Paraformaldeído
PGs	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PLA ₂	<i>Phospholipase A₂</i> (Fosfolipase A ₂)
P2X3	Receptor purinérgico

Rac	Raclopride (antagonista do receptor D2)
RPM	Rotações por minuto
<i>RVM</i>	<i>Rostral Ventromedial Medulla</i> (Bulbo Ventromedial Rostral)
s	Segundo
Sal	Salina
SCH	SCH23390 (antagonista do receptor D1)
SNC	Sistema Nervoso Central
S1	Córtex somatosensorial primário
S2	Córtex somatosensorial secundário
<i>TNF-α</i>	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
<i>TRP</i>	<i>Transient Receptor Potential</i> (Receptor de Potencial Transitório)
<i>TRPV</i>	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid subfamily, member 1</i> (Receptor de Potencial Transitório, subfamília Vanilóide, tipo 1)
U	U99194A (antagonista do receptor D3)
V	Ventral
<i>VTA</i>	<i>Ventral Tegmental Area</i> (Área Tegmentar Ventral)
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro

Introdução

1. INTRODUÇÃO

*“Nature has placed mankind under
the governance of two sovereign
masters, pain and pleasure.”*

Jeremy Bentham

A dor pode ser definida como a percepção de uma sensação nociceptiva. É uma experiência complexa e subjetiva que inclui as dimensões afetivo-motivacional e cognitivo-avaliativa, além da dimensão sensorial-discriminativa (MELZAC e CASEY, 1968 apud TREEDE, 1999). Enquanto a dimensão sensorial-discriminativa define localização, intensidade e qualidade da dor, as dimensões afetiva e cognitiva estão relacionadas ao aspecto desagradável e subjetivo da dor e emoções dele decorrentes. Esse componente emocional depende de fatores como aprendizagem, memória e mecanismos de recompensa (CALVINO e GRILO, 2006). Em uma análise restrita, a dor envolve a ativação das vias nociceptivas, ou seja, vias sensoriais responsáveis pela detecção dos estímulos nociceptivos. Seu aspecto final, entretanto, é dependente de uma série de fatores integrados pelo Sistema Nervoso Central (SNC) que podem determinar e alterar a percepção do estímulo nociceptivo.

1.1 As Vias da Dor

A dor funciona como um alarme que indica a existência de um processo lesivo ou potencialmente lesivo ao organismo. Para sua detecção, existem estruturas nervosas especializadas, os nociceptores, definidos por Sherrington em 1906 como receptores que respondem seletivamente a um estímulo que causa ou ameaça causar dano ao organismo (WILLIS, 2007). São amplamente distribuídos por todo o organismo, presentes na pele, mucosa, membranas, fásCIAS profundas,

tecido conectivo de órgãos viscerais, ligamentos e cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões e vasos sanguíneos (JULIUS e BASBAUM, 2001; ALMEIDA et al., 2004; CALVINO e GRILO, 2006; WILLIS, 2007; GOLD e GEBHART, 2010). Os nociceptores são neurônios sensoriais primários que apresentam terminações livres – não associadas a uma estrutura receptora específica – e com alto limiar de ativação, segregados em fibras A-delta (A δ) e C (BRENNEIS et al., 2013). As fibras A δ são finamente mielinizadas, de médio diâmetro (2,0 a 6,0 μ m), com velocidade de condução média entre 12 e 30 m/s e correspondem a aproximadamente 13% das fibras de dor na pele. São responsáveis pela dor rápida, aguda e lancinante após a estimulação nociva. As fibras C, não mielinizadas, são de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2 μ m), com velocidade de condução menor (0,5 a 2 m/s) e correspondem a 87% das fibras condutoras da informação dolorosa presentes na pele. São responsáveis pela dor lenta e difusa (MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001). Levando em conta o critério funcional, as fibras A δ respondem à estimulação mecânica, porém, podem ser ativadas pelo calor, enquanto as fibras do tipo C respondem tanto a estímulos térmicos quanto mecânicos e químicos, sendo classificadas como nociceptores polimodais. Além disso, há receptores normalmente não responsivos a estímulos mecânicos ou térmicos e que são sensibilizados na presença de inflamação ou lesão tecidual, tornando-se responsivos mesmo a estímulos mecânicos ou térmicos de baixa intensidade. São os chamados receptores silentes (MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001; WILLIS, 2007).

As células nervosas sensoriais periféricas, também conhecidas como neurônios aferentes primários ou neurônios de primeira ordem, possuem corpos celulares

localizados nos gânglios das raízes dorsais (GRDs). Dos gânglios saem prolongamentos centrais que se dirigem para a medula espinal, penetrando pela substância branca, localizada perifericamente na medula. A partir disso, as fibras se ramificam para cima e para baixo por 2 ou 3 segmentos espinais, constituindo o trato de Lissauer (CALVINO e GRILO, 2006), e entram perpendicularmente na substância cinzenta localizada na região central da medula espinal.

A substância cinzenta é formada bilateralmente por 3 regiões distintas: coluna dorsal, zona intermediária e coluna ventral. De acordo com Rexed, pode ser dividida em 10 lâminas sendo que as lâminas de Rexed de I a VI correspondem à coluna dorsal, a lâmina VII é equivalente à zona intermediária e as lâminas VIII e IX compreendem a coluna ventral. A lâmina X consiste na substância cinzenta circunjacente ao canal central da medula espinal. As fibras A δ e C entram na coluna dorsal ipsilateral e terminam principalmente nas lâminas de Rexed superficiais I (zona marginal) e II (substância gelatinosa) ou se estendem até as camadas mais profundas V, VI, VII e X (GAURIAU e BERNARD, 2001; ALMEIDA et al., 2004; CALVINO e GRILO, 2006). Nessas lâminas estão localizados os corpos celulares dos neurônios de segunda ordem, cujos axônios cruzam a linha média na medula e ascendem pela substância branca, principalmente pela coluna anterolateral, do lado oposto. É importante salientar que na região orofacial, os corpos celulares dos neurônios aferentes primários estão localizados nos gânglios trigeminais e seus prolongamentos centrais entram no tronco encefálico, no nível da ponte, onde formam o trato trigeminal espinal. Este trato, por sua vez, termina no núcleo trigeminal espinal, onde se localizam os neurônios de segunda ordem (BASBAUM e JESSELL, 2000). Os axônios dos neurônios de segunda ordem

também cruzam a linha média no tronco encefálico e se juntam às fibras ascendentes dos segmentos espinais superiores. Embora a maior parte dos neurônios de segunda ordem projete para estruturas supraespinais pelo lado contralateral, uma pequena parte não cruza a linha média e ascende ipsilateralmente (MILLAN, 1999; BASBAUM e JESSELL, 2000; CALVINO e GRILO, 2006).

A partir dos neurônios de segunda ordem, as informações nociceptivas são transmitidas para os centros superiores no encéfalo através dos tratos neuronais específicos. A organização das vias ascendentes é altamente complexa. Em termos neuroanatômicos, existem dois tipos de vias ascendentes: as monossinápticas e as polissinápticas (MILLAN, 1999). As primeiras são vias que projetam diretamente para estruturas supraespinais – tratos espinotalâmico, espinomesencefálico, espinoparabraquial, espinohipotalâmico, espinoreticular e cervicotalâmico. As vias polissinápticas, por sua vez, são indiretas, ou seja, apresentam sinapses ao longo de seu trajeto até os centros superiores – vias espinocervicotalâmica e espinoreticulotalâmica (BESSON e CHAOUCH, 1987; MILLAN, 1999; PRADO, 1999; BASBAUM e JESSELL, 2000; TRACEY e MANTYH, 2007).

Muitos núcleos do tálamo processam a informação nociceptiva, sendo dois deles de particular importância: os grupos nuclear lateral (ou região posterior) e nuclear medial. A região posterior do tálamo compreende o núcleo ventroposterior medial, o núcleo ventroposterior lateral e o núcleo posterior. Estes núcleos recebem projeções monossinápticas do trato espinotalâmico ventral (neoespinotalâmico),

projetam para o córtex somatossensorial e provavelmente estão envolvidos com o componente sensorial-discriminativo da dor. Os núcleos mediais do tálamo consistem no complexo intralaminar que recebe projeções polissinápticas do trato espinotalâmico dorsal (paleoespinotalâmico) e projeta para os gânglios da base e para diferentes regiões corticais envolvidas com o aspecto afetivo-motivacional da dor (BASBAUM e JESSEL, 2000; ALMEIDA et al., 2004; CALVINO e GRILO, 2006). Além disso, há projeções espinotalâmicas monossinápticas para o núcleo medial central (parte do complexo intralaminar do tálamo) que por sua vez projeta para estruturas límbicas e sensório-motoras. Essas projeções sugerem que o núcleo medial central do tálamo atua na integração das funções afetiva, cognitiva e sensório-motora subjacente ao comportamento dirigido por objetivo (VERTES et al., 2012). Considerando a evolução dos mamíferos, a via para o tálamo medial foi a primeira projeção espinotalâmica a surgir e é, portanto, conhecida como trato paleoespinotalâmico. A projeção para os núcleos ventroposterior lateral e medial é mais recente e chamada de trato neoespinotalâmico (BASBAUM e JESSELL, 2000).

Estudos em humanos e em animais experimentais sugerem que as dimensões sensorial e afetiva da dor são processadas por vias neurais parcialmente dissociáveis. Essas dimensões da dor e suas interações estão relacionadas a uma rede central de estruturas encefálicas que processam a informação nociceptiva em paralelo e em série (TREEDE et al., 1999; PRICE, 2000; ALMEIDA et al., 2004; UHELSKI et al., 2012). As vias espinais para estruturas límbicas e núcleos talâmicos mediais fornecem projeções diretas para regiões cerebrais envolvidas com afeto. Outra parte das vias espinais projeta para áreas talâmica e cortical

somatossensorial que, por sua vez, se conecta à via córtico-límbica. Essa última integra a informação nociceptiva com informação contextual e memória para fornecer a mediação cognitiva para o componente afetivo-motivacional da dor. Ambas as vias, direta e córtico-límbica, convergem para o córtex cingulado anterior e estruturas subcorticais cuja função é estabelecer a valência emocional e a prioridade de resposta (PRICE, 2000; UHELSKI et al., 2012).

1.2 Estimulação das Vias Nociceptivas e Processamento da Dor

Os estímulos indutores da sensação dolorosa (nocicepção) podem ser de natureza mecânica, elétrica ou química, internos ou externos ao organismo. É importante que se faça uma distinção conceitual entre os termos nocivo e nociceptivo. O termo nocivo se refere a algo que causa dano, provoca prejuízos. Um estímulo nocivo causa dano a um determinado tecido, ou seja, é injuriante, prejudicial. Por outro lado, o termo nociceptivo se refere a algo que ativa as vias sensoriais especializadas em conduzir a informação produzida pelos estímulos nocivos ou potencialmente nocivos. Portanto, as vias nociceptivas não são ativadas somente por estímulos nocivos podendo ser ativadas por estímulos não nocivos. Isso significa que o estímulo não é capaz de causar prejuízo tecidual, mas sua intensidade é suficiente para levar à ativação das vias nociceptivas (ALMEIDA et al., 2004; ARALDI, 2012). É o caso, por exemplo, de uma pressão intensa exercida sobre a pele, que não é capaz de lesar o tecido (estímulo não-nocivo), mas, ativa os nociceptores nele presentes (estímulo nociceptivo). Em resumo, pode-se dizer que o estímulo nocivo está relacionado à qualidade da estimulação em si, que pode danificar o tecido, enquanto o estímulo nociceptivo está relacionado aos aspectos quantitativos da estimulação. As fibras nervosas nociceptivas podem ser

ativadas por qualquer tipo de estímulo, desde que em intensidade suficiente para tal (ARALDI, 2012).

Assim, a dor é uma experiência subjetiva decorrente da ativação das vias sensoriais responsáveis por detectar a presença de estímulos nociceptivos, prejudiciais ou potencialmente prejudiciais ao organismo. O processo fisiológico se inicia nos nociceptores e envolve fenômenos iônicos, ou seja, existe a indução de uma resposta elétrica nas fibras sensoriais responsáveis pela detecção dos estímulos de alta intensidade, com entrada de íons sódio (Na^+) por canais específicos (GOLD e GEBHART, 2010). A ativação dos neurônios aferentes primários leva à liberação de neurotransmissores e neuromoduladores dos terminais pré-sinápticos no corno dorsal da medula espinal. Aminoácidos excitatórios (BATTAGLIA e RUSTIONI, 1988; TRACEY et al., 1991), neuropeptídeos (JU et al., 1987; SMITH et al., 1993), entre outras substâncias como prostaglandinas (PGs), óxido nítrico (NO) e ATP (MILLAN, 1999) atuam nos receptores pós-sinápticos localizados nos neurônios de segunda ordem. A partir da estimulação dos neurônios de segunda ordem, a informação nociceptiva ascende para as áreas supraespinais através de vias neuronais específicas.

Diferentes vias ascendentes e regiões encefálicas são ativadas pelo estímulo nociceptivo e participam no processamento da dor (WILLIS e WESTHUND, 1997). O número e a extensão de ativação dessas diferentes áreas variam em função da intensidade da dor. As vias nociceptivas que se originam no corno dorsal da medula espinal ativam diretamente estruturas encefálicas envolvidas nos aspectos rudimentares da ativação do sistema neurovegetativo, fuga, orientação motora e

medo (BURSTEIN et al., 1987; BERNARD e BESSON, 1990; CRAIG, 1995; PRICE, 1999). Essas estruturas incluem formação reticular, camadas profundas do colículo superior, substância cinzenta periaquedutal, amígdala, hipotálamo e núcleos talâmicos mediais. A ativação dessas estruturas ocorre durante a fase inicial da dor quando acontecem respostas neurovegetativas, medo e comportamento defensivo. Essas respostas são geralmente automáticas e envolvem um mínimo de cognição (PRICE, 2000). Outro mecanismo resulta da ativação dos núcleos laterais do tálamo, córtex somatossensorial e subsequente ativação de estruturas cerebrais envolvidas nos aspectos perceptivo e cognitivo do processamento da dor. O córtex somatossensorial primário (S1) e o secundário (S2) estimam a intensidade e a qualidade da sensação dolorosa e estão interconectados ao córtex parietal posterior, que integra a informação nociceptiva com informações contextuais para fornecer um sentido geral de ameaça ao organismo (PRICE, 2000; ALMEIDA et al., 2004; CALVINO e GRILO, 2006; UHELSKI, et al., 2012). O processamento da dor requer uma avaliação da sensação em relação ao seu contexto geral, gerando a ligação entre sensação e afeto. Para tanto, é necessária a integração da informação somatossensorial com outras modalidades sensoriais e com aprendizado e memória (PRICE, 2000). Essa integração é crítica uma vez que possibilita ao organismo tomar uma decisão comportamental relevante em relação à extensão da ameaça apresentada. O córtex parietal posterior, responsável por essa integração, é a origem da via córtico-límbica que converge para as mesmas estruturas límbicas corticais e subcorticais – córtex cingulado anterior, córtex insular, amígdala – que recebem as projeções diretas das vias espinais ascendentes da dor. A convergência no córtex cingulado anterior sugere um complexo papel dessa estrutura em interrelacionar

funções atencionais e avaliativas com valência emocional e prioridades de resposta. As prioridades de resposta estariam proximamente relacionadas a funções pré-motoras que estão, por sua vez, relacionadas à motivação e emoções e podem ser associadas com o esforço imediato de fuga para evitar a dor ou uma situação que evoca dor (PRICE, 2000; RAINVILLE, 2002).

É importante salientar que alguns fenômenos dolorosos podem ocorrer espontaneamente, como no caso da dor resultante de alteração no limiar devido a alterações no SNC (ALMEIDA et al., 2004). O SNC é, portanto, capaz de alterar a sensibilidade à dor (LORENZ, et al., 2003). Assim, em humanos, por exemplo, a ativação do córtex cingulado anterior, e possivelmente de outras estruturas límbicas clássicas, parece estar intimamente relacionada à experiência subjetiva e desagradável de dor e pode refletir na regulação dos mecanismos endógenos de modulação da dor (RAINVILLE, 2002).

1.3 Modulação da Dor

A modulação da transmissão nociceptiva no SNC por estruturas encefálicas foi primeiramente demonstrada por Sherrington em 1906 (TRACEY e MANTYH, 2007), que observou uma intensificação dos reflexos nociceptivos após transecção da medula espinal. Estudos posteriores mostraram que a excitabilidade da medula espinal era diretamente influenciada por projeções descendentes e que essas projeções poderiam ser tanto inibitórias quanto facilitatórias (BASBAUM e FIELDS, 1984; PORRECA et al., 2002; REN e DUBNER, 2002). Atualmente, sabe-se que a modulação da dor existe na forma de um circuito descendente (STAMFORD, 1995; FIELDS et al., 2005) que se origina em múltiplas áreas encefálicas. Estudos de

neuroimagem em humanos têm sugerido uma “matriz da dor” (*pain matrix*), áreas do encéfalo consistentemente ativadas por estímulos nociceptivos. O conceito de “matriz da dor” não significa uma via regulatória rígida, mas, mais do que isso, representa um conjunto de regiões envolvidas em funções como cognição, emoção, motivação e sensação, bem como na dor. Essas regiões encefálicas agindo em conjunto no contexto de modulação da nocicepção, dão origem à dor enquanto experiência (TRACEY e MANTYH, 2007). Essas áreas frequentemente incluem, mas, não estão restritas a, córtex pré-frontal medial, córtex cingulado anterior, córtex insular, amígdala, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal (*PAG*, sigla para o termo em inglês) e projeções desta para o bulbo (FIELDS et al., 2005; TRACEY e MANTYH, 2007; HEINRICHER et al., 2009; OSSIPOV et al., 2010; MASON, 2012).

Os neurônios contidos no bulbo ventromedial rostral (*RVM*, sigla para o termo em inglês), projetam para os cornos dorsais da medula e para o núcleo trigeminal espinal, e direta ou indiretamente, facilitam ou inibem a nocicepção, alterando a experiência de dor (FIELDS et al., 2005). Algumas influências descendentes são tonicamente ativas, mas, o equilíbrio entre inibição e facilitação é dinâmico e pode ser alterado em diferentes condições comportamentais, emocionais e patológicas (HEINRICHER et al., 2009). Pode-se, por exemplo, verificar hipoalgesia (reduzida resposta ao estímulo nociceptivo) em situações de medo ou estresse agudo intenso, o que reflete uma alteração do equilíbrio a favor da inibição. Por outro lado, inflamação e lesão neural estão associadas à hiperalgesia (resposta exacerbada ao estímulo nociceptivo), o que, por sua vez, mostra predominância da facilitação.

Os trabalhos conduzidos por Fields e colaboradores no final da década de 70 e na década de 80, identificaram duas diferentes populações de neurônios relacionados à via nociceptiva na *PAG* e *RVM*. As duas classes de células exerciam ações modulatórias opostas e foram chamadas células “*ON*” e células “*OFF*” (FIELDS, 2004; HEINRICHER et al., 2009; OSSIPOV et al., 2010; MASON, 2012). Essas células disparam espontaneamente de forma fásica e recíproca. Em condições basais as duas classes de células alternam sua atividade. No entanto, na presença de um estímulo nociceptivo, previamente à resposta reflexa, as células “*OFF*” cessam os disparos e as células “*ON*” se mantêm ativas, permitindo e facilitando a resposta nociceptiva. O limiar nociceptivo é menor quando as células “*ON*” estão ativas e as células “*OFF*” estão silentes (HEIRINCHER et al., 2009; MASON, 2012). Por sua vez, quando as células “*OFF*” são ativadas, por opióides por exemplo, as células “*ON*” param de disparar (FIELDS, 2004; HEINRICHER et al., 2009; MASON et al., 2012) e a nocicepção é inibida. Uma vez que essas populações neuronais têm projeções para o corno dorsal da medula, elas constituem a via básica para o controle descendente da dor.

Vários trabalhos realizados em humanos e em animais experimentais indicam a participação do córtex cingulado anterior na modulação da dor. Essa região cortical recebe projeções do tálamo medial e é densamente conectada ao núcleo Accumbens (NAcc), que, por sua vez, se encontra ativado quando um estímulo nociceptivo é apresentado (BECERRA et al., 2001). Além disso, sabe-se que o estímulo nociceptivo leva à ativação dos neurônios da área tegmentar ventral (*VTA*, sigla para o termo em inglês), em grande parte, neurônios de projeção

dopaminérgica para o NAcc e córtex pré-frontal (BRISCHOUX et al., 2009), que constituem uma importante via relacionada à motivação e recompensa.

Essas áreas encefálicas parecem representar pontos de sobreposição entre os circuitos envolvidos com recompensa e com o processamento da dor (BECERRA et al., 2001), o que dá suporte à ideia de que dor e recompensa são dois lados opostos do mesmo espectro comportamental (ESPINOZA, 1883 apud BECERRA et al., 2001).

1.4 Dor e o Sistema de Recompensa

A sinalização na via VTA – NAcc, conhecida como via dopaminérgica mesolímbica, é crucial para associações de estímulos emocionais e o estabelecimento de memórias referentes a circunstâncias ameaçadoras ou recompensadoras. Mas, a ativação prolongada desse sistema pode ser mal-adaptativa (NESTLER e CARLEZON, 2006; KRISHNAN et al., 2007). A fisiologia dessas estruturas pode ser alterada, por exemplo, em condições de estresse. Durante um evento de estresse agudo, as projeções dopaminérgicas VTA – NAcc podem ser ativadas, aumentando a ativação e motivação do organismo para agir mediante a ameaça e contribuindo para respostas homeostáticas e aprendizagens adaptativas relacionadas ao estresse (NESTLER e CARLEZON, 2006; PITTENGER e DUMAN, 2008). Por outro lado, o estresse crônico pode causar alterações plásticas duradouras na via mesolímbica que, por sua vez, podem contribuir para sua disfunção (NESTLER e CARLEZON, 2006). Uma vez que os neurônios da VTA são ativados frente a um estímulo nociceptivo (BRISCHOUX et

al., 2009), é plausível especular que processos semelhantes ocorram na dor, em suas condições aguda e crônica.

Do ponto de vista anatômico, o NAcc faz parte do estriado ventral e é uma estrutura que integra informações sensoriais e motivacionais. Em ratos, o NAcc é composto de duas sub-regiões primárias, o *core* e o *shell*, que diferem quanto à organização anatômica e às propriedades funcionais (ZAHM, 1999, 2000; VOORN et al., 2004). É importante salientar que as projeções aferentes para o NAcc não são homogeneamente distribuídas entre *core* e *shell* e as projeções eferentes do NAcc também diferem entre estas sub-regiões (ZAHM e BROG, 1992; ZAHM, 1999). Outros achados mostram ainda que existem interconexões diretas entre neurônios do *core* e *shell*, fornecendo evidência anatômica de que essas sub-regiões do NAcc não funcionam completamente separadas, mas na verdade constituem redes neuronais integradas (VAN DONGEN et al., 2005).

Vários estudos sugerem a participação do NAcc na modulação da dor (NETO et al., 1999; MAGNUSSON e MARTIN, 2002; TAYLOR et al., 2003; KNYIHÁR e CSILLIK, 2006). Manipulações farmacológicas sobre diferentes receptores dos sistemas de neurotransmissores no NAcc têm demonstrado sua atividade moduladora sobre a nocicepção (ALTIER e STEWART, 1999; SCHMIDT et al. 2001). Cerca de 95% dos neurônios que compõem o NAcc são os chamados neurônios espinhosos médios, divididos em duas subpopulações: neurônios que expressam receptores dopaminérgicos do tipo D1 e aqueles que expressam receptores do tipo D2 (LOBO et al., 2010). Portanto, são de particular interesse os receptores de dopamina do *core* e *shell* do NAcc. Com relação aos receptores

dopaminérgicos, sabe-se que as ações da dopamina são mediadas por 5 diferentes subtipos de receptores, os quais são acoplados à proteína G. Os subtipos de receptores dopaminérgicos são divididos em duas subclasses. D1 e D5 são convencionalmente classificados como semelhantes à D1 (*D1-like*). Esses receptores ativam proteína G_s que estimula a adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMPc. D2, D3 e D4 são classificados como semelhantes à D2 (*D2-like*) e ativam proteína G_i que inibe a adenilato ciclase, reduzindo os níveis de AMPc (ZHANG et al., 2009). No *core* do NAcc existem receptores D1 e D2 - encontrados em neurônios GABAérgicos co-expressando encefalinas. No *shell* do NAcc existem receptores D1, D2 - expressos em neurônios contendo neurotensina – e D3 – expressos em neurônios contendo neurotensina e substância P (MISSALE et al., 1998). É importante ressaltar que os receptores D2 e D3 podem ser encontrados tanto na membrana pré quanto na pós-sináptica, nesta última funcionando como autorreceptores, envolvidos no controle homeostático da liberação de dopamina (USIELLO et al., 2000).

Muitos trabalhos descrevem a relação da atividade dopaminérgica com a modulação inibitória mediada pelo NAcc durante a dor aguda (ALTIER e STEWART, 1999; GEAR et al., 1999; WOOD, 2004). Alguns estudos também mostram que o aumento da atividade dopaminérgica no sistema mesolímbico pode atenuar o comportamento nociceptivo em animais (CHUDLER e DONG, 1995; ALTIER e STEWART, 1999; MAGNUSSON e FISHER, 2000; TAYLOR et al., 2003). Outros estudos demonstram que a diminuição da liberação de dopamina, por microinjeções anestésicas em estruturas dopaminérgicas mesolímbicas ou por

lesões neurotóxicas em neurônios dopaminérgicos, induz aumento da sensação dolorosa (SAADE et al., 1997; MAGNUSSON e MARTIN, 2002).

Além de um papel modulador na dor aguda desempenhado pelos neurônios dopaminérgicos do sistema mesolímbico, é interessante notar que essas vias têm sido amplamente descritas por participarem nos processos de recompensa, natural ou pelo uso de drogas, prazer e motivação. Segundo Altier e Stewart (1999), a ativação dos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos na inibição da dor aguda pode fornecer a solução para um paradoxo: a exposição tanto a eventos positivos como negativos, ativa os mesmos neurônios. Esses eventos, embora com valências afetivas opostas, ativam sistemas neurais comuns para promover melhor adaptação ao ambiente.

1.5 Hiperalgisia Persistente

A dor de origem inflamatória resulta da produção e liberação de mediadores inflamatórios incluindo bradicinina, serotonina e, especialmente, prostaglandinas, que sensibilizam os nociceptores. As prostaglandinas são sintetizadas a partir da ação da enzima ciclooxigenase (COX) sobre o ácido aracdônico, um componente das células que, por sua vez é liberado pela ação direta da fosfolipase A₂ (PLA₂) sobre os fosfolípidos de membrana em resposta a estímulos fisiológicos e patológicos (DAVIES et al., 1984; NARUMIYA et al., 1999; ALLAJ et al., 2013). As prostaglandinas exercem diferentes funções em diferentes tecidos, sendo produzidas em praticamente todas as células do organismo em quantidades fisiológicas. Apresentam ação autócrina (agindo sobre as próprias células secretoras) e parácrina (agindo sobre as células vizinhas) e são rapidamente

metabolizadas após sua liberação. A síntese desregulada de prostaglandinas é considerada patológica (BOIE et al., 1997; LEGLER et al., 2010).

De particular interesse é a prostaglandina E_2 (PGE_2), que age como mediador inflamatório e como neuromodulador, alterando a excitabilidade neuronal e o processamento sináptico (NICOL e CUI, 1994; LIN et al., 2006). Atua via 4 tipos de receptores, chamados receptores EP, amplamente expressos em diferentes células neurais periféricas e centrais. Esses receptores são acoplados à proteína G e desencadeiam diferentes mecanismos de transdução de sinal: EP1 - elevação da concentração intracelular de cálcio; EP2 e EP4 - ativação da adenilato ciclase e EP3 e suas isoformas - inibição da adenilato ciclase e, possivelmente, geração de fosfoinosítídeos e aumento de cálcio intracelular (BOIE et al., 1997; LIN et al., 2006; KAWABATA, 2011; ALLAJ et al., 2013). Os receptores EP1, EP2, EP3 e EP4 são expressos nos neurônios aferentes primários, sendo que principalmente EP1 e EP4 estão envolvidos nos mecanismos que desencadeiam hiperalgesia (LIN et al, 2006; MURASE et al., 2008; KAWABATA, 2011).

A PGE_2 é, provavelmente, a principal forma de prostaglandina pró-nociceptiva no tecido periférico (BOIE et al., 1997; MILLAN, 1999). Age sobre os terminais periféricos dos neurônios sensoriais reduzindo seu limiar aos estímulos através da fosforilação de TRPV1 (canais catiônicos) (HUANG et al., 2006; BTESH et al., 2013) e de outros canais TRP (PATAPOUTIAN et al., 2009), e da sensibilização de receptores purinérgicos (P2X3) (WANG et al., 2007). Além disso, aumenta a excitabilidade da membrana terminal pela fosforilação de canais de sódio e cálcio voltagem-dependentes (KAWABATA, 2011). O reflexo clínico dessa diminuição do

limiar nociceptivo é descrito genericamente como hiperalgesia inflamatória. Do ponto de vista clínico a diminuição do limiar nociceptivo causa tanto um aumento da resposta dolorosa (hiperalgesia), quanto uma sensação dolorosa a estímulos normalmente não nociceptivos (alodinia).

Na maioria das vezes, com a resolução do processo inflamatório, o aumento da sensibilidade do tecido inflamado também desaparece. No entanto, pode ocorrer que, mesmo após a resolução da inflamação, a hiperalgesia continue ou o neurônio periférico fique mais suscetível à hiperalgesia (FERREIRA et al., 1990; PARADA et al., 2003; VILLARREAL et al., 2005). A dor persistente, crônica, não tem propósito fisiológico, portanto, pode-se falar em dor “patológica”, em relação à dor “fisiológica”, que diz respeito ao valor protetivo da dor aguda. Além disso, inatividade temporária e comportamentos característicos da dor aguda são adaptativos. No entanto, a dor persistente pode levar a um estado de inatividade de longo prazo, com anedonia e indiferença ao ambiente, respostas semelhantes aos estados depressivos, que não podem ser considerados adaptativos (WILLIS, 2007).

Uma das dificuldades de se entender o processo de cronificação da dor se dá pela falta de modelos experimentais que mimetizem com bom grau de predição as condições clínicas observadas em humanos. A grande maioria dos modelos experimentais de hiperalgesia avalia as respostas a estímulos nocivos agudos ou transitórios. Em contraste, a hiperalgesia crônica normalmente persiste por semanas, meses ou até anos, e muito provavelmente é resultado de alterações do fenótipo neuronal, com alterações plásticas nas vias nociceptivas e no metabolismo neuronal (REN e DUBNER, 1999). Em 1990, Ferreira et al.

desenvolveram um modelo animal de hiperalgesia mecânica persistente no qual a sensibilização da pata traseira do rato dura por mais de 30 dias após o término de 14 dias de tratamento com administrações locais de prostaglandina E₂ (PGE₂) no tecido subcutâneo intraplantar (i.pl.). Também foi demonstrada hiperalgesia persistente induzida por administrações diárias de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β que provocam a liberação de PGE₂, mostrando que a sensibilização persistente da via nociceptiva ocorre também pela liberação endógena de PGE₂ (SACHS et al., 2002). Este modelo demonstra uma propriedade plástica das vias nociceptivas após serem submetidas à sensibilização prolongada por ação de mediadores inflamatórios.

Embora o efeito antinociceptivo da ativação das vias dopaminérgicas mesolímbicas na dor aguda seja bem documentado, a influência destas estruturas e seu efeito modulador sobre a hiperalgesia crônica ainda não foram descritos. Alguns trabalhos de neuroimagem realizados em humanos – Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) – com marcador de receptor de dopamina D2/D3, mostram que pode haver alterações no tônus dopaminérgico e na densidade desses receptores no estriado límbico nas condições de dor orofacial crônica (HAGELBERG et al., 2003) e fibromialgia (WOOD et al., 2007). Essas alterações neuroquímicas que acompanham a dor crônica podem constituir um processo fisiopatológico diferente daquele descrito para a dor aguda. A partir disso, nossa proposta foi verificar a influência e possíveis alterações plásticas da via dopaminérgica do NAcc no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória persistente em ratos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi, portanto, verificar a participação da via dopaminérgica do NAcc na hiperalgesia persistente de origem inflamatória.

2.1 Objetivos Específicos

- Investigar o papel da transmissão dopaminérgica no núcleo accumbens na modulação da hiperalgesia mecânica inflamatória induzida por PGE₂ e durante a indução da hiperalgesia persistente de origem inflamatória.
- Verificar a expressão dos receptores de dopamina no NAcc após a instalação da hiperalgesia persistente.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Foram utilizados ratos adultos Wistar machos (200-250 g), provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp. Os ratos permaneceram cerca de um mês no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à comida e água, antes de serem submetidos aos ensaios biológicos.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com o guia da IASP para uso de animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983) e todos os procedimentos e protocolos experimentais foram submetidos à aprovação prévia do Comitê de Ética para Pesquisa Animal da Unicamp (protocolo número 1767-1). O desconforto dos animais e o número de animais por grupo foram mantidos no mínimo possível.

3.2 Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas

Para a cirurgia, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de uma mistura de cetamina (Cetamin, Syntec), 10mg/100g de peso do animal, e xilazina (Xilazin, Syntec), 8mg/100g de peso do animal. Após tricotomia da região dorsal da cabeça, os animais foram colocados no aparelho esterotáxico e foi realizada assepsia da região com álcool etílico 70%. Uma incisão de aproximadamente 15mm foi feita no tecido cutâneo, seguida do afastamento do periósteo para exposição da calota craniana. A seguir, com uma broca odontológica de aço-carbono esférica (número 1/2) adaptada a um motor de baixa rotação, o crânio foi perfurado para fixação de um parafuso de aço. Outros dois

orifícios foram feitos, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986), nas coordenadas (em mm) AP +1.3 (relativo ao Bregma); L $\pm$ 1,8 (relativo à sutura sagital); V -7,2 (relativo à superfície do crânio) para implante bilateral de duas cânulas-guia de aço inoxidável 23G (*gauge*) com 15mm de comprimento. As cânulas-guia foram implantadas no crânio até que suas extremidades ficassem no NAcc, 1mm aquém da região de microinjeção, e foram fixadas no crânio através do parafuso de aço e de resina acrílica odontológica (Vipi Flash; VIPI Indústria, Comércio, Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda., Brasil). A técnica de cirurgia estereotáxica foi adaptada para o tratamento crônico: a quantidade de resina acrílica utilizada foi reduzida, a pele foi perfurada com uma agulha espessa (19G) para que as cânulas-guia passassem através desse tecido e o tecido cutâneo foi suturado sobre o aparato de fixação (Figura 1).

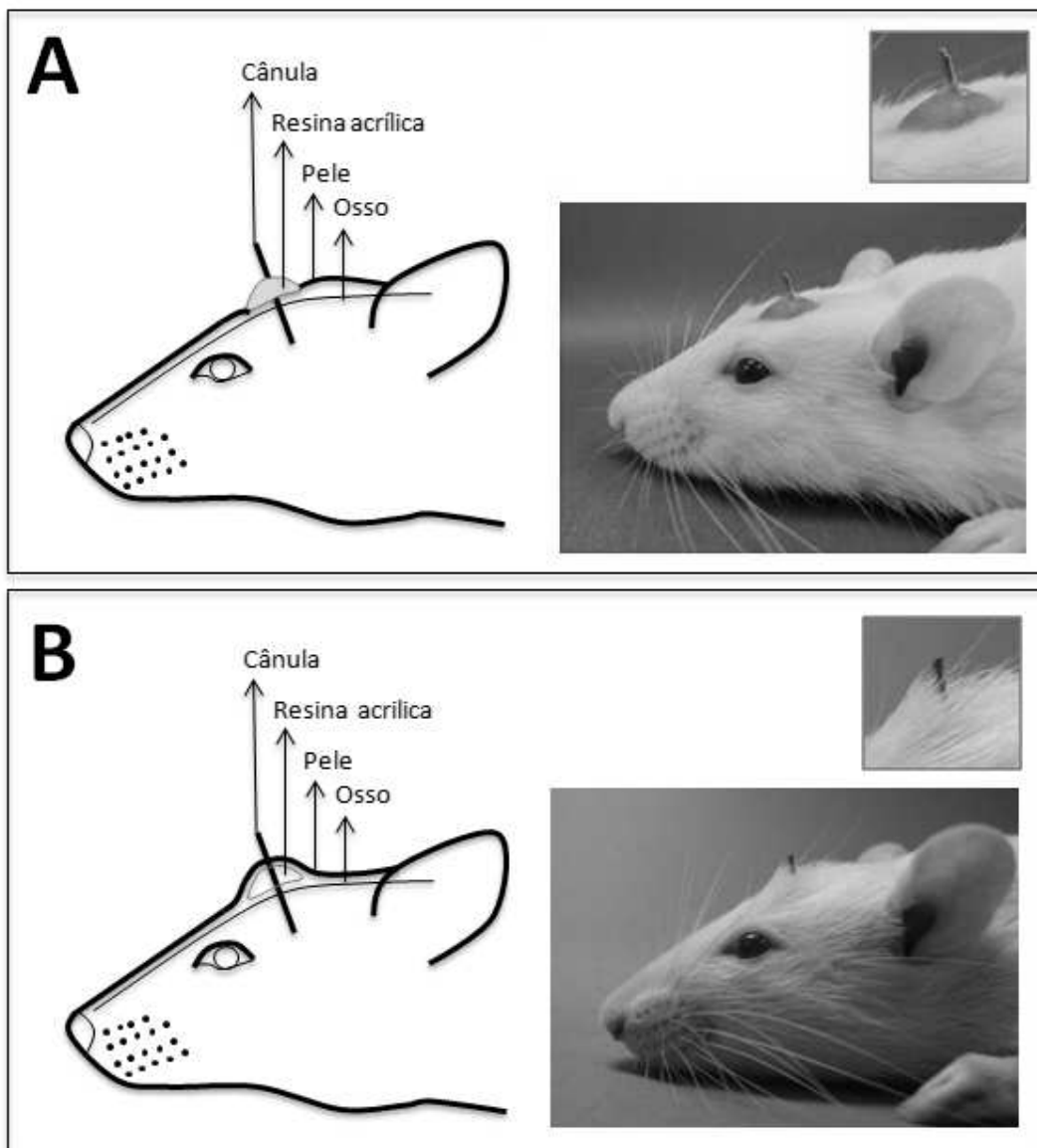


Figura 1. Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guia pelo método convencional em (A) e pelo método adaptado em (B). À esquerda das figuras A e B, a representação esquemática do implante da cânula, detalhando a posição da cânula, resina acrílica, pele e osso. À direita, imagem adquirida do animal 14 dias após a cirurgia, local da cânula em maior detalhe na figura superior.

Dessa forma, o capacete acrílico não ficou exposto, reduzindo a possibilidade de movimentação ou remoção deste pelo animal durante o comportamento de limpeza ou manutenção (*"grooming"*). Além disso, a ferida cirúrgica fechada reduz o contato com o meio externo, evitando possíveis infecções e contribuindo para uma boa cicatrização dos tecidos o que possibilitou a manutenção das cânulas

pelo período necessário para realização do tratamento crônico. Uma agulha gengival 30G, com 15mm de comprimento, e espessura igual ao diâmetro interno da cânula, foi introduzida em cada cânula-guia para que as mesmas permanecessem obliteradas até o momento da administração das soluções. Os ratos submetidos à cirurgia se recuperaram por, ao menos, uma semana antes do início dos experimentos.

3.2.1 Adaptação da cirurgia para implante de um sistema de microinfusão para liberação sustentada de drogas no NAcc:

Para otimizar a infusão diária de drogas no NAcc necessária durante 7 dias, padronizamos a técnica de implante de duas mini bombas osmóticas (Alzet ®) de 7 dias para liberação contínua de pequena quantidade (0,5µl/h) da solução contendo a droga de interesse. As mini bombas osmóticas foram acopladas a catéteres de polietileno ligados às cânulas (23G; 15mm de comprimento) que tiveram suas extremidades curvadas (forma de L, com ângulo arredondado). Todo preparo das mini bombas foi realizado em capela de fluxo laminar, ambiente estéril. Para o implante do conjunto, foi realizada divulsão do tecido cutâneo dorsal do animal até a região interescapular, através da incisão feita na pele da cabeça para implante das cânulas. O conjunto foi colocado em posição subcutaneamente e as cânulas implantadas por cirurgia estereotáxica. Imediatamente após e no dia seguinte à cirurgia, os animais foram tratados com dipirona diluída em salina (30mg/500µl), via intraperitoneal (i.p.).

3.3 Teste nociceptivo comportamental

O uso de filamentos de von Frey (VON FREY, 1896) é um método utilizado rotineiramente em procedimentos experimentais para avaliar nocicepção. Esse

método foi adaptado para um equipamento eletrônico usado inicialmente em humanos (JENSEN et al., 1986) e posteriormente adaptado para ratos (VIVANCOS et al., 2004) e camundongos (CUNHA et al., 2004). No presente trabalho, os experimentos foram realizados com um analgesímetro eletrônico (EFF 301 Analgesímetro Digital, Insight, Brasil), que consiste em um transdutor de força conectado a um contador digital que expressa força em gramas (g). A precisão do aparelho é de 0,5 gf e este está calibrado para registrar uma força máxima de 150 gf, mantendo a precisão de 0,5 gf até a força de 80 gf. O contato do transdutor de força com a pata é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, medindo 12x20x17 cm cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5 mm², constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura. Os ratos permaneceram nas caixas durante 15 minutos para habituação antes do início do teste comportamental. Espelhos ficam posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais.

O experimentador aplicou, por entre as malhas da rede, uma força linearmente crescente no centro da superfície plantar da pata do rato até que o animal retirasse a pata estimulada produzindo uma resposta caracterizada como sacudida ("*flinch*"). Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, em geral, até que o animal apresentasse 3 medidas consecutivas similares com uma clara resposta de "*flinch*" após a retirada da pata.

A intensidade de hiperalgesia foi quantificada pela variação (Δ) do limiar mecânico, em gramas, obtida subtraindo-se a média de três valores expressos em

gramas (grama-força) observados antes da administração de PGE₂ na pata (valor basal ou 0 hora) da média de três valores expressos em gramas (grama-força) obtidos 3h após o tratamento com PGE₂ na pata. O intervalo de tempo de 3h foi determinado por ser o pico do efeito hiperalgésico induzido pela PGE₂.

3.4 Administração de drogas

As drogas foram administradas localmente. Na pata, foram administradas no tecido subcutâneo da superfície plantar (intraplantar, i.pl.) com seringa de insulina (BD Ultra Fine 30U, agulha 29G). PGE₂ (100ng/50µl/pata) ou salina (50µl/pata) foram administrados na pata de ratos em uma única dose ao dia - hiperalgesia aguda - ou durante 14 dias para a indução da hiperalgesia persistente. Como descrito por Ferreira et al. (1990), duas semanas de administração subcutânea de PGE₂ induz hiperalgesia mecânica persistente que permanece por mais de 30 dias após a interrupção do tratamento. A dose de PGE₂ utilizada é a dose submáxima obtida de uma curva dose-resposta previamente determinada em nosso laboratório. Em alguns experimentos agudos, foi utilizada uma dose menor de PGE₂ (30ng/50µl/pata) para determinar se as drogas administradas no NAcc poderiam estar envolvidas na facilitação da hiperalgesia.

Para injeção no NAcc, os animais foram ligeiramente contidos e as drogas (GBR12909, SCH23390, Raclopride, U99194A), ou seus veículos, foram microinjetadas através de uma agulha gengival de aço inoxidável 30G ligada a um tubo de polietileno (0,80x0,40mm; Silverwater B. C., Australia) acoplado a uma seringa Hamilton de 2µl (Hamilton, Reno, NV, USA). A agulha foi inserida na cânula-guia imediatamente antes da microinjeção e avançada 1mm além do

comprimento da cânula-guia. O volume injetado foi 0,25µl, liberado em velocidade constante por um período de 30s. A agulha foi removida 50s após a completa administração da droga para evitar um possível refluxo da solução infundida.

Nos animais com mini bombas osmóticas implantadas, a administração da droga no NAcc foi lenta e contínua: 0,5µl/h, durante 7 dias.

3.5 Teste para verificação da atividade motora: Teste da barra giratória - Rotarod

O aparato (EFF 411 Rotarod para ratos, Insight, Brasil) consiste basicamente de uma barra giratória separada por 5 paredes acrílicas permitindo que sejam testados 4 ratos simultaneamente. As barras giram em torno de um ângulo fixo a uma velocidade constante. Abaixo de cada uma das barras encontra-se uma plataforma que desliga o contador no momento em que o animal cai sobre a mesma. Animais normais podem se manter por longos períodos de tempo sobre o *Rotarod* enquanto prejuízos neurológicos como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade são detectados pela inabilidade do animal em se manter em equilíbrio. Dessa maneira, é possível detectar alguma disfunção motora caracterizada por diminuição do tempo de permanência no equipamento.

Um grupo de 4 ratos foi colocado na barra giratória, com velocidade constante de 16 rpm, e o tempo de permanência foi medido. Os animais passaram pelo treino com 3 tentativas no dia anterior ao teste (*baseline*). No dia do teste, a latência no *Rotarod* foi medida 30 min após a microinjeção no NAcc (adaptado de TAYLOR, 2003).

3.6 Confirmação do local de injeção

Ao final dos experimentos, marcador azul de pontamina (0,25µl) foi microinjetado para verificação do local de injeção intracerebral. Os ratos foram anestesiados, decapitados e seus cérebros removidos. A marcação foi localizada em cortes coronais de cada cérebro e identificados por diagramas do atlas de Paxinos e Watson (1986). Somente ratos mostrando a marcação na estrutura alvo foram considerados para análise.

3.7 Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas:

- *GBR12909* - Inibidor da recaptação de dopamina - Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).
- *SCH23390* - Antagonista seletivo do receptor D1 de dopamina - Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)
- *Raclopride* - Antagonista seletivo do receptor D2 de dopamina - Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)
- *U99194A* - Antagonista seletivo do receptor D3 de dopamina - Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)
- *Prostaglandina E₂* - Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)
- *Dipirone* - Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

GBR12909 foi diluído em DMSO 100% e manipulado em solução salina 0,9% resultando em soluções de DMSO 1,2%, 2,5% e 5% para administração nos animais. Prostaglandina E₂ foi diluída em álcool etílico 100% para constituição de

uma solução mãe, posteriormente diluída em solução tampão fosfato 0,1M (solução de estoque) e ainda em solução salina 0,9% (álcool etílico 0,00002%). SCH23390, raclopride, U99194A e dipirona foram diluídos em solução salina 0,9%.

3.8 Protocolo Experimental

Em experimentos separados, 3 diferentes doses das drogas foram administradas localmente no NAcc 10 min antes do teste de hiperalgesia em patas de ratos tratadas com PGE₂ (100ng/50µl/pata) ou salina (50µl/pata). O teste de hiperalgesia foi realizado na 3^a hora após o tratamento com PGE₂. As doses (0,1; 0,25 e 0,5nmol para GBR12909 e 0,5; 3,0 e 10nmol para SCH23390, raclopride e U99194A) foram estabelecidas considerando informações da literatura sobre administração do inibidor de recaptação (RADCLIFFE e ERWIN,1996) e dos antagonistas dos receptores de dopamina (SCHIMDT et al., 2002; ANDERSON et al., 2006; SAURER et al., 2009; CHAUDHRI et al., 2009) no SNC de ratos.

Em outro experimento, os antagonistas foram co-administrados com o inibidor da recaptação de dopamina, GBR12909, no NAcc, 10 min antes do teste de hiperalgesia em patas de ratos tratadas com PGE₂ (100ng/50µl/pata) ou salina (50µl/pata). O teste de hiperalgesia foi realizado na 3^a hora após o tratamento com PGE₂ (Figura 2).

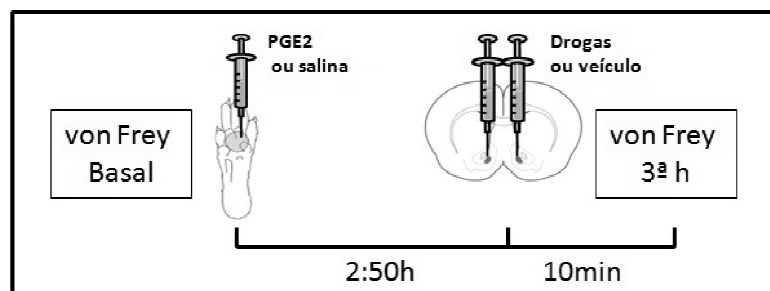


Figura 2. Desenho experimental para hiperalgesia aguda.

Para verificar se o aumento de dopamina no NAcc facilita a indução da hiperalgesia persistente, ratos foram tratados por 7 dias com GBR 12909 liberado continuamente através de mini bombas osmóticas ligadas por catéteres às cânulas implantadas no NAcc. Paralelamente, PGE₂ foi administrada no tecido periférico (100ng/50µl/pata) diariamente durante esses 7 dias (Figura 3). A dose utilizada foi a dose eficaz de GBR 12909 0,5nmol obtida no experimento de hiperalgesia aguda induzida por PGE₂. O limiar nociceptivo mecânico foi testado durante o tratamento farmacológico (dia sim/dia não) e nos 7^o (dia 14) e 14^o (dia 21) dias após a administração das drogas.

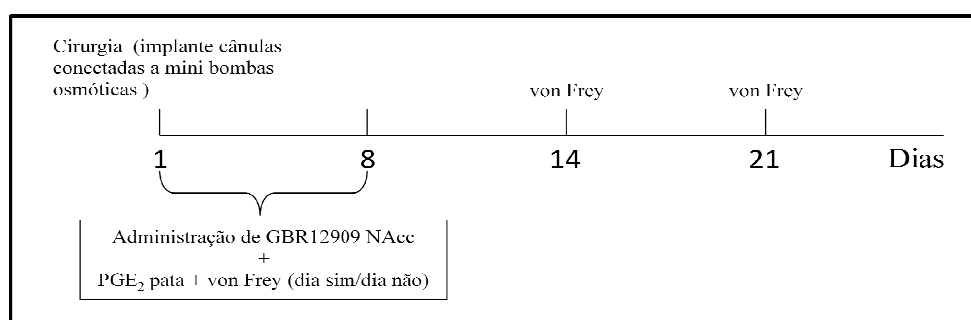


Figura 3. Desenho experimental para hiperalgesia persistente.

Para verificar a hipótese de que a ativação dos receptores de dopamina no NAcc contribui na indução da hiperalgesia persistente de origem inflamatória, antagonistas seletivos dos receptores de dopamina (SCH23390 para D1, raclopride para D2 e U99194A para D3) foram administrados topicamente no NAcc de ratos. Os ratos foram tratados por 7 dias com um dos antagonistas liberado continuamente através de mini bombas osmóticas ligadas por catéteres às cânulas implantadas no NAcc. Paralelamente, PGE₂ foi administrada no tecido periférico (100ng/50µl/pata) diariamente durante 14 dias (Figura 4). As doses utilizadas

neste experimento foram as doses que apresentaram efeito no experimento de hiperalgesia aguda induzida por PGE_2 quando co-administradas com GBR12909 (SCH23390 3nmol; Raclopride 10nmol; U99194A 10nmol). O limiar nociceptivo mecânico foi testado durante os 14 dias de indução da hiperalgesia persistente (dia sim/dia não) e 7 dias após o tratamento com PGE_2 (dia 21).

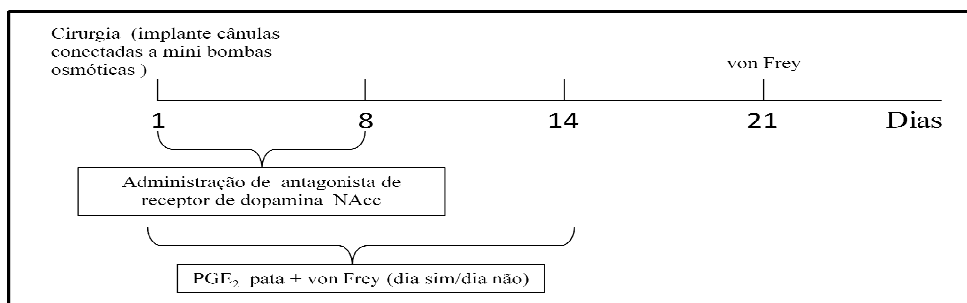


Figura 4. Desenho experimental para hiperalgesia persistente.

3.9 Imunofluorescência: Análise microscópica dos receptores de dopamina D1 e D2

Os ratos tratados com PGE_2 ou salina por 14 dias e testados 7 dias após o término do tratamento, foram profundamente anestesiados para perfusão, com solução salina (NaCl 0,9%) seguida de PFA 4%, por via transcardíaca. Em seguida, foi realizada extração do cérebro, o qual, depois de extraído, foi armazenado em solução de PFA 4% em geladeira por aproximadamente 2 horas. A solução de PFA 4% foi substituída por uma solução de PBS e o cérebro assim armazenado em geladeira, para posterior corte em vibratomo (50 μm). Os cortes foram colhidos sequencialmente e colocados em uma placa com 96 poços preenchidos com solução de PBS. Foram selecionados cortes em níveis semelhantes, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986), e tomados 3 cortes de cada cérebro (correspondentes às regiões anterior, média e posterior do NAcc) para o ensaio de

imunofluorescência. Os cortes foram transferidos para placas de 24 poços e lavados em PBS por 5 vezes de 5 min antes de serem colocados em solução de bloqueio (PBS, NGS - normal goat serum - 5%, albumina 0,2% e de Triton X100 0,1%). Após o bloqueio, realizado por 1h, os cortes foram incubados com anticorpo primário para um dos receptores D1 e D2 (Anti-dopamine D1 receptor rabbit pAb, 324390; Anti-dopamine D2 receptor rabbit pAb, AB5084P, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA) diluídos 1:500 em PBS, albumina 0,2% e Triton X100 0,05%, onde permaneceram sob agitação por 48h a 4°C. Os cortes foram lavados 6 vezes de 10min em PBS+Triton X-100 0,05% e posteriormente incubados no anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo na diluição de 1:1000 (Alexa Fluor 488, anti-rabbit IgG, A-21206, Invitrogen, Eugene, OR, USA). O anticorpo secundário fluorescente foi diluído em PBS, albumina 0,2% e Triton X100 0,05%. A incubação em anticorpo secundário foi realizada *overnight*, sob agitação, a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados 6 vezes de 10min em PBS+Triton X-100 0,05%. Finalmente, as lâminas foram montadas com glicerol 50% em PBS e seladas. Antes do ensaio de imunofluorescência, as lâminas foram gelatinizadas para melhor adesão dos cortes às lâminas.

As imagens da imunomarcção foram obtidas através de microscopia de fluorescência (Leica DFC360 FX), em aumentos de 10X, para quantificação da fluorescência da área, e 40X, para análise celular. Por se tratar de receptores de membrana abundantes na região de interesse, há grande variabilidade de expressão entre as células, dependente das diferentes projeções que diferentes células recebem. A análise de células individuais aleatórias poderia nos conduzir a imprecisão. Portanto, optou-se pela aferição das áreas contendo as células

marcadas, para verificar a diferença de expressão de uma forma geral. A área referente ao NAcc foi delimitada em cada corte, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986), tendo como referência a comissura anterior e a área delimitada teve a intensidade de fluorescência quantificada através do software LAS AF (Leica Microsystems).

3.10 Extração de RNAm e Proteínas

Para extração simultânea de RNAm e proteínas foi utilizado o reagente Trizol® (Invitrogen, USA), seguindo protocolo sugerido pelo fabricante. As proteínas foram resuspensas em tampão de extração padrão: PB 50 mM pH 7,4, β -mercaptoetanol 5%, EDTA 1 mM, coquetel inibidor de protease (SIGMA) 1% e SDS 1%.

3.11 Análise molecular dos receptores de dopamina D1 e D2 por Western blotting

Para a realização da análise por *Western blotting*, as proteínas das amostras do NAcc (25 μ g de proteína/poço) foram separadas por *SDS-PAGE* (em gel de poliacrilamida 10%) e, em seguida, foram transferidas por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (0,22 μ m). As membranas foram incubadas por 2h em uma solução de leite em pó desnatado 3% para bloqueio dos sítios de ligação inespecífica. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas em anticorpo primário (Anti-dopamine D1 receptor rabbit pAb, 324390 e Anti-dopamine D2 receptor rabbit pAb, AB5084P, Millipore, USA) na concentração de 1:500, por 12h, a 4°C. As membranas foram lavadas com PBS contendo Tween-20 0,1% e então incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Goat anti-rabbit, 656120, Invitrogen, USA) na concentração de 1:10000. Um ensaio de

quimioluminescência (Supersignal West Pico, Pierce, Illinois, USA) foi utilizado para identificar a imunorreatividade das bandas e a densidade óptica foi avaliada através do software GeneSnap (Syngene). Para quantificação empregou-se o software GeneTools (Syngene). A dosagem de proteínas feita através do método de Bradford foi confirmada pela coloração das proteínas totais das membranas com Ponceau S USBTM. Desta forma, a coloração com Ponceau S permitiu o emprego do valor da densitometria óptica de todas as proteínas detectadas na membrana como um controle interno (ROMERO-CALVO et al., 2010).

3.12 Análise da expressão do RNAm por qPCR em tempo real

A quantificação de RNAm das amostras foi feita por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho EPOCH (Bio-Tek, USA). A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1µg de RNA total, utilizando o kit High Capacity (Life Technologies, USA) com hexâmeros aleatórios, seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. O cDNA obtido foi diluído 10 vezes em água deionizada e foi armazenado a -20°C. O nível de expressão gênica foi determinado através de *PCR* em tempo real realizado em um sistema Step One Plus® Applied (Applied Biosystems, USA) utilizando o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies, USA). Como controle endógeno foi utilizado o gene GAPDH (FW: 5'- AAGATTGTCAGCAATGCATCC - 3' ; RV: 5'- ACTGTGGTCATGAGCCCTTC - 3'). Os primers para os receptores de dopamina D1 (FW: 5' – CCGAGATTGCTGGCTTTTGG - 3'; RV 5'- GGTTTCAGAATGGACGCCGTA - 3') e D2 (FW: 5'- AAGACGATGAGCCGCAGAAA - 3'; RV 5' – CTGTTGACATAGCCCAGCCA – 3') foram desenhados utilizando a ferramenta de *primer blast* do site *NCBI* (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK

LOC=BlastHome) e sintetizados por Eurofins, Nantes, França. As condições para os ciclos de *PCR* foram: 10min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min. As amostras foram processadas em triplicata e uma análise de *melting* foi realizada em cada amostra. A determinação da expressão gênica relativa foi realizada através do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O valor de C_t (ciclo limiar no qual a fluorescência medida é maior que o limiar padrão da fluorescência de fundo) foi determinado para os genes alvos e o controle endógeno em cada amostra. A diferença entre os valores de C_t dos genes alvos e do controle endógeno foi determinada para cada amostra (ΔC_t). A mudança relativa da expressão gênica foi calculada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.13 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas com o auxílio do programa *Graph Pad Prism 4.0* e os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) dos animais de cada grupo. A análise das curvas obtidas foi feita pelo teste de análise de variância ANOVA One-way seguido de Teste Tukey para as comparações múltiplas. Em análises comparando dois grupos em relação a uma variável independente foi utilizado teste T de Student não-pareado. Dados com duas variáveis independentes foram analisados por ANOVA Two-way seguido do Teste Bonferroni para comparações de todos os pares. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Procedimento cirúrgico para implante de cânulas não alterou o limiar mecânico

Para avaliar se o procedimento de cirurgia estereotáxica para implante das cânulas-guia interfere com o limiar mecânico nociceptivo dos animais, o teste do limiar nociceptivo mecânico – von Frey eletrônico – foi realizado previamente à cirurgia e 7 ou 10 dias após a cirurgia.

Como pode ser verificado na figura 5, o limiar mecânico dos animais se manteve semelhante antes e após - 7 ou 10 dias - a cirurgia, mostrando que não houve interferência do procedimento cirúrgico sobre a resposta comportamental dos animais.

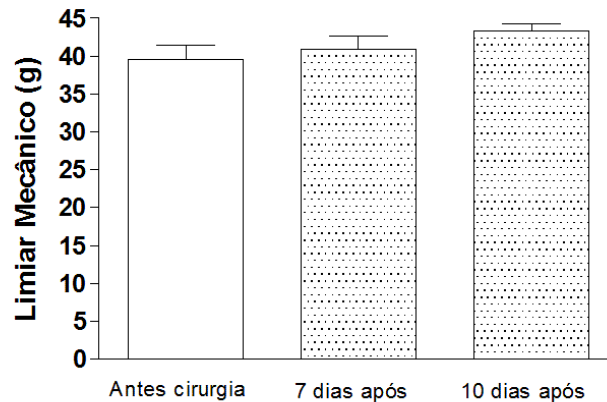


Figura 5. Limiar mecânico da pata de ratos submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guia. O teste nociceptivo comportamental do limiar mecânico foi realizado pelo analgesímetro eletrônico antes e 7 ou 10 dias após a cirurgia. Os dados são expressos como média $\pm$ epm de 6 animais por grupo (ANOVA One-way seguida de Teste Tukey; $p > 0,05$).

Apenas os ratos com as cânulas-guia corretamente localizadas no NAcc foram utilizados para as análises. Com relação às subdivisões do NAcc, as extremidades

das cânulas-guia ficaram localizadas próximas à interface *core* e *shell* (Figura 6), por essa razão não fomos capazes de determinar qualquer diferença entre administrações de drogas no *core* ou *shell* do NAcc.

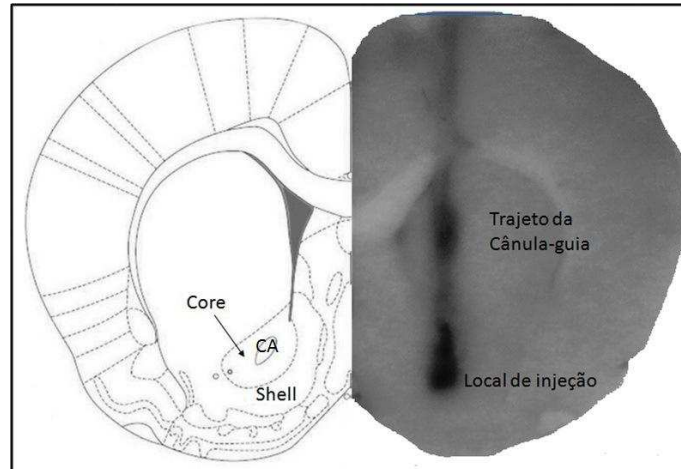


Figura 6. Desenho esquemático (esquerda) e foto (direita) de um corte coronal de cérebro (AP+1,3) mostrando a localização da extremidade da cânula-guia no NAcc dos ratos utilizados nas análises. CA: comissura anterior (Paxinos e Watson, 1986).

Para avaliar se o método cirúrgico adaptado poderia provocar danos teciduais aos animais, pele e osso, em contato prolongado com o acrílico, foram removidos e preparados para histologia. A análise histológica detalhada foi realizada nos tecidos cutâneo e ósseo de 2 grupos (n=4 por grupo) de animais: capacete (submetido à cirurgia estereotáxica convencional) e suturado (submetido à cirurgia adaptada). Verificou-se um melhorado processo de cicatrização da pele quando esta é suturada em relação àquele que acontece quando o capacete acrílico é mantido sobre a ferida cirúrgica. A pele dos animais suturados apresenta tecido de granulação e evidente reepitelização, em estágios adiantados quando comparados à pele dos animais submetidos à cirurgia convencional (Figura 7).

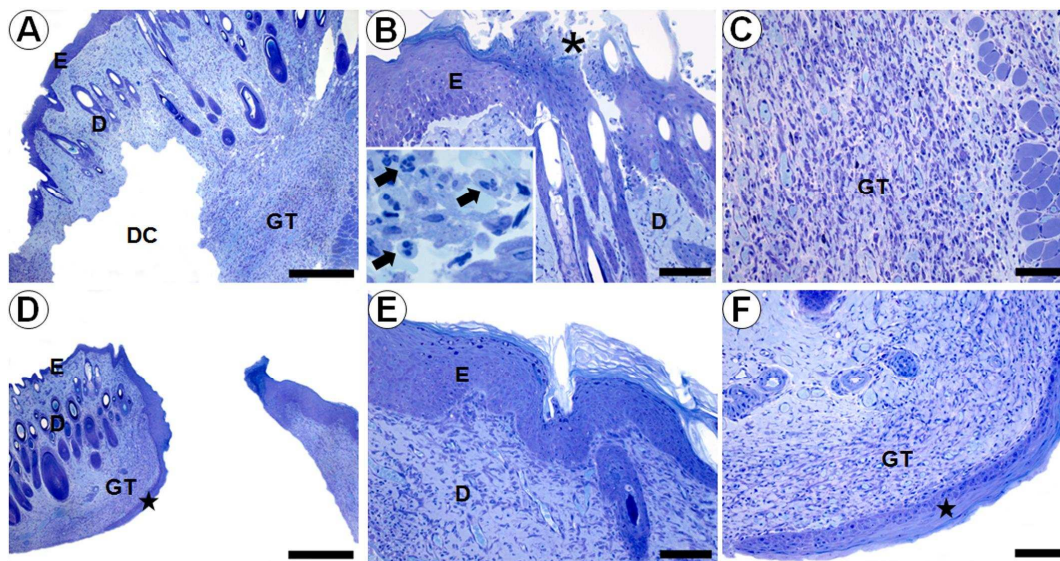


Figura 7. Cortes histológicos de pele: A, B e C - pele de animais submetidos à cirurgia convencional (capacete) e D, E e F: pele de animais submetidos à cirurgia modificada (suturado) 14 dias após a cirurgia. A marcação com azul de toluidina evidenciou a epiderme (E), derme (D), tecido de granulação (GT), zona de contato com a resina acrílica, que foi removida (DC) e zona de reepitelização (★). A borda da ferida do grupo submetido à cirurgia convencional mostra atrasada cicatrização onde células inflamatórias (*) podem ser observadas (setas). (Créditos: *Sílvio Consonni*)

Com relação ao tecido ósseo, na técnica modificada houve a formação de uma zona de ossificação com trabéculas ósseas organizadas (Figura 8), indicando um processo avançado de cicatrização, o que poderia ser explicado por uma fixação favorecida pela pele sobrejacente. Quando o capacete externo é mantido, as cânulas ficam mais suscetíveis a pequenos deslocamentos quando o animal mexe no aparato, o que prejudica a cicatrização.

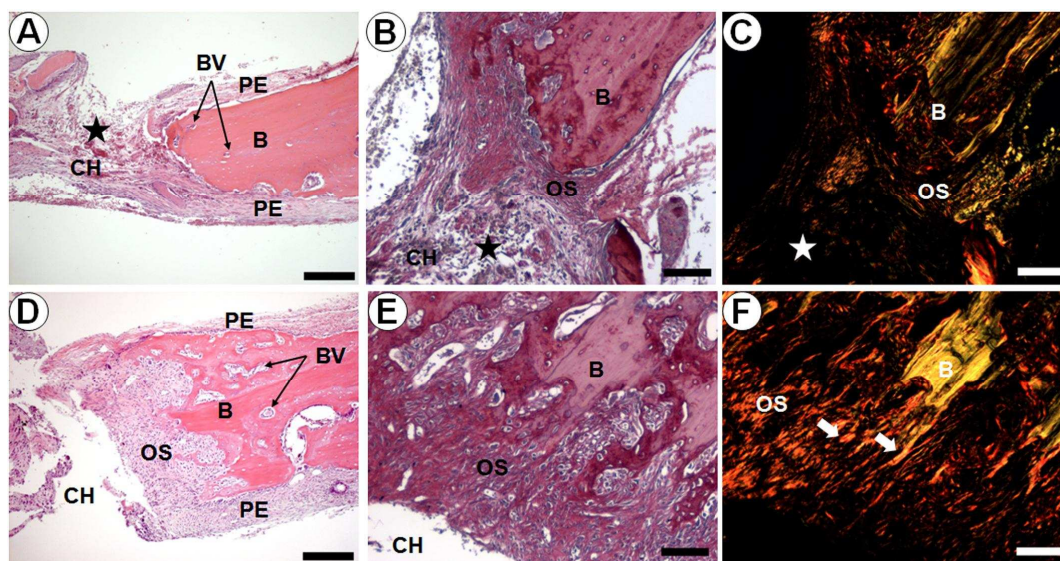


Figura 8. Cortes histológicos longitudinais do osso do crânio: A, B e C - osso de animais submetidos à cirurgia convencional (capacete) e D, E e F - osso de animais submetidos à cirurgia modificada (suturado) 14 dias após a cirurgia. Em A e D a marcação com Hematoxilina-Eosina (H&E) evidenciou a morfologia da perfuração da cânula-guia (CH), que foi removida, e tecido ósseo adjacente, onde morfologia óssea típica (B) pode ser observada com vasos sanguíneos (BV) e perióstio (PE). No grupo da cirurgia convencional, CH apresenta um tecido fibroso com células inflamatórias, coágulo e eritrócitos (★) enquanto no grupo da cirurgia modificada, uma zona de ossificação (OS) pode ser verificada adjacente ao osso. Em B e E, a marcação com Sirius Red (em C e F sob luz polarizada) evidencia a organização das fibras colágenas próximo a CH. Em B e C o colágeno foi raramente encontrado na região do coágulo (★), o tecido fibroso adjacente não mostrou organização das fibras, mas, uma pequena região de ossificação (OS) foi observada. Em contraste, E e F mostram uma zona de ossificação (OS) com osteoblastos organizados em fina trabéculas, que podem ser claramente observadas sob luz polarizada (setas). (Créditos: *Silvio Consonni*)

4.2 Aumento de dopamina no NAcc reduziu a hiperalgesia inflamatória

O inibidor da recaptação de dopamina, GBR12909 foi administrado intra NAcc 10min antes da medida do limiar nociceptivo realizado 3 horas após a administração de PGE₂ (100ng/50µl/pata) ou salina (50µl/pata). GBR12909 0,5nmol foi capaz de reduzir a hiperalgesia na 3ª hora pós PGE₂ (Figura 9). A administração de GBR12909 não alterou o limiar nociceptivo mecânico em ratos tratados com salina na pata.

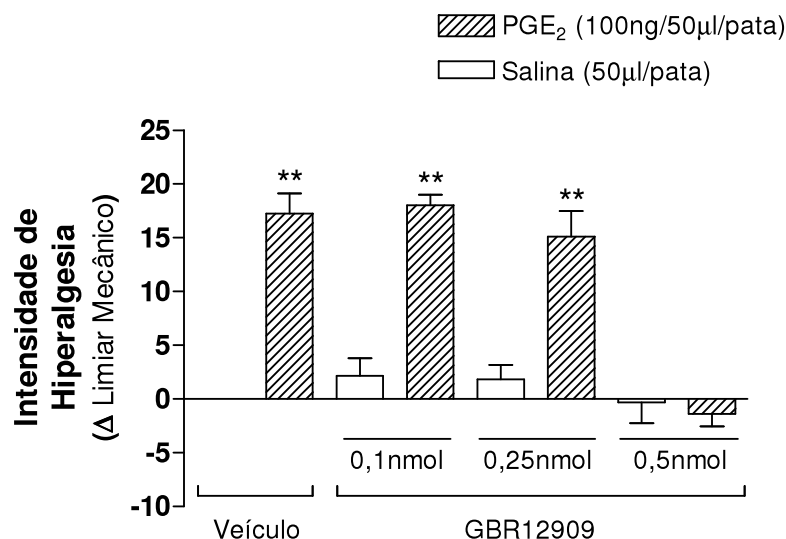


Figura 9. Efeito da administração no NAcc do inibidor da recaptação de dopamina, GBR12909, sobre a hiperálgia mecânica induzida por PGE₂. A administração no NAcc de GBR12909 0,5nmol, mas não 0,1 ou 0,25nmol, preveniu a hiperálgia medida 3h após a administração de PGE₂ (100ng/pata) no tecido periférico. GBR12909 foi administrado 10 min antes do teste nociceptivo mecânico realizado na 3ª hora. A administração de GBR12909 não alterou o limiar nociceptivo mecânico em patas tratadas com salina (50μl). O símbolo “**” significa diferença estatística ($p < 0,001$) dos grupos Veículo/PGE₂, GBR0,1/PGE₂, GBR0,25/PGE₂ em relação ao grupo GBR0,5nmol/PGE₂ e àqueles tratados com salina na pata. Os dados são expressos como média $\pm$ epm de 8 animais por grupo (ANOVA One-way seguida do Teste Tukey).

Para demonstrar que a diminuição do limiar nociceptivo mecânico não estava associada à alteração da atividade motora, ratos tratados com GBR12909 0,5nmol (0,25μl/lado) no NAcc foram testados na barra giratória (*Rotarod*). Não houve diferença no tempo de permanência na barra giratória entre o grupo de ratos tratados com GBR12909 e veículo (0,25μl/lado).

4.3 O efeito anti-hiperalgésico do aumento de dopamina no NAcc não é mediado pelo receptor D1

Para verificar se o receptor D1 está envolvido na analgesia induzida pelo aumento de dopamina no NAcc, a administração de 3 diferentes doses de SCH23390, antagonista do receptor D1, foi seguida pela administração do inibidor de

recaptação de dopamina, GBR12909 0,5nmol. A hiperalgesia foi medida 3 horas após a administração de PGE₂ (100ng/pata) ou salina (50µl/pata) e 10 minutos após a administração das drogas ou veículo (0,5µl/lado) no NAcc. Como mostrado na Figura 10, SCH23390 não reverteu o efeito anti-hiperalgésico induzido pelo GBR12909. A combinação de SCH23390 e GBR12909 não alterou o limiar mecânico de patas tratadas com salina.

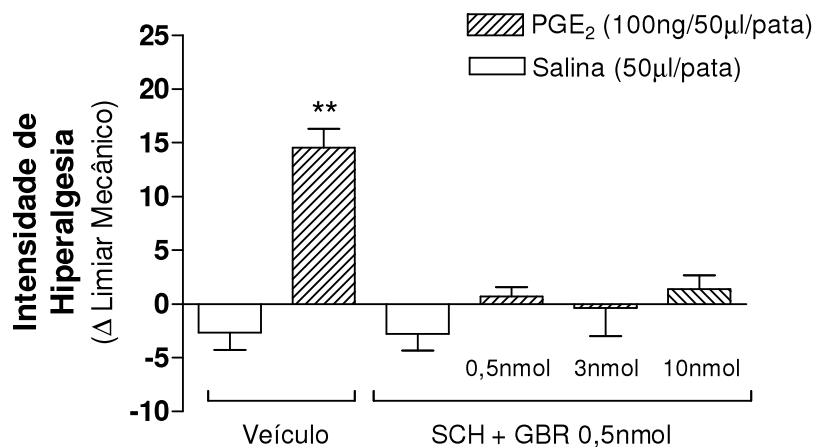


Figura 10. Efeito da administração do antagonista do receptor D1 sobre a analgesia induzida pelo aumento de dopamina no NAcc. A administração de SCH23390 no NAcc não alterou o efeito anti-hiperalgésico do GBR12909 0,5nmol administrado imediatamente depois, medido 3h após a administração de PGE₂ no tecido periférico. A combinação de SCH23390 e GBR12909 não alterou o limiar nociceptivo mecânico em patas tratadas com salina. O símbolo “**” significa diferença estatística ($p < 0,001$) do grupo Veículo/PGE₂ em relação ao grupo Veículo/Sal e aos demais grupos tratados com SCH nas diferentes doses+GBR/PGE₂ ou salina na pata. Os dados são expressos como média $\pm$ epm de 6 animais no grupo SCH10nmol e de 8 animais nos demais grupos (ANOVA One-way seguida do Teste Tukey). **SCH**: SCH23390 e **GBR**: GBR12909.

4.4 A administração do antagonista seletivo de receptor D1, SCH23390, no NAcc não alterou a resposta nociceptiva induzida por PGE₂.

A administração do antagonista seletivo do receptor D1 de dopamina, SCH23390 3nmol, no NAcc não alterou a hiperalgesia induzida por PGE₂. A droga e o veículo foram administrados centralmente 2h 50min após a injeção de PGE₂ ou salina na pata, ou seja, 10 min antes do teste nociceptivo que ocorreu na 3ª hora. A Figura 11 mostra que os grupos tratados com salina (50µl) na pata não apresentaram

diferença no limiar mecânico quando receberam SCH23390 3nmol ou veículo (0,25µl/lado) intra NAcc. Quando PGE₂ foi injetada na dose submáxima de 100ng/50µl/pata, a intensidade de hiperalgesia não diferiu significativamente entre os animais que receberam no NAcc o antagonista do receptor D1 ou seu veículo. Para avaliar uma possível facilitação provocada pelo bloqueio do receptor D1, que poderia estar mascarada quando a dose submáxima de PGE₂ foi utilizada, uma dose subliminar de 30ng/50µl/pata foi administrada. Os grupos tratados com a dose subliminar de PGE₂ ou com salina não apresentaram diferença no limiar nociceptivo mecânico quando receberam SCH23390 ou veículo.

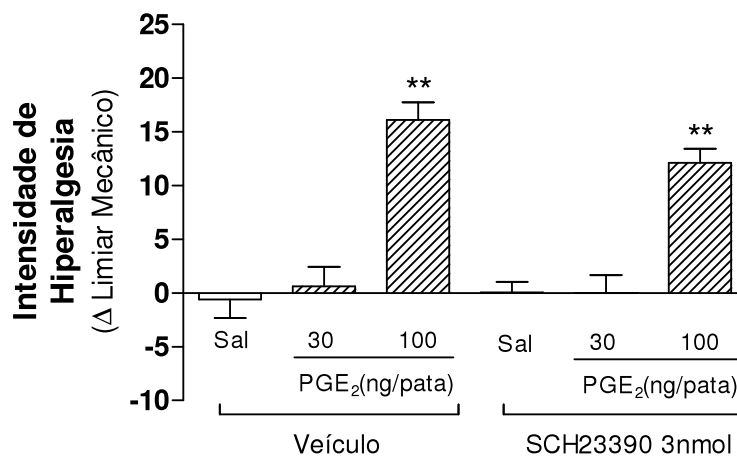


Figura 11. Efeito do antagonista do receptor D1 de dopamina, SCH23390, sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂. A administração de SCH23390 3nmol não alterou a hiperalgesia medida 3h após a administração de PGE₂ (100ng ou 30ng/pata) no tecido periférico. SCH23390 não alterou o limiar mecânico de patas tratadas com salina. O símbolo “***” indica que os grupos Veículo/PGE₂100 e SCH/PGE₂100 são significativamente diferentes ($p < 0,001$) dos grupos Veículo/Sal e PGE₂30 e grupos SCH/Sal e PGE₂30. Os dados são expressos como média $\pm$ epm de 7 animais por grupo (ANOVA One-way seguida do Teste Tukey).

4.5 O efeito anti-hiperalgésico do aumento de dopamina no NAcc é bloqueado pela co-administração de raclopride

A administração do antagonista do receptor D2, raclopride, foi seguida pela administração do inibidor de recaptação de dopamina, GBR129090 5nmol, para verificar se o receptor D2 está envolvido na analgesia induzida pelo aumento de

dopamina no NAcc. A hiperalgesia foi medida 3 horas após a administração de PGE₂ (100ng/pata) ou salina (50µl/pata) e 10 minutos após a administração das drogas ou veículo (0,5µl/lado) no NAcc. Como mostrado na Figura 12, raclopride 10nmol reverteu o efeito anti-hiperalgésico induzido pelo GBR12909. A combinação de raclopride e GBR12909 não alterou o limiar mecânico de patas tratadas com salina.

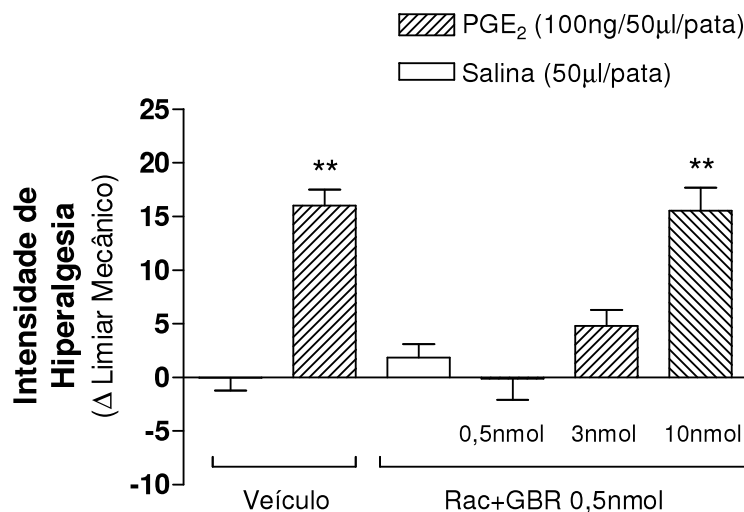


Figura 12. Efeito da administração do antagonista do receptor D2 sobre a analgesia induzida pelo aumento de dopamina no NAcc. A administração de raclopride 10nmol no NAcc bloqueou o efeito anti-hiperalgésico do GBR12909 0,5nmol administrado imediatamente depois, medido 3h após a administração de PGE₂ no tecido periférico. A combinação de raclopride e GBR12909 não alterou o limiar nociceptivo mecânico em patas tratadas com salina. O símbolo “***” significa diferença estatística ($p < 0,001$) dos grupos Veículo/PGE₂ e Rac 10+GBR/PGE₂ em relação aos grupos Veículo/Sal e Rac 0,5 ou 3 + GBR/PGE₂ ou salina. Os dados são expressos como média $\pm$ epm de 7 animais por grupo (ANOVA One-way seguida do Teste Tukey). **Rac**: Raclopride.

4.6 O antagonista do receptor de dopamina D2 intra NAcc favoreceu a resposta nociceptiva induzida por PGE₂

Raclopride ou veículo foram administrados centralmente 2h 50min após a injeção de PGE₂ ou salina na pata, ou seja, 10 min antes do teste nociceptivo que ocorreu na 3ª hora. A Figura 13 mostra que os grupos tratados com salina (50µl) na pata não apresentaram diferença no limiar mecânico quando receberam raclopride

10nmol ou veículo (0,25µl/lado) intra NAcc. Quando PGE₂ foi injetada na dose de 100ng/50µl/pata, a intensidade de hiperalgesia não diferiu significativamente entre os animais que receberam no NAcc o antagonista do receptor D2 ou seu veículo. Para avaliar uma possível facilitação provocada pelo bloqueio do receptor D2, que poderia estar mascarada quando a dose submáxima de PGE₂ foi utilizada, uma dose subliminar de 30ng/50µl/pata foi administrada. O grupo tratado com veículo não apresentou diferença no limiar mecânico quando tratado com PGE₂ 30ng ou salina na pata. No entanto, a dose subliminar de PGE₂ foi capaz de provocar uma resposta hiperalgésica nos ratos que receberam raclopride no NAcc.

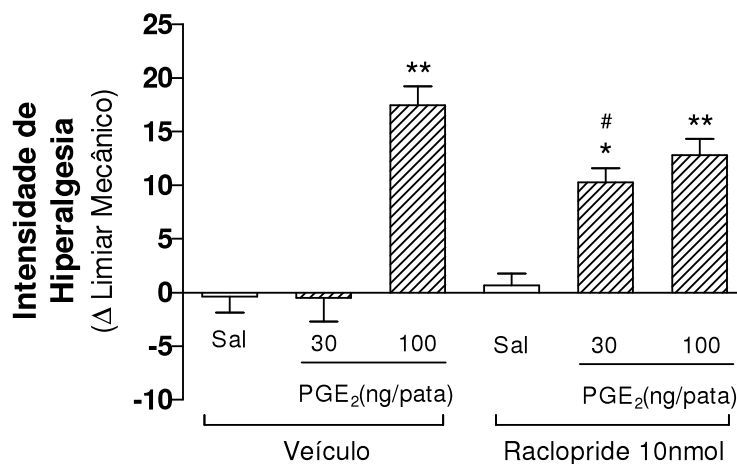


Figura 13. Efeito do antagonista do receptor D2 de dopamina, raclopride, sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂. A administração de raclopride 10nmol não alterou a hiperalgesia medida 3 horas após a administração de PGE₂ (100ng/pata) no tecido periférico. No entanto, raclopride foi capaz de facilitar a hiperalgesia quando a dose subliminar de PGE₂ (30ng/pata) foi utilizada. Raclopride não alterou o limiar mecânico de patas tratadas com salina. O símbolo “***” (p<0,001) indica que os grupos Veículo/PGE₂ 100 e Raclopride/PGE₂ 100 são estatisticamente diferentes dos grupos Veículo/Sal ou PGE₂ 30 e Raclopride/Sal. “**” (p<0,05) significa diferença significativa dos grupos Veículo ou Raclopride/PGE₂ 100 em relação ao grupo Raclopride/PGE₂ 30. “#” (p<0,01) indica a diferença entre Raclopride/PGE₂ 30 e Veículo ou Raclopride/Sal ou Veículo/PGE₂ 30. Os dados são expressos como média ± epm de 10 animais por grupo (ANOVA One-way seguida do Teste Tukey).

4.7 O antagonista do receptor D3 reduz parcialmente o efeito anti-hiperalgésico induzido pelo aumento de dopamina no NAcc

Para verificar se o receptor D3 está envolvido na analgesia induzida pelo aumento de dopamina no NAcc, a administração de U99194A, antagonista do receptor D3, foi seguida pela administração do inibidor de recaptação de dopamina, GBR12909 0,5nmol. A hiperalgesia foi medida 3 horas após a administração de PGE₂ (100ng/pata) ou salina (50μl/pata) e 10 minutos após a administração das drogas ou veículo (0,5μl/lado) no NAcc. U99194A foi capaz de reverter parcialmente o efeito anti-hiperalgésico induzido pelo GBR12909. A combinação de U99194A e GBR12909 não alterou o limiar mecânico de patas tratadas com salina (Figura 14).

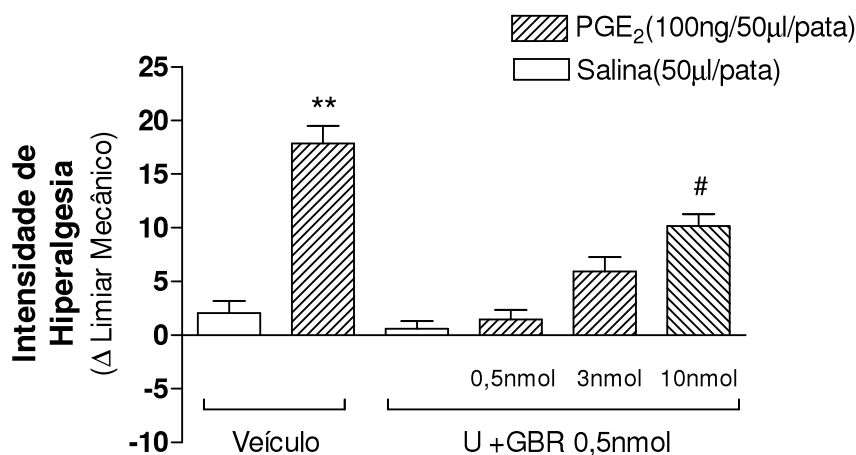


Figura 14. Efeito da administração do antagonista do receptor D3 sobre o efeito anti-hiperalgésico induzido pelo aumento de dopamina no NAcc. A administração de U99194A 10nmol no NAcc reduziu o efeito anti-hiperalgésico do GBR12909 0,5nmol administrado imediatamente depois, medido 3h após a administração de PGE₂ no tecido periférico. A combinação de U99194A e GBR12909 não alterou o limiar nociceptivo mecânico em patas tratadas com salina. O símbolo “***” (p<0,001) indica que o grupo Veículo/PGE₂ é diferente dos grupos Veículo/Sal, U 0,5 ou 3+GBR/Sal ou PGE₂. “#” (p<0,01) significa diferença estatística do grupo U 10+GBR/PGE₂ em relação aos grupos Veículo/Sal ou PGE₂, U 0,5 ou 3+GBR/Sal ou PGE₂. Os dados são expressos como média ± epm de 7 animais por grupo (ANOVA One-way seguida do Teste Tukey). U: U99194A.

4.8 Antagonista seletivo de receptor D3, U99194A, administrado no NAcc não alterou a resposta nociceptiva induzida por PGE₂.

U99194A ou o veículo foram administrados centralmente 2h 50min após a injeção de PGE₂ ou salina na pata, ou seja, 10 min antes do teste nociceptivo que ocorreu

na 3ª hora. A Figura 15 mostra que os grupos tratados com salina (50µl) na pata não apresentaram diferença no limiar mecânico quando receberam U99194A 10nmol ou veículo (0,25µl/lado) intra NAcc. Quando PGE₂ foi injetada na dose de 100ng/50µl/pata, a intensidade de hiperalgesia não diferiu significativamente entre os animais que receberam no NAcc o antagonista do receptor D3 ou seu veículo. A dose subliminar de PGE₂ (30ng/50µl/pata), administrada para avaliar uma possível facilitação provocada pelo bloqueio do receptor D3, não foi capaz de provocar resposta hiperalgésica.

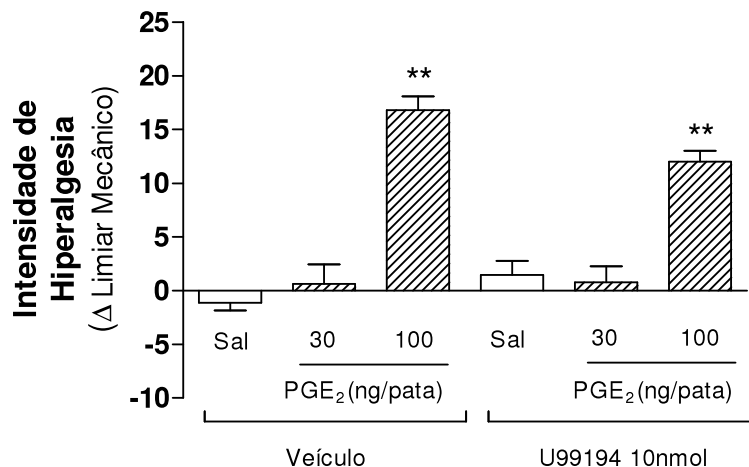


Figura 15. Efeito do antagonista do receptor D3 de dopamina, U99194A, sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂. A administração de U99194A 10nmol não alterou a hiperalgesia medida 3h após a administração de PGE₂ (100ng ou 30ng/pata) no tecido periférico. U99194A não alterou o limiar mecânico de patas tratadas com salina. O símbolo “***” (p<0,001) indica que os grupos Veículo ou U99194A/PGE₂ 100 são significativamente diferentes dos grupos Veículo/Sal ou PGE₂ 30 e U99194A/Sal ou PGE₂ 30. Os dados são expressos como média ± epm de 6 animais por grupo (ANOVA One-way seguida do Teste Tukey).

4.9 Administração de PGE₂ no tecido periférico por 14 dias induziu hiperalgesia persistente

Para indução de hiperalgesia persistente, PGE₂ (100ng/50µl/pata) foi administrada por 14 dias consecutivos. Os ratos foram submetidos ao teste nociceptivo mecânico antes do início do tratamento e em dias alternados (dia sim, dia não) durante o tratamento com PGE₂, com testes realizados antes de sua

administração. A partir do 5º dia de administração de PGE₂ começa a haver uma redução do limiar mecânico, que se torna significativa no 7º dia. Essa redução do limiar nociceptivo é indicativa de hiperalgesia e se manteve, a partir do 7º dia, durante e após o tratamento com PGE₂ (Figura 16). Em todos os experimentos de hiperalgesia persistente os dados se referem ao limiar nociceptivo mecânico e sua variação pode ser observada ao longo do tempo.

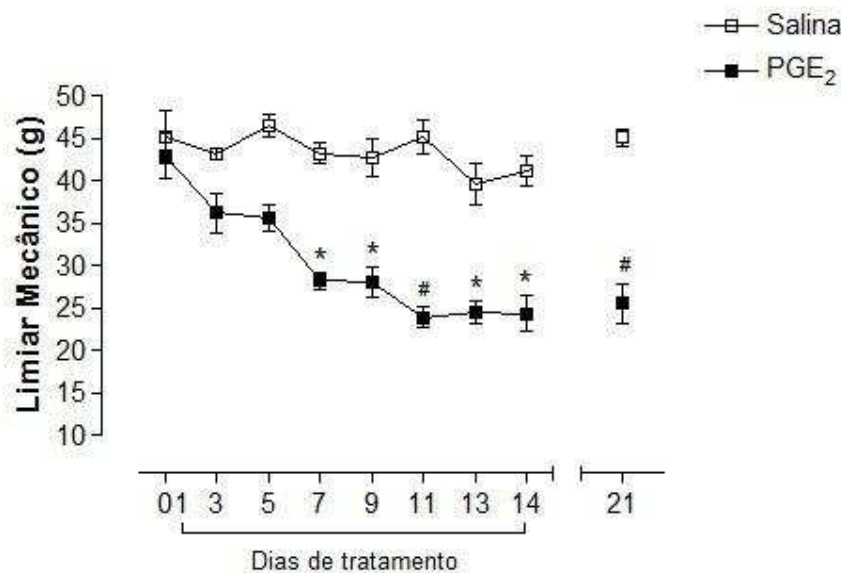


Figura 16. Indução de hiperalgesia persistente (esquerda do gráfico). A hiperalgesia persistente foi induzida pela administração de PGE₂ (100ng/pata) por 14 dias e o limiar se manteve reduzido em relação ao controle a partir do 7º dia de administração. **Manutenção da hiperalgesia persistente (direita do gráfico).** Sete dias (21º dia) após o término do tratamento com PGE₂, o limiar mecânico nociceptivo permaneceu reduzido. Os símbolos “*” (p<0,05) e “#” (p<0,01) significam estatisticamente diferente do grupo salina. Os dados são expressos como média ± epm de 6 por grupo (ANOVA Two-way seguido de Teste Bonferroni (esquerda); teste T não pareado (direita)).

Após os experimentos, os ratos foram profundamente anestesiados, com uma mistura de cetamina e xilazina, e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina 0,9% seguida de paraformaldeído 4% (PFA 4%) tamponado com tampão fosfato 0,1M. Os cérebros foram removidos e mantidos em imersão em PFA 4% por 2h e posteriormente em PBS. Foram cortados em vibrátomo e microscopicamente analisados por imunofluorescência.

4.10 Procedimento cirúrgico para implante de cânulas não alterou a indução e manutenção da hiperalgesia inflamatória persistente

Para avaliar se a cirurgia estereotóxica para implante das cânulas-guia interfere no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia persistente, o teste do limiar nociceptivo mecânico – von Frey eletrônico – foi realizado previamente e em dias alternados (dia sim/dia não) após a cirurgia. A figura 17 indica que não houve interferência do procedimento cirúrgico sobre a resposta comportamental dos animais.

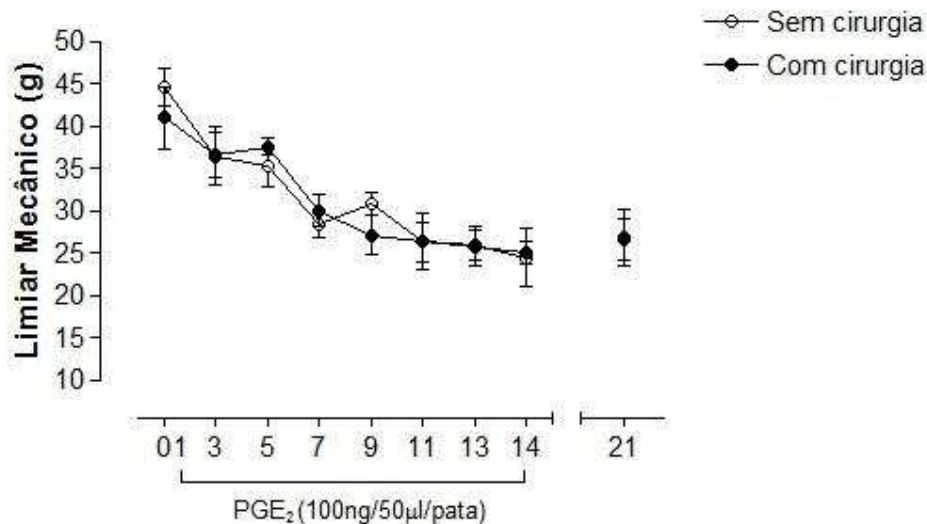


Figura 17. Efeito do procedimento cirúrgico estereotóxico sobre a indução (esquerda do gráfico) e manutenção (direita do gráfico) da hiperalgesia persistente. A hiperalgesia persistente foi induzida pela administração de PGE_2 (100ng/pata) por 14 dias em ratos submetidos ou não à cirurgia estereotóxica. O limiar apresenta redução nos dois grupos ao longo do período de administração. Sete dias (21º dia) após o término do tratamento com PGE_2 , o limiar mecânico nociceptivo permaneceu reduzido nos dois grupos. Os dados são expressos como média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. $p>0,05$; ANOVA Two-way seguido de Teste Bonferroni (esquerda); teste T não pareado (direita).

4.11 Hiperalgesia persistente é favorecida pelo aumento de dopamina no NAcc

A fim de evitar um trauma tecidual mecânico pela infusão diária de 0,25µl/lado de drogas no NAcc durante 7 dias, mini bombas (*mini pump*) osmóticas foram implantadas para liberação contínua de pequena quantidade (0,5µl/h) de solução contendo a droga de interesse. Ratos submetidos à infusão contínua de salina não apresentaram alterações comportamentais quando comparados aos ratos que não receberam o implante das mini bombas osmóticas (Figura 18).

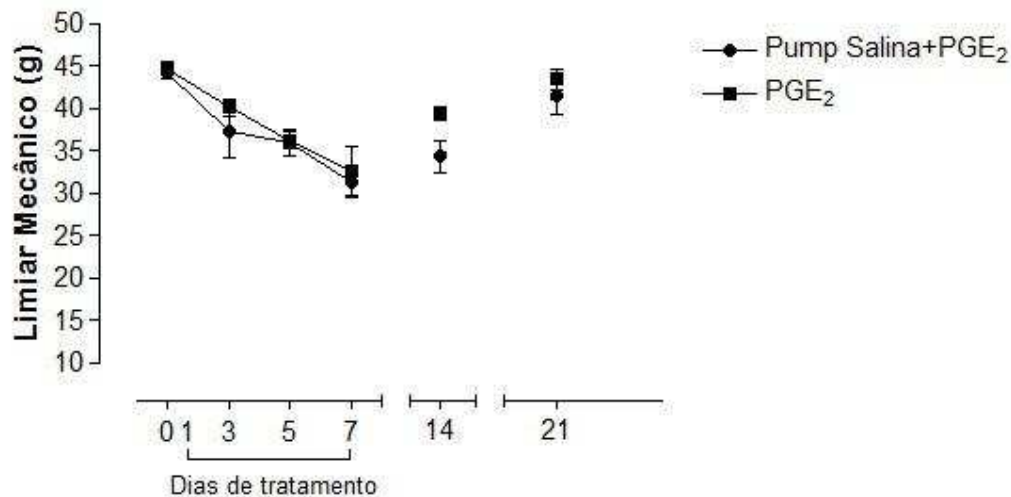


Figura 18. Efeito do procedimento para implante de mini bombas osmóticas sobre a resposta comportamental de ratos. A hiperalgesia foi induzida pela administração de PGE₂ (100ng/pata) por 7 dias em ratos submetidos ou não à cirurgia. O limiar apresenta redução nos dois grupos ao longo do período de administração, se restabelecendo 7 dias (14º dia) após o término do tratamento com PGE₂. À direita do gráfico, o limiar mecânico 14 dias (21º dia) após o término do tratamento com PGE₂. Os dados são expressos como média ± epm de 5 animais por grupo. $p > 0,05$; ANOVA Two-way seguido de Teste Bonferroni (esquerda do gráfico); teste T não pareado (centro e direita). **Sal:** Salina.

A administração de PGE₂ na pata por 7 dias não foi capaz de induzir hiperalgesia persistente quando associada à infusão de veículo no NAcc. No entanto, ratos submetidos à infusão contínua do inibidor de recaptação de dopamina, GBR12909 0,5nmol no NAcc por 7 dias, apresentaram redução persistente do limiar nociceptivo após 7 dias de administração de PGE₂ (100ng/50µl) na pata. O limiar mecânico se manteve reduzido por até 14 dias após o tratamento. O inibidor de

recaptação infundido intra-NAcc não alterou a resposta da pata contralateral que recebeu salina (Figura 19).

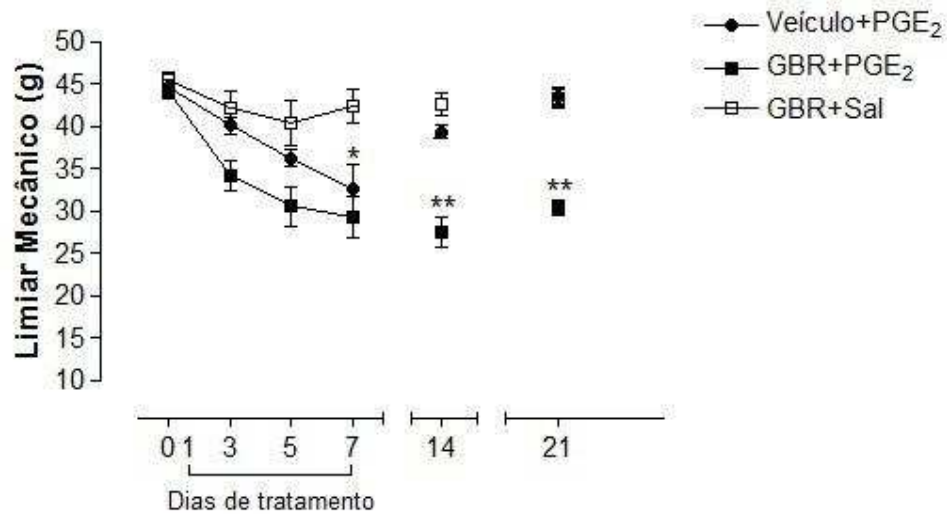


Figura 19. Efeito do aumento de dopamina no NAcc sobre o limiar mecânico. Redução persistente do limiar mecânico foi induzida pela administração de PGE₂ (100ng/pata) por 7 dias concomitante à administração do inibidor de recaptação de dopamina, GBR12909 0,5nmol no NAcc. O limiar se apresentou reduzido em relação ao controle no 7º dia de administração e essa redução se manteve no 14º e 21º dias. O símbolo “*” ($p < 0,05$) indica que os grupos GBR ou Veículo/PGE₂ são estatisticamente diferentes do grupo GBR/Sal. “***” ($p < 0,001$) significa diferença significativa do grupo GBR/PGE₂ em relação aos grupos GBR/Sal e Veículo/PGE₂. Os dados são expressos como média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. ANOVA Two-way seguido de Teste Bonferroni (esquerda do gráfico); ANOVA One-way seguido de teste Bonferroni (centro e direita do gráfico). **GBR**: GBR12909; **Sal**: Salina.

A hiperalgesia persistente, verificada pela redução persistente do limiar mecânico, foi observada nos ratos submetidos à administração concomitante de GBR12909 intra-NAcc e PGE₂ na pata por 7 dias e não diferiu da hiperalgesia induzida por 14 dias de administração de PGE₂ na pata (Figura 20).

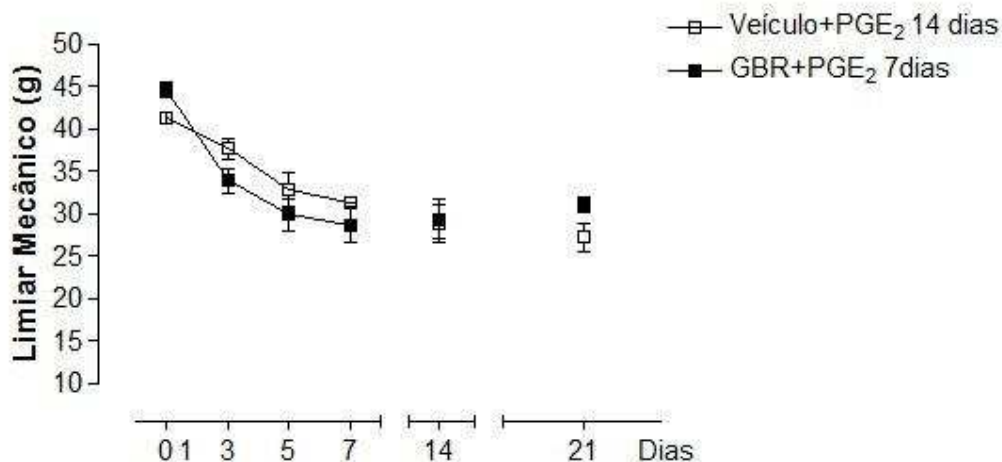


Figura 20. Efeito do aumento de dopamina no NAcc na indução (esquerda e centro do gráfico) e manutenção (direita do gráfico) da hiperalgesia persistente. Hiperalgesia persistente foi induzida pela administração concomitante de PGE₂ (100ng/pata) e do inibidor de recaptação de dopamina, GBR12909 0,5nmol por 7 dias no NAcc e foi semelhante ao grupo que recebeu PGE₂ na pata por 14 dias. A hiperalgesia observada permaneceu até o 21º dia (direita do gráfico). Os dados são expressos como média ± epm de 6 animais por grupo. $p > 0,05$; ANOVA Two-way seguido de Teste Bonferroni (esquerda); teste T não pareado (centro e direita). **GBR**: GBR12909.

4.12 A administração sustentada do antagonista seletivo do receptor D1, SCH23390, no NAcc alterou a resposta nociceptiva persistente induzida por PGE₂

A infusão por 7 dias de SCH23390 3nmol no NAcc de ratos não comprometeu o processo de sensibilização durante os 14 dias de administração de PGE₂ na pata. No entanto, quando comparado ao grupo que recebeu veículo intra-NAcc, o grupo SCH23390 apresentou um aumento no limiar mecânico medido 7 dias após o término do tratamento periférico com PGE₂ (Figura 21). O antagonista do receptor D1 não alterou o limiar mecânico da pata contralateral tratada com salina (dados não apresentados).

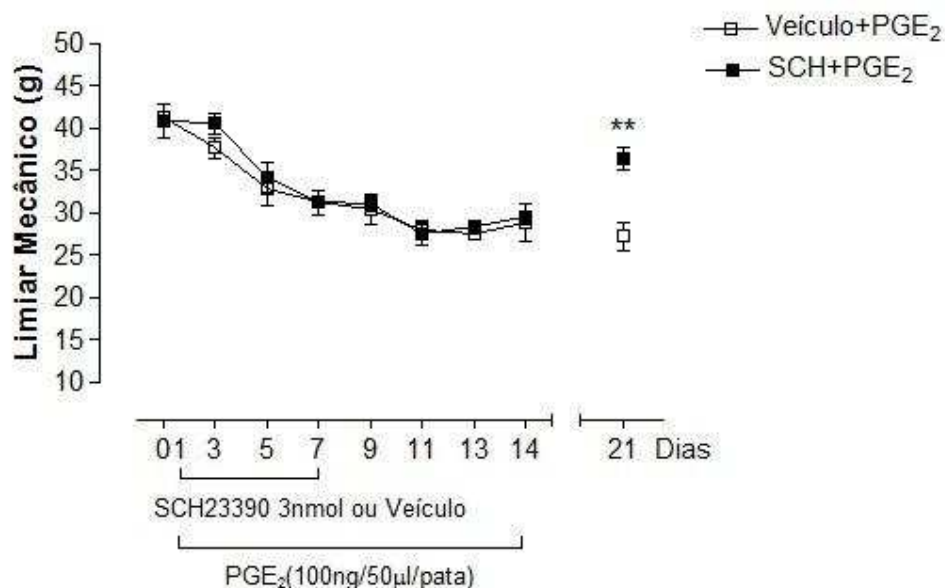


Figura 21. Efeito do antagonista do receptor D1 de dopamina, SCH23390, sobre a hiperalgesia persistente induzida por PGE₂. O antagonista de D1, SCH23390 3nmol administrado por 7 dias, não alterou o processo de sensibilização ao longo dos 14 dias de administração de PGE₂ (100ng/pata) no tecido periférico (esquerda do gráfico). No entanto, a administração de SCH23390 3nmol por 7 dias no período de indução (14 dias de administração de PGE₂ no tecido periférico), alterou o limiar mecânico medido 7 dias após os 14 dias de tratamento com PGE₂ (direita do gráfico). O símbolo “**” ($p < 0,005$) indica que o grupo tratado é significativamente diferente do grupo veículo. Os dados são expressos como média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. ANOVA Two-way seguido do Teste Bonferroni (esquerda); teste T não pareado (direita). **SCH**: SCH23390.

4.13 Raclopride intra-NAcc atenuou a resposta nociceptiva persistente induzida por PGE₂

Ratos que receberam infusão de raclopride 10nmol por 7 dias no NAcc não apresentaram alteração no processo de sensibilização durante os 14 dias de administração de PGE₂ na pata. No entanto, quando comparado ao grupo que recebeu veículo intra-NAcc, o grupo raclopride apresentou um aumento no limiar mecânico medido 7 dias após o término do tratamento periférico com PGE₂ (Figura 22). O antagonista do receptor D2 não alterou o limiar mecânico da pata contralateral tratada com salina (dados não apresentados).

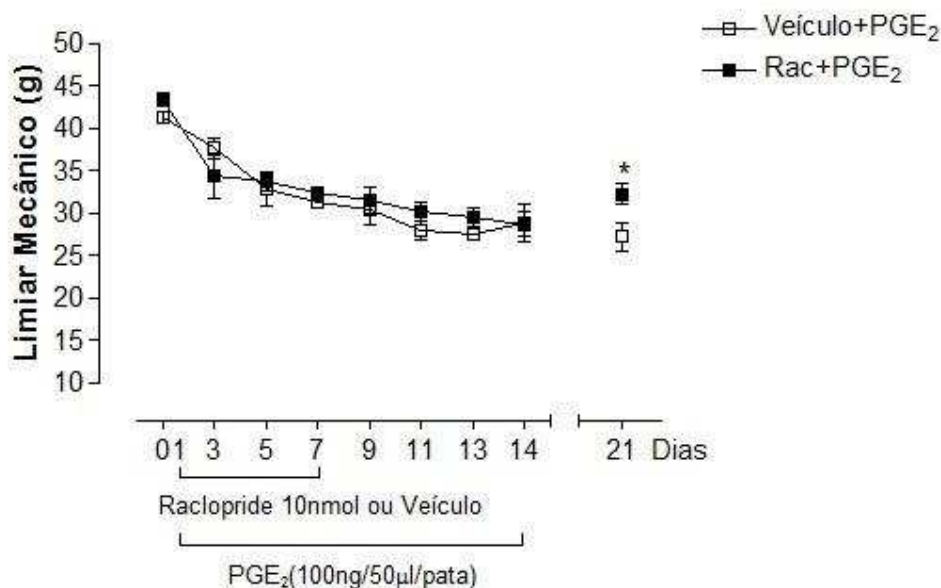


Figura 22. Efeito do antagonista do receptor D2 de dopamina, raclopride, sobre a hiperalgesia persistente induzida por PGE₂. O antagonista de D2, raclopride 10nmol, administrado por 7 dias, não alterou o processo de sensibilização ao longo dos 14 dias de administração de PGE₂ (100ng/pata) no tecido periférico (esquerda do gráfico). No entanto, a administração de raclopride por 7 dias no período de indução (14 dias de administração de PGE₂ no tecido periférico), alterou o limiar mecânico medido 7 dias após os 14 dias de tratamento com PGE₂ (direita do gráfico). O símbolo “*” (p<0,05) indica que o grupo tratado difere significativamente do grupo controle. Os dados são apresentados como média ± epm de 6 animais por grupo. ANOVA Two-way seguido do Teste Bonferroni (esquerda); teste T não pareado (direita). **Rac:** Raclopride.

4.14 Antagonista seletivo de receptor D3, U99194A, administrado cronicamente no NAcc não alterou a resposta nociceptiva induzida por PGE₂

U99194A 10nmol ou o veículo foram administrados centralmente, por infusão contínua, durante 7 dias. Não houve alteração no processo de sensibilização durante os 14 dias de administração de PGE₂ na pata. Quando comparado ao grupo que recebeu veículo intra-NAcc, o grupo que recebeu o antagonista de D3 não apresentou alteração do limiar mecânico medido 7 dias após o término do tratamento periférico com PGE₂ (Figura 23). U99194A não alterou o limiar mecânico da pata contralateral tratada com salina (dados não apresentados).

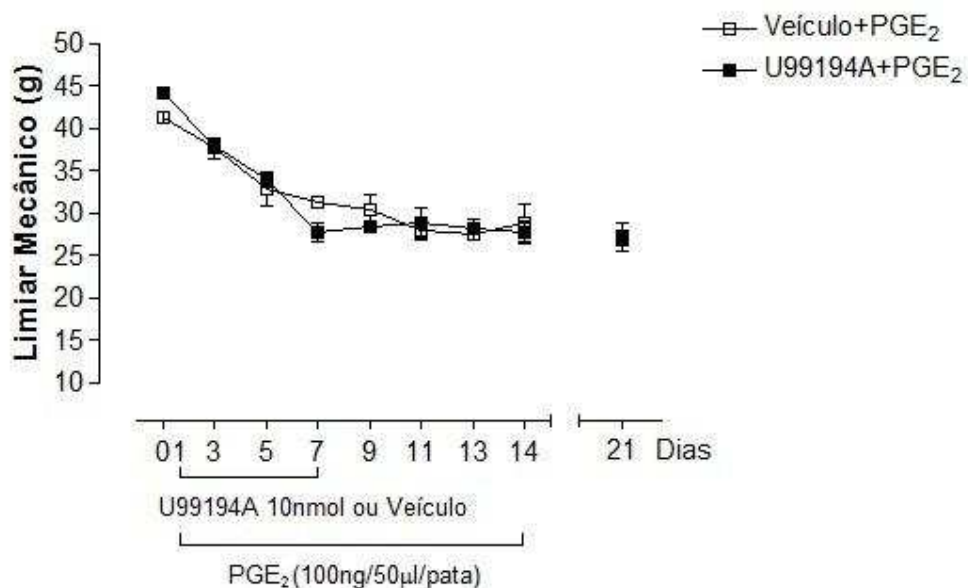


Figura 23. Efeito do antagonista do receptor D3 de dopamina, U99194A, sobre a hiperalgesia persistente induzida por PGE₂. A administração de U99194A 10nmol no NAcc, por 7 dias, não alterou a hiperalgesia observada durante (esquerda do gráfico) e 7 dias após (direita do gráfico) a administração crônica de PGE₂ (100ng/pata) no tecido periférico. Os dados são apresentados como média $\pm$ epm de 6 animais por grupo. $p > 0,05$; ANOVA Two-way seguido do Teste Bonferroni (esquerda); teste T não pareado (direita).

4.15 A hiperalgesia persistente de origem inflamatória não alterou a expressão dos receptores de dopamina na NAcc avaliada por imunofluorescência

A partir dos resultados comportamentais, com evidente participação dos receptores de dopamina no processo de indução (14 dias de administração de PGE₂) da hiperalgesia persistente, foi realizada análise da expressão dos receptores dopaminérgicos por imunofluorescência. Para análise, a intensidade de fluorescência da área correspondente ao NAcc - delimitada a partir da comissura anterior (CA) - dos animais controles e tratados foi quantificada. Intensa imunomarcagem foi observada no NAcc dos dois grupos, no entanto, não houve diferença na intensidade de fluorescência determinada pelos receptores D1 (Figura 24) ou pelos receptores D2 (Figura 26) entre os grupos controle e tratado.

Em uma imagem em maior aumento (40X) é possível observar a disposição dos receptores dopaminérgicos imunomarcados na membrana dos neurônios do NAcc (Figuras 25 e 27).

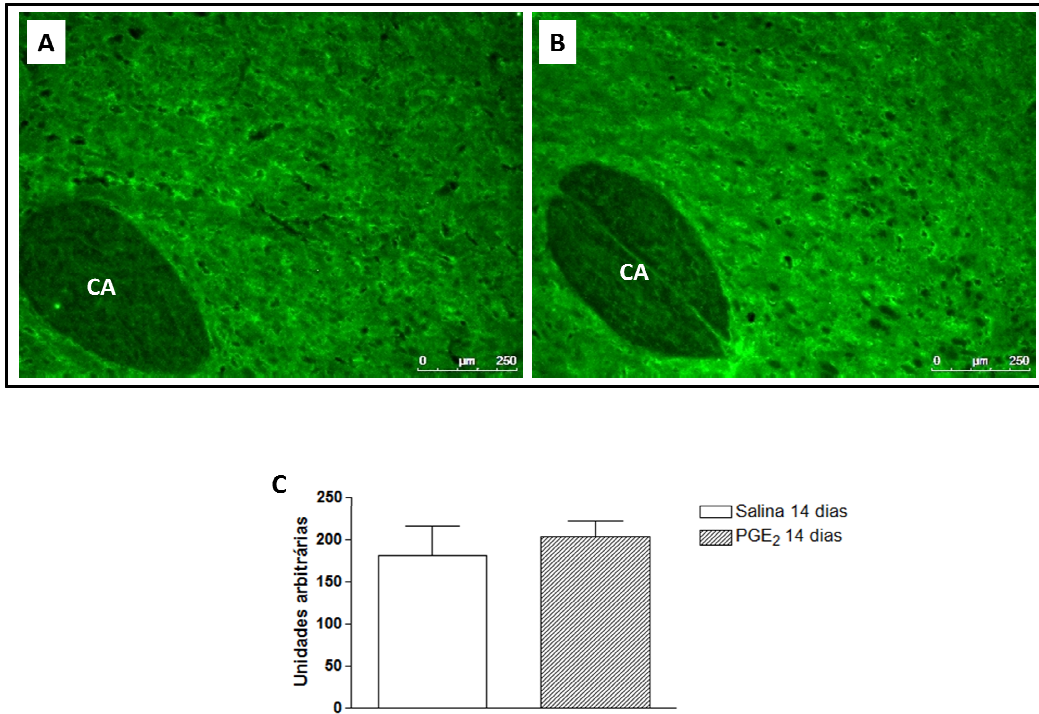


Figura 24. Efeito da administração de PGE₂ na pata por 14 dias sobre a expressão do receptor D1 de dopamina no NAcc de ratos. Fotos representativas da marcação do receptor D1 no NAcc após administração de salina (50μl/pata) por 14 dias (A) e administração de PGE₂ (100ng/50μl/pata) por 14 dias (B) (em aumento de 10X). O gráfico (C) representa a intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) do NAcc em cada grupo (n=4 por grupo; Teste T não pareado; p>0,05). CA: comissura anterior.

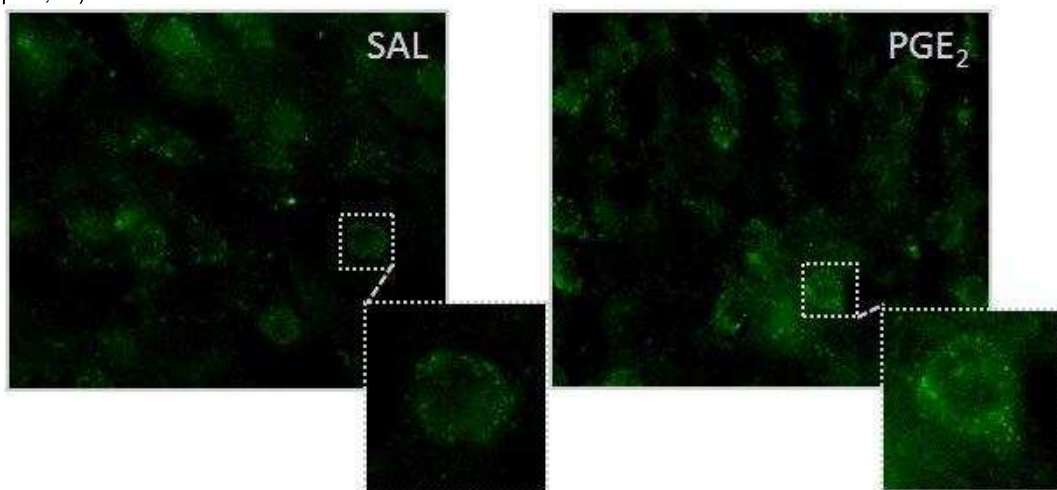


Figura 25. Fotos representativas da marcação do receptor D1 no NAcc, em maior aumento (40X), mostrando o padrão de marcação na membrana dos neurônios imunomarcados.

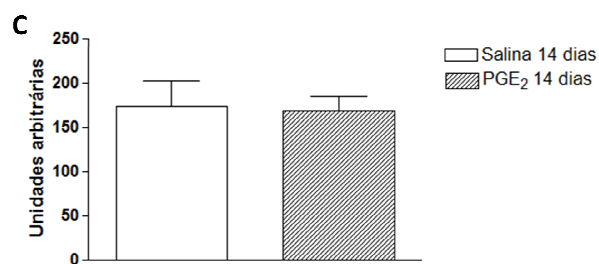
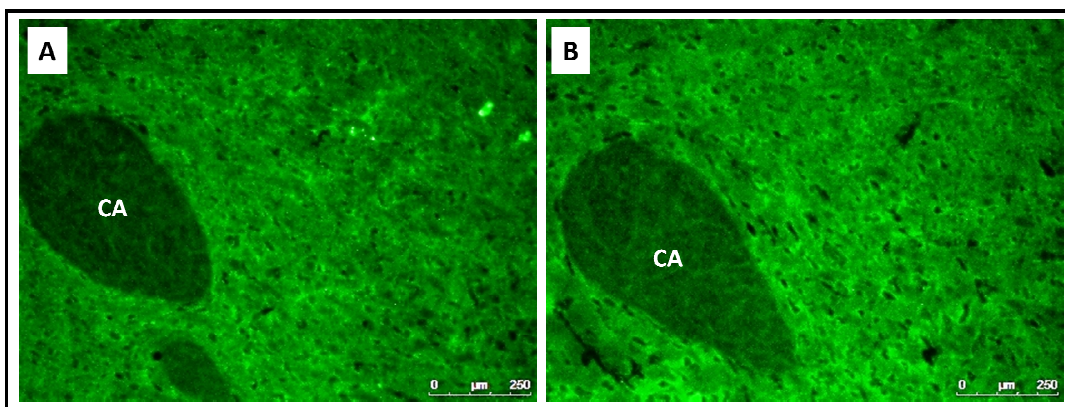


Figura 26. Efeito da administração de PGE₂ na pata por 14 dias sobre a expressão do receptor D2 de dopamina no NAcc de ratos. Fotos representativas da marcação do receptor D2 no NAcc após administração de salina (50µl/pata) por 14 dias **(A)** e administração de PGE₂ (100ng/50µl/pata) por 14 dias **(B)** (em aumento de 10X). O gráfico **(C)** representa a intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) do NAcc em cada grupo (n=4 por grupo; Teste T não pareado; p>0,05). **CA:** comissura anterior.

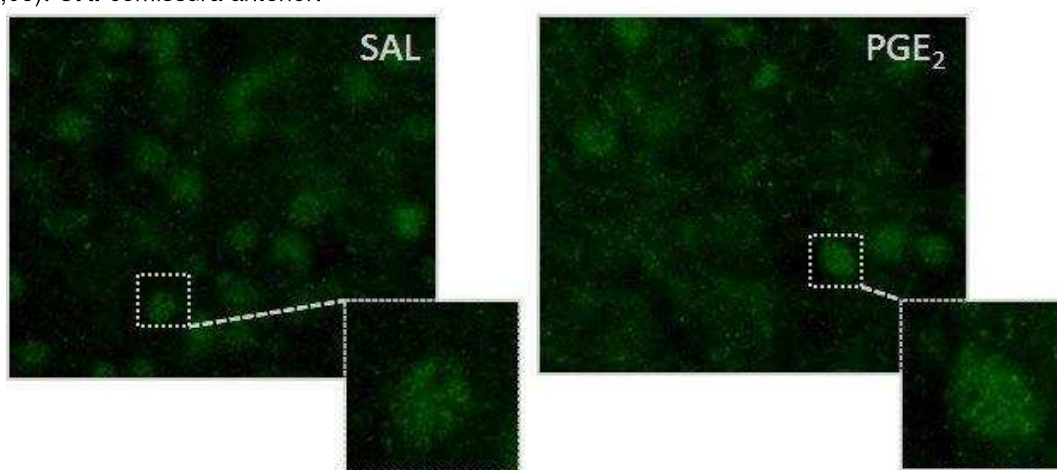


Figura 27. Fotos representativas da marcação do receptor D2 no NAcc, em maior aumento (40X), mostrando o padrão de marcação na membrana dos neurônios imunomarcados.

4.16 Hiperalgesia persistente de origem inflamatória não alterou a expressão de receptores de dopamina no NAcc avaliada por Western blotting

A análise dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 por *Western blotting* não mostrou alteração quantitativa desses receptores no NAcc dos ratos tratados por 14 dias com PGE₂ na pata quando comparados ao grupo controle, que recebeu salina por 14 dias (Figuras 28 e 29).

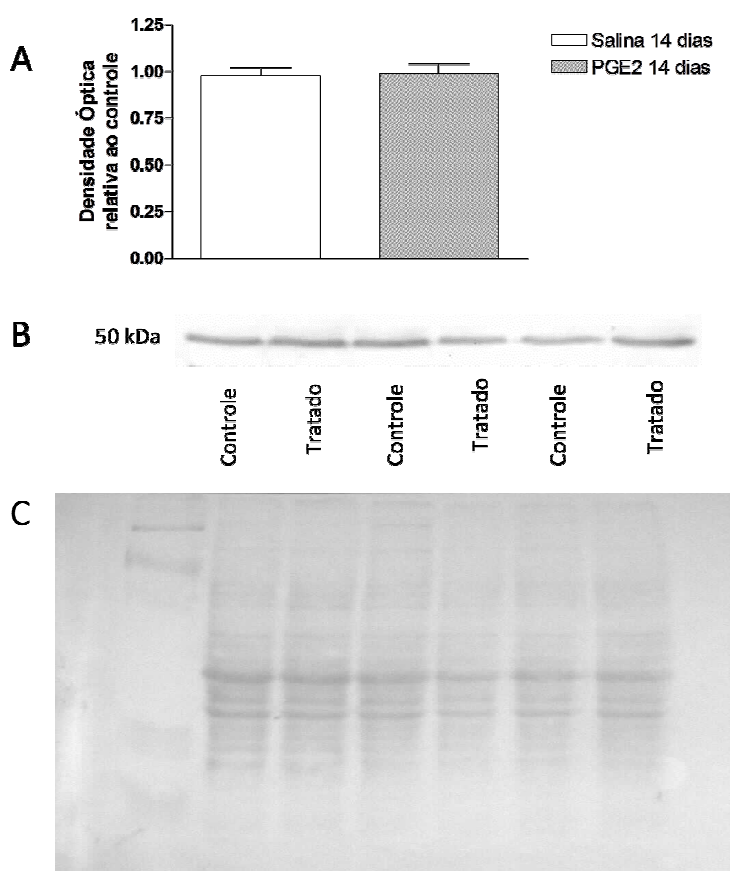


Figura 28. Expressão do receptor D1 de dopamina no NAcc de ratos com hiperalgesia persistente induzida pela administração crônica de PGE₂ na pata. **A)** O gráfico representa os valores médios da densidade óptica das bandas do receptor D1 dos animais tratados com PGE₂ (100ng/50µl/pata) por 14 dias em relação aos animais controles tratados com salina (50µl/pata). **B)** Foto representativa das bandas imunorreativas do receptor D1 de animais tratados e controles. **C)** Membrana eletrotransferida corada com Ponceau S, que foi utilizada para a padronização dos valores de densitometria óptica (n=6 por grupo; Teste T não pareado; p>0,05).

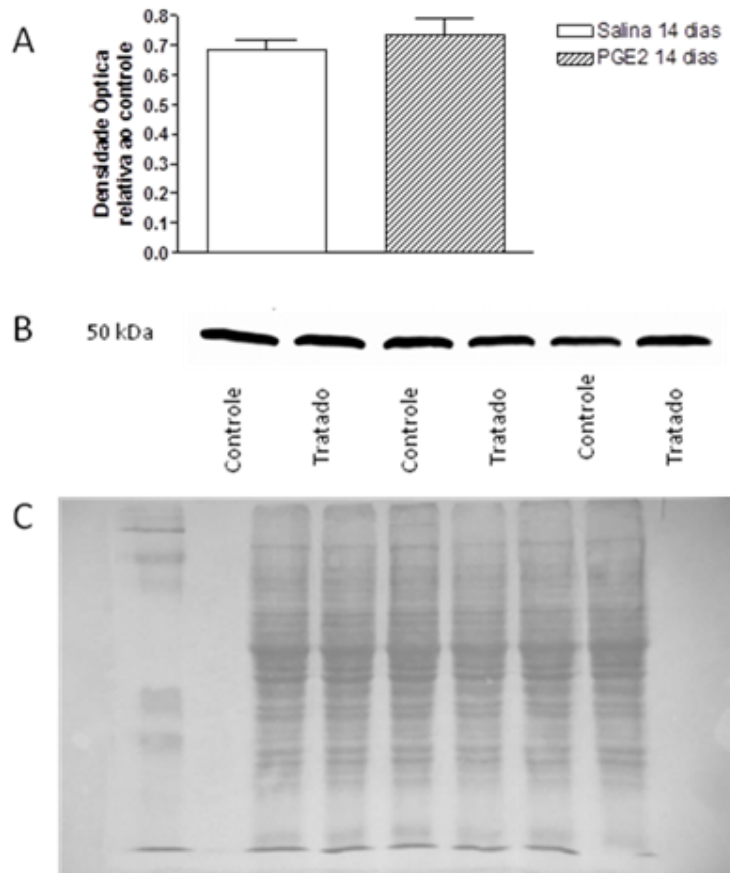


Figura 29. Expressão do receptor D2 de dopamina no NAcc de ratos com hiperalgesia persistente induzida pela administração crônica de PGE₂ na pata. A) O gráfico representa os valores médios da densidade óptica das bandas do receptor D2 dos animais tratados com PGE₂ (100ng/50μl/pata) por 14 dias em relação aos animais controles tratados com salina (50μl/pata). **B)** Foto representativa das bandas imunorreativas do receptor D2 de animais tratados e controles. **C)** Membrana eletrotransferida corada com o Ponceau S, que foi utilizada para a padronização dos valores de densitometria óptica (n=6 por grupo; Teste T não pareado; p>0,05).

4.17 A expressão do RNAm do receptor de dopamina D1 no NAcc, mas não do receptor D2, está alterada na hiperalgesia persistente de origem inflamatória

A análise do receptor dopaminérgico D1 por *qPCR* mostrou aumento na expressão do RNAm desses receptores no NAcc dos ratos tratados por 14 dias com PGE₂ na pata quando comparados ao grupo controle, que recebeu salina por 14 dias (Figura 30).

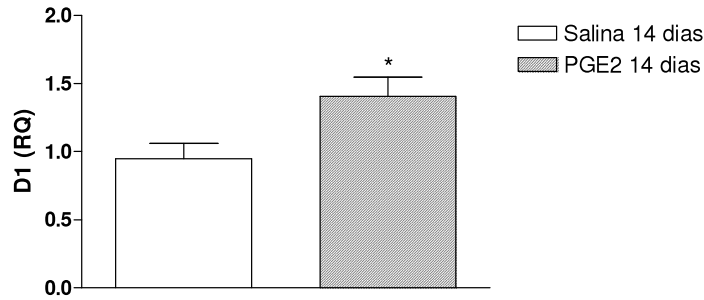


Figura 30. Expressão do RNAm do receptor D1 de dopamina no NAcc de ratos com hiperalgesia persistente induzida pela administração crônica de PGE₂ na pata. O gráfico representa os valores médios de quantificação relativa (RQ) da expressão do receptor D1 dos animais tratados com PGE₂ (100ng/50µl/pata) por 14 dias e animais controles tratados com salina (50µl/pata) relativa à expressão do endógeno GAPDH (n=6 por grupo; Teste T não pareado, *p<0,05).

Na análise quantitativa por *qPCR* do receptor de dopamina D2 não houve diferença quando o grupo com hiperalgesia persistente induzida por PGE₂ foi comparado ao grupo controle, como indicado na figura 31.

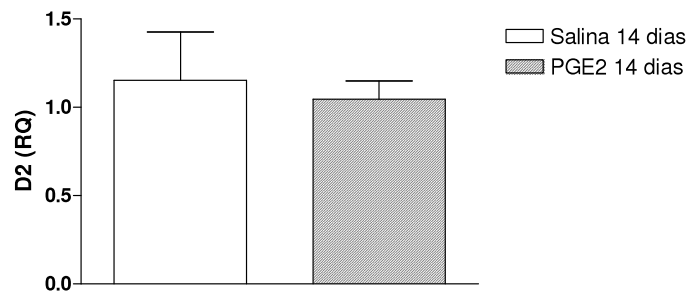


Figura 31. Expressão do RNAm do receptor D2 de dopamina no NAcc de ratos com hiperalgesia persistente induzida pela administração crônica de PGE₂ na pata. O gráfico representa os valores médios de quantificação relativa (RQ) da expressão do receptor D2 dos animais tratados com PGE₂ (100ng/50µl/pata) por 14 dias e animais controles tratados com salina (50µl/pata) relativa à expressão do endógeno GAPDH (n=6 por grupo; Teste T não pareado, p>0,05).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstram o envolvimento da via dopaminérgica do NAcc na modulação da hiperalgesia de origem inflamatória, induzida pela PGE₂ administrada no tecido periférico. Na hiperalgesia aguda, essa modulação é negativa, ou seja, a dopamina atua inibindo a resposta hiperalgésica. No entanto, o papel da dopamina é facilitatório quando se trata da hiperalgesia inflamatória persistente, o que sugere alterações neuroquímicas diferentes no processo fisiopatológico subjacente às condições aguda e crônica.

O NAcc é parte integrante do sistema dopaminérgico mesolímbico classicamente envolvido com mecanismos de prazer, motivação e recompensa, natural ou pelo uso de drogas. Contudo, estudos evidenciam que esse sistema também participa na modulação da dor, atenuando o comportamento nociceptivo quando sua atividade é aumentada (CHUNDLER e DONG, 1995; ALTIER e STEWART, 1999; MAGNUSSON e FISHER, 2000; HAGHPARAST et al., 2012) ou levando à hiperalgesia quando a liberação endógena de dopamina é reduzida (SAADE et al., 1997; MAGNUSSON e MARTIN, 2002). Além disso, estudos mostram que estímulos nocivos podem aumentar a liberação de dopamina no NAcc (GAO et al., 2001; SCHMIDT et al., 2002; MARINELLI et al., 2005; BRISCHOUX et al., 2009) o que sugere um papel adaptativo para a dopamina que liberada por estimulação nociva leva a antinocicepção endógena.

Parece não restar dúvidas que a PGE₂ liberada no tecido periférico durante o processo inflamatório induz hiperalgesia, devido à sensibilização dos neurônios

aferentes primários (FERREIRA e NAKAMURA, 1979; KHASAR et al, 1995; CHEN et al., 1999; WOOLF e SALTER, 2000; VILLARREAL et al., 2005; LIN et al., 2006; SACHS et al., 2009; NATURA et al., 2013). Nosso trabalho demonstrou que o aumento de dopamina no NAcc inibe a hiperalgesia inflamatória induzida por PGE₂ no tecido periférico sem alterar o limiar nociceptivo basal. Quando administramos o inibidor da recaptação de dopamina, GBR12909, no NAcc de ratos tratados com PGE₂ na pata, observamos uma analgesia induzida pelo aumento de dopamina. Isso sugere que a dopamina, endogenamente liberada no NAcc, modula o processamento nociceptivo decorrente da sensibilização do tecido periférico. Nesse sentido, o limiar nociceptivo mecânico basal não é alterado pelo aumento de dopamina no NAcc induzido pela administração de GBR12909. Esse fato corrobora o papel adaptativo da transmissão dopaminérgica do NAcc na nocicepção: na presença de um estado tecidual anormal, como inflamação, o SNC lança mão de mecanismos de modulação da dor para propiciar flexibilidade comportamental e assim otimizar a resposta à ameaça. Em contraste, estímulos nociceptivos em tecidos normais requerem reações habituais à ameaça para impedir o dano tecidual (LORENZ, 2003). Nossos dados estão de acordo com outros trabalhos que verificaram o efeito antinociceptivo do aumento de dopamina no NAcc, utilizando o modelo da formalina (FRANKLIN et al., 1989; MORGAN et al., 1991; ALTIER E STEWART, 1998; GAO et al., 2001; TAYLOR et al., 2003) e o teste da capsaicina (dados do nosso laboratório).

Provavelmente o efeito antinociceptivo do aumento de dopamina no NAcc não é mediado pelo receptor D1, visto que, nosso trabalho demonstrou que a administração do antagonista seletivo do receptor D1, SCH23390, no NAcc não foi

capaz de reverter o efeito induzido pela administração imediatamente posterior do inibidor da recaptação de dopamina (GBR12909). Esses resultados estão de acordo com dados da literatura (MAGNUSSON e FISHER, 2000; TAYLOR et al., 2003) e com outros dados do nosso laboratório (teste da capsaicina) que mostram que o receptor D1 não é mediador da ação antinociceptiva da dopamina. Diferentemente, alguns trabalhos relatam que o antagonista de D1 é capaz de prevenir o efeito antinociceptivo do aumento de dopamina induzido por estímulo nocivo (SCHIMDT et al., 2002) ou de atenuar a antinocicepção, no teste da formalina, induzida pela infusão de drogas que aumentam a dopamina no NAcc (ALTIER e STEWART, 1998; HAGHPARAST et al., 2012). Estes trabalhos também utilizaram SCH23390. Uma razão para a diferença entre os resultados poderia estar relacionada às doses utilizadas, já que altas doses do antagonista de D1 induzem sedação e prejuízo motor (NAKAJIMA e WISE, 1987). Em relação ao trabalho de Altier e Stewart (1998), a dose utilizada em nosso trabalho foi 10 vezes maior que a dose que preveniu a antinocicepção no teste da formalina. No entanto, Schimdt (2002) utilizou uma dose maior que a dose que nós utilizamos e obteve uma resposta intacta. Isso descartaria um possível prejuízo motor provocado pela dose de SCH23390 utilizada em nosso trabalho. Outra razão para descartar a possibilidade de alteração motora é que o antagonista de D1 quando administrado no NAcc não produziu, por si só, qualquer alteração na hiperalgesia induzida por PGE₂, avaliada por uma resposta dependente de atividade motora normal. O papel de D1 no efeito antinociceptivo da dopamina, diferentemente de D2, não está bem estabelecido na literatura. De acordo com nossos resultados, além do SCH23390 não alterar a antinocicepção produzida pelo aumento de dopamina no

NAcc, ele não alterou a resposta hiperalgésica da PGE₂, nem favoreceu a hiperalgesia quando uma dose subliminar de PGE₂ foi administrada na pata.

Com relação ao receptor D2, nossos dados mostram que a administração do seu antagonista seletivo, raclopride, foi capaz de bloquear o efeito anti-hiperalgésico proporcionado pelo aumento de dopamina no NAcc pela administração do inibidor de recaptação GBR12909. A mediação do efeito antinociceptivo da dopamina pelo receptor D2 está de acordo com resultados de trabalhos realizados com o modelo da formalina (MORGAN e FRANKLIN, 1991; ALTIER e STEWART, 1998, 1999; TAYLOR et al., 2003; HAGHPARAST et al., 2012), *tail-flick* (HAGHPARAST et al., 2012) e teste da capsaicina (dados do nosso laboratório). Reforçando esses achados, um trabalho realizado com óxido nítrico, um anestésico inalatório amplamente utilizado na clínica, verificou que seu efeito antinociceptivo no teste da formalina é, ao menos em parte, mediado pelos receptores D2 do NAcc (*Shell*) (KOYANAGI et al., 2008).

Além disso, o receptor de dopamina D2 pode estar relacionado ao controle endógeno basal da via nociceptiva, visto que seu bloqueio no NAcc facilitou a resposta hiperalgésica quando a dose subliminar de 30ng de PGE₂ foi administrada na pata. Apesar da dinâmica de liberação e recaptação de dopamina não estar totalmente elucidada, sabe-se que ela é um mensageiro que funciona via “transmissão por volume”, indo além da fenda sináptica e agindo sobre receptores e transportadores extrassinápticos (GARRIS et al., 1994). Há evidências de liberação tônica e fásica de dopamina (SCHULTZ, 2000; WIGHTMAN e ROBINSON, 2002), sendo que a concentração extracelular basal de dopamina

chega a 20nmol/L ou mais, segundo estudos neuroquímicos (ROBINSON et al., 2003). Sendo assim, os receptores de alta afinidade poderiam se manter cronicamente ocupados, como parece ser o caso dos receptores D2 (DUGAST et al., 1997; BERKE e HYMAN, 2000). Uma vez que os receptores de dopamina D2 tem ação antinociceptiva e se mantem ocupados em condição basal, seria plausível propor que seu antagonista, raclopride, bloqueia sua ação basal a favor da hiperalgesia. Assim é possível verificar uma resposta hiperalgésica quando PGE₂ é administrada em uma dose, normalmente, subliminar. O antagonista do receptor de dopamina D2, por si só não alterou a hiperalgesia induzida por PGE₂ (100ng) administrada na pata. Importante, a administração de raclopride no NAcc não alterou o limiar nociceptivo mecânico dos ratos tratados com salina na pata, sugerindo que o receptores D2 do NAcc não estão relacionados à nocicepção mecânica da pata em condição normal.

O receptor D3 é predominantemente expresso em regiões límbicas do cérebro, em especial no NAcc (MISSALE et al., 1998), e os estudos relacionando o receptor D3 e sensibilidade à dor são recentes e escassos na literatura (ZHU et al, 2010; DOWLING et al., 2011). O receptor dopaminérgico D3 faz parte do subgrupo de receptores semelhantes à D2 (*D2-like*), apresentando, portanto, grande semelhança estrutural ao receptor D2 o que torna difícil a seletividade de drogas para D2 e para D3. O próprio raclopride apresenta afinidade por D3, podendo agir sobre esse receptor dependendo da dose utilizada. A administração do antagonista do receptor D3, U99194A (~30 vezes mais seletivo para D3 em relação à D2) no NAcc não alterou a hiperalgesia nem o limiar mecânico dos animais. No entanto, Dowling et al (2011) trabalhando com camundongos *knockout*

para receptor D3, verificaram um aumento da resposta nociceptiva em relação ao controle na segunda fase do teste da formalina - fase inflamatória. No presente trabalho uma facilitação da hiperalgesia pela administração de U99194A não foi verificada, mas, o antagonista de D3 foi capaz de reduzir o efeito anti-hiperalgésico decorrente do aumento de dopamina no NAcc, mostrando que o receptor D3 pode estar envolvido com a inibição da nocicepção. Uma vez que o antagonista do receptor D3, U99194A, é moderadamente seletivo (AUDINOT et al., 1998) e reduziu o efeito do aumento de dopamina no NAcc sobre a hiperalgesia, pode-se sugerir que esse efeito da dopamina é mediado por D2 e D3. Isto é, o bloqueio da resposta hiperalgésica é em parte devido ao receptor D3 e em sua maior parte devido ao receptor D2, visto que U99194A (mais seletivo) foi capaz apenas de reduzir enquanto raclopride (menos seletivo) foi capaz de bloquear o efeito anti-hiperalgésico. Propõe-se que os dois receptores no NAcc possuem ação semelhante sobre a hiperalgesia aguda induzida por PGE₂.

Ainda utilizando o potencial de sensibilização da PGE₂ sobre as fibras nociceptivas, a hiperalgesia inflamatória persistente foi induzida em ratos, replicando o experimento de Ferreira et al. (1990). A administração de PGE₂ na pata por 14 dias foi capaz de induzir hiperalgesia sustentada, medida 7 dias após o término do tratamento periférico. O mesmo não ocorreu quando salina foi injetada na pata durante 14 dias. A redução persistente do limiar mecânico observada nos animais tratados cronicamente com PGE₂ se deve provavelmente a alterações plásticas nas vias neurais envolvidas no processamento da dor (REN e DUBNER, 1999; HAGELBERG et al., 2003; KNYIHÁR e CSILLIK, 2006). Pode-se dizer que mediadores inflamatórios sensibilizam e estimulam continuamente os

nociceptores, e conseqüentemente seus alvos sinápticos centrais, promovendo uma plasticidade mal-adaptativa de longo prazo que resulta na dor persistente (ELLIS e BENNETT et al., 2013). É bom salientar que, mecanismos centrais, especialmente a plasticidade neural, desempenham um importante papel em todas as condições de dor crônica, de origem inflamatória ou neuropática (ELLIS e BENNETT et al., 2013).

A partir disso, verificamos o efeito do aumento de dopamina no NAcc sobre a hiperalgesia persistente. Administrando o inibidor de recaptação de dopamina, GBR12909, no NAcc concomitantemente à PGE₂ periférica por 7 dias, foi observada uma facilitação da hiperalgesia, sendo que o limiar permaneceu reduzido quando avaliado aos 7 e 14 dias após o término do tratamento com PGE₂ e GBR12909. No entanto, quando PGE₂ foi administrada isoladamente ou associada ao veículo intra-NAcc por 7 dias, a redução do limiar mecânico não se manteve, indicando que 7 dias de administração periférica de PGE₂ não são suficientes para induzir hiperalgesia persistente. Portanto, nossos experimentos demonstram que o aumento de dopamina no NAcc, por inibição de sua recaptação, tem um papel facilitatório na hiperalgesia persistente induzida por PGE₂, contrariamente ao que ocorre na hiperalgesia aguda.

Neste sentido, foi demonstrado que a administração sistêmica de anfetamina, droga que aumenta a disponibilidade sináptica de dopamina, reduz o limiar mecânico em camundongos (ZHU et al., 2010). Essa sensibilização ocorreu ao longo de 21 dias de tratamento com anfetamina e foi independente da manipulação farmacológica periférica. Em nosso trabalho, no entanto, o limiar mecânico das patas que não estavam sensibilizadas por PGE₂ não foi alterado,

apesar do aumento de dopamina no NAcc. Semelhante ao que aconteceu na hiperalgesia mecânica aguda, quando administramos o inibidor da recaptação de dopamina no NAcc, não há qualquer alteração do limiar mecânico da pata tratada com salina. Isso sugere que a dopamina, endogenamente liberada no NAcc, modula apenas o processamento nociceptivo que ocorre durante a sensibilização do tecido periférico. A via de administração é uma possível explicação para a diferença na alteração do limiar mecânico relatada nos dois trabalhos. Na administração sistêmica de anfetamina, o aumento de dopamina acontece de forma generalizada, em todas as regiões do SNC onde a transmissão dopaminérgica acontece. Enquanto no nosso trabalho o aumento de dopamina ficou restrito ao NAcc. A administração local da droga evita a ocorrência de respostas comportamentais inespecíficas que muitas vezes levam a uma interpretação equivocada do comportamento observado.

Estudos realizados em humanos com dor crônica, como fibromialgia e dor orofacial, fazem correlação entre disfunção na neurotransmissão dopaminérgica do estriado e hiperalgesia persistente (JAASKELAINEN et al., 2001; WOOD, 2004; HAGELBERG et al., 2003 e 2004; WOOD et al., 2007). No entanto, os resultados desses estudos são incongruentes. Jaaskelainen et al. (2001) e Hagelberg et al. (2003) sugerem que pacientes com dor orofacial apresentam um reduzido tônus dopaminérgico o que contribui para suscetibilidade à dor crônica. Por outro lado, Wood et al. (2007) relatam que pacientes com fibromialgia apresentam um aumentado tônus dopaminérgico basal. Corroborando o dado de que um aumento de dopamina facilitaria o desenvolvimento da hiperalgesia persistente, o trabalho de Austin et al. (2010), utilizando um modelo de dor neuropática em ratos, sugere

um aumentado nível de dopamina no NAcc dos animais com dor. No entanto, permanece a questão: se o aumento de dopamina é determinado pela dor ou é o determinante da dor. Apesar do presente trabalho demonstrar que o aumento de dopamina no NAcc favorece o estabelecimento da hiperalgesia persistente, não podemos afirmar que, em condições normais, sem intervenção farmacológica, esse aumento aconteça e seja determinante da cronificação. É importante considerar que o aumento experimentalmente provocado e sustentado de dopamina pode levar a alterações plásticas na via dopaminérgica do NAcc semelhantes àsquelas responsáveis pelo desenvolvimento da hiperalgesia persistente.

Com relação aos receptores de dopamina envolvidos no estabelecimento da hiperalgesia persistente, nossos resultados mostraram que os antagonistas de D1 e de D2, mas não o de D3, interferiram na redução persistente do limiar mecânico. Nossos dados comportamentais sugerem que a ativação contínua do receptor D1 é necessária no processo de indução da hiperalgesia persistente, uma vez que seu antagonista, SCH23390, administrado por 7 dias do período de indução, foi capaz de impedir a redução persistente do limiar mecânico. Essa ação pró-nociceptiva já foi descrita para o receptor D1 em outra região encefálica, o córtex insular anterior (COFFEEN et al., 2008). Além disso, ratos com hiperalgesia persistente instalada apresentaram um aumento na expressão de RNAm do receptor D1 no NAcc, como verificado por *qPCR*, sugerindo, a princípio, a participação de D1 na manutenção da hiperalgesia e indicando um papel pró-nociceptivo. No entanto, análises da proteína por *Western blotting* e imunofluorescência não sustentam esse resultado. A falta de correlação entre os resultados da análise de RNAm e da proteína pode ser explicada de duas formas.

Considerando que ocorrem alterações pós transcricionais, um aumento na expressão de RNAm não significa necessariamente um aumento na expressão da proteína. Isso nos leva a concluir que não houve aumento da densidade de receptor D1 funcional. Contudo, fica a questão: porque existe um aumento na expressão de RNAm após o tratamento crônico para indução da hiperalgesia sem que haja uma alteração funcional relacionada aos receptores? Uma explicação plausível é que ocorreu o aumento da proteína, mas, este não foi detectado pelas técnicas utilizadas em nosso trabalho. Visto que existe uma ampla distribuição do receptor de dopamina D1 no NAcc e que os neurônios envolvidos na hiperalgesia representam uma pequena fração da população neuronal dessa estrutura (BRISCHOUX et al., 2009), a diferença na densidade do receptor seria muito sutil, a ponto de não ser detectada por *Western blotting* ou imunofluorescência, mas passível de ser detectada por uma técnica mais sensível como o *qPCR* em tempo real. Para essas análises, utilizamos o NAcc como um todo. É digno de nota que para a análise por *Western blotting*, as amostras foram constituídas pelo NAcc dos lados direito e esquerdo e, além disso, não houve separação das subregiões, *core* e *shell*. Isso pode ter dificultado a detecção de um possível aumento da proteína, caso este tenha ocorrido. Austin et al. (2010) mostraram alteração na expressão do receptor D2 no NAcc por *Western blotting*, contudo, analisaram os NAcc do lado direito e esquerdo separadamente, o que favoreceu a detecção da diferença na expressão da proteína.

Nossos dados também mostraram que o antagonista de D2, raclopride, não permitiu a instalação da hiperalgesia persistente, avaliada uma semana após o período de indução com PGE₂. Esse achado parece intrigante: considerando que o

receptor D2 apresenta ação antinociceptiva (TAYLOR et al., 2003; KOYANAGI et al., 2008; HAGHPARAST et al., 2012), seu bloqueio facilitaria e não inibiria o desenvolvimento da hiperalgesia. No entanto, existem relatos de uma regulação negativa (*down regulation*) da densidade de receptores D1 quando antagonistas de receptores D2 são utilizados (LIDOW et al., 1997). Portanto, o prejuízo no estabelecimento da hiperalgesia persistente pela administração de raclopride pode ser resultado de uma redução da sinalização via receptor D1 e não do bloqueio efetivo do receptor D2. De acordo com nossos resultados moleculares - imunofluorescência, *Western blotting* e *qPCR* - os níveis do receptor D2 não se apresentam alterados no NAcc de animais com hiperalgesia persistente estabelecida. Diferentemente, Austin et al. (2010), trabalhando com dor neuropática, modelo de constrição do nervo ciático, relataram alterações na expressão dos receptores D2 no NAcc, que variou de acordo com o lado e subregião analisados.

Nossos resultados demonstram o envolvimento da via dopaminérgica do NAcc na modulação da hiperalgesia aguda e no desenvolvimento da hiperalgesia persistente de origem inflamatória, mediada pela administração crônica de PGE₂ no tecido periférico. Sugerem que a ativação dessa via é necessária, através de receptores dopaminérgicos D1, para a redução persistente do limiar mecânico. É importante ressaltar que o NAcc é uma estrutura límbica e está envolvido com o processamento das emoções. Manipulando essa estrutura em ratos, não podemos deixar de considerar também alterações afetivas que podem influenciar a resposta de dor apresentada. Além disso, a própria hiperalgesia persistente instalada pode contribuir para uma alteração da percepção da dor pelo animal. Permanece a

questão se as alterações do limiar nociceptivo observadas na hiperalgesia persistente, a partir da manipulação da via dopaminérgica do NAcc, são resultantes unicamente da alteração na modulação da via sensorial estimulada e/ou também da alteração na percepção da dor pelo animal. Finalmente, nosso trabalho indica que a neurotransmissão dopaminérgica no NAcc representa um alvo fisiologicamente relevante para a compreensão e tratamento da hiperalgesia crônica, embora detalhes relacionados à disfunção da transmissão dopaminérgica na cronificação necessitem ser esclarecidos.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra o envolvimento da via dopaminérgica do NAcc na modulação da hiperalgesia aguda e no desenvolvimento da hiperalgesia persistente de origem inflamatória, sugerindo que a neurotransmissão dopaminérgica no NAcc representa um alvo fisiologicamente relevante para a compreensão e tratamento da dor.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAJ, V.; GUO, C.; NIE, D. Non-steroid anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and cancer. *Cell&Biosc*, v. 8(3), 13p., 2013
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res*, v. 1000, p. 40-46, 2004
- ALTIER, N.; STEWART, J. Dopamine receptor antagonists in the Nucleus Accumbens attenuate analgesia induced by ventral tegmental area substance P or morphine and by Nucleus Accumbens amphetamine. *J Pharm Exp Therap*, v. 285(1), p. 208-215, 1998
- ALTIER, N.; STEWART, J. The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia. *Life Science*, v. 65(22), p. 2269-2287, 1999
- ANDERSON, S. M.; SCHMIDT, H. D.; PIERCE, R. C. Administration of the D2 dopamine receptor antagonist sulpiride into the shell, but not core, of the nucleus accumbens attenuates cocaine priming-induced reinstatement of drug seeking. *Neuropsychoph*, v. 31(7), p. 1452-1461, 2006
- ARALDI, D. *O Papel da Interleucina-1 β Produzida no Gânglio da Raiz Dorsal no Desenvolvimento da Hiperalgisia Inflamatória*. 79p., Tese de Doutorado, IB-Unicamp, Campinas, 2012
- AUDINOT, V.; NEWMAN-TANCREDI, A.; GOBERT, A.; RIVET, J. M.; BROCCO, M.; LEJEUNE, F.; GLUCK, L.; DESPOSTE, I.; BERVOETS, K.; DEKEYNE, A.; MILAN, M. J. A comparative in vitro and in vivo pharmacological characterization of the novel dopamine D3 receptor antagonists (+)-S 14297, nafadotride, GR 103,691 and U 99194. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 287(1), p. 187-197, 1998
- AUSTIN, P. J.; BEYER, K.; BEMBRICK, A. L.; KEAY, K. A. Pheripheral nerve injury differentially regulates dopaminergic pathways in the Nucleus Accumbens of rats with either "pain alone" or "pain disability". *Neurosci*, v.171, p.396-343, 2010
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci*, v. 7, p. 309-338, 1984
- BASBAUM A. I.; JESSEL, T. M. The Perception of Pain. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. *Principles of Neural Science*, Estados Unidos da América: MacGraw-Hill, 4ª ed., 2000, p. 472-491
- BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J Comp Neurol*, v. 277(2), p. 302-312, 1988
- BECERRA, L., BREITER, H. C., WISE, R., GONZALEZ, G. Reward circuitry activation by noxious thermal stimuli. *Neuron*, v. 32, p. 927-946, 2001
- BERKE, J. D.; HYMAN, S. E. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, v. 25, p.515-532, 2000
- BERNARD, J. F.; BESSON J. M. The spino(trigemino)pontoamygdaloid payhway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J Neurophysiol*, v. 63(3), p. 473-490, 1990
- BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev*, v. 67(1), p. 67-186, 1987
- BOIE, Y.; STOCCO, R.; SAWYER, N.; SLIPETZ, D. M.; UNGRIN, M. D.; NEUSCHAFER-RUBE, F.; PUSCHEL, G. P.; METTERS, K. M.; ABRAMOVITZ, M. Molecular cloning and characterization of

the four rat prostaglandin E₂ prostanoid receptor subtypes. *Eur J Pharmac*, v. 304, p. 227-241, 1997

BRENNEIS, C.; KISTNER, K.; PUOPOLO, M.; SEGAL, D.; ROBERSON, D.; SISIGNANO, M.; LABOCHA, S.; FERREIRO, N.; STROMINGER, A.; COBOS, E. J.; GHASEMLOU, N.; GEISSLINGER, G.; REEH, P. W.; BEAN, B. P.; WOOLF, C. J. Phenotyping the function of TRPV1-expressing sensory neurons by targeted axonal silencing. *J Neurosci*, v. 33(1), p. 315-326, 2013

BRISCHOUX, F.; CHAKRABORTY, S.; BRIERLEV, D. I.; UNGLESS, M. A. Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *PNAS*, v. 106 (12), p. 4894-4899, 2009

BTESH, J.; FISCHER, M. J. M.; STOTT, K.; McNAUGHTON, P. A. Mapping the binding site of TRPV1 on AKAP79: Implications for inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci*, v. 33(21), p. 9184-9193, 2013

BURSTEIN R.; CLIFFER, K. D.; GIESLER, G. J. JR. Direct somatosensory projections from the spinal cord to the hypothalamus and telencephalon. *J Neurosci*, v. 7(12), p. 4159-4164, 1987

CALVINO, B.; GRILO, R.M. Central pain control. *Joint Bone Spine*, v. 73, p. 10-16, 2006

CHAUDHRI, N.; SAHUQUE, L. L.; JANAK, P. H. Ethanol seeking triggered by environmental contextis attenuated by blocking dopamine D1 receptors in the nucleus accumbens core and shell in rats. *Psychopharmac*, v. 207, p. 303-314, 2009

CHEN, X.; TANNER, K.; LEVINE, J. D. Mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors by prostaglandin E₂ in the rat. *Neurosci Lett*, v. 267, p. 105-108, 1999

CHUDLER, E. H.; DONG, W. K. The role of the basal ganglia in nociception and pain. *Pain*, v. 60(1), p. 3-38, 1995

COFFEEN, U.; LOPEZ-AVILA, A.; ORTEGA-LEGASPI, J. M.; DEL ANGEL, R.; LOPEZ-MUNOZ, F.; PELLICER, F. Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate long-term nociception in the rat. *Eur J Pain*, v. 12, p. 535-543, 2008

CRAIG, A. D. In: J.-M. BESSON, J.-M.; GUILDBAUD, G.; OLLAT, H. *Forebrain Areas Involved in Pain Processing*. Eds. Eurotext, Paris, 1995, p.13-25

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. JR; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res*, v. 37(3), p.401-407, 2004

DAVIES, P.; BAILEY, P. J.; GOLDENBERG, M. M. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Ann Rev Immunol*, v. 2, p. 335-357, 1984

DOWLING, P.; KLINKER, F.; STADELMANN, C.; HASAN, K.; PAULUS, W.; LIEBETANZ, D. Dopamine D3 Receptor Specifically Modulates Motor and Sensory Symptoms in Iron-Deficient Mice. *J Neurosci*, v. 31(1), p. 70-77, 2011

DUGAST, C.; BRUN, P.; SOTTY, F.; RENAUD, B.; SUAUD-CHAGNY, M. F. On the involvement of a tonic dopamine D2-autoinhibition in the regulation of pulse-to-pulse-evoked dopamine release in the rat striatum in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 355, p.716-719, 1997

ELLIS, A. e BENNETT, D. L. H. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *British J Anaesth*, v. 111(1), p. 26-37, 2013

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. I. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandins*, v. 18(2), p.179-190, 1979

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; DE CAMPOS, D.I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. *Pain*, v. 42(3), p.365-371, 1990

- FIELDS, H. L. State-dependent opioid control of pain. **Nature**, v. 5, p. 565-575, 2004
- FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I.; HEINRICHER M. M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMAHON, S., KOLTZENBURG, M. **Textbook of Pain**. Burlington, MA, USA: Elsevier Health Sciences; 5^a ed, 2005, p.125–142
- FRANKLIN, K .B. Analgesia and the neural substrate of reward. **Neurosci Biobehav Rev**, v.13, p.149–154, 1989
- GAO, X.; ZHANG, Y-Q.; ZHANG, L-M.; WU, G-C. Effects of intraplantar injection of carrageenan on central dopamine release. **Brain Res Bull**, v. 54(4), p. 391-394, 2001
- GARRIS, P.A.; CIOLKOWSKI, E.L.; PASTORE, P.; WIGHTMAN, R. M. Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain. **J Neurosci**, v. 14, p.6084–6093, 1994
- GAURIAU, C.; BERNARD, J-F. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. **Exp Physiol**, v. 87(2), p. 251-258, 2001
- GEAR, R.; ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. **J Neurosci**, v. 19(16), p. 7175-7181, 1999
- GOLD, M. S.; GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nature**, v. 16(11), p. 1248-1257, 2010
- HAGELBERG, N.; FORSELL, H.; AALTO, S.; RINNE, J. O.; SCHEININ, H.; TAIMINEN, T.; NAGREN, K.; ESKOLA, O.; JAAKELAINEN, S. K. Altered dopamine D2 receptor binding in atypical facial pain. **Pain**, v. 106, p.43-48, 2003
- HAGELBERG, N.; JAAKELAINEN, S. K.; MARTIKAINEN, I. K.; MANSIKKA, H. ; FORSELL, H.; SCHEININ, H.; HIETALA, J.; PERTOVAARA, A. Striatal dopamine D2 receptors in modulation of pain in humans: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 500, p. 187-192, 2004
- HAGHPARAST, A.; GHALANDARI-SHAMAMI, M.; HASSANPOUR-EZATTI, M. Blockade of D1/D2 dopamine receptors within the Nucleus Accumbens attenuated the antinociceptive effect of cannabinoid receptor agonist in the basolateral amygdala. **Brain Res**, v.1471, p. 23-32, 2012
- HEINRICHER, M. M.; TAVARES, I.; LEITH, J. L.; LUMB, B. M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Res Rev**, v. 60, p. 214-225, 2009
- HUANG, J.; ZHANG, X.; McNAUGHTON, P. A. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. **Curr Neuropharmacol**, v. 4, p. 197-206, 2006
- JAAKELAINEN, S. K.; RINNE, J. O.; FORSELL, H.; TENOVUO, O.; KAASINEN, V.; SONNINEN, P.; BERGMAN, J. Role of the dopaminergic system in chronic pain – a fluorodopa-PET study. **Pain**, v. 90, p.257-260, 2001
- JENSEN, K.; ANDERSEN, H. O.; J. OLESEN; LINDBLOM, U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. **Pain**, v. 25(3), p. 313- 323, 1986
- JU, G.; HOKFELT, T.; BRODIN, E.; FAHRENKRUG, J.; FISCHER, J. A.; FREY, P.; ELDE, R. P.; BROWN, J. C.. Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. **Cell Tissue Res**, v. 247(2), p.417-431, 1987
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p.203-210, 2001

- KAWABATA, A. Prostaglandin E₂ and pain – an update. *Biol Pharm Bull*, v. 34(8), p. 1170-1173, 2011
- KHASAR, S. G.; OUSEPH, A. K.; CHOU, B.; HO, T.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. Is there more than one prostaglandin E receptor subtype mediating hyperalgesia in the rat hindpaw? *Neurosci*, v. 64(4), p. 1161-1165, 1995
- KNYIHÁR, E.; CSILLIK, B. Plasticity of nociception: recent advances in function-oriented structural pain research. *Ideggyogy Sz*, v. 59(3-4), p. 87-97, 2006
- KOYANAGI, S.; HIMUKASHI, S.; SHICHINO, T.; FUKUDA, K. Dopamine D2-like receptor in the Nucleus Accumbens is involved in the antinociceptive effect of nitrous oxide. *Anesth Analg*, v. 106(6), p. 1904-1909, 2008
- KRISHNAN, V.; HAN, M. H.; GRAHAM, D. L.; BERTON, O.; RENTHAL, W.; RUSSO, S. J.; LAPLANT, Q.; GRAHAM, A.; LUTTER, M.; LAGACE, D. C.; GHOSE, S.; REISTER, R.; TANNOUS, P.; GREEN, T. A.; NEVE, R. L.; CHAKRAVARTY, S.; KUMAR, A.; EISCH, A. J.; SELF, D. W.; LEE, F. S.; TAMMINGA, C. A.; COOPER, D. C.; GERSHENFELD, H. K.; NESTLER, E. J. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, v. 131(2), p. 391-404, 2007
- LEGLER, D. F.; BRUCKNER, M.; ALLMEN, E. U.; KRAUSE, P. Prostaglandin E₂ at new glance: Novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *Intern J Biochem Cell Biol*, v. 42, p. 198-201, 2010
- LIDOW, M. S.; ELSWORTH, J. D.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Down-regulation of the D1 and D5 dopamine receptors in the primate prefrontal cortex by chronic treatment with antipsychotic drugs. *J Pharm Exp Therap*, v.281, p.597-603, 1997
- LIN, C-R.; AMAYA, F.; BARRET, L.; WANG, H.; TAKADA, J.; SAMAD, T.; WOOLF, C. J. Prostaglandin E₂ receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 319(3), p. 1096-1103, 2006
- LOBO, M. K.; COVINGTON, H. E. 3rd.; CHAUDHURY, D.; FRIEDMAN, A. K.; SUN, H.; DAMEZ-WERNO, D.; DIETZ, D. M.; ZAMAN, S.; KOO, J. W.; KENNEDY, P. J.; MOUZON, E.; MOGRI, M.; NEVE, R. L.; DEISSEROTH, K.; HAN, M. H.; NESTLER, E. J. Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science*, v. 330(6002), p. 385-90, 2010
- LORENZ, J.; MINOSHIMA, S.; CASEY, K. L. Keeping pain out of mind: the role of the dorsolateral prefrontal cortex in pain modulation. *Brain*, v. 126, p. 1079-1091, 2003
- MAGNUSSON, J. E.; FISHER, K. The involvement of dopamine in nociception: the role of D(1) and D(2) receptors in the dorsolateral striatum. *Brain Res*, v. 855(2), p. 260-266, 2000
- MAGNUSSON, J. E.; MARTIN, R. V. Additional evidence for the involvement of the basal ganglia in formalin-induced nociception: the role of the nucleus accumbens. *Brain Res*, v. 942(1-2), p. 128-132, 2002
- MARINELLI, S.; PASCUCCI, T.; BERNARDI, G.; PUGLISI-ALLEGRA, S.; MERCURI, N. B. Activation of TRPV1 in the VTA excites dopaminergic neurons and increased chemical- and noxious-induced dopamine release in the Nucleus Accumbens. *Neuropsychopharmac*, v. 30, p. 864-870, 2005
- MASON, P. Medullary circuits for nociceptive modulation. *Curr Opin Neurobiol*, v.22, p. 640-645, 2012
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Progr Neurobiology*, v. 57, p. 1-164, 1999

- MISSALE, C.; NASH, S.R.; ROBINSON, S.W.; JABER, M.; CARON, M.G. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol Rev**, v. 78(1), p. 189-225, 1998
- MORGAN, M. J.; FRANKLIN, K.B. Dopamine receptor subtypes and formalin test analgesia. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 40, p.317-322, 1991
- MURASE, A.; OKUMURA, T.; SAKAKIBARA, A.; TONAI-KACHI, H.; NAKAO, K.; TAKADA, J. Effect of prostanoid EP4 receptor antagonist, CJ-042, 794, in rat models of pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*, v. 580, p. 116-121, 2008
- NAKAJIMA, S.; WISE, R.A. Heroin self-administration in the rat suppressed by SCH23390. **Soc Neurosci Abstr**, v. 13, p. 1545, 1987
- NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiol Rev**, v. 79(4), p. 1193-1226, 1999
- NATURA, G.; BAR, K-J.; EITNER, A.; BOETTGER, M. K.; RICHTER, F.; HENSELLEK, S.; EBERSBERGER, A.; LEUCHTWEIS, J.; MARUYAMA, T.; HOFMANN, G. O.; HALBHUBER, K-J.; SCHAIKLE, H-G. Neuronal prostaglandin E₂ receptor subtype EP3 mediates antinociception during inflammation. **PNAS**, Early edition, p. 1-6, jul 2013
- NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol Psychiat**, v. 59, p.1151-1159, 2006
- NETO, F. L.; SCHADRACK, J.; ABLEITNER, A.; CASTRO-LOPES, J. M.; BARTENSTEIN, P.; ZIEGLGÄNSBERGER, W.; TÖLLE T. R. Supraspinal metabolic activity changes in the rat during adjuvant monoarthritis. **Neuroscience**, v. 94(2), p. 607-621, 1999
- NICOL, G. D.; CUI M. Enhancement by prostaglandin E₂ of bradykinin activation of embryonic rat sensory neurons. **J Physiol**, v. 480(3), p. 485-492, 1994
- OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central Modulation of pain. **J Clin Invest**, v.120(11), p. 3779-3787, 2010
- PARADA, C. A.; YEH, J. J.; REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Transient attenuation of protein kinase C epsilon can terminate a chronic hyperalgesia state in the rat. **Neurosci**, v. 120(1), p. 219-226, 2003
- PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature**, v. 8, p. 55-68, 2009
- PAXINOS, G.; WATSON, C. (1986) **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Academic Press, Orlando, Florida
- PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychoph**, v. 33(1), p. 88-109, 2008
- PORRECA, F.; OSSIPOV, M. H., GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci**, v. 25, 319-325, 2002
- PRADO, W. A. Medicamentos analgésicos de ação central. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo: Ateneu, p. 175-195, 1999
- PRICE, D. D., **Psychological Mechanisms of Pain and Analgesia** (I.A.S.P. Press, Seattle, WA, 1999)
- PRICE D. D. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. **Science**, v. 288, p.1769-1772, 2000

- RADCLIFFE, R. A.; ERWIN, V. G. Alterations in locomotor activity after microinjections of GBR-12909, selective dopamine antagonists or neurotensin into the medial prefrontal cortex. **J Pharm Exp Therap**, v. 277(3), p. 1467-1476, 1996
- RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. **Curr Opin Neurobiol**, v.12, p. 195-204, 2002
- REN, K.; DUBNER, R. Central nervous system plasticity and persistent pain. **J Orofac Pain**, v. 13, p. 155-163, discussion 164-171, 1999
- REN, K.; DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. **Pain**, v.100, p. 1-6, 2002
- ROBINSON, D. L.; VENTON, B. J.; HEIEN, M. L. A. V.; WIGHTMAN, R. M. Detecting subsecond dopamine release with fast-scan cyclic voltammetry in vivo. **Clin Chemistry**, v. 49(10), p. 1763-1773, 2003
- ROMERO-CALVO, I.; OCÓN, B.; MARTÍNEZ-MOYA, P.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal Biochem**, v. 401(2), p.318-320, 2010
- SAADÉ, N. E.; ATWETH S. F.; BAHUTH, N. B.; JABBUR S. J Augmentation of nociceptive reflexes and chronic deafferentation pain by chemical lesions of either dopaminergic terminals or midbrain dopaminergic neurons. **Brain Res**, v. 751(1), p. 1-12, 1997
- SACHS, D.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. **Pain**, v. 96 (1-2), p. 89-97, 2002
- SACHS, D.; VILLARREAL, C.; CUNHA, F.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S.H. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. **Br J Pharmacol**, v.156(5), p.826-834, 2009
- SAURER, T. B.; JAMES, S. G.; LYSLE, D. T. Evidence for the Nucleus Accumbens as a neural substrate of heroin-induced immune alterations. **J Pharm Exp Therap**, v. 329(3), p. 1040–1047, 2009
- SCHMIDT, B.L.; TAMBELI, C. H.; GEAR, R.W.; LEVINE, J.D. Nicotine withdrawal hyperalgesia and opioid-mediated analgesia depend on nicotine receptors in nucleus accumbens. **Neuroscience**, v. 106(1), p. 129-136, 2001
- SCHMIDT, B.L.; TAMBELI, C.H.; BARLETTA, J.; LUO, L.; GREEN, P.; LEVINE, J. D.; GEAR, R.W. Altered nucleus accumbens circuitry mediates pain-induced antinociception in morphine-tolerant rats. **J Neurosci**, v. 1:22(15), p. 6773-6780, 2002
- SCHULTZ, W. Predictive reward signal of dopamine neurons. **J Neurophysiol**, v.80, p.1–27,1998
- SMITH, C.H.; J. N. BARKER; R. W. MORRIS; D. M. MACDONALD; T. H. LEE. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. **J Immunol**, v. 151(6), p.3274-3282,1993
- STAMFORD, J. A. Descending control of pain. **Br J Anaesth**, v. 75(2), p. 217-227, 1995
- TAYLOR, B. K.; JOSHI, C.; UPPAL, H. Stimulation of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens inhibits inflammatory pain. **Brain Res**, v. 987(2), p. 135-143, 2003
- TRACEY, D.J.; DE BIASI, S.; PHEND, K.; RUSTIONI, A. Aspartate-like immunoreactivity in primary afferent neurons. **Neuroscience**, v. 40(3), p.673-686, 1991

- TRACEY I., MANTYH P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55(3), p.377–391, 2007
- TREED R. D., KENSHALO D. R., GRACEY R. H., JONES A. K. The cortical representation of pain. **Pain**, v. 79, p.105-111, 1999
- UHELSKI, M. L.; DAVIS, M. A.; FUCHS, P. N. Pain affect in the absence of pain sensation: Evidence of asomaesthesia after somatosensory cortex lesions in the rat. **Pain**, v.153, p. 885-892, 2012
- USIELLO, A.; BAIK, J-H.; ROUGE-PONT, F.; PICETTI, R.; DIERICH, A.; LEMEUR, M.; PIAZZA, P. V.; BORRELLI, E. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. **Nature**, v. 408(9), p. 199-203, 2000
- VAN DONGEN, Y. C.; DENIAU, J. M.; PENNARTZ, C. M.; GALIS –DE GRAAF Y.; VOORN P.; THIERRY, A. M. AND OTHERS Anatomical evidence for direct connections between the shell and core subregions of the rat nucleus accumbens. **Neuroscience**, v. 136, p. 1049-1071, 2005
- VERTES, R. P.; HOOVER, W. B.; RODRIGUEZ, J. J. Projections of the central medial nucleus of the thalamus in the rat: node in cortical, striatal and limbic forebrain circuitry. **Neuroscience**, v. 219, p. 120-126, 2012
- VILLARREAL, C.F.; SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S. H. The role of Na(V)1.8 sodium channel in the maintenance of chronic inflammatory hypernociception. **Neurosci Lett**, v. 386(2), p. 72-77, 2005
- VIVANCOS, G. G.; VERRI, W. A. JR; CUNHA, T. M.; SCHIVO, I. R.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 37(3), p. 391-399, 2004
- VON FREY, M. Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. Bandes der Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königl.**Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften**, v. 23, p.175-266, 1896
- VOORN, P.; VANDERSCHUREN, L. J.; GROENEWEGEN, H. J.; ROBBINS, T. W.; PENNARTZ, C. M. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. **Trends Neurosci**, v. 27, p. 468-474, 2004
- WANG, C.; LI, G-W.; HUANG, L-Y. M. Prostaglandin E2 potentiation of P2X3 receptor mediated currents in dorsal root ganglion neurons. **Molecular Pain**, v. 3(22), 13p, 2007
- WIGHTMAN, R. M.; ROBINSON, D. L. Transient changes in mesolimbic dopamine and their association with reward. **J Neurochem**, v. 82, p.721–735, 2002
- WILLIS, W. D.; WESTHUND, K. D. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J Clin Neurophysiol**, v. 14(1), p. 2-31, 1997
- WILLIS, W. D. The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. **Brain Res Rev**, v. 55, p. 297-313, 2007
- WOOD, P. B. Stress and dopamine: implications for the pathophysiology of chronic widespread pain. **Medical Hypotheses** v. 62, p. 420-424, 2004
- WOOD, P. B.; SCHWEINHARDT, P.; JAEGER, E.; DAGHER, A.; HAKYEMEZ, H.; RABINER, E. A.; BUSHNELL, M. C.; CHIZH, B. A. Fibromyalgia patients show an abnormal dopamine response to pain. **Eur j Neurosc**, v. 25, p.3576-3582, 2007
- WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765-1768, 2000

ZAHM, D. S.; BROG, J. S. On the significance of subterritories in the “accumbens” part of the rat ventral striatum. **Neuroscience**, v. 50, p. 751-767, 1992

ZAHM, D. S. Functional-anatomical implications of the nucleus accumbens core and shell subterritories. **Ann N Y Acad Sci**, v. 877, p. 113-128, 1999

ZAHM D. S. An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptative responding with emphasis on the nucleus accumbens. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24(1), p. 85-105, 2000

ZHANG, J.; XIONG, B.; ZHEN, X.; ZHANG, A. Dopamine D1 receptor ligands: where are we now and where are we going. **Med Res Rev**, v. 29(2), p. 272-294, 2009

ZHU, J.; CHEN, Y.; LAI, J.; DANG, Y.; YAN, C.; XU, M.; CHEN, T. Dopamine D3 receptor regulates basal but not amphetamine-induced changes in pain sensitivity in mice. **Neurosc Lett**, v. 477, p. 134-137, 2010

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16(2), p. 109-110, 1983

Anexo

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

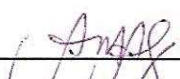
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1767-1, sobre "**Papel dos receptores de dopamina do Núcleo Accumbens na dor crônica de origem inflamatória**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada / Elayne Vieira Dias**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **16 de março de 2009**.

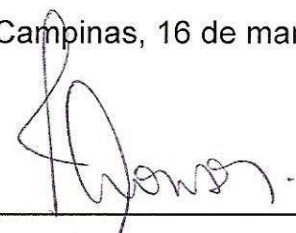
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1767-1, entitled "**Role of Nucleus Accumbens dopamine receptors on chronic inflammatory pain**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **March 16, 2009**.

Campinas, 16 de março de 2009.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva