

Fernanda Bredariol Velhote

**Caracterização da ação da Crotalina
sobre a função de macrófagos
peritoneais de ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni

Versão original

Sao Paulo
2013

RESUMO

VELHOTE, F. B. **Caracterização das ações da Crotalfina sobre função de macrófagos peritoneais de ratos**. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A Crotalfina (CRF) é um peptídeo sintético produzido a partir da sequência do fator analgésico natural isolado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* que induz potente e prolongado efeito antinociceptivo, em modelos de dor aguda e crônica. Este efeito é do tipo opióide, detectado apenas na presença de inflamação ou lesão tecidual, e os mecanismos envolvidos com esta ação não estão totalmente elucidados. Recentes estudos sobre os mecanismos envolvidos com a atividade analgésica relatam a importância da interação de opióides exógenos e endógenos com células imunes para este efeito. Em particular, os macrófagos, células cruciais no controle do desenvolvimento/resolução das reações inflamatórias, vêm sendo apontados como alvos celulares-chave para os efeitos dos diferentes opióides. Neste sentido, a ação da CRF sobre a função dessas células, bem como sobre seus receptores opióides, não foi até o presente momento, investigada. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar a modulação da CRF sobre o comportamento funcional de macrófagos peritoneais residentes (sem estímulo), ou inflamatórios (estimulados *in vitro* com LPS) de ratos e a importância de receptores opióides nestas ações. Os resultados apontam que a CRF inibe a capacidade de fagocitose, liberação de H₂O₂ e produção de NO[•] por macrófagos residentes e inflamatórios. Ainda, foi observado estimulação da secreção de IL-1 β , modulação da secreção de IL-6 (estimulada em macrófagos residentes e inibida em macrófagos inflamatórios) e inibição da secreção de TNF- α , sendo esta independentemente do estado em que se encontram os macrófagos. Ensaios experimentais, por *western blotting* e ELISA, demonstraram que macrófagos apresentam expressão e ativação de receptores opióides, sendo preferencialmente receptores κ , seguido de μ e δ , em macrófagos residentes, e receptores μ , seguido por receptores κ e δ , em macrófagos inflamatórios. Foi também observado que quando incubados com a CRF, macrófagos residentes apresentam expressão e ativação, preferencialmente, de receptores μ , seguido por κ e δ , enquanto que macrófagos inflamatórios apresentam receptores κ , seguido por μ e δ . Antagonistas não seletivo e seletivos de receptores opióides bloquearam as ações da CRF, mostrando que este peptídeo apresenta ação modulatória mediada por receptores tipo opióide. Assim, esses dados demonstram, pela primeira vez, a modulação da CRF sobre a função de macrófagos residentes e inflamatórios, o que pode contribuir para ação analgésica descrita para este peptídeo.

Palavras chave: Crotalfina. Macrófagos. Receptores opióides. Inflamação.

ABSTRACT

VELHOTE, F. B. **Characterization of Crotalphine actions on function of rat macrophages**. 2013. 118 p. Ph. D. thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Crotalphine (CRF), a peptide isolated from the venom of South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* venom, induces potent opioid effect and antinociceptive activity in models of acute and chronic pain. This effect is detected in the presence of tissue injury or inflammation. The mechanisms involved in this action are not fully elucidated. Studies involved in the analgesic activity report the importance of the interaction of exogenous and endogenous opioids in immune cells. Macrophages have been identified as targets for the effects of opioids. This study aimed to characterize the effect of CRF on the macrophages functions and the involvement of opioid receptors in these actions. CRF inhibited phagocytosis, release of H_2O_2 and $NO\bullet$ production by resident and elicited macrophages. Also stimulated the secretion of IL- 1β and modulates the secretion of IL-6 (stimulated in resident macrophages and inhibited in elicited macrophages) and inhibited the secretion of TNF- α , regardless of the state of macrophage activation. *Western blotting* and ELISA demonstrated that resident macrophages present expression and activation κ receptors, followed by μ and δ receptors. Already, elicited macrophages express μ receptors, followed by κ and δ receptor. When incubated with CRF, resident macrophages showed expression and activation preferentially μ receptor, followed by κ and γ receptors. Elicited macrophages showed expression and activation κ receptors, followed by μ and γ receptors. Non-selective and selective antagonists opioid receptors blocked the actions of CRF, indicating that this peptide has modulatory effect mediated by opioid receptor.

Keywords : Crotalphine. Macrophages. Opioid receptors. Inflammation.

INTRODUÇÃO

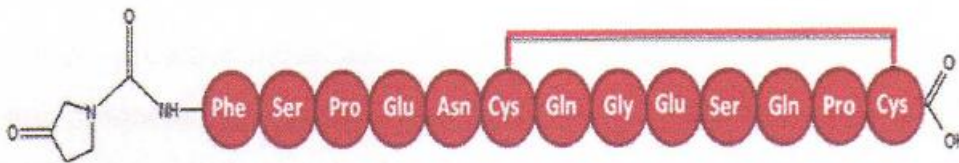
A administração farmacológica de analgésicos opiáceos, bem como a liberação de opióides endógenos, modulam os mecanismos fundamentais envolvidos com a restauração do equilíbrio homeostático durante a inflamação. A administração de opióides afeta tanto a imunidade inata como a adaptativa e, *in vivo* depende, também, do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal e do sistema nervoso simpático na contra-regulação das alterações hemodinâmicas e bioquímicas, sistemas amplamente estudados. Por outro lado, a compreensão do impacto de opióides sobre as alterações hemodinâmicas e sobre a resposta inflamatória, em particular sobre as células do sistema imune, envolvidas nestas desordens não está completamente elucidada. Uma das formas de ação dos opióides sobre a resposta imune inata e adaptativa ocorre diretamente, por meio da sua interação com os receptores opióides presentes na superfície das células do sistema imune. A ativação de receptores opióides ocorre como resposta natural à diferentes desordens, tais como injúria traumática, intervenções cirúrgicas ou sepse resultando na ativação das respostas neuroendócrina e opiácea, que têm como objetivo restaurar a hemodinâmica e a homeostasia bioquímica. A atividade imunomodulatória *in vivo* e *in vitro* de opióides vem sendo grande objetivo de diferentes pesquisas nos últimos anos que buscam elucidar alvos celulares e moleculares dos opióides no sistema imune. Neste presente trabalho, os estudos foram concentrados na investigação da interação direta da Crotalfina, um peptídeo opióide, com potente ação analgésica, derivado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, sobre a função de macrófagos, células cruciais na defesa imunológica contra agentes patogênicos e no controle do desenvolvimento/resolução das reações inflamatória.

1.1 Crotalfina

A crotalfina (CRF) é um peptídeo sintético produzido a partir da sequência do fator analgésico natural isolado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, popularmente conhecida como cascavel (GUTIERREZ et al., 2008). Este peptídeo possui massa molecular de 1534,6 g/mol e sequência de aminoácido (<E F S P E N

C Q G E S Q P C>), idêntica à cadeia γ da crotapotina, a subunidade não tóxica, não enzimática e acídica da crotoxina, principal neurotoxina presente no veneno crotálico (AIRD et al., 1990; BON et al., 1989) (**Figura 1**).

Figura 1- Seqüência de aminoácidos da Crotalfina.



É descrito para esse peptídeo potente e prolongado efeito antinociceptivo em modelos experimentais de dor aguda e crônica (BRIGATTE et al., 2007; GUTIERREZ et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2012). Em modelo de hiperalgesia mecânica induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂), em ratos, a CRF, administrada sistemicamente e em baixas concentrações (0,008 a 0,2 μ g/kg), acarreta ação antinociceptiva (KONNO et al., 2008). Este efeito é observado, também, em modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina e em modelos de dor crônica, como a dor neuropática, induzida por constrição crônica do nervo isquiático de ratos (GUTIERREZ et al., 2008).

Embora a estrutura química não se assemelhe com nenhum peptídeo opióide conhecido, os estudos indicam que a CRF apresenta efeito antinociceptivo do tipo opióide. Esta sugestão está baseada nos resultados experimentais que mostraram a reversão do efeito antinociceptivo da CRF por antagonistas seletivos de receptores opióides do tipo κ (*kappa*) e δ (*delta*) (GUTIERREZ et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2012; KONNO et al., 2008). Ainda, receptores canabinóides (CB1 e CB2), que apresentam grande interação molecular com os receptores opióides, participam do efeito analgésico da CRF demonstrado em modelo inflamatório agudo, induzido por carragenina e PGE₂ (MACHADO et al., 2010).

Quando administrado perifericamente, na vigência de sensibilização por PGE₂

ou constrição do nervo isquiático de ratos, este peptídeo, da mesma maneira que os agonistas opióides, altera o estado conformacional dos receptores opióides presentes no gânglio da raiz dorsal (DRG) e no nervo safeno isolado da pata de ratos, indicando a ativação desses receptores (ZAMBELLI, 2011). Adicionalmente, a CRF ativa a via das MAP quinases (ERK1/2 e JNK) em neurônios do DRG, evento dependente da pré-sensibilização com PGE₂, da ativação do receptor opióide tipo κ e da proteína quinase C ζ (ZAMBELLI, 2011).

É importante salientar que este peptídeo é efetivo em induzir antinocicepção em modelo de dor de origem neoplásica, avaliado no modelo de tumor de pata, acarretado pela injeção intraplantar de células do tumor de Walker 256 (BRIGATTE et al., 2007) e pela injeção dessas células tumorais em fêmur de ratos (GUTIERREZ, 2013). Nestes modelos, a CRF administrada por via oral, induz antinocicepção também de longa duração (2 dias), mediada pela ativação de receptores opióides do tipo κ e δ periféricos (BRIGATTE et al., 2013; GUTIERREZ, 2012).

Diferentemente dos fármacos opióides disponíveis na clínica, como a morfina, a CRF destaca-se pela ausência do desenvolvimento de tolerância ao efeito nociceptivo, após o uso prolongado (GUTIERREZ et al., 2008) além de não induzir o desenvolvimento de hiperalgesia tardia e alterações da atividade motora (GUTIERREZ et al., 2008).

Por outro lado, a CRF apresenta característica comum aos fármacos opióides: seu efeito periférico, de longa duração, é detectado apenas na presença de inflamação ou lesão tecidual. Estes achados corroboram aos dados da literatura que demonstram que os fármacos opióides possuem eficácia aumentada na vigência de inflamação (STEIN; LANG, 2009), decorrentes do aumento da expressão de receptores opióides, tanto em nervos periféricos, como em DRG e na medula espinhal (CAHILL et al., 2003; ZAMBELLI et al., 2011). Ainda, em relação aos estudos sobre os mecanismos envolvidos com a atividade analgésica, mais recentemente vem sendo descrita a importância da interação de opióides exógenos e endógenos com células imunes para este efeito. A atividade secretória e funcional de células do sistema imune é mediada pela interação direta desses opióides com os seus receptores presentes na membrana desses leucócitos que passam a secretar peptídeos opióides na vigência da resposta inflamatória. Neste sentido, a

ação da CRF sobre a função dessas células, bem como sobre os receptores opióides expressos por elas, não foi até o presente momento, investigada.

1.2 Receptores Opióides – Estrutura e Função

Cinco tipos diferentes de receptores opióides: *mu* (μ) ou MOR, *delta* (δ) ou DOR, *kappa* (κ) ou KOR, *sigma* (ζ) e *epsilon* (ϵ), foram descritos, sendo que os três primeiros são os receptores responsáveis pelo efeito analgésico dos opióides. Estudos comprovaram a existência de diversos subtipos de receptores dentro de cada tipo, sendo eles: para MOR: μ_1 , μ_2 ; KOR κ_1 , κ_2 , κ_3 e DOR δ_1 , δ_2 . Os receptores opióides são os responsáveis por mediar os efeitos fisiológicos dos fármacos opióides e dos opióides endógenos, incluindo comportamento da dor e analgesia, estresse, tolerância e dependência, aprendizado, atividade sexual e secreção de hormônios, estado de humor, função gastrointestinal, renal, hepática e respiratória, controle da termorregulação e respostas imunológicas (ERFANPARAST et al., 2010; KATSUNG, 2003; SILVA, 2006). Sabe-se que receptores tipo μ estão envolvidos diretamente nos efeitos analgésicos e por alguns dos mais importantes efeitos colaterais (depressão respiratória, euforia, dependência física e sedação), enquanto que receptor tipo κ podem mediar os efeitos sedativos dos opióides, podendo contribuir um pouco para a analgesia. Já os receptores δ contribuem fortemente para a analgesia central.

Os três principais tipos de receptores opióides (μ , κ e δ) são encontrados em altas concentrações no SNC sendo muito observado no corno dorsal da medula espinhal (lâminas I e II), núcleo trigêmeo medular, tálamo, hipotálamo, substância periaquedutal cinzenta, núcleos da rafe, região ventral superior do bulbo e da ponte e *locus coeruleus*. São encontrados receptores também em neurônios de transmissão da dor na medula espinhal e nos aferentes primários que transmitem a mensagem da dor. Estudos demonstraram a presença desses receptores também em células do sistema imune (CHUANG et al., 1995).

Receptores opióides são pertencentes a família dos receptores de membranas acoplados a proteína G (GPCRs) e apresentam um segmento N-terminal extracelular, 7 domínios transmembrânicos, 3 alças extracelulares e intracelulares, além de possuírem uma extensa homologia estrutural devido ao alinhamento das sequências primárias de aminoácidos (ZHANG et al., 2005). Por serem GPCRs,

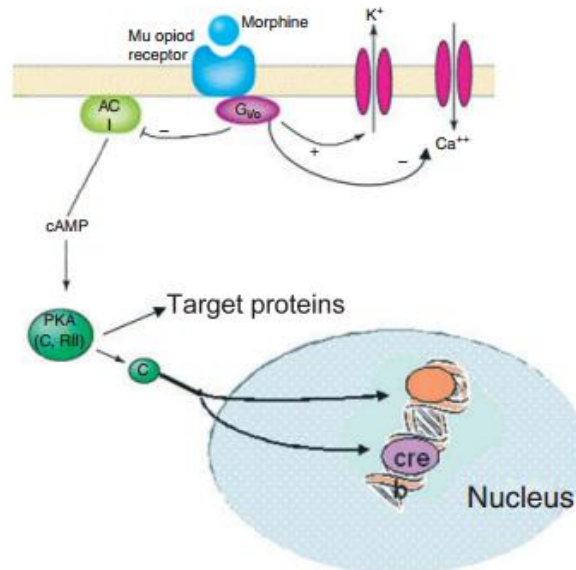
estes receptores compartilham características em comum com outros receptores desta mesma família, como por exemplo, alterações conformacionais quando estes são ativados por agonistas específicos (CHATURVED et al., 2000).

Da mesma maneira que outros GPCRs, os receptores opióides agem não apenas como monômeros, mas também por meio da formação de complexos heteroméricos e homoméricos com outros subtipos de receptores opióides e outros GPCPs, formando novos receptores com novas propriedades farmacológicas (van RIJIN et al., 2010). A importância da expressão e formação de dímeros na modulação da função imune é foco de estudos recentes (NINKOVIC; ROY, 2013).

Receptores opióides pertencem à classe A (rodopsina, μ , κ , δ), família de receptores acoplados à proteína Gi/Go com um domínio N-terminal extracelular com sete domínios transmembrânicos helicoidal ligados por três domínios extracelulares e três domínios intracelulares, bem como uma cauda C-terminal intracelular. Sete hélices transmembrânicas dos receptores opióides são dispostos sequencialmente de uma forma anti-horário, para formar um feixe helicoidal, juntamente com domínios extracelulares do receptor, isto proporciona uma interface dinâmica para a ligação de vários ligantes opióides. A homologia entre os receptores é cerca de 60%, sendo a maior homologia nas hélices transmembrânicas e a maior diversidade nos seus N e C terminais (NINKOVIC; ROY, 2013). A proteína G é composta por três subunidades: α , β e γ , sendo a subunidade α ligada ao nucleotídeo difosfato de guanosina (GDP). Quando há a ligação de um agonista a estes receptores, ocorrem alterações conformacionais, promovendo a troca de GDT pelo trifosfato de guanosina (GTP), acarretando a dissociação do trímero em subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$. Essas subunidades, por sua vez, podem associar-se com outros efetores, tais como canais iônicos ou enzimas, auxiliando em suas funções biológicas. Em relação aos receptores opióides, a subunidade $G\alpha_i$ inibe a enzima Adenilil-ciclase, responsável pela redução da produção do monofosfato de adenosina (AMPc). Sua redução leva à diminuição da liberação de neurotransmissores por reduzir a atividade da via AMPc e proteína quinase A (PKA) (**Figura 2**). Em decorrência, os opióides reduzem a excitabilidade celular por promover hiperpolarização da membrana pela ativação da condutância do potássio e inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Esses eventos são mediados pela subunidade $G\beta\gamma$ da proteína G (MOLINA, 2006; NESTLER, 2001).

Ainda, a ativação de receptores opióides ocorre como resposta natural à diferentes desordens, tais como injúria traumática, intervenções cirúrgicas ou sepse resultando na ativação das respostas neuroendócrina e opiácea, que têm como objetivo restaurar a hemodinâmica e a homeostasia bioquímica.

Figura 2 - Efeitos mediados por opióides.



Opióides endógenos e análogos de opiáceos administrados farmacologicamente ligam-se a receptores acoplados à proteína $G_{\gamma/o}$, levando à inibição Adenilil-ciclase (AC), níveis reduzidos de atividade da proteína quinase A (PKA) e diminuiu da fosforilação de proteínas alvo. Além disso, a ativação do receptor pela ligação de opióides leva ao aumento da condutância de canais de K^+ e diminuição no influxo de Ca^{++} por meio do canal de Ca -tipo-L. Os opióides exercem seus efeitos em múltiplos alvos centrais e periféricos, produzindo depressão respiratória, analgesia, efeito inotrópico negativo e imunossupressão. cAMP: monofosfato de adenosina cíclico; C: da subunidade catalítica; RII: subunidade reguladora.

Fonte: Molina (2006)

1.3 Opióides Exógenos e Endógenos

1.3.1 Opióides Exógenos

Dos opióides exógeno, a morfina é o principal alcaloide de ópio e o mais extensivamente estudado. A primeira síntese completa da molécula foi realizada em 1952, por GATES e TSCHUDI (GYLBERT L, 1973¹ apud NINKOVIC; ROY, 2013).

¹ Gylbert, L. The Crystal and molecular structure of morphine hydrochloride trihydrate. Acta Crystallographica. 1973; Section B 29(8): 1630-1635.

Sua estrutura geral consiste em dois planos, sendo que o primeiro plano contém um anel de benzeno, um anel de óxido, e um anel carboxílico, enquanto que o segundo plano contém um anel carbocíclico, um anel de etenamina, oxigênio e nitrogênio (GYLBERT, 1973). A morfina é hidrofílica e metabolizada pela mucosa intestinal e fígado em morfina-3-glucuronídeo (M3G, 70%), morfina-6-glucuronídeo (M6G, 10%) e em sulfatos conjugados. Embora M3G é o metabólito mais comum (responsável por 50% dos metabólitos produzidos), não exercem nenhuma atividade biológica quando se ligam a MOR. Por outro lado, a M6G, embora menos frequente (representando 10% dos metabólitos produzidos), pode induzir efeito analgésico por ligação ao MOR (DAHAN et al., 2008). Em relação às ações da morfina sobre as células do sistema imune, diferentes estudos *in vitro* têm demonstrado que este alcaloide ligando-se a seus receptores opióides presentes na membrana de diferentes leucócitos (BRYANT et al., 1988a,b, 1991; EISENSTEIN; HILBURGER, 1998), acarretando efeitos supressores, mediados principalmente pelos MOR (BORNER et al., 2008; GAVERIAUX-RUFF et al., 1998). Outros opióides exógenos, tais como a fetanil e a metadona, com propriedade lipofílica e com atividade analgésica até 100 vezes mais potente que a morfina apresentam ações imunomodulatórias, principalmente sobre a atividade secretória de macrófagos, com a importante participação dos receptores opióides (FILIPCZACK-BRYNIARSKA et al., 2012).

1.3.2 Peptídeos Opióides

A descoberta dos opióides endógenos se deu no início da década de 70 por cientistas que buscavam “algo a mais” na caracterização e no mecanismo de sinalização de neurotransmissores no SNC. São três as principais famílias de opióides endógenos: *Enkefalinas*, *Dinorfinas* e *Endorfinas*, onde cada família deriva-se de uma molécula precursora diferente e com característica de distribuição anatômica também distinta, sendo geralmente encontrados em áreas associadas aos sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos, noradrenérgicos e substância P, tais como SNC, glândulas endócrinas como hipófise e adrenal, trato digestivo e outros tecidos (VALLE; OLIVEIRA FILHO, 1996). São elas as *pró-enkefalina*, *pró-dinorfina* e *pró-opiomelanocortina* (POMC), no qual são codificadas, clivadas e

processadas em três genes distintos, resultando na síntese de encefalinas, dinorfinas e endorfinas, respectivamente.

O principal produto da clivagem da POMC é a Beta Endorfina, que embora contenha a sequência de Met-encefalina em sua extremidade amino-terminal, não pode ser convertida a esse peptídeo. Entretanto, a POMC também é capaz de codificar peptídeos não opióides como o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), hormônio melanócito estimulante (MSH-) e o hormônio pituitário lipotrófico (LPH), uma vez que estes fazem parte de sua sequência estrutural.

Já, as pró-encefalinas codificam as diversas formas de encefalinas (Met ou Leu), incluindo duas formas estendidas de Met-encefalinas (a heptapeptídica e a octapeptídica) e a forma única de Leu-encefalina. Vale a pena citar que, as Met-encefalinas e as Leu-encefalinas se diferenciam pela cadeia estrutural, sendo leucina o último aminoácido que compõe a cadeia da Leu-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-**Leu**) e metionina o último que compõe a Met-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-**Met**).

As pró-dinorfinas são moléculas precursoras capazes de codificar três peptídeos opióides com cadeias peptídicas iniciais semelhantes a sequência da Leu-encefalina, diferenciando-se no tamanho (tridecapeptídeo) e na composição estrutural (CARVALHO;VIANA, 1998). São elas a dinorfina A, dinorfina B e a neoendorfina.

Os peptídeos opióides compartilham a sequência do amino-terminal comuns de Tyr-Gly-Gly - Phe – (Met ou Leu), que tem sido chamado como *motif* opióides, que representam a sequência mínima de ativação para os receptores opióides (COX; MULLER,1995) . Assim, cada peptídeo opióides é composto por uma região *motif* seguido por várias cadeias aminoácidos na porção C-terminal (GAVAN; HUDA, 2002; MAO, 1990).

O processo de síntese dos opióides endógenos apresenta-se similar a síntese de qualquer outra proteína, no qual cada respectivo DNA é codificado por um RNA mensageiro e encaminhado aos ribossomos onde são produzidas e sintetizadas as moléculas pró-precursoras do respectivo opióides endógeno. Após este processo, a molécula é encaminhada para o complexo de Golgi, onde é estocada e armazenada em forma de grânulos, aguardando estímulo para a clivagem enzimática e conversão do opióides endógeno (MAINS; EIPPE,1999).

As endorfinas foram descobertas em 1975 e são as principais representantes da classe dos opióides endógenos. Compostas por sequências polipeptídicas, são

produtos da clivagem da POMC (AKIL et al., 1984), se sub dividindo, principalmente, em quatro tipos : α endorfina, β endorfina, γ endorfina e σ endorfina, que se diferenciam no número (entre 16 -31) e nos tipos de aminoácidos compostos em sua cadeia estrutural. Sua denominação se origina das palavras *endo* (interno) e *morfina* (analgésico), sendo a β -endorfina sua principal representante. Produzida principalmente pelo hipotálamo e glândula hipófise anterior, a β -endorfina possui um efeito analgésico potente superior ao da morfina, circulando na forma livre como um terminal de 31 aminoácidos em sua cadeia polipeptídica, possuindo alta afinidade por receptores tipo μ e δ , não exercendo qualquer efeito em κ (NINKOVIC; ROY, 2013). As encefalinas compõem uma classe de opióides endógenos provindos da molécula de pro-encefalina e estão envolvidos principalmente na regulação do mecanismo nociceptivo. Podem ser encontradas, como anteriormente descrito, em duas formas: Leu encefalinas e Met-encefalinas, que se diferenciam de acordo com o ultimo aminoácido da porção N- terminal (leucina para leu encefalinas ou metionina para Met-encefalinas). Já as dinorfinas são sintetizadas a partir da proteína precursora prodinorfina em diversos peptídeos ativos, sendo os três principais: a dinorfina A, dinorfina B e neoendorfina (NINKOVIC; ROY, 2013).

Os primeiros estudos realizados nas décadas de 1970 e 1980, concluíram que a produção de opióides endógenos era limitada às células do sistema nervoso. Descobertas recentes demonstraram que todos os peptídeos opióides também são encontrados em leucócitos. As endorfinas são processadas a partir da POMC, processo que ocorre no retículo endoplasmático e na nas redes *trans*-Golgi e foram estudadas mais extensivamente por (RITTNER et al., 2005). A β -endorfina, POMC e todas as enzimas de processadoras foram localizados em leucócitos no sangue e no tecido inflamado de ratos (MOUSA et al., 2004). Portanto, os leucócitos podem processar POMC em β -endorfina funcionalmente ativa. Além disso, met-encefalina, dinorfina e endorfinas também são detectáveis nos leucócitos de tecidos inflamados. Algumas células imunes que contém opióide identificados até o momento são: os linfócitos T e B, granulócitos e monócitos/macrófagos (CABOT et al., 1997; MOUSA et al., 2001; PRZEWLOCKI et al., 1992; RITTNER et al., 2001).

Alcaloides opióides e peptídeos, tais como a morfina e peptídeos opióides endógenos modulam, diretamente, a função de leucócitos. Em particular, os macrófagos, células cruciais na defesa imunológica contra agentes patogênicos e

no controle do desenvolvimento/resolução das reações inflamatória, vêm sendo apontados como alvos celulares-chave para os efeitos supressores desses opióides.

1.4 Macrófagos – Características Gerais

O macrófago foi descrito por Metchnikoff (1905) no final do século dezenove, como uma célula com capacidade fagocitária. Somente a partir dos estudos de McCleskey e colaboradores (1970), a atividade secretora desta célula adquiriu importância.

Ontogeneticamente, o macrófago deriva do saco vitelínico (MOORE; METCALF, 1970) e, no homem adulto, da medula óssea (van FURTH, 1989), a partir da célula precursora para macrófagos e neutrófilos, a CFU-GM (colony-forming unit, granulocyte-macrophage) (METCALF, 1971). A primeira célula da linhagem macrofágica na medula óssea é o monoblasto, ainda pouco diferenciado e cuja divisão dá origem aos pró-monócitos que, ao contrário do seu precursor, já apresentam capacidade de pinocitose e expressam receptores característicos de macrófagos (van FURTH; DIESSELHOFF-DULK, 1970; van FURTH et al., 1980).

O pró-monócito, ao dividir-se, dá origem aos monócitos, que permanecem na medula óssea por aproximadamente 24 horas, encaminhando-se então, para a corrente sanguínea, na forma de monócitos circulantes, que permanecem na circulação por cerca de 70 horas no homem (WHITELAW, 1966) e 25 horas no camundongo (van FURTH; CONH, 1968). Uma vez na circulação, o monócito migra para diferentes tecidos e cavidades do organismo, diferenciando-se em macrófago, de acordo com o tecido e sua função. Nestes tecidos e cavidades, o macrófago permanece como célula residente, com pequena atividade funcional. A baixa capacidade de espraiamento, fagocitose e de secreção basal de determinados produtos, tais como, lisozima, proteinases neutras e ácidas e espécies reativas do oxigênio, confere a esta célula fraca capacidade microbicida e fungicida (CONH, 1978; TAKEMURA; WERB, 1984).

O macrófago residente permanece no órgão ou cavidade para o qual migrou por alguns meses (van FURTH; CONH, 1968) e é considerada célula terminal, sem capacidade de proliferação (GORDON, 1986), embora em algumas ocasiões, tal

fenômeno tenha sido observado, como em macrófagos alveolares (TARLING et al., 1987).

Durante o processo inflamatório, ocorre aumento do número de monócitos circulantes e da sua produção na medula óssea (METCALF, 1971), assim como redução no tempo de permanência dos mesmos na circulação, uma vez que há migração destas células para o foco da lesão (van FURTH et al., 1973). No sítio inflamatório, o monócito, agora denominado macrófago, passa por um processo de ativação, definido como a aquisição de competência para executar uma tarefa complexa (ADAMS; HAMILTON, 1984). Exemplos de funções complexas incluem quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, lise de parasitas intracelulares, capacidade de morte tumoral. Esta ativação envolve diferentes estágios (COHN, 1978; GORDON, 1986; NATHAN, 1987; WERB et al., 1986) e inclui a) *macrófagos inflamatórios*, com elevada capacidade secretória, de espraiamento e de fagocitose (GORDON, 1995); b) *macrófagos ativados*, com baixa atividade secretória, porém com marcada capacidade de produção de metabólitos reativos de oxigênio e de óxido nítrico, importantes para sua ação tumoricida e microbicida (ADAMS; HAMILTON, 1984; JORENS et al., 1995).

Os macrófagos têm grande atividade secretória, que inclui mais de cem substâncias biologicamente ativas, tais como enzimas, proteínas plasmáticas, hormônios, substâncias que regulam a função e crescimento de outras células (interleucinas, collagenases, ativador do plasminogênio, prostaglandinas E₁ e E₂, fibronectina, componentes do sistema complemento, eritropoetina, interferons, entre outras) (NATHAN, 1987; RAPPOLEE; WERB, 1988; TAKEMURA; WERB, 1984). A secreção destas substâncias determina a multifuncionalidade dos macrófagos e a sua participação em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, entre esses, a hematopoiese, hemostasia, inflamação, resposta imune, cicatrização, controle do desenvolvimento tumoral, destruição de microorganismos (TAPPER, 1996).

Além do seu papel efetor e fundamental na imunidade inata, os macrófagos mobilizam linfócitos para a elaboração da resposta celular específica/antígeno (GORDON, 1998), e podem alterar a resposta imunológica por meio da sua estimulação por diversos meios, entre eles a produção de citocinas e produtos microbianos (TAYLOR et al., 2005).

Os macrófagos, como participantes da resposta inflamatória, estão sujeitos às modulações características deste processo, que incluem a sua regulação por

meio de modificação do comportamento hormonal (GARCIA LEME, 1989). Por efeitos diretos ou indiretos, os hormônios alteram a resposta inflamatória modificando o perfil celular, através de interação com receptores, promovendo alterações relacionadas à função e metabolismo destas células. Durante o processo inflamatório é observado o aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, resultando no aumento das concentrações plasmáticas de alguns hormônios, entre eles o adrenocorticotrófico (ACTH), cortisol e do peptídeo opióides, β -endorfina. Esta observação motivou a investigação da possível relação entre estes peptídeos opióides e a atividade do sistema imune (MADDEN; FELTEN, 1995), hipotetizando, de fato, que os opióides endógenos poderiam modular a atividade destas células. Sabe-se que monócitos e macrófagos são modulados por opióides exógenos e endógenos, secretam moléculas opioidérgicas (FLIERL et al., 2008) e que possuem receptores opióides do tipo μ , κ e δ (GEIN et al., 2007; RODA et al., 1996).

1.4.1 Macrófagos e modulação opióide

É bem descrito que opiáceos e peptídeos opióides modulam as respostas imune e inflamatória (JANKOVIÉ; MARIÉ, 1994; KASTIN, 2001; McCARTHY et al., 2001; ROY; LOH, 1996; WALKER et al., 1997) Essa modulação pode ocorrer de forma indireta, por meio das vias neuroendócrina e neural (ADMSON; WINDH, 1991; McCARTHY et al., 2001; ROY; LOH, 1996; VACCARINO; KASTIN, 2001; WALKER et al., 1997) ou por ação direta mediada por receptores presentes na superfície das células imune/inflamatória (EISENSTEIN; HILBURGER, 1998; HOUSE et al., 1996; KAMPHIUS et al., 1998; SHARP et al., 1998).

Experimentalmente, estudos *in vivo* demonstraram a ação supressora da morfina sobre funções de macrófagos peritoneais, tais como a quimiotaxia, fagocitose e o metabolismo oxidativo (PEREZ-CASTRILLON et al., 1992). A administração de antagonistas reverteu essa ação, mostrando o envolvimento de receptores opióides clássicos nestes efeitos (ROJAVIN et al., 1993). Estudos *in vitro* comprovaram a ação supressora direta da morfina sobre a função de macrófagos, que, da mesma maneira que observado para os estudos *in vivo*, envolvem a participação dos receptores opióides (ROY et al., 1998a; SZABO et al., 1993; TOMASSINI et al., 2004). De fato, a ativação de receptores opióides em

macrófagos pode atingir diversas vias de sinalização intracelulares, resultando na mudança da atividade funcional dessas células (MAKMAN et al., 1998). Inicialmente, e de forma mais extensiva, a ação da morfina sobre a função de macrófagos foi demonstrada, tanto em ensaios *in vivo*, como *in vitro*. Mais recentemente, outros opióides exógenos foram avaliados nestes diferentes ensaios, demonstrando efeitos modulatórios distintos e divergentes aos encontrados para morfina (FILIPCZAC-BRYNIARSKA et al., 2012), evidenciando que a ação de opióides sobre o sistema imune é complexa e que não pode ser explicada por um único mecanismo.

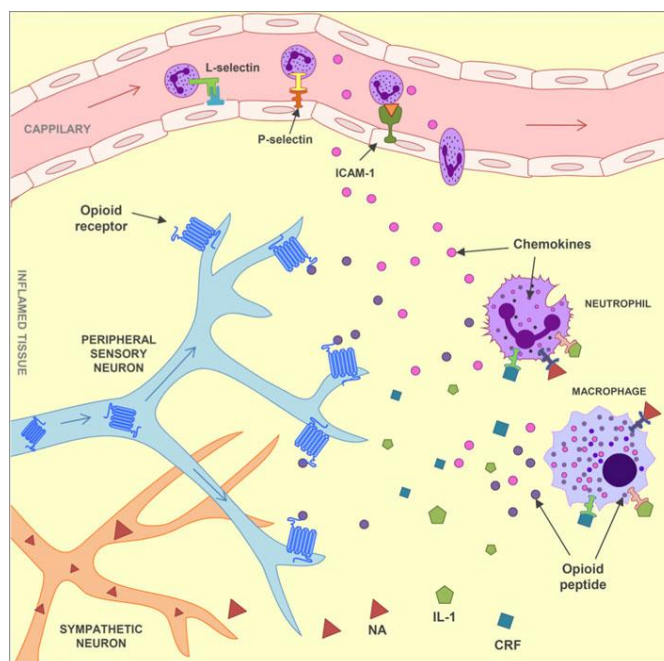
Peptídeos opióides endógenos, tais como Leu- e Met-encefalina (agonistas de receptor δ) são capazes de inibir a fagocitose de hemácias de ovelhas opsonizadas por macrófagos, demonstrado em estudos *in vitro* (CASELLAS et al., 1991). Grimm e colaboradores (1998b) mostraram significativa diminuição da capacidade de quimiotaxia por macrófagos, quando essas células foram pré-incubadas com morfina ou met-encefalina. Esses autores concluíram que esta inibição é decorrente da ligação ao MOR em macrófagos, e subsequente fosforilação e dessensibilização de receptores de quimiocinas, tais como CCR1, CCR2, CXCR1 e CXCR2, tornando-os incapazes de responder aos seus ligantes. Além disso, a Met-encefalina, *in vitro*, pode determinar diminuição ou aumento da liberação de metabólitos do oxigênio de macrófagos peritoneais obtidos de ratos *Wistar*, conforme a concentração do estímulo utilizado para eliciar estes macrófagos (STANOJEVIC et al., 2008). Ainda, a modulação deste peptídeo opióide sobre esta função depende da interação funcional dos diferentes tipos e subtipos de receptores opióides (STANOJEVIC et al., 2008).

Macrófagos expressam todas as vias necessárias para regular a síntese, processamento e liberação de peptídeos opióides, que por sua vez, podem agir de maneira autócrina ou parácrina (MOUSA et al., 2004; SARAIVA et al., 1998). Portanto, além de serem modulados pelos peptídeos endógenos, macrófagos apresentam peptídeos opióides, tais como a β -endorfina, estocados em grânulos secretores, dispostos na periferia da célula, pronto para serem excitados.

Na gênese da resposta inflamatória, os leucócitos migram para o local de infecção e, em conjunto com as células residentes, secretam várias quimiocinas, tais como CXCL8, CXCL1 e citocinas que levam a hiperalgesia (KRAUS, 2009). As citocinas, por sua vez, são mediadores liberados, tipicamente, por células do

sistema imune, sendo potentes reguladores da expressão gênica de receptor opióide, particularmente, MOR, evidenciando a participação desses mediadores como uma importante base molecular na interação entre os sistemas imune e neural (KRAUS, 2009). Na fase de resolução da resposta, macrófagos e os linfócitos secretam IL-4, IL-10 e IL-13, inibitórias das vias hiperalgésicas em diferentes estágios e levando à analgesia. Ainda, os leucócitos podem libertar os peptídeos opióides sequêcia estimulação do fator liberador de corticotropina (CRF) e IL-1 β , bem como derivados do neurônio simpático que podem agir em seus respectivos receptores em leucócitos para libertar os peptídeos opióides, que podem modular a função de diferentes leucócitos, bem como podem ligar-se a receptores opióides, na periferia dos nociceptores, levando à ação analgésica (**Figura 3**). Ainda, peptídeos endógenos liberados por células imune e peptídeos exógenos interagem de modo aditivo ou sinérgico, prevenindo ou revertendo as ações de múltiplos estímulos inflamatórios.

Figura 3 - Produção local de peptídeos opióides



Os leucócitos migrados para o tecido inflamatório podem ser estimulados pelo fator liberador de corticotropina (CRF), interleucina-1 β (IL-1) e/ou a noradrenalina (NA) que, por sua vez, estimulam a liberação de opióides por ativação dos seus respectivos receptores encontrados na superfície dos leucócitos. Os opióides liberados ligam-se a receptores opióides dos nociceptores periféricos, diminuindo a excitabilidade desses neurônios e acarretando analgesia.

Fonte: Ninković e Roy (2013)

Experimentalmente, em modelos *in vivo* e *in vitro* pode-se modificar o estado funcional e secretório de macrófagos pela administração de LPS, aumentando a liberação e produção de H₂O₂ e NO, respectivamente, e de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-6 e o TNF- α (BALOG et al., 2001; MAROTTI et al., 1998). Esta ação estimulatória é suprimida pela morfina (ROY et al., 1998b) e por peptídeos opióides, como as endorfinas (BALOG et al., 2010). O óxido nítrico, *per se*, pode regular a liberação de citocinas em decorrência da ação inibitória sobre a ativação transcricional do NF κ B (MATTHEWS et al., 1996; PARK et al., 1997). Citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α e a IL-1 induzem a transcrição de receptores opióides tipo μ , acompanhada pela ativação da via do NF κ B (KRAUS et al., 2003). Adicionalmente, estudos recentes demonstraram que a estimulação de macrófagos pelo LPS leva à ativação de receptores *Toll like* (TLRs), aumentando a translocação do NF κ B, levando ao aumento da expressão dos TLRs. Nestas condições, opióides, como a morfina e peptídeos opióides endógenos exercem seus efeitos inibitórios via ativação de MOR, que por sua vez, inibe a expressão de TLR4, evidenciando novos mecanismos envolvidos nas ações imunossupressoras dos opióides (FRANCHI et al., 2012).

Apesar dos diferentes estudos realizados para a compreensão dos efeitos dos opióides endógenos e exógenos sobre a resposta imune, a relevância dessas ações para a modulação da resposta inflamatória e da transmissão dolorosa não está completamente elucidado. Além do mais, a ação inibitória de opióides sobre a liberação de citocinas e quimiocinas pode reduzir os sinais inflamatórios e reduzir potencialmente a dor, por agirem em nociceptores e DRG, o que torna importante a caracterização dos efeitos de substâncias opióides sobre o sistema imune.

* * *

Como assinalado na Introdução, é bem descrito que opiáceos e opióides endógenos modulam as respostas imune e inflamatória de forma indireta, por vias neuronal ou neuroendócrina, ou de forma direta, no qual células imune/inflamatórias sintetizam e secretam opióides endógenos e ativam seus receptores opióides para autoregulação. Dentre essas células, estão os macrófagos, que possuem uma alta capacidade secretora e participação fundamental no primeiro mecanismo de defesa do organismo.

Recentemente foi caracterizada, a partir do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, a Crotalfina (CRF), um peptídeo com atividade analgésica, cujos estudos experimentais demonstraram que este peptídeo induz uma potente atividade antinociceptiva em diferentes modelos de dor. É interessante ressaltar que a CRF exerce seus efeitos através da ativação de receptores opióides em células e tecidos, principalmente receptores do tipo κ e δ , e é observada que sua eficiência ocorre apenas na vigência de lesão tecidual/inflamação. Este fato alavanca a hipótese da importância de células do sistema imune na ação analgésica descrita para este peptídeo. Assim, esse estudo demonstrará, pela primeira vez, a modulação da CRF sobre a função de macrófagos quiescentes e inflamatórios.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a CRF modula diferentes funções de macrófagos, conforme o estado de ativação dessas células. Ainda, este peptídeo aumenta a expressão e ativação dos receptores μ , κ e δ , importantes para as ações da CRF sobre as diferentes funções dos macrófagos. Portanto, assim como descrito para morfina e peptídeos opióides, a CRF, um importante peptídeo com ação analgésica pode ser uma molécula regulatória fundamental para as ações sobre o sistema imune e na neuromodulação.

REFERÊNCIAS²

- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 283- 318, 1984.
- ADAMON, W. T et al. Ontogeny of δ - and κ -opiate receptor control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology**, v. 129, p. 956 – 964, 1991.
- AIRD, S. D. et al. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 3, n. 1040, p. 217-224, 1990.
- AKIL, H. et al. Endogenous opioids: biology and function. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 223–255, 1984.
- BALOG, T. et al. Endomorphin-suppressed nitric oxide release from mice peritoneal macrophages. **Neuropeptides**, v. 44, n. 1, p. 25-29, 2010.
- BALOG, T. et al. The effect of methionine-enkephalin on nitric oxide release in mice is age and gender related. **Pharmacol. Res.**, v. 44, p. 287–292, 2001.
- BON, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v. 39, n.4, p. 439-448, 1989.
- BORNER, C. et al. T-cell receptor/CD28-mediated activation of human T lymphocytes induces expression of functional mu-opioid receptors. **Mol. Pharmacol.**, v. 74, p.496 – 504, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248 - 253, 1976.
- BRIGATTE, P. et al. Peripheral kappa and delta opioid receptors are involved in the antinociceptive effect of crotaline in a rat model of cancer pain. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 109, p. 1 - 7, 2013.
- BRIGATTE, P. et al. Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. **J. Pain.**, v. 5, p. 412 - 421, 2007.
- BRYANT, H. U. et al. Morphine pellet-induced immunomodulation in mice: temporal relationships. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 245, p. 913 – 920, 1988a.
- BRYANT, H. U. et al. Role of adrenal cortical activation in the immunosuppressive effects of chronic morphine treatment. **Endocrinology**, v.128, p. 3253–3258, 1991.
- BRYANT, H. U. et al. Morphine-induced immunomodulation is not related to serum morphine concentrations. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 149, p.165 –169, 1988b.

² De acordo:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CABOT, P. J. et al. Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. **J. Clin. Invest.** , v.100, p. 142 – 148, 1997.

CAHILL, C. M. et al. Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. **Pain**, v.101, n.1 - 2, p.199 - 208, 2003.

CARVALHO, W. A.; VIANA, W. Analgésicos opióides. In: SILVA, P (Ed). Farmacologia. 5ª ed, Rio de Janeiro:Editora Guanabara,1998.

CASELLAS, A. M. et al. Inhibition by opioids of phagocytosis in peritoneal macrophages. **Neuropeptides.**, v.18, p. 35 – 40, 1991.

CHATURVEDI, K. et al. mu Opioid receptor: role for the amino terminus as a determinant of ligand binding affinity. **Brain Res. Mol. Brain**, v. 76, n. 1, p. 64 - 72, 2000.

CHUANG, T. K. et al. Mu opioid receptor gene expression in immune cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 216, n. 3, p. 922 - 930,1995.

COHN, Z. A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. **J. Immunol.**v. 121, p. 813 - 816, 1978.

COX, B. M.; MULLER, G. P. Endogenous opioide peptides. In: BECKER, K. L. (Ed.). **Principles and practice of endocrinology and metabolismo.** 2. ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1995. p. 1430 -1457.

DAHAN, A. et al. Morphine-6-glucuronide (M6G) for postoperative pain relief. **Eur. J. Pain.**,v. 12, n. 4, p. 403 - 411, 2008.

DING, A. H. et al. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.

EISENSTEIN, T. K; HILBURGER, M. E. Opioid modulation of immune responses: effects on phagocyte and lymphoid cell populations. **J. Neuroimmunol.**, v. 83, p. 36 – 44, 1998.

FILIPCZAK-BRYNIARSKA, I. et al. The influence of opioids on the humoral and cell-mediated immune responses in mice. The role of macrophages. **Pharmacol. Rep.** v. 64, n. 5, p. 1200 - 1215, 2012.

FRANCHI, S. et al. Mu opioid receptor activation modulates Toll like receptor 4 in murine macrophages. **Brain. Behav. Immun.**, v. 26, n .3, p. 480- 488, 2012.

FLIERL, M. L. et al. Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? **Mol. Med.**,v.14,n. 3 - 4, p. 195 - 204, 2008.

GAVAN, P. M; HUDA, A. Opioid peptides and their receptors: overview and function in pain modulation. In: KENNETH, L.D; Charney, D; Coyle, J.T and Nemeroff, C (Eds). **Neuropsychopharmacology**. The fifth generation of progress. American College of Neuropsychopharmacology, 35 - 46, 2002.

GAVERIAUX, C. et al. Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. **FEBS Lett.**, v. 369 ,p. 272 – 276,1995.

GORDON, S. Biology of the macrophages. **J. Cell. Sci.**, v.4,p. 267 - 286, 1986.

GORDON, S. The macrophage. **Bioessays**., v. 17, p. 977 - 986, 1995.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Res. Immunol.** v. 149, p. 685-688, 1998.

GRIMM, M. C. Opiate inhibition of chemokine-induced chemotaxis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 840, p. 9 – 20, 1998.

GUPTA, A. et al. Conformation state sensitive antibodies to G-protein coupled receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n .8, p. 5116 - 5124, 2006.

GUTIERREZ, V. P. et al. Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 594, n.1 - 3, p. 84 - 92, 2008.

GUTIERREZ, V. P. et al. The peripheral L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP pathway and ATP-sensitive K⁺ channels are involved in the antinociceptive effect of crotalphine on neuropathic pain in rats. **Behav. Pharmacol.**, v. 23,n .1,p .14 - 24, 2012.

GUTIERREZ, V. P. Efeito antinociceptivo da crotalfina sobre a dor óssea induzida pelo tumor de Walker 256 em fêmur de ratos/ Vanessa Pacciari Gutierrez – São Paulo, 2012.

HOUSE, R. V. et. al. A comparative study of immunomodulation produced by in vitro exposure to opioid receptor agonist peptides. **Peptides**, v. 17, p. 175–181, 1996.

JACOBOWITZ, D. M.; O'DONOHUE, T.L.alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. **Proc. Natl.Acad. Sci. USA.**, v. 75, p. 6300 – 6304,1978.

JANKOVIC, B. D; MARIC´, D. Enkephalins as regulators of inflammatory immune reactions. In SCHARRER, M.; SMITH, E.M.; STEPHANO, G.B. (eds). **Neuropeptides and Immunoregulation**. Berlin:Springer, p. 76 –100,1994.

JORENS, P. G. et al. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 4,p. 75 - 89,1995.

KAMPFIUS, S. et al.Role of endogenous pro-enkephalin A-derived peptides in human T cell proliferation and monocyte IL-6 production. **J. Neuroimmunol.**, v. 84, p. 53– 60, 1998.

KONNO, K. et al. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, v. 29,n. 8,p. 1293-1304, 2008.

KRAUS, J. Regulation of mu-opioid receptors by cytokines. **Front. Biosci. (Schol Ed)**.v. 1,p. 164-70, 2009.

KRAUS, J. et al. The role of nuclear factor κ b in tumor necrosis factor regulated transcription of the human l-opioid receptor gene. **Mol. Pharmacol.**, v. 64,p. 876–884, 2003.

KUENG, W. et al. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Anal. Biochem.**, v.182,n.1,p.16-19, 1989.

MACHADO, F. C. et al. CB1 and CB2 cannabinoid receptors are involved in the effect of crotalphine, an opioid-like analgesic peptide. *Memórias do Instituto Butantan*, 67, resumo 12.22, December 2010, XII Annual Scientific Meeting São Paulo, SP – Brazil. ISSN1982-3045.

MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Experimental basis of neural-immune interactions. **Physiol. Rev.**, v. 75,p. 77-106,1995.

MAKMAN ,M. H. et al. Properties of mu 3 opiate alkaloid receptors in macrophages, astrocytes and HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 437,p. 137– 148,1998.

MAO, J. NMDA and opioid receptors: Thiers interaction in antinociception, tolerance and neuroplasticity. **Brain. Res. Reviews**, v. 30,p. 289-304,1990.

MAROTTI, T. et al. The role of cytokines in METenkephalin-modulated nitric oxide release. **Neuropeptides** v. 32,p. 57–62, 1998.

MATTHEW, J. R., et al. Inhibition of NF κ b DNA binding by nitric oxide. **Nucl. Acid. Res.**, v.24, p. 2236–2242, 1996..

McCARTHY, L. et al. Opioids, opioid receptors, and the immune response. **Drug Alcohol. Depend.**,v. 62,p. 111–123, 2001.

METCALF, D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro. **J. Cell. Physiol.**, v. 77,p. 277-280, 1971.

METCHNIKOFF, E. 1905. Apud AUGER & ROSS, 1992.

MOLINA, P. E. Opioids and opiates: analgesia with cardiovascular, haemodynamic and immune implications in critical illness. **J. Intern. Med.**, v .259, n. 2,p. 138-154, 2006.

MOORE, M. A. S.; METCALF, D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. **Br. J. Haematol.**, v. 18,p. 279-296, 1970.

MOUSA, S. A. et al. Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain. **Endocrinology**, v.145,p.1331–1341, 2004.

MOUSA, S. A. et al. b-Endorphin-containing memory-cells and l-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. **J. Neuroimmunol.**, v. 115, p. 71–78, 2001.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p. 319-326, 1987.

NESTLER, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nat Rev Neurosci.**, v.2,n.2,p.119-128, 2001. Review. Erratum in: **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, n.3 ,p. 215, 2001.

NINKOVIC', J.; ROY, S. Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. **Amino Acids**, v. 45 ,n. 1,p. 9-24, 2013.

PARK, S. K., et al. Nitric oxide regulates nitric oxide synthase-2 gene expression by inhibiting NF-kb binding to DNA. **Biochem. J.**, v.322,p. 609–613,1997.

PEREZ-CASTRILLON, J. L, et al. Opioids depress in vitro human monocyte chemotaxis. **Immunopharmacology**, v. 23,p. 57–61, 1992.

PICK, E.; MIZEL, M. Rapid micro assay for the measurement of super oxide and hydrogen peroxide production by macrophages using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Meth.**, v. 46,p. 211-226, 1981.

PRZEWLOCKI, R. et al. Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: functional role in antinociception. **Neuroscience** , v. 48,p. 491– 500, 1992.

RAPPOLEE, D. A. ; WERB, Z. Secretory products of phagocytes. **Curr. Opin. Immunol.**, v.1,p. 47-55, 1988.

RITTNER, H. L. et al. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. **Anesthesiology** , v. 95, p. 500–508, 2001.

RITTNER, H. L. et al. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. **J. Leukoc. Biol.**, v.78, p. 1215–1222, 2005.

RODA, L. G. et al. Positive and negative immunomodulation by opioid peptides. **Int J. Immunopharmac.**, v.18,n.1,p.1-16, 1996.

ROJAVIN, M. Morphine treatment in vitro or in vivo decreases phagocytic functions of murine macrophages. **Life Sci.**, v. 53,p. 997–1006,1993.

ROSENFELD, G. Symptomathology, Pathology and Treatment of snakes bites in South America. In: Bücherl, W and Buckley, E. (eds) **Venomous Animals and Their Venoms**, New York: Academic Press 2, p. 345 - 384, 1971.

ROY, S. et al. MU-opioid receptor-knockout mice: role of mu-opioid receptor in morphine mediated immune functions. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 61, p. 190–194, 1998a.

ROY, S. et al. Morphine accelerates the progression of sepsis in an experimental sepsis model. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 437, p. 21–31, 1998b.

ROY, S.; LOH, H. H. Effects of opioids on the immune system. **Neurochem. Res.**, v.21,p.1375–1386, 1996.

SAMPAIO, S. C. et al. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicol.**, v.47,n.3,p. 313-321, 2006.

SAMPAIO, S. C. et al. *Durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. **J. Leuk. Biol.**, v.7,p. 551-558, 2001.

SAMPAIO, S. C. et al. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicol.**, v. 41,p. 899-907, 2003.

SARAIVA, F. Differential response to a stress stimulus of proenkephalin peptide content in immune cells of naive and chronically stressed rats. **Neuropeptides**, v. 32,p. 351–359, 1998.

SHARP, B. M. et al. Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system. **J. Neuroimmunol.**, v. 83,p. 45–56, 1998.

STANOJEVIC´,S. et al. Methionine-enkephalin modulation of hydrogen peroxide (H₂O₂) release by rat peritoneal macrophages involves different types of opioid receptors. **Neuropeptides**, v. 42,n. 2, p. 147-158 ,2008.

STEIN, C.; LANG, L. J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 9, n. 1, p. 3-8. 2009.

SZABO, I. et al. Suppression of peritoneal macrophage phagocytosis of *Candida albicans* by opioids. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 267,p. 703 – 706,1993.

TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am. J. Physiol.**, v. 246, p. C1-C9, 1984.

TAPPER, H. The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**,v. 59, p. 613-620, 1996.

TARLING, J. D. et al. Self renewal of pulmonary alveolar macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v. 42, p. 443-446, 1987.

TOMASSINI, N. et al. Morphine inhibits Fc-mediated phagocytosis through mu and delta opioid receptors. **J. Neuroimmunol.**, v. 147, p. 131–133, 2004

VACCARINO, A. L.; KASTIN, A. J. Endogenous opiates. **Peptides**, v. 22, p. 2257–2328, 2000.

VALE, L. B.; OLIVEIRA FILHO, R. M. Farmacologia dos opioides. In: _____. **Farmacologia integrada: fundamentos farmacológicos da terapêutica.** Vol II. Rio de Janeiro: Atheneu Editora, 1996.

Van FURTH, R. ; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **J. Exp. Med.**, v.128,p. 415-435, 1968.

Van FURTH, R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. **Curr. Top. Pathol.**, v. 79, p. 125-150, 1989.

Van FURTH, R. et al. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. **J. Exp. Med. Med.**, v. 138, p. 1314-1330, 1973.

Van FURTH, R. et al. Characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes. In: van FURTH, M. N. (Ed.). **Mononuclear phagocytes. Functional aspects.** London: The Hague, 1980.

Van RIJIN, R. M. et al. Opioid-receptor-heteromer-specific trafficking and pharmacology. **Curr, Opin, Pharmacol.**, v.10,n.1,p.73-79, 2010.

WALKER, J. S. et al. The anti-inflammatory effects of opioids: Their possible relevance to the pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatoid Arthritis**, v. 1, p. 291–299, 1997.

WERB, Z. et al. Commitment to expression of metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. **J. Cell Biol.**, v. 102, p. 697-702, 1986.

WHITELAW, D. M. The intravascular lifespan of monocytes. **Blood**, v. 28, p. 445-464, 1966.

ZAMBELLI, V. O. **Avaliação da expressão e ativação de receptores opióides após injúria periférica em ratos.** 2011. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ZHANG, Y. Specific cross-linking of Lys233 and Cys235 in the mu opioid receptor by a reporter affinity label. **Biochemistry**, v. 44 ,n. 7, p- 2271-2275, 2005.