

Vanessa Olzon Zambelli

**Avaliação da expressão e ativação de
receptores opióides após injúria
periférica em ratos**

Tese apresentada ao Programa 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. Yara Cury

Versão Corrigida

Versão original se encontra arquivada no Serviço de Comunicações do ICB

São Paulo
2011

RESUMO

ZAMBELLI, V. O. **Avaliação da expressão e ativação de receptores opióides após injúria periférica em ratos.** 2011. 180 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A crotalfina, um peptídeo inicialmente identificado e isolado do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, induz potente efeito antinociceptivo, em diferentes modelos de dor aguda e crônica. Este efeito é de longa duração e mediado pela ativação de receptores opióides periféricos do tipo κ - (modelo da hipernocicepção induzida pela prostaglandina E_2/PGE_2) ou κ - e δ - (modelo da constrição crônica do nervo isquiático/CCI). Contudo, a eficácia e a longa duração analgésica deste peptídeo são observadas apenas na vigência de lesão tecidual/inflamação. Diversas evidências experimentais tem mostrado que a eficácia antinociceptiva periférica de fármacos opióides é aumentada na presença de lesão tecidual, contudo, os mecanismos envolvidos neste fenômeno não são conhecidos. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar alguns dos mecanismos envolvidos no aumento da eficácia analgésica da crotalfina na vigência de inflamação ou lesão tecidual. Os ensaios experimentais utilizando rt-PCR, *western blotting* e ELISA demonstraram que a injeção de PGE_2 (100 ng/pata) em ratos, aumenta a expressão gênica e protéica de receptores opióides do tipo μ e κ e diminui a expressão de receptores do tipo δ , no gânglio da raiz dorsal (DRG) e nervo da pata (NP), quando comparado com animais *naive*. A CCI aumentou a expressão de receptores opióides do tipo μ no DRG e NP, e do tipo δ , no DRG. Por outro lado, este procedimento reduziu a expressão dos receptores opióides do tipo κ . Apesar das alterações na expressão de receptores opióides, a PGE_2 e CCI, *per se*, não causaram alterações conformacionais no sítio N-terminal destes receptores, indicando que a inflamação ou lesão tecidual não ativam estes receptores. Por outro lado, os agonistas de receptores opióides e a crotalfina acarretaram maior ativação de receptores opióides na vigência de sensibilização pela PGE_2 ou CCI. Estudos de sinalização intracelular demonstraram que a crotalfina adicionada ao meio de cultura de células do DRG, ativa a via das MAP quinases (ERK1/2 e JNK). Contudo, a ativação destas vias de sinalização é detectada apenas na vigência de sensibilização induzida pela pré-incubação destas células com PGE_2 . A ativação das MAP quinases pela crotalfina é dependente de receptores opióides do tipo κ e da proteína quinase $C\zeta$. Estes resultados indicam que a expressão e ativação de receptores opióides periféricos são regulados diferentemente pela presença de injúria aguda ou crônica. As diferenças na expressão dos receptores opióides do tipo κ e δ , na vigência de injúria aguda ou crônica, pode contribuir para a ativação distinta de receptores opióides pela crotalfina, na presença de PGE_2 e CCI.

Palavras chave: Receptores Opióides. Opióides. Crotalfina. Analgesia. Dor. Inflamação.

ABSTRACT

ZAMBELLI, V. O. **Evaluation of expression and activation of opioid receptors after peripheral injury in rats.** 2011. 180 p. Ph.D. thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Crotalphine (CRP), a peptide first identified and isolated from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, induces potent antinociceptive activity, mediated by activation of peripheral κ - (prostaglandin E₂-induced hypernociception) or κ - and δ - (chronic constriction injury of rat sciatic nerve/CCI) opioid receptors. However, the high efficacy and long-lasting activity of this peptide is only observed in the presence of tissue lesion/inflammation. Several data have shown that the peripheral antinociceptive efficacy of opioid drugs is enhanced in the presence of tissue injury, but the mechanisms involved in this phenomenon are not well known. Therefore, this study aimed to characterize some of the mechanisms involved in the increase of the antinociceptive efficacy of CRP caused by inflammation/tissue injury. Studies using rt-PCR, western blotting and ELISA assays demonstrated that intraplantar injection of PGE₂ (100 ng/paw) in rats, increases the genic and proteic expression of μ - and κ -opioid receptors and decreases the expression of δ -opioid receptors in the dorsal root ganglia (DRG) and nerve paw (NP), when compared to naïve rats. CCI up-regulates the expression of μ -opioid receptors in DRG and NP and of δ -opioid receptors in DRG. In contrast, κ -opioid receptors were down-regulated by CCI. Despite these changes in receptor expression, PGE₂ and CCI, *per se*, did not cause receptor conformational changes, characteristic of activation, indicating that the tissue inflammation/lesion do not activate these receptors. On the other hand, activation of opioid receptors caused by CRP was enhanced in NP slices under PGE₂ or CCI sensitization or in DRG cells incubated with PGE₂. Studies on the intracellular signaling pathways triggered by CRP demonstrated that, in DRG cell culture, the peptide activates ERK1/2 and JNK MAPKs. However, this activation is only observed when the cells were pre-incubated with PGE₂. Activation of MAPKs by CRP is dependent on activation of κ -opioid receptors and PKC ζ . These results indicate that peripheral opioid receptor expression and activation are distinctly regulated by the presence of acute or chronic injury. The different patterns of expression of κ - and δ - opioid receptors caused by acute and chronic injury may contribute to the activation of distinct opioid receptors by CRP, in the presence of PGE₂ and CCI.

Keywords: Opioid Receptors. Opioids. Crotalphine, Analgesia. Pain. Inflammation.

1 Introdução

Os receptores opióides são proteínas transmembrânicas que pertencem à superfamília dos receptores acoplados a proteínas G, estando presentes tanto no sistema nervoso central quanto em tecidos periféricos (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001). Estes receptores medeiam a analgesia induzida por fármacos com atividade opióide. Os opióides são amplamente utilizados no tratamento de dores de diferentes origens, incluindo dores de origem inflamatória e neuropática. Dados da literatura têm mostrado que fármacos com atividade opióide possuem eficácia analgésica periférica aumentada na vigência de resposta inflamatória (STEIN et al., 1989). Os mecanismos responsáveis por este aumento na eficácia analgésica envolvem alterações da expressão/ exposição e/ ou funcionalidade de receptores opióides (HASSAN et al., 1993; ANTONIJEVIC et al., 1995; ZOLLNER et al., 2003). Contudo, este fenômeno é ainda pouco compreendido.

Aumento na atividade antinociceptiva, na vigência de inflamação/lesão tecidual foi recentemente detectada para a crotalfina, um peptídeo inicialmente isolado e caracterizado do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (KONNO et al., 2008). Os estudos experimentais mostraram que a crotalfina induz potente atividade antinociceptiva em diferentes modelos de dor aguda e persistente. Esta atividade é de longa duração (2 a 5 dias) e mediada pela ativação de receptores opióides do tipo κ (modelos de nocicepção aguda) ou κ e δ (modelos de dor neuropática e câncer) (KONNO et al., 2008; GUTIERREZ et al., submetido; BRIGATTE e CURY, em fase de elaboração). Contudo, a longa duração da ação antinociceptiva da crotalfina é detectada apenas na presença de lesão tecidual (constricção crônica do nervo isquiático) ou de estímulos como a carragenina ou prostaglandina E_2 , uma vez que na ausência destes estímulos o efeito é observado por um período de apenas 5 horas (PEREIRA e CURY, em fase de elaboração). Apesar dos dados mostrando que a eficácia, a duração e o tipo de receptor opióide envolvido no efeito antinociceptivo da crotalfina são dependentes de sensibilização neuronal e do modelo experimental (nocicepção aguda ou crônica) utilizado, não foram ainda determinados os mecanismos pelos quais o processo de sensibilização aguda ou crônica interfere com a eficácia antinociceptiva do peptídeo e/ou o tipo de receptor opióide envolvido neste efeito.

1.1 Dor- considerações gerais

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP)(descrita em 1979 e mantida até 2011), “a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a lesão real ou potencial dos tecidos”, sendo sempre subjetiva. Cada indivíduo aprende a utilizar este termo através de experiências anteriores. Para os neurocientistas, os estímulos que causam dor são, em geral, estímulos capazes de causar lesão tecidual (MERSKEY, 1994). Contudo, a percepção da dor é dependente de experiências emocionais, motivacionais e psicológicas. Assim, utilizamos o termo nocicepção para definir os processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo (LOESER e TREEDE, 2008), enquanto que a dor envolve, além da nocicepção, o componente emocional, geralmente desagradável, da dor (LOESER, 1980). Desta forma, a nocicepção está presente na maioria dos casos dolorosos, contudo, pode ocorrer dor sem nocicepção e nocicepção sem dor.

A transmissão da nocicepção está associada à atividade elétrica de algumas fibras nervosas aferentes primárias. Estas fibras possuem terminações sensoriais livres, denominadas nociceptores, presentes nos tecidos periféricos, as quais são capazes de transduzir e codificar os estímulos nociceptivos (LOESER e TREEDE, 2008). Os neurônios que constituem estas fibras são pseudounipolares, contendo um axônio dirigido à periferia, um corpo celular presente no gânglio da raiz dorsal da medula espinal (DRG) e um axônio dirigido ao sistema nervoso central (medula espinal), onde ocorre a primeira sinapse do sistema de transmissão da dor. Os estímulos nociceptivos são caracterizados como aqueles capazes de gerar lesão tecidual potencial ou real e ativar nociceptores (LOESER e TREEDE, 2008). Os nociceptores são normalmente ativados por estímulos de alta intensidade, tanto mecânicos, quanto térmicos e/ou químicos.

Os neurônios aferentes primários desempenham três funções principais no que diz respeito à nocicepção: 1- detecção do estímulo nociceptivo ou nocivo (transdução); 2- condução do impulso da periferia para a medula espinal; 3- transferência desses impulsos para neurônios secundários e interneurônios presentes em lâminas específicas do corno dorsal da medula espinal (transmissão sináptica)(CAVIEDES e HERRANZ, 2002). Da medula espinal, as informações

nociceptivas são conduzidas ao tronco cerebral, tálamo e córtex cerebral, onde ocorre a percepção da dor (SCHAIBLE e RICHTER, 2004; WOOLF, 2004).

Muitas fibras aferentes nociceptivas são desprovidas de mielina e, portanto possuem baixa velocidade de condução (fibras C). As fibras C são também caracterizadas como nociceptores polimodais, uma vez que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. As fibras nociceptivas mielinizadas, denominadas A δ , conduzem mais rapidamente os impulsos elétricos. Estudos de eletrofisiologia permitiram a subdivisão dos nociceptores A δ em duas classes: tipo I (nociceptores mecânicos de alto limiar) que respondem bem a estímulos mecânicos e químicos, mas que respondem apenas a temperaturas relativamente altas (>50 °C); fibras A δ do tipo II possuem menor limiar de ativação pelo calor, mas apresentam limiar muito alto para estímulos mecânicos (BASBAUM et al., 2009).

É importante salientar que, além das fibras C, existe um grupo adicional de nociceptores não-mielinizados, sensíveis a estímulos térmicos e insensíveis a estímulos mecânicos, denominados receptores "silenciosos" (silent nociceptors). Estes nociceptores tem essa denominação porque se tornam responsivos a estímulos mecânicos na vigência de lesão tecidual (SCHMIDT et al., 1995). Estas fibras são, provavelmente, modificadas pela presença de mediadores inflamatórios, tornando-se mais ativas (BASBAUM et al., 2009). Os receptores "silenciosos" são encontrados na pele, articulações e em órgãos viscerais (SCHAEFFER JR et al., 1988; SCHEMELZ et al., 1994).

As aferências das fibras nociceptivas primárias terminam nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinal, formando conexões sinápticas com os neurônios de segunda ordem que se projetam a centros supra-espinais (BELMONTE e CERVERO, 1996; JULIUS e BASBAUM, 2001; CAVIEDES e HERRANZ, 2002). A medula espinal foi dividida em 10 lâminas por critérios anatômicos e eletrofisiológicos, sendo que a lâmina I é a mais superficial à partir da região dorsal (REXED, 1954; TODD e KOERBER, 2006). As fibras A δ , por exemplo, se projetam para as lâminas I e V, enquanto que as fibras C se projetam para as lâminas I e II. Ainda, a lâmina V recebe, indiretamente, projeções de fibras C denominados neurônios de faixa dinâmica ampla ("wide dynamic range"/WDR), que são capazes de responder a várias intensidades de estímulos, incluindo estímulos nocivos e não-nocivos.

Após a propagação da informação nociceptiva dos neurônios de primeira ordem para os de segunda ordem, a informação nociceptiva sofre modulações (inibitórias e/ou excitatórias) e os neurônios de projeção levam a informação nociceptiva, por diferentes vias ascendentes, para estruturas do tronco encefálico e diencefalo (MILLAN, 1999). Dentre as principais projeções supraespinais da via nociceptiva estão os tratos espinomesencefálico, espino-reticular, espino-hipotalâmico e espinotalâmico, sendo este último o mais importante na condução do impulso nociceptivo. A via espinotalâmica projeta-se para os núcleos talâmicos específicos (ventral pósterolateral (VPL) e ventral pósteromedial (VPM), envolvidos com os componentes discriminativos da sensibilidade dolorosa e para os núcleos talâmicos inespecíficos (centromedial, centrolateral, látero-central e intralaminares), relacionados com os componentes afetivos da dor. No tálamo ocorre a recepção, integração e transferência da informação nociceptiva para o córtex cerebral, onde a informação pode ser somatotopicamente organizada (CRAIG et al., 1999). Baseando-se em critérios funcionais, as principais regiões corticais envolvidas na resposta dolorosa são os córtices sensorial primário (S-I), secundário (S-II) e motor (ou giro pré-central) (BROMM e TREEDE, 1987; TEIXEIRA, 1994; SCHNITZLER e PLONER, 2000; TODD e KOERBER, 2006; BASBAUM et al., 2009)..

Durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, por exemplo, as fibras nociceptivas, particularmente as do tipo C, são sensibilizadas e, por consequência, podem ser ativadas por estímulos de menor intensidade, acarretando hipernocicepção ou alodinia (KIDD e URBAN, 2001; DWORKIN et al., 2003), os sintomas ou sinais mais importantes de um processo inflamatório. O termo hiperalgesia é aplicado para o aumento da sensibilidade à dor (LOESER e TREEDE, 2008) e está relacionada à caracterização deste fenômeno em seres humanos. O termo alodínia é utilizado quando ocorre a sensação de dor frente a um estímulo não nociceptivo. Cabe ressaltar que os termos hiperalgesia e hipernocicepção aplicam-se à diminuição do limiar de dor em humanos. Assim, como é avaliada a nocicepção em animais, a diminuição do limiar nociceptivo é denominada hipernocicepção.

Várias substâncias sintetizadas e/ou liberadas durante o processo inflamatório, como por exemplo, prótons extracelulares, citocinas, bradicinina, prostaglandina, endotelinas, aminas simpáticas, entre outros, podem interferir com a atividade dos neurônios nociceptivos primários (NAKAMURA e FERREIRA, 1987; FERREIRA; ROMITELLI; DE NUCCI, 1989; PIOVEZAN et al., 1997; JULIUS e BASBAUM, 2001;

SCHAIBLE e RICHTER, 2004; BASBAUM et al., 2009). Os mediadores hiperalgésicos podem atuar via receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), como a prostaglandina E₂, bradicinina, substância P e CGRP; receptores tirosina quinase, como interleucina 1 β (IL1- β) e fator de crescimento neural (NGF); canais iônicos sensíveis à acidez (ASIC), como prótons, entre outros. A ativação destes receptores ou canais, com conseqüente ativação de intermediários celulares regulatórios (segundos mensageiros), podem regular a permeabilidade da membrana neuronal e a concentração iônica celular (BEVAN, 1999; REICHLING e LEVINE, 1999; BASBAUM et al., 2009). A sensibilização dos neurônios nociceptivos primários é decorrente, em parte, do incremento das concentrações intracelulares de AMPc, ativação de proteínas quinase, como PKA, induzindo a fosforilação de canais iônicos e aumento do influxo de Ca²⁺ intracelular. A conseqüência destes efeitos metabólicos é a despolarização parcial da membrana neuronal, facilitando a geração e a transmissão de impulsos nervosos (FERREIRA, 1994; ENGLAND et al., 1996; CUNHA; TEIXEIRA; FERREIRA, 1999). Alguns mediadores hiperalgésicos elevam as concentrações intracelulares de AMPc, enquanto outros, sensibilizam nociceptores por mecanismos independentes da formação direta do AMPc. Estes mecanismos incluem a geração de prostanóides e a ativação da proteína quinase C (PKC)(BEVAN, 1999). A ativação da PKC acarreta a fosforilação e o aumento da atividade de canais iônicos permeáveis a Ca²⁺ e Na⁺, como receptores TRPV1 e canais de sódio dependentes de voltagem (LORENZETTI e FERREIRA, 1996; MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001).

A família das PKCs é constituída de serina/treonina quinases, com ampla homologia no sítio catalítico (região C-terminal). Estas isoenzimas estão envolvidas em eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos hormonais, neuronais e fatores de crescimento específicos. A família das PKCs é constituída por 12 isoformas, classificadas em três diferentes subfamílias, de acordo com a afinidade do domínio regulatório (região N-terminal) pelo substrato ativador. As isoformas clássicas (PKC α , PKC β I, PKC β II, PKC γ) são reguladas por Ca²⁺, fosfatidilserina, diacilglicerol (DAG) e éster de forbol (PMA). As isoformas novas (PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ) são reguladas por fosfatidilserina, DAG e PMA, ou seja, não são ativadas por Ca²⁺. Por fim, as isoformas atípicas (PKC ξ , PKC τ , PKC λ) são reguladas por ceramida e fosfatidilinositol 3,4,5-fosfato. As diferentes isoformas de PKC estão

distribuídas em diversos tecidos, demonstrando diferenças funcionais de acordo com sua localização intracelular (MOCHLY-ROSEN e KAUVAR, 1998). No DRG, foram encontrados cinco isoformas de PKC ($PKC\beta_i$, $PKC\beta_{ii}$, $PKC\delta$, $PKC\epsilon$, $PKC\zeta$), sendo que a $PKC\epsilon$ tem sido descrita como importante quinase nos processos de sensibilização do nociceptor. Das cinco isoformas observadas em neurônios sensitivos, duas delas, a $PKC\beta_i$ e $PKC\beta_{ii}$, estão localizadas na membrana plasmática da célula, em estado de repouso e não são ativadas após sensibilização por bradicinina. As demais isoformas, $PKC\delta$, $PKC\epsilon$, $PKC\zeta$, estão uniformemente distribuídas no citoplasma das células, quando em repouso, sendo que apenas a $PKC\epsilon$ transloca-se para a membrana plasmática na presença de bradicinina (CESARE et al., 1999). Outra isoforma importante para os processos nociceptivos é a $PKC\gamma$. Estudos demonstram que esta isoforma está localizada preferencialmente na lamina II da medula espinal, onde está expressa em interneurônios excitatórios, tendo importante papel nos fenômenos de sensibilização central (MALMBERG et al., 1997; POLGAR et al., 1999).

Além das PKCs, quinases como as da via das proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs), são relevantes em processos nociceptivos. A ativação desta via, pela fosforilação de resíduos de tirosina e treonina, pode ocorrer independentemente da ativação da PKC ou PKA (DINA et al., 2003). Esta via de sinalização é composta por 3 membros: quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), quinase N-terminal c-Jun (JNK) e a p-38 MAPK (JI e WOOLF, 2001). Dai et al. 2002 demonstraram a participação das MAPKs, mais especificamente das ERKs, em processos hiperalgésicos.

Independentemente do mecanismo de sinalização intracelular, o aumento na expressão e fosforilação de canais iônicos, em membranas de neurônios periféricos, constitui o principal fator responsável pelo aumento da excitabilidade da membrana destas células (WOOLF, 2000). Entre os principais canais iônicos responsáveis pela geração de potenciais de ação na membrana de neurônios nociceptivos estão os canais de sódio dependentes de voltagem (VANEGAS e SCHAIBLE, 2000; SAEGUSA; MATSUDA; TANABE, 2002; WOOLF, 2004). Diversos tipos de canais de sódio estão expressos em neurônios sensitivos, incluindo canais sensíveis à tetrodotoxina (TTX), como os $Na_v1.1$, $Na_v1.6$ e $Na_v1.7$ e resistentes à TTX, como os $Na_v1.8$ e $Na_v1.9$. A contribuição dos canais $Na_v1.7$ e $Na_v1.8$ em fenômenos

nociceptivos tem sido descrita (COX et al., 2006; DIB-HAJJ, S. D.; YANG, Y.; WAXMAN S.G., 2008). Os canais do tipo $Na_v1.7$ estão mais expressos na vigência de resposta inflamatória e, juntamente com os canais $Na_v1.8$ contribuem para a hipernocicepção térmica inflamatória e também para a resposta aguda frente a um estímulo nocivo (AKOPIAN et al., 1999; NASSAR et al., 2004). O canais $Na_v1.8$ são também importantes para a transmissão do estímulo induzido pelo frio (ZIMMERMANN et al., 2007). Além dos canais de sódio, os de cálcio também apresentam importante papel em processos nociceptivos. Os principais canais de cálcio envolvidos em processos nociceptivos são os canais de cálcio do tipo N, P/Q e T. Os canais de cálcio do tipo P/Q estão expressos nas terminações sinápticas nas lâminas II-IV do corno dorsal da medula espinal e estão envolvidos em dores como as enxaquecas (VAN DER VRIES et al. 2010). Os canais do tipo N e T estão expressos em fibras C e tem a expressão aumentada na vigência de neuropatias (CAO, 2006; SWAYNE e BOURINET, 2008; MESSINGER et al., 2009; ZAMPONI et al., 2009).

O corno dorsal da medula espinal é um sítio importante no processo de transmissão e modulação da informação nociceptiva da periferia para o SNC (AIMONE e YAKSH, 1989; YAKSH, 1999). Neste sítio medular, o principal neurotransmissor excitatório envolvido na nocicepção é o glutamato. Além do glutamato, os neuropeptídeos, como a substância P, neurocinina A e o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP), tem papel importante no processo nociceptivo, atuando como neuromoduladores da transmissão nociceptiva (KIDD e URBAN, 2001; SCHAIBLE e RICHTER, 2004). Estes neurotransmissores e neuromoduladores agem em receptores específicos presentes na membrana pós-sináptica. A ativação e a modulação dos receptores NMDA tem papel importante na indução e manutenção da sensibilização dos neurônios medulares (Sensibilização Central) (SCHAIBLE e RICHTER, 2004). Contudo, a liberação de neuropeptídeos, de fatores neurotróficos e de prostaglandinas, além da ativação de células da glia (astrócitos e microglia) neste sítio medular, também contribui para a gênese do processo de Sensibilização Central (BESSION, 1999; WOOLF, 2000; SCHAIBLE e RICHTER, 2004; WIESELER-FRANK, J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R., 2004).

A transmissão nociceptiva na medula espinal é modulada por tratos descendentes excitatórios e inibitórios, os quais podem atuar em fibras aferentes primárias, ou ter ação em fibras pós-sinápticas ou em interneurônios presentes no

cornos dorsais da medula espinal (COUSINS e COHEN, 2005). Os múltiplos tratos descendentes inibitórios se originam de núcleos presentes no tronco cerebral. Neurotransmissores como acetilcolina, GABA, glicina e opióides modulam a atividade destes tratos descendentes inibitórios (MILLAN, 2002). A nocicepção é, portanto, um processo gerado na periferia e modulado no SNC. Alterações no controle descendente da nocicepção podem também provocar sensibilização central e, conseqüentemente, estados hiperalgésicos.

A caracterização dos mediadores químicos e dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na gênese da dor tem contribuído para o avanço no conhecimento da fisiopatologia dos processos nociceptivos e de seu controle, bem como para a caracterização de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos analgésicos. Esse avanço no conhecimento tem sido possível por meio da utilização de diferentes modelos experimentais *in vivo* de avaliação da nocicepção. Estes modelos têm favorecido o estudo das dores manifestas e da hipernocicepção tanto de origem inflamatória quanto neuropática.

1.2 Agentes indutores de hipernocicepção

1.2.1 Hipernocicepção aguda

Vários agentes indutores de hipernocicepção têm sido utilizados experimentalmente, dentre eles, a carragenina, um agente inflamatório e a prostaglandina E₂ (PGE₂), um mediador inflamatório. O aumento da sensibilidade à dor (hipernocicepção) causado pela carragenina, é caracterizado por um componente periférico, resultante da sensibilização dos nociceptores, e por um componente central, com a participação de circuitos centrais de dor (FERREIRA; LORENZETTI; CORRÊA, 1978). A mediação química desta hipernocicepção envolve a liberação seqüencial de mediadores nociceptivos. Em ratos, esta cascata inicia-se com a formação de bradicinina (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993), que estimula a liberação do fator de necrose tumoral alfa - TNF α (CUNHA et al., 1992), que por sua vez induz a secreção de interleucina-6 e interleucina-1 β (FERREIRA et al., 1988). Estas citocinas estimulam a formação de produtos da ciclooxigenase, resultando principalmente na produção de PGE₂ (NAKAMURA e FERREIRA, 1987).

O TNF- α é também capaz de induzir a liberação de quimiocinas (interleucina-8/CXCL8 em humanos, CINC-1 em ratos) (CUNHA et al., 1991; LORENZETTI et al., 2002), as quais estimulam a liberação/produção de aminas simpatomiméticas. Prostanóides e aminas simpatomiméticas representam os mediadores finais responsáveis pelo desenvolvimento do quadro hipernociceptivo induzido pela carragenina. Cabe ressaltar que em camundongos, existe diferença na hierarquia de liberação de citocinas. Assim, foi demonstrado que não só o TNF- α , mas também a quimiocina derivada de queratinócitos, KC/CXCL1 são as primeiras citocinas liberadas pela carragenina, sendo sucedidas pela secreção de IL-1 β . O KC/CXCL1, além de acarretar a liberação de prostaglandinas, age também via liberação de aminas simpatomiméticas (CUNHA et al., 2005).

Diferentemente da carragenina, as prostaglandinas da série E₂ (PGE₂) são conhecidas por sua capacidade de sensibilizar diretamente os nociceptores, durante a inflamação (WILLIS e CORNELSEN, 1973; FERREIRA e NAKAMURA, 1979a; TAIWO et al., 1989). Este efeito das PGE₂ decorre da sua interação com receptores EP presentes na membrana dos neurônios (SOUTHALL e VASKO, 2001). A estimulação de receptores EP resulta na ativação de complexas vias de sinalização intracelular, que dependem do receptor ativado e das células estudadas. Receptores EP dos subtipos EP2, EP3 e EP4 são descritos como acoplados a adenilil ciclase (AC) (SUGIMOTO et al., 1992; COLEMAN et al., 1994; REGAN et al., 1994), sendo que a ativação de EP2 e EP4 acarreta aumento dos níveis do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPc). A ativação de EP3 pode aumentar ou diminuir a atividade da AC, dependendo da isoforma do receptor ativado (COLEMAN et al., 1994).

Dados experimentais tem mostrado que a ativação da isoforma EP3C, presente em DRGs, induz aumento de AMPc (SOUTHALL e VASKO, 2001). Os DRGs expressam tanto RNAm para síntese quanto as proteínas EP1, EP2, EP3 e EP4 (SOUTHALL e VASKO, 2001). A adição de PGE₂ em cultura de DRGs, com conseqüente ativação de seus receptores, pode gerar tanto AMPc (HINGTGEN et al., 1995), como resultado da ativação da AC, quanto fosfatos de inositol, como resultado da ativação da enzima fosfolipase C (PLC) (SMITH et al., 1998). O passo subsequente ao aumento nos níveis de AMPc é a ativação de uma proteína quinase (PK) dependente de AMPc, a PKA (FERREIRA e NAKAMURA, 1979a; TAIWO e

LEVINE, 1991; ALEY e LEVINE, 1999; KASSUYA et al., 2007). Os receptores do subtipo EP1 estão acoplados à via de sinalização da fosfolipase C, com conseqüente hidrólise de fosfatidilinositol-bifosfato, o que resulta na liberação de inositol trifosfato (IP₃) e diacil-glicerol (DAG) (WATABE et al., 1993). O DAG, altamente lipossolúvel, encontra-se associado à membrana plasmática, podendo ativar uma proteína quinase C (PKC). De fato, a sensibilização acarretada pela PGE₂ tem sido associado à ativação de PKCε (ALEY et al., 2000; PARADA et al., 2003; KASSUYA et al., 2007). Adicionalmente, têm sido descritos mecanismos alternativos de sinalização para a PGE₂, independentes da geração de AMPc ou fosfatos de inositol (WATABE et al., 1993). Estudos *in vivo* têm associado a ativação de receptores EP3 à de ERK1/2 (KASSUYA et al., 2007). Foi também observado que a ativação de receptores EP4 por PGE₂, em cultura de células embrionárias de rim humano, acarreta a fosforilação de ERK1/2, via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (FUJINO et al., 2003). De modo geral, a ativação deste receptor EP resulta na despolarização da membrana celular e transmissão do impulso nociceptivo (FERREIRA, 1994). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a PGE₂ aumenta a excitabilidade neuronal por suprimir as correntes de potássio (EVANS et al., 1999) e/ou aumentar a atividade canais de sódio resistentes a tetrodotoxina (ENGLAND; BEVAN; DOCHERTY, 1996; GOLD et al., 1996).

1.2.2 Hipernociceção persistente

Nas últimas décadas, vários modelos experimentais têm sido propostos para o estudo de dor persistente, incluindo a dor de câncer (SCHWEI et al., 1999; LUGER et al., 2002; SASAMURA et al., 2002; SHIMOYAMA et al., 2002; KURASHI et al., 2003; ZHANG et al., 2003; LEE et al., 2005; SHIMOYAMA et al., 2005) e a dor neuropática (BENNETT e XIE, 1988; SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990; KIM e CHUNG, 1992). Estes modelos tem favorecido o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese da dor persistente, bem como possibilitado o estudo de fármacos com atividade antinociceptiva neste tipo de dor.

Dores neuropáticas em humanos são resultantes, muitas vezes, de injúria de nervo periférico. Este tipo de dor é caracterizado pela presença de dor espontânea em queimação, acompanhada de hiperalgesia e alodinia (NAKAMURA e FERREIRA, 1987; DWORKIN et al., 2003).

A persistência de uma lesão nervosa (excitação constante dos nervos lesados) pode induzir alterações no Sistema Nervoso Periférico, resultando em sensibilização, o que contribui para o desenvolvimento da dor neuropática (SELTZER et al., 1991; GRACEY; LYNCH; BENNETT; DEVOR, 1994; MAO et al., 1995; PORRECA et al., 1999; CAVIEDES e HERRANZ, 2002; DWORKIN et al., 2003). Neste caso, observa-se aumento nos níveis de canais de sódio voltagem-dependente $Na_v1.8$ nos nociceptores, ativação de microglia no corno dorsal da medula espinal e reorganização do sistema nervoso simpático que passa a ativar as vias nociceptivas (MCLACHLAN et al., 1993; JOSHI et al., 2006). Estas alterações facilitam o desenvolvimento da sensibilização central e neurodegeneração sináptica (ITO; OBATA; SAITO, 2009). Adicionalmente, estudos demonstram que os estímulos capazes de induzir dor persistente, estimulam também a liberação de mediadores inflamatórios na medula espinal, fenômeno que pode contribuir também para a cronificação do processo nociceptivo (VOSCOPOULOS e LEMA, 2010).

O tratamento da dor neuropática é freqüentemente ineficaz. Contudo, quando se considera a complexidade dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento deste tipo de dor, torna-se compreensível a dificuldade encontrada na clínica para o controle deste processo. Os modelos experimentais usualmente empregados para o estudo da dor neuropática, incluem modelos de dor neuropática induzida por diabetes *mellitus* e dor originária da injúria parcial de nervos periféricos ou espinais (BENNETT e XIE, 1988; SELTZER; DUBNER; SHIR; KIM e CHUNG, 1992). A injúria parcial de nervos pode ser produzida por constrictões crônicas do nervo isquiático de ratos (BENNETT e XIE, 1988). A hipernocicepção causada pela constrição pode iniciar entre 24 horas a 5 dias após a indução da lesão, com respostas máximas ao final da segunda semana, e que persistem por até 2 meses (BENNETT e XIE, 1988). As alterações estruturais envolvem degeneração de todas as fibras A e a maioria das fibras C (BASBAUM et al., 1991; CARLTON et al., 1991).

Dentre os medicamentos utilizados clinicamente para o tratamento da dor neuropática, as principais classes de analgésicos são: opióides, como o tramadol; anti-depressivos, como os tricíclicos; anti-convulsivantes, como a gabapentina e pré-gabalina; antagonistas de receptores NMDA, como a ketamina e antiinflamatórios não-esteroidais (COLLINS et al. 2010; TZELLOS et al., 2008). Usualmente, a combinação de dois ou mais fármacos possibilita a maior eficácia no controle deste tipo de dor (MAO; GOLD; BACKONJA, 2010).

1.3 Opióides

O ópio, do grego “opion”, diminutivo de “opós” (suco), era obtido a partir do extrato das sementes da papoula. Registros antigos descrevem que os sumérios (habitantes da região onde é atualmente, o Iraque), no final do terceiro milênio (A.C.), cultivavam a papoula e teriam isolado o ópio. O poder hipnótico e euforizante da papoula determinou a denominação de “planta da alegria” (BROWNSTEIN, 1993). Em 1806, Serturmer isolou o ingrediente ativo do ópio e o denominou Morfina.

Assim, o termo opióide aplica-se à qualquer substância que produz efeitos semelhantes aos da morfina e que são bloqueados por antagonistas do tipo naloxona (FOLEY e INTURRISI, 1987; REISINE et al., 1996). Os opióides induzem analgesia em seres humanos e em animais, por ação em receptores específicos, alterando a resposta neuronal a estímulos nociceptivos (YAKSH, 1999).

Atualmente, são conhecidas pelo menos 5 famílias de receptores opióides, os quais são denominados pela União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR), receptores do tipo do tipo MOP ou *mu* (μ), KOP ou *kappa* (κ) e DOP ou *delta* (δ), *epsilon* (ϵ) e *sigma* (σ) (KIEFFER e EVANS, 2009). Em 1996, foi proposta uma nova nomenclatura para estes receptores, a qual não foi completamente aceita, sendo que atualmente, ainda são amplamente utilizados os símbolos gregos para nomear estes receptores (DHAWAN et al., 1996). Outros receptores opióides já foram caracterizados e vem sendo alvos de estudos, entretanto, não estão ainda completamente caracterizados (JUNIEN e WETTSTEIN, 1992). A síntese destes receptores é regulada por três diferentes genes, os quais apresentam extensa homologia estrutural entre si (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001). Uma sexta classe de receptores, denominada nociceptina/orfanina FQ (NOP), cujo ligante natural é a nociceptina, tem sido proposta como integrante da família dos receptores opióides (BARLOCCO et al., 2000).

Os principais efeitos analgésicos dos opióides são mediados pelos receptores μ , κ e δ . O tipo de receptor envolvido neste efeito depende da natureza do estímulo nocivo, bem como das condições patológicas do organismo (JUNIEN e WETTSTEIN, 1992).

No Sistema Nervoso Central, os receptores opióides estão amplamente distribuídos em regiões como tálamo, córtex cerebral, amígdala, núcleo acumbens,

substância negra, formação reticular mesencefálica e substância cinzenta periaquedutal mesencefálica, além de serem encontrados na medula espinal (YAKSH, 1999). A distribuição dos receptores opióides no córtex varia de acordo com a porção cortical e laminar. Os receptores μ estão localizados preferencialmente nas camadas I, V e VI, os receptores δ , nas camadas II, III, V e VI, de maneira mais difusa, enquanto os receptores κ estão presentes nas camadas III, V, e VI do córtex anterior cingulado (LEWIS et al., 1987). Na medula espinal, os receptores μ , na proporção de 70%, estão distribuídos predominantemente nas camadas superficiais do corno dorsal, principalmente na substância gelatinosa (ATWEH e KUHAR, 1977; DAVIDSON et al., 2000). Os receptores κ (7%) e δ (23%) estão também distribuídos nas camadas superficiais do corno dorsal, em vários segmentos da medula espinal (QUIRION, 1984; DAVIDSON et al., 2000). Os receptores δ encontram-se preferencialmente nos segmentos cervicais, apresentando baixa densidade de ligação em regiões lombo-sacrais, diferindo do padrão dos sítios de ligação κ , concentrados nestas regiões (GOUARDERES; CROS; QUIRION, 1985).

A presença de opióides endógenos em tecidos periféricos, tem sido reconhecida. Estes receptores são detectados em neurônios aferentes primários, gânglios autonômicos, nervos entéricos e na medula adrenal (NORTH e EGAN, 1983). No DRG, estes receptores estão expressos em neurônios de pequeno, médio e grande diâmetro (MANSOUR et al., 1994; COGGESHALL et al., 1997).

Wittert e et al. (1996) (WITTERT et al., 1996) mostraram que, além de serem encontrados no sistema nervoso (BODNAR e KLEIN, 2005), os três principais receptores para opióides estão presentes no intestino, nas glândulas adrenais, rins, pulmões, baço, testículos, ovários, útero, estômago, fígado e coração de ratos. A detecção de receptores opióides na periferia sugere que peptídeos opióides endógenos têm importante papel na regulação de processos fisiológicos.

Cada tipo de receptor é dividido em múltiplos subtipos (HARRISON et al., 1998; NARITA et al., 2001). A subdivisão desses receptores tem sido feita com base na capacidade de antagonistas específicos exercerem ação em um receptor e não em outro. Assim, o receptor μ foi dividido em μ_1 e μ_2 , o receptor δ , em δ_1 e δ_2 e o receptor κ em quatro subtipos, κ_1 -4 (JENSEN, 1997; ELIAV et al., 1999; NARITA et al., 2001; PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001).

Os ligantes endógenos destes receptores foram identificados como encefalinas, dinorfinas, endorfinas e endomorfina (REISINE et al., 1996; PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001). As encefalinas apresentam alta afinidade pelos receptores δ . Estudos anatômicos têm sugerido co-distribuição entre encefalinas e os receptores δ , em muitas regiões do Sistema Nervoso. Estes mesmos opióides endógenos têm também alta afinidade por receptores μ . Da mesma forma que o observado para receptores δ , há correlação entre a distribuição de receptores μ e a presença de RNAm para encefalinas. Receptores κ possuem afinidade elevada por dinorfina A, indicando ser este é o ligante endógeno deste receptor. A beta-endorfina liga-se a receptores μ e δ , sugerindo que, em tecidos periféricos, onde as endorfinas são mais abundantes que as encefalinas ou dinorfinas, as beta-endorfinas sejam o ligante endógeno destes receptores.

Os receptores μ são os responsáveis pela maioria dos efeitos analgésicos dos opióides e por alguns dos mais importantes efeitos colaterais, como depressão respiratória, euforia, dependência física e sedação. A maioria dos analgésicos opióides é representada por agonistas destes receptores (BROWNSTEIN, 1993; PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001; JONGKAMONWIWAT et al., 2003). A morfina, o protótipo dos fármacos opióides, liga-se, preferencialmente, a receptores do tipo μ , porém, infusões crônicas ou tratamento com doses elevadas deste opióide, alteram sua seletividade pelos receptores opióides, induzindo ação também em receptores κ e δ (MELCHIORRI et al., 1992; NEGRI et al., 1993; PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001). Os receptores δ são, provavelmente, mais importantes na periferia, entretanto podem, também, contribuir para a analgesia central. Os receptores κ contribuem para a analgesia central e acarretam número relativamente pequeno de efeitos indesejáveis, podendo contribuir para a sedação e disforia, mas não para a dependência física (WOOD, 1988; BOWEN et al., 2003).

Os receptores μ , κ e δ apresentam 7 domínios transmembrânicos acoplados à proteína G (GPCRs) e possuem extensa homologia estrutural entre si (PRZEWLOCKI e PRZEWLOCKA, 2001; ZHANG et al., 2005). Por serem GPCRs, estes receptores compartilham características de outros membros desta família, como por exemplo, a ocorrência de alterações conformacionais quando ativados por seu agonista específico (CHATURVEDI et al., 2000). Além disso, a ligação do agonista a seu receptor favorece sua fosforilação por quinases específicas de

GPCRs, denominadas quinases de GPCRs (GRKs) ou por outros tipos de proteínas quinase da cascata de sinalização deste receptor, como a PKC, por exemplo. Além de contribuir para a geração do efeito biológico, a fosforilação de domínios citoplasmáticos de receptores por GRKs é um importante mecanismo regulador negativo da sinalização de GPCRs. Assim, as GRKs são responsáveis por estabelecer sítios de ligação do GPCR a proteínas chamadas arrestinas. As arrestinas são proteínas adaptadoras multifuncionais que possuem alta afinidade pelos GPCRs fosforilados (LOHSE et al., 1990; FERGUSON et al., 1996; FERGUSON, 2001). A ligação das arrestinas ao receptor, incluindo receptores opióides, favorece a internalização citoplasmática do receptor e como consequência, o término da resposta induzida pelo agonista, sendo que uma nova resposta só pode ser iniciada quando o receptor retorna à membrana plasmática (JOHNSON et al., 2005; ZHENG et al., 2010).

Diversos mecanismos moleculares estão envolvidos na ação analgésica dos opióides. Estes mecanismos incluem a abertura de canais de potássio, com consequente hiperpolarização da membrana celular e/ou a inibição do sistema de adenil ciclase, diminuindo a produção de AMPc (SCHULTZ e GROSS, 2001) e inibindo canais de cálcio voltagem-dependentes. A redução do influxo de cálcio nas fibras nervosas acarreta inibição da liberação de neurotransmissores, contribuindo para a diminuição da transmissão sináptica do impulso nervoso (DICKENSON e SULLIVAN, 1987; LAW et al., 2000).

Até a década de 1970, o efeito analgésico de fármacos opióides estava correlacionado às suas ações no Sistema Nervoso Central, como por exemplo, na substância cinzenta periaquedutal (PAG) ou ainda, na medula espinal, modulando a atividade de neurônios de segunda ordem (KUHAR et al., 1973; BASBAUM et al., 1976; FIELDS e ANDERSON, 1978; YAKSH e RUDY, 1978; YOSHIMURA e NORTH, 1983; LIGHT e WILLCOCKSON, 1999; PORRECA et al., 2002). Neste sítio medular, o efeito dos opióides parece estar relacionado à ativação de canais de potássio retificadores de entrada, ativados pela proteína G (GIRKs), presentes nos neurônios pós-sinápticos (NORTH, 1989; OCANA et al., 2004)

No final da década de 1970, Ferreira e Nakamura (1979b) demonstraram a ação antinociceptiva periférica dos opióides, uma vez que a morfina, administrada pela via intraplantar, apresentou efeito antinociceptivo sobre a hipernocicepção induzida pela carragenina ou PGE₂. Sugere-se, atualmente, que a ativação da via L-

arginina-óxido nítrico-GMPc seja a responsável pela analgesia periférica induzida por alguns opióides ou substâncias liberadoras de opióides endógenos (FERREIRA et al., 1991; GRANADOS-SOTO et al., 1995; PICOLO et al., 2003; SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004).

A participação do NO e do GMPc no efeito analgésico periférico de opióides foi evidenciada pela observação de que inibidores da enzima responsável pela síntese de NO, ou da guanilil ciclase, revertem o efeito destes fármacos, quando avaliados em modelos de hipernocicepção inflamatória aguda (FERREIRA, 1990; FERREIRA et al., 1991; GRANADOS-SOTO et al., 1997; GRANADOS-SOTO et al., 1995; AMARANTE e DUARTE, 2002) ou persistente (SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004). As enzimas responsáveis pela síntese de NO pertencem a uma família de enzimas denominadas NOS. Atualmente, são conhecidas três principais isoformas da NOS (endotelial, neuronal e induzida), sendo que as duas primeiras são consideradas constitutivas e a última é sintetizada durante processos inflamatórios. As NOS constitutivas podem ser ativadas pela entrada de Ca^{2+} intracelular, com conseqüente ligação do Ca^{2+} à calmodulina, resultando na produção de NO. Ainda, a ativação da NOS pode ocorrer por um mecanismo independente de Ca^{2+} e dependente de fosforilação pelas quinases PI_3K /proteína quinase B (AKT). Recentemente, Cunha et al., 2009, demonstraram, por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro*, que a ativação da via do NO, pela morfina e agonista de receptores opióides do tipo κ , é dependente da estimulação de PI_3K /AKT. Uma vez sintetizado, o NO é capaz estimular a enzima guanilato ciclase a catalisar a conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em GMPc.

Diversos estudos experimentais demonstram que a síntese de GMPc pelo NO, promove a abertura de canais para potássio sensíveis à ATP (K_{ATP}) (SOARES et al., 2000; SOARES e DUARTE, 2001). O GMPc é capaz de modular, diretamente ou indiretamente (via ativação da proteína quinase G, PKG), a atividade destes canais, favorecendo o efluxo de íons potássio, a hiperpolarização da célula neuronal, resultando em antinocicepção (WHITE, 1999; HAN et al., 2001; SEGAWA et al., 2001; HAN et al., 2002; SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004). A PKG é uma proteína quinase que é estimulada seletivamente, mas não exclusivamente, pelo GMPc. Uma vez estimulada, a PKG induz a inibição da atividade da fosfolipase C, do 1,4,5-inositol trifosfato e de canais de Ca^{2+} , além de estimular a atividade da Ca^{2+} ATPase e de canais de K_{ATP} (SACHS; CUNHA; FERREIRA, 2004).

Adicionalmente a estes mecanismos, tem sido demonstrado que, durante a ativação de receptores opióides, a subunidade $\beta\gamma$ da proteína G, acoplada ao receptor, pode ativar a via das MAP quinases (MAPKs) (POLAKIEWICZ, SCHIEFERL, DORNER et al., 1998; POLAKIEWICZ, SCHIEFERL, GINGRAS et al., 1998; LAW et al., 2000). Fármacos opióides, incluindo substâncias capazes de ativar receptores opióides do tipo κ , podem ativar as três enzimas (ERK1/2, p38 e JNK) integrantes da via de sinalização das MAPKs, em diferentes sistemas (BELCHEVA et al., 1998; BOHN et al., 2000; KAM et al., 2004a; BELCHEVA et al., 2005; BRUCHAS et al., 2006; BRUCHAS et al., 2007). Ainda, a ativação diferencial de uma ou outra destas enzimas parece ser importante para os efeitos duradouros de alguns antagonistas opióides (BRUCHAS et al., 2007). Esta via de quinases é ativada por um grande número de estímulos, desde sinais intracelulares, via interação proteína-proteína, até de cascatas de fosforilação (KARANDIKAR e COBB, 1999).

Originalmente, a ativação de MAPKs foi observada a partir da ativação de receptores tirosina quinase, entretanto, vários estudos tem evidenciado que GPCRs podem ativar diretamente estas quinases e, atualmente, esta ativação direta é amplamente estudada. Alguns GPCRs ativam os receptores tirosina quinase por fosforilação direta ou indireta, através da ativação de MAPKs (PIERCE et al., 2001). Adicionalmente, inúmeros estudos tem demonstrado que os GPCRs ativam as MAPKs através de moléculas como a Src, c-Raf e fosfolipase C (BRUCHAS e CHAVKIN, 2010).

A MAPK melhor caracterizada na sinalização dos receptores opióides, é a ERK1/2. Estudos demonstram que ocorre fosforilação desta quinase após a estimulação aguda de receptores opióides do tipo μ e κ , em células astrocíticas em cultura e de receptores δ , em linhagem de células COS-7 transfectadas com este receptor (BELCHEVA et al., 1998). Contudo, a cinética de ativação da ERK1/2 difere entre os três tipos receptores opióides. A ativação de receptores do tipo δ promove fosforilação desta quinase, via subunidade $\beta\gamma$ do GPCR e Ras (BELCHEVA et al., 1998). Em cultura imortalizada de astrócitos, observou-se que a ativação da ERK1/2 por ligantes de receptores opióides μ é mediada pela ativação de PKC ϵ , enquanto que ligantes do receptor κ requerem PI₃K, PKC ζ e cálcio (BELCHEVA et al., 2005). Estas diferenças detectadas entre os receptores da mesma classe fortalecem a

hipótese de que estas quinases são finamente reguladas e dependem do estímulo e do tipo de célula utilizada.

Além das ERKs, a via da p38 MAPK também pode ser ativada por substâncias que ativam receptores opióides do tipo κ , em diferentes células, como neurônios e em astrócitos, presentes no núcleo estriado e em astrócitos localizados na medula espinal (BRUCHAS et al., 2006; BRUCHAS et al., 2007). Os mecanismos pelos quais esta quinase controla a sinalização deste receptor são ainda desconhecidos. Estudos demonstram que esta quinase é a responsável pelo efeito do fator de crescimento neural (NGF) sobre o aumento da expressão de receptores opióides do tipo μ no DRG, bem como pelo aumento do transporte axonal destes receptores (YAMDEU et al. 2010).

Outra MAPK envolvida na sinalização de receptores opióides é a JNK. A ativação de receptores opióides do tipo δ causa fosforilação desta quinase por um mecanismo dependente da via da PI₃K/Akt em linfócitos T (SHAHABI et al., 2006). Contudo, estudos utilizando linhagens de células (SH-SY5Y e COS-7) transfectadas com cada um dos receptores opióides, demonstram que a ativação desta quinase pelos agonistas seletivos destes receptores, é independente da via PI₃quinase/Akt (KAM et al., 2004b). Bruchas et al. (2007), utilizando células HEK293 transfectadas com receptor opióide do tipo κ , mostraram que o Nor-BNI, antagonista seletivo deste receptor, bloqueia a sinalização intracelular decorrente de sua ativação, por exemplo, a inibição do AMPc, a ativação de canais de K⁺ e a ativação de ERK1/2 e p38 (PIROS et al., 1996; BOHN et al., 2000; BELCHEVA et al., 2005).

Em conjunto, estes dados sugerem que opióides ativam a cascata das MAPKs, entretanto, o papel de cada uma destas quinases, para o efeito dos opióides, não está totalmente caracterizado.

1.3.1 Alterações na expressão e funcionalidade de receptores opióides na vigência de sensibilização prévia

Diversas evidências experimentais e clínicas têm sugerido que fármacos opióides possuem eficácia aumentada na vigência de processos inflamatórios (STEIN et al., 1989; STEIN; GRAMSCH; HERZ et al., 1990; STEIN et al., 1990; STEIN et al., 1991). Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar o aumento na intensidade do efeito analgésico na presença de inflamação. Estas hipóteses

incluem aumento da síntese *de novo* de receptores opióides, aumento do transporte axonal destes receptores (HASSAN et al., 1993; MOUSA et al., 2001), além do incremento na exposição de receptores opióides na fibra nervosa sensitiva, decorrentes de alterações na barreira perineural destes neurônios, ocasionadas pela lesão ou inflamação (RECHTHAND e RAPOPORT, 1987; OLSSON, 1990).

Diversos estudos experimentais têm mostrado alterações, tanto na periferia quanto centralmente, da síntese de receptores opióides na vigência de inflamação (HASSAN et al., 1993; JI et al., 1995; SCHAFER et al., 1995; MOUSA et al., 2001; MOUSA et al., 2002; CAHILL et al., 2003). Estes estudos evidenciaram, por exemplo, aumento no número de receptores μ opióides no gânglio da raiz dorsal da medula espinal (DRG) ou em nervos periféricos da pata de ratos, três dias após a administração intraplantar de carragenina (JI et al., 1995) ou adjuvante completo de Freund (CFA) (SCHAFER et al., 1995; MOUSA et al., 2001; MOUSA et al., 2002), respectivamente. Adicionalmente, Hassan et al. (1993) observaram, em animais submetidos à constrição crônica do nervo isquiático e injetados, por via intraplantar, com CFA, acúmulo marcante de receptores μ opióides em torno da ligadura no nervo isquiático, além do acúmulo destes receptores na pata injetada com o CFA, sugerindo que a inflamação local aumenta o transporte axonal de receptores opióides no nervo isquiático e o seu acúmulo no tecido inflamado. Apesar destas evidências, não foram realizados até o presente momento, estudos investigando a expressão destes receptores nos estágios iniciais do processo inflamatório.

Adicionalmente ao aumento na expressão de receptores opióides na periferia é também observado aumento na expressão destes receptores no SNC (medula espinal), durante inflamação periférica. Assim, em modelo de inflamação articular induzida pela administração de CFA, foi detectado aumento da expressão de RNAm para os receptores opióides μ e κ , mas não δ , nas lâminas I e II da medula espinal (MAEKAWA et al., 1996). Por outro lado, quando este agente flogístico é administrado na pata de ratos, ocorre aumento da expressão de receptores opióides μ e δ na medula espinal (MOUSA et al., 2002; CAHILL et al., 2003). Em relação aos receptores δ , foi observado que este aumento é decorrente de seu recrutamento, dos estoques intracelulares, para a membrana plasmática (CAHILL et al., 2003).

Além dos estudos realizados em roedores, estudos experimentais realizados em humanos demonstram a eficácia analgésica periférica de opióides apenas na

vigência de inflamação. Nestes estudos, foi observado que o efeito analgésico da 6- β -glucoronato de morfina (M6G) é detectado apenas quando o tecido é sensibilizado pelo frio ou contração muscular. Interessantemente, os autores não detectaram efeito analgésico deste opióide na presença de injúria induzida por estimulação elétrica (TEGEDER et al., 2003). Neste tipo de injúria não é detectada resposta inflamatória, uma vez que a aplicação da eletro-estimulação não desencadeia sinais e sintomas do processo inflamatório (NAGAKURA et al., 2008).

O aumento da expressão de receptores opióides, particularmente do tipo μ , detectado na vigência de lesão tecidual, como a constrição crônica do nervo isquiático (CCI) (TRUONG et al., 2003), pode explicar a maior eficácia antinociceptiva local de drogas com atividade opióide, em comparação à observada após a administração sistêmica destas drogas. Klabi e Cahill (2007) mostraram, também em modelos de CCI, aumento na expressão de receptores δ em DRG de animais submetidos à constrição do nervo, quando comparado aos animais falso-operados. Apesar destas evidências, existem dados contraditórios na literatura mostrando que na vigência de dores crônicas, a efetividade de agonistas opióides está diminuída (TRUONG et al., 2003). Neste sentido, Zhang e et al. (1998) e Kohno e et al. (1995) evidenciaram, em estudos utilizando modelos experimentais de dor neuropática, diminuição da expressão de receptores opióides μ em neurônios do DRG. Dessa forma, os dados da literatura são controversos em relação à expressão destes receptores, bem como em relação à eficácia de fármacos opióides na vigência de inflamação/lesão tecidual. Cabe ressaltar que a maioria dos dados de literatura envolvem estudos com receptores opióides do tipo μ , uma vez que, como citado anteriormente, os principais fármacos utilizados no controle da dor atuam preferencialmente nestes receptores.

Além de interferir com a expressão gênica e protéica de receptores opióides, a inflamação ou lesão tecidual podem também aumentar a exposição destes receptores no tecido inflamado. Antonijevic et al. (1995) demonstraram que a ruptura da barreira perineural, seja por mediadores inflamatórios ou por solução hiperosmótica, é essencial para o efeito antinociceptivo de agonistas μ opióides. Estes autores propõem que a ruptura desta barreira física facilitaria o acesso do agonista opióide ao seu receptor, aumentando seu efeito antinociceptivo.

Estudos experimentais têm mostrado também que a reação inflamatória pode alterar a funcionalidade de receptores opióides e sua ligação ao agonista (ZOLLNER

et al., 2003; SHAQURA et al., 2004). Estudos utilizando células do DRG, mostraram que a inflamação induzida por CFA favorece a ligação de receptores μ opióides ao seu respectivo agonista e o acoplamento deste receptor com a proteína G, com conseqüente ampliação da sinalização intracelular. Ainda, foi mostrado em estudos *in vitro*, que a diminuição do pH do microambiente de células em cultura, altera a função de proteínas G de membranas. Estas alterações incluem a diminuição da estimulação da adenilil ciclase por proteínas G estimulatórias (Gs), acarretando a potencialização do efeito inibitório gerado por um agonista opióide, via proteína G inibitória (Gi) (SELLEY et al., 1993). Cabe ressaltar que, novamente, grande parte destes estudos envolve receptores μ opióides, sendo escassas as informações envolvendo receptores κ e δ opióides. Przewlocka et al. (1992) observaram que a adenilil ciclase de células obtidas de DRG de ratos portadores de monoartrite, são mais sensíveis à inibição por agonistas μ e δ opióides. Como conseqüência deste efeito, estes animais apresentam maior resposta antinociceptiva à injeção intratecal de opióides, quando comparado aos animais controles. Estes dados mostram novamente, que a presença de um processo inflamatório favorece a efetividade analgésica de agonistas opióides. Contudo, a maioria dos estudos envolve modelos de sensibilização crônica, sendo que o aumento da potência analgésica de opióides é também detectada nos períodos iniciais da inflamação. Assim, estudos para melhor compreender os mecanismos envolvidos neste efeito, avaliando possíveis alterações na funcionalidade destes receptores, nesta fase aguda do processo, e que possam contribuir para o aumento na atividade analgésica dos opióides, tornam-se relevantes.

1.4 A crotalfina

Os estudos com a crotalfina estiveram baseados em evidências, do início do século passado, que mostravam que o veneno da cascavel induz potente efeito analgésico em seres humanos (BRAZIL, 1934; 1950). Em decorrência destes dados, nosso grupo realizou estudos experimentais para confirmar e melhor caracterizar esta atividade do veneno crotálico. Estes estudos mostraram que a administração oral do veneno em camundongos ou ratos (200 – 1.600 $\mu\text{g}/\text{kg}$), induz antinocicepção mediada pela ativação de receptores opióides do tipo κ e/ou δ (GIORGI et al., 1993;

KOHNO et al., 1995; PICOLO et al., 1998; PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; PICOLO et al., 2003; PICOLO e CURY, 2004; BRIGATTE, 2005). Subseqüentemente à ativação dos receptores opióides, periféricamente ocorre ativação da via L-arginina/óxido nítrico/GMPc/PKG e abertura de canais de K⁺ dependentes de ATP, mecanismo molecular fundamental para o efeito antinociceptivo periférico do veneno (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; PICOLO e CURY, 2004). Apesar da atividade opióide, o tratamento prolongado com o veneno crotálico não induz tolerância ao efeito antinociceptivo no modelo de hipernocicepção induzida por carragenina (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000) e não acarreta o aparecimento de sintomas que caracterizem uma síndrome de abstinência (BRIGATTE et al., 2001). Foi também demonstrado que o efeito antinociceptivo do veneno crotálico é de longa duração, sendo detectado por 120 horas, quando avaliado em modelo animal de neuropatia por constrição crônica do nervo isquiático de rato (GUTIERREZ et al., 2008) e 72 horas, quando avaliado no teste da placa quente e nos modelos de hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina ou prostaglandina E₂ (PGE₂) (PICOLO; GIORGI; CURY, 2000; BRIGATTE et al., 2001; PICOLO e CURY, 2004).

Baseado nas propriedades antinociceptivas do veneno crotálico, procedeu-se à purificação e caracterização química do componente responsável pelo efeito antinociceptivo do veneno. Nestes estudos foi identificada a crotalfina, um peptídeo de 14 aminoácidos, contendo uma ponte dissulfídica e um ácido piroglutâmico (Figura 1).

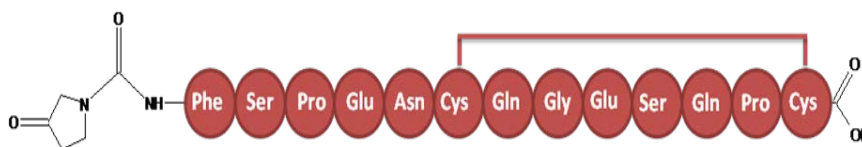


Figura 1. Seqüência de aminoácidos da crotalfina.

Estudos com a crotalfina mostraram que, da mesma maneira que o veneno bruto, esta substância é capaz de induzir antinocicepção de longa duração, mediada pela ativação de receptores opióides (KONNO et al., 2008). Curiosamente, apesar deste peptídeo apresentar efeito opióide, a sua estrutura química não se assemelha a nenhum peptídeo opióide conhecido (KONNO et al., 2008). É importante salientar que este peptídeo apresenta similaridade com a cadeia gama da crotapotina, a subunidade não tóxica da forma heterodimérica da crotoxina, a principal neurotoxina do veneno crotálico (BON et al., 1989; AIRD et al., 1990; FAURE et al., 1991).

Com base na estrutura química da crotalfina, foi possível obter o peptídeo na sua forma sintética (síntese química manual em fase sólida) (KONNO et al., 2008). Os estudos sobre a atividade antinociceptiva da crotalfina sintética mostraram que este peptídeo reproduz os dados obtidos com o veneno bruto e também com o peptídeo natural. Assim, a crotalfina sintética induz antinocicepção no modelo de hipernocicepção induzida por PGE₂, quando administrada por vias sistêmicas – oral e endovenosa – ou por via local – intraplantar (KONNO et al., 2008). Quando administrada por via oral, sua efetividade neste modelo é observada a partir da dose de 0,0016 µg/Kg. O efeito antinociceptivo deste peptídeo é também observado no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina e em modelos experimentais de dor crônica – dor de câncer e dor neuropática (BRIGATTE, 2005; GUTIERREZ et al., 2008; KONNO et al., 2008). Em todos os modelos o efeito é de longa duração (2-3 dias nos modelos de dor crônica e 5 dias no modelo de hipernocicepção inflamatória) e mediado pela ativação de receptores opióides periféricos dos tipos κ (modelos agudos) ou κ e δ (modelos crônicos) (GUTIERREZ et al., submetido).

Os estudos com a crotalfina mostraram ainda, que o tratamento prolongado com este peptídeo não acarreta o desenvolvimento de tolerância ao efeito antinociceptivo, quando avaliado em modelo de dor neuropática (GUTIERREZ et al., 2008). Diferentemente do observado com a morfina (CELERIER et al., 2000; GUIGNARD et al., 2000; COMPTON et al., 2003), a administração de crotalfina em ratos, em doses sub-analgésicas, não induz o aparecimento de hipernocicepção ou, quando administrada em doses analgésicas, não acarreta o desenvolvimento de hipernocicepção tardia, subseqüentemente ao fim do efeito analgésico (PEREIRA e CURY, em fase de elaboração). É importante ressaltar, ainda, que a efetividade da crotalfina foi também demonstrada, recentemente, em animais fêmeas. Este é um

parâmetro importante no desenvolvimento de um novo fármaco, uma vez que várias evidências têm sugerido a existência de diferenças na sensação de dor entre homens e mulheres, bem como entre animais machos e fêmeas (BERKLEY, 1997; BINDER et al., 2000; WIESENFELD-HALLIN, 2005). Os dados obtidos pelo nosso grupo demonstram que a crotalina é mais efetiva em acarretar antinocicepção em ratas, quando comparado aos machos, além de induzir efeito de maior duração nas fêmeas (6 dias após uma única administração) (BRITTO e CURY, em fase de elaboração).

Estudos recentes mostraram que a maior potência e a longa duração de ação da crotalina são detectadas na presença de um estímulo inflamatório (carragenina), de sensibilização (PGE_2) ou de neuropatia, uma vez que na ausência destes estímulos, o efeito antinociceptivo é de menor intensidade e detectado apenas por 5 horas (PEREIRA e CURY, em fase de elaboração). Apesar destes dados, não foi determinado, até o presente momento, se as alterações observadas para as propriedades antinociceptivas da crotalina, na vigência de sensibilização prévia, estão relacionadas a alterações na expressão e/ou funcionalidade de receptores opióides. Como ressaltado anteriormente, alterações na intensidade do efeito analgésico de drogas com atividade opióide, como por exemplo a morfina, são também observadas na vigência de processos inflamatórios. Apesar de alguns mecanismos envolvidos nestas alterações já terem sido descritos (HASSAN et al., 1993; ANTONIJEVIC et al., 1995; ZOLLNER et al., 2003), estes mecanismos não são totalmente compreendidos, em particular, aqueles relacionados às alterações que ocorrem nos estágios iniciais dos processos inflamatórios. Adicionalmente, estudos mostrando a possível correlação entre a instalação de dores crônicas, como a dor neuropática, e a expressão e atividade de receptores opióides, são ainda controversos. Ainda em relação aos estudos sobre a ação da crotalina que mostram que, na presença de nocicepção aguda, o efeito antinociceptivo deste peptídeo é decorrente da ativação de receptores κ -opióides e em modelos de dor persistente, este efeito é decorrente da ativação de receptores κ - e δ -opióides, não foram ainda determinados os mecanismos pelos quais o processo de sensibilização neuronal aguda ou crônica interfere com o tipo de receptor opióide expresso ou ativado por este peptídeo.

6 Conclusão

Os dados apresentados indicam que:

- ✓ fármacos com atividade opióide apresentam maior eficácia local antinociceptiva na vigência de sensibilização aguda induzida pela PGE₂ ou de hipernocicepção crônica induzida pela CCI. Estas condições de sensibilização interferem com a expressão gênica e protéica de receptores opióides do tipo μ , κ e δ . Contudo, estes receptores são diferentemente regulados, dependendo do estímulo e do tecido avaliado, podendo ainda, apresentar maior ativação por seu agonista, nestas condições. Estes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias que resultem em melhor controle terapêutico dos diferentes tipos de dor.
- ✓ a crotalina apresenta maior eficácia antinociceptiva na vigência de sensibilização e este efeito parece ser decorrente da maior ativação de receptores κ (hipernocicepção induzida por PGE₂) ou κ e δ (hipernocicepção crônica induzida por lesão de nevo). Os resultados indicam ainda, que a crotalina ativa a via de sinalização das MAPKs, sendo que a sensibilização induzida pela PGE₂ amplia este efeito. A ativação das MAPKs por este peptídeo, é mediada pela ativação de PKC ζ em células do DRG. Estes resultados abrem novos caminhos para a investigação destas vias de sinalização no controle da hipernocicepção.

Referências

REFERÊNCIAS*

- AIMONE, L. D.; YAKSH, T. L. Opioid modulation of capsaicin-evoked release of substance P from rat spinal cord in vivo. **Peptides**, v. 10, n. 6, p. 1127-1131, 1989.
- AIRD, S. D. et al. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1040, n. 2, p. 217-224, 1990.
- AKOPIAN, A. N. et al. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. **Nat. Neurosci.**, v. 2, n. 6, p. 541-548, 1999.
- ALEY, K. O.; LEVINE, J. D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 6, p. 2181-2186, 1999.
- ALEY, K. O. et al. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. **J. Neurosci.**, v. 20, n. 12, p. 4680-4685, 2000.
- AMARANTE, L. H.; DUARTE, I. D. The kappa-opioid agonist (+/-)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 454, n. 1, p. 19-23, 2002.
- ANTONIJEVIC, I. et al. Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 1 p. 165-172, 1995.
- ARVIDSSON, U. et al. Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 5, p. 3328-3341, 1995.
- ATWEH, S. F.; KUHAR, M. J. Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. I. Spinal cord and lower medulla. **Brain. Res.**, v. 124, n. 1, p. 53-67, 1977.
- BARLOCCO, D. et al. The opioid-receptor-like 1 (ORL-1) as a potential target for new analgesics. **Eur J Med Chem**, v. 35, n. 3, p. 275-282, 2000.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.
- BASBAUM, A. I. et al. Opiate and stimulus-produced analgesia: functional anatomy of a medullospinal pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 73, n. 12, p. 4685-4688, 1976.
- BASBAUM, A. I. et al. The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. **Pain**, v. 47, n. 3, p. 359-367, 1991.
- BEGLEY, R. et al. Biodistribution of intracellularly acting peptides conjugated reversibly to Tat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 318, n. 4, p. 949-954, 2004.
- BELCHEVA, M. M. et al. Mu and kappa opioid receptors activate ERK/MAPK via different protein kinase C isoforms and secondary messengers in astrocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 30, p. 27662-27669, 2005.
- BELCHEVA, M. M. et al. Opioid modulation of extracellular signal-regulated protein kinase activity is ras-dependent and involves Gbetagamma subunits. **J. Neurochem.**, v. 70, n. 2, p. 635-645, 1998.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: Referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BELMONTE, C.; CERVERO, E. Neurobiology of receptors. In: BELMONTE, C.; CERVERO, E. (Ed.) **Oxford University Press**: Oxford, 1996. p. 34-39.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, 1988.

BERKLEY, K. J. Sex differences in pain. **Behav Brain Sci**, v. 20, n. 3, p. 371-380; discussion 435-513, 1997.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 1999.

BEVAN, S. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. In: WALL, P. D. e MELZACK, R. (Ed.). **Text Book of Pain**. Edinburgh: Churchill-Livingstone, p. 85-103. 1999.

BINDER, W. et al. Effect of gender on anti-inflammatory and analgesic actions of two kappa-opioids. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 292, n. 1, p. 303-309, 2000.

BODNAR, R. J.; KLEIN, G. E. Endogenous opiates and behavior: 2004. **Peptides**, v. 26, n. 12, p. 2629-2711, 2005.

BOHN, L. M. et al. Mitogenic signaling via endogenous kappa-opioid receptors in C6 glioma cells: evidence for the involvement of protein kinase C and the mitogen-activated protein kinase signaling cascade. **J. Neurochem.**, v. 74, n. 2, p. 564-573, 2000.

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.

BOWEN, C. A. et al. Effects of mixed-action kappa/mu opioids on cocaine self-administration and cocaine discrimination by rhesus monkeys. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 6, p. 1125-1139, 2003.

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. 248-254, 1976.

BRAZIL, V. **Do emprêgo da peçonha em terapêutica**. p. 7-21, 1934.

BRAZIL, V. **Do emprego da peçonha em terapêutica**. v. 60, p. 398-408, 1950.

BRIGATTE, P. **Efeito antinociceptivo do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a dor de câncer em ratos. Inibição do crescimento tumoral pela crotoxina**. 2005. 152 f. Tese (Doutorado em Patologia) - Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BRIGATTE, P. et al. Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediated by pharmacodynamic mechanisms. **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1399-1410, 2001.

BROMM, B.; TREEDE, R. D. Pain related cerebral potentials: late and ultralate components. **Int. J. Neurosci.**, v. 33, n. 1-2, p. 15-23, 1987.

BROWNSTEIN, M. J. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 90, n. 12, p. 5391-5393, 1993.

BRUCHAS, M. R.; CHAVKIN, C. Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 210, n. 2, p. 137-147, 2010.

BRUCHAS, M. R. et al. Kappa opioid receptor activation of p38 MAPK is GRK3- and arrestin-dependent in neurons and astrocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 26, p. 18081-18089, 2006.

BRUCHAS, M. R. et al. Repeated swim stress induces kappa opioid-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. **Neuroreport**, v. 19, n. 14, p. 1417-1422, 2008.

BRUCHAS, M. R. et al. Long-acting kappa opioid antagonists disrupt receptor signaling and produce noncompetitive effects by activating c-Jun N-terminal kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 41, p. 29803-29811, 2007.

CAHILL, C. M.; HOLDRID et al. Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. **Trends Pharmacol Sci**, v. 28, n. 1, p. 23-31, 2007.

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.

CAO, Y. Q. Voltage-gated calcium channels and pain. **Pain**, v. 126, n. 1-3, p. 5-9, 2006.

CARLEZON JR., W. A.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. The many faces of CREB. **Trends Neurosci.**, v. 28, n. 8, p. 436-445, 2005.

CARLTON, S. M. et al. Neuroma formation and numbers of axons in a rat model of experimental peripheral neuropathy. **Neurosci. Lett.**, v. 131, n. 1, p. 88-92, 1991.

CARROLL, I. et al. Pharmacological properties of JD1c: a novel kappa-opioid receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 501, n. 1-3, p. 111-119, 2004.

CATHELINE, G.; KAYSER, V. GUILBAUD, G. Further evidence for a peripheral component in the enhanced antinociceptive effect of systemic morphine in mononeuropathic rats: involvement of kappa-, but not delta-opioid receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 315, n. 2, p. 135-143, 1996.

CAVIEDES, B. E.; HERRANZ, J. L. [Advances in physiopathology and the treatment of neuropathic pain]. **Rev Neurol**, v. 35, n. 11, p. 1037-1048, 2002.

CELERIER, E. et al. Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats: preventive effect of ketamine. **Anesthesiology**, v. 92, n. 2, p. 465-472, 2000.

CESARE, P. et al. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron**, v. 23, n. 3, p. 617-624, 1999.

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

CHATURVEDI, K. et al. Structure and regulation of opioid receptors. **Biopolymers**, v. 55, n. 4, p. 334-346, 2000.

COGGESHALL, R. E. et al. Opioid receptors on peripheral sensory axons. **Brain. Res.**, v. 764, n. 1-2, p. 126-132, 1997.

COLEMAN, R. A. et al. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol. Rev.**, v. 46, n. 2, p. 205-229, 1994.

COLLINS, S. et al. NMDA receptor antagonists for the treatment of neuropathic pain. **Pain Med.**, v. 11, n. 11, p. 1726-1742,

COMPTON, P. et al. Withdrawal hyperalgesia after acute opioid physical dependence in nonaddicted humans: a preliminary study. **J. Pain.**, v. 4, n. 9, p. 511-519, 2003.

COUSINS, M. J.; COHEN, M. L. Physiology and Psychology of Acute Pain. In: COUSINS, M. J. e COHEN, M. L. (Ed.). **Acute Pain Management: Scientific Evidence**. Melbourn, Australia: Australian and New Zealand College of Anaesthetists, 2005. p. 1-19.

COX, J. J. et al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 894-898, 2006.

CUNHA, F. Q. et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br J Pharmacol.**, v. 104, n. 3, p. 765-767, 1991.

CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 660-664, 1992.

CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M.M; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127, n. 3, p. 671-678, 1999.

CUNHA, T. M. et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 107, n. 9, p. 4442-4447, 2010.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

DADO, R. J. et al. Immunofluorescent identification of a delta (delta)-opioid receptor on primary afferent nerve terminals. **Neuroreport**, v. 5, n. 3, p. 341-344, 1993.

DAI, Y. et al. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 17, p. 7737-7745, 2002.

DAVIDSON, J. et al. Pethidine-augmented white cell scintigraphy in inflammatory bowel disease. **Eur J Nucl Med**, v. 27, n. 6, p. 656-659, 2000.

DEVOR, M. The pathophysiology of damaged peripheral nerves. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (Ed.). **Text Book of Pain**. Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1994. p. 79-100.

DHAWAN, B. N. et al. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 48, n. 4, p. 567-592, 1996.

DIB-HAJJ, S. D.; YANG, Y.; WAXMAN S.G Genetics and molecular pathophysiology of Na(v)1.7-related pain syndromes. **Adv. Genet.**, v. 63, p. 85-110, 2008.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN, A. F. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 8, p. 1235-1238, 1987.

DINA, O. A. et al. Role of the sensory neuron cytoskeleton in second messenger signaling for inflammatory pain. **Neuron**, v. 39, n. 4, p. 613-624, 2003.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 75, p. 125-131, 1995.

DWORKIN, R. H. et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch. Neurol.**, v. 60, n. 11, p. 1524-1534, 2003.

ELIAV, E. et al. The kappa opioid agonist GR89,696 blocks hyperalgesia and allodynia in rat models of peripheral neuritis and neuropathy. **Pain**, v. 79, n. 2-3, p. 255-264, 1999.

ENDRES-BECKER, J. et al. Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. **Mol. Pharmacol.**, v. 71, n. 1, p. 12-18, 2007.

ENGLAND, S.; BEVAN, S.; DOCHERTY, R.J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. **J. Physiol.**, v. 495, pt. 2, p. 429-440, 1996.

ERSPAMER, V. et al. Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for delta opioid binding sites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 86, n. 13, p. 5188-5192, 1989.

EVANS, A. R. et al. The cAMP transduction cascade mediates the PGE2-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. **J. Physiol.**, v. 516, pt. 1, p. 163-178, 1999.

FAURE, G. et al. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A2 neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. **Biochemistry**, v. 30, n. 32, p. 8074-8083, 1991.

FERGUSON, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, n. 1, p. 1-24, 2001.

FERGUSON, S. S. et al. Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. **Science**, v. 271, n. 5247, p. 363-366, 1996.

FERREIRA, S. H. Local control of inflammatory pain. **Agents Actions**, v. 11, n. 6-7, p. 636-638, 1981.

FERREIRA, S. H. **A classification of peripheral analgesics based upon their mode of action.** Oxford: Oxford University Press, 1990.

FERREIRA, S. H. **Óxido Nítrico Endógeno y Farmacos Nitrovasodilatadores.** Cantabria: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cantabria, 1994.

FERREIRA, S. H. et al. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 201, n. 1, p. 121-122, 1991.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B. Prostaglandin hyperalgesia, IV: a metabolic process. **Prostaglandins**, v. 21, n. 5, p. 789-792, 1981.

FERREIRA, S. H. et al. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, n. 6184, p. 698-700, 1988.

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

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 1227-1231, 1993.

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

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. II - Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonists. **Prostaglandins**, v. 18, n. 2, p. 191-200, 1979b.

FERREIRA, S. H.; ROMITELLI, M.; DE NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 13, p. S220-222, 1989. Suppl. 5.

FIELDS, H. L.; ANDERSON, S. D. Evidence that raphe-spinal neurons mediate opiate and midbrain stimulation-produced analgesias. **Pain**, v. 5, n. 4, p. 333-349, 1978.

FOLEY, K. M.; INTURRISI, C. E. Analgesic drug therapy in cancer pain: principles and practice. **Med. Clin. North. Am.**, v. 71, n. 2, p. 207-232, 1987.

FUJINO, H. et al. Prostaglandin E₂ induced functional expression of early growth response factor-1 by EP₄, but not EP₂, prostanoid receptors via the phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 14, p. 12151-12156, 2003.

GENDRON, L. et al. Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. **Neuroscience**, v. 150, n. 4, p. 807-817, 2007.

GIORGI, R. et al. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 31, n. 10, p. 1257-1265, 1993.

GOLD, M. S.; LEVINE, J. D. DAMGO inhibits prostaglandin E₂-induced potentiation of a TTX-resistant Na⁺ current in rat sensory neurons in vitro. **Neurosci. Lett.**, v. 212, n. 2, p. 83-86, 1996.

GOLD, M. S. et al. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p. 1108-1112, 1996.

GOUARDERES, C.; CROS, J.; QUIRION, R. Autoradiographic localization of mu, delta and kappa opioid receptor binding sites in rat and guinea pig spinal cord. **Neuropeptides**, v. 6, n. 4, p. 331-342, 1985.

GRACEY, R. H.; LYNCH S.A.; BENNETT, G.J. Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. **Pain**, v. 51, n. 2, p. 175-194, 1992.

GRANADOS-SOTO, V. et al. Evidence for the involvement of nitric oxide in the antinociceptive effect of ketorolac. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 277, n. 2-3, p. 281-284, 1995.

GRANADOS-SOTO, V. et al. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 340, n. 2-3, p. 177-180, 1997.

GUIGNARD, B. et al. Acute opioid tolerance: intraoperative remifentanil increases postoperative pain and morphine requirement. **Anesthesiology**, v. 93, n. 2, p. 409-417, 2000.

GUPTA, A. et al. Conformation state-sensitive antibodies to G-protein-coupled receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 8, p. 5116-5124, 2007.

GUTIERREZ, V. P. **Efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a dor neuropática e a resposta imune**. 2005. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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. Peripheral -arginine-nitric oxide-cGMP pathway and ATP-sensitive K⁺ channels are involved in the antinociceptive effect of crotalphine on neuropathic pain in rats. **Behavioural Pharmacology**. Submitted.

HAN, J. et al. ATP-sensitive K(+) channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 283, n. 4, p. H1545-1554, 2002.

HAN, J. et al. Modulation of ATP-sensitive potassium channels by cGMP-dependent protein kinase in rabbit ventricular myocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 25, p. 22140-22147, 2001.

HARRISON, L. M. et al. Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates. **Peptides**, v. 19, n. 9, p. 1603-1630, 1998.

HASSAN, A. H. et al. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. **Neuroscience**, v. 55, n. 1, p. 185-195, 1993.

HINGTGEN, C. M. et al. Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 7 Pt 2, p. 5411-5419, 1995.

INGRAM, S. L.; WILLIAMS, J. T. Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase. **Neuron**, v. 13, n. 1, p. 179-186, 1994.

ITO, N. OBATA, H.; SAITO, S. Spinal microglial expression and mechanical hypersensitivity in a postoperative pain model: comparison with a neuropathic pain model. **Anesthesiology**, v. 111, n. 3, p. 640-648, 2009.

JENSEN, T. S. Opioids in the brain: supraspinal mechanisms in pain control. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 41, n. 1, pt. 2, p. 123-132, 1997.

JI, R. R.; WOOLF, C. J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol. Dis.**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2001.

JI, R. R. et al. Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 12, p. 8156-8166, 1995.

JOHNSON, E. E. et al. The role of opioid receptor phosphorylation and trafficking in adaptations to persistent opioid treatment. **Neurosignals**, v. 14, n. 6, p. 290-302, 2005.

JONGKAMONWIWAT, N. et al. The presence of opioid receptors in rat inner ear. **Hear Res.**, v. 181, n. 1-2, p. 85-93, 2003.

JOSHI, S. K. et al. Involvement of the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. **Pain**, v. 123, n. 1-2, p. 75-82, 2006.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

JUNIEN, J. L.; WETTSTEIN, J. G. Role of opioids in peripheral analgesia. **Life Sci.**, v. 51, n. 26, p. 2009-2018, 1992.

KABLI, N.; CAHILL, C. M. Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain. **Pain**, v. 127, n. 1-2, p. 84-93, 2007.

KAGE, K. et al. Alteration of dorsal root ganglion P2X3 receptor expression and function following spinal nerve ligation in the rat. **Exp. Brain Res.**, v. 147, n. 4, p. 511-519, 2002.

KAM, A. Y. et al. Kappa-opioid receptor signals through Src and focal adhesion kinase to stimulate c-Jun N-terminal kinases in transfected COS-7 cells and human monocytic THP-1 cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 310, n. 1, p. 301-310, 2004a.

KAM, A. Y. et al. Phosphatidylinositol-3 kinase is distinctively required for mu-, but not kappa-opioid receptor-induced activation of c-Jun N-terminal kinase. **J. Neurochem.**, v. 89, n. 2, p. 391-402, 2004b.

KARANDIKAR, M.; COBB, M. H. Scaffolding and protein interactions in MAP kinase modules. **Cell Calcium**, v. 26, n. 5, p. 219-226, 1999.

KASSUYA, C. A. et al. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **Br. J. Pharmacol.**, v. 150, n. 6, p. 727-737, 2007.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 87, n. 1, p. 3-11, 2001.

KIEFFER, B. L. et al. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 89, n. 24, p. 12048-12052, 1992.

KIEFFER, B. L.; EVANS, C. J. Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo. **Neuropharmacology**, v. 56 Suppl 1, p. 205-212, 2009.

KIM, S. H.; CHUNG, J. M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, n. 3, p. 355-363, 1992.

KOHNO, T. et al. Three-dimensional structure in solution of the calcium channel blocker omega-conotoxin MVIIA. **Biochemistry**, v. 34, n. 32, p. 10256-10265, 1995.

KOMATSU, T. et al. Spinal ERK activation via NO-cGMP pathway contributes to nociceptive behavior induced by morphine-3-glucuronide. **Biochem. Pharmacol.**, v. 78, n. 8, p. 1026-1034, 2009.

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.

KREIBICH, A. S.; BLENDY, J. A. cAMP response element-binding protein is required for stress but not cocaine-induced reinstatement. **J. Neurosci.**, v. 24, n. 30, p. 6686-6692, 2004.

KUHAR, M. J. et al. Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. **Nature**, v. 245, n. 5426, p. 447-450, 1973.

KURASHI, Y. et al. Suppression by gabapentin of pain-related mechano-responses in mice given orthotopic tumor inoculation. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, n. 4, p. 550-552, 2003.

LAW, B. K. et al. Salicylate-induced growth arrest is associated with inhibition of p70s6k and down-regulation of c-myc, cyclin D1, cyclin A, and proliferating cell nuclear antigen. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 49, p. 38261-38267, 2000.

LAW, P. Y. et al. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 40, p. 389-430, 2000.

LEE, B. H. et al. Behavioral characteristics of a mouse model of cancer pain. **Yonsei. Med. J.**, v. 46, n. 2, p. 252-259, 2005.

LEWIS, J. et al. Opioids and pain regulation. **Pain Headache**, v. 9, p. 129-159, 1987.

LI, J. L. et al. Immunocytochemical localization of mu-opioid receptor in primary afferent neurons containing substance P or calcitonin gene-related peptide. A light and electron microscope study in the rat. **Brain. Res.**, v. 794, n. 2, p. 347-352, 1998.

LIGHT, A. R.; WILLCOCKSON, H. H. Spinal laminae I-II neurons in rat recorded in vivo in whole cell, tight seal configuration: properties and opioid responses. **J. Neurophysiol.**, v. 82, n. 6, p. 3316-3326, 1999.

LIN, Y. F. et al. NO stimulation of ATP-sensitive potassium channels: Involvement of Ras/mitogen-activated protein kinase pathway and contribution to neuroprotection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, n. 20, p. 7799-7804, 2004.

LOESER, J. D. Perspectives on pain. In: WORLD CONGRESS ON CLINICAL PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, 1., 1980, London. **Proceedings...** London: [s.n.], 1980. p. 316-326.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-477, 2008.

LOHSE, M. J. et al. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. **Science**, v. 248, n. 4962, p. 1547-1550, 1990.

LOMAS, L. M. et al. Sex differences in the potency of kappa opioids and mixed-action opioids administered systemically and at the site of inflammation against capsaicin-induced hyperalgesia in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 191, n. 2, p. 273-285, 2007.

LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrrone-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflamm Res**, v. 45, n. 6, p. 308-311, 1996.

LORENZETTI, B. B. et al. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **Eur Cytokine Netw**, v. 13, n. 4, p. 456-461, 2002.

LUGER, N. M. et al. Efficacy of systemic morphine suggests a fundamental difference in the mechanisms that generate bone cancer vs inflammatory pain. **Pain**, v. 99, n. 3, p. 397-406, 2002.

MA, W. et al. Chronic morphine exposure increases the phosphorylation of MAP kinases and the transcription factor CREB in dorsal root ganglion neurons: an in vitro and in vivo study. **Eur. J. Neurosci.**, v. 14, n. 7, p. 1091-1104, 2001.

MAEKAWA, K. et al. Expression of mu- and kappa-, but not delta-, opioid receptor mRNAs is enhanced in the spinal dorsal horn of the arthritic rats. **Pain**, v. 64, n. 2, p. 365-371, 1996.

MALMBERG, A. B. et al. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKCgamma. **Science**, v. 278, n. 5336, p. 279-283, 1997.

MANSOUR, A. et al. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. **J. Comp. Neurol.**, v. 350, n. 3, p. 412-438, 1994.

MAO, J.; GOLD, M.S.; BACKONJA, M.M. Combination drug therapy for chronic pain: a call for more clinical studies. **J. Pain.**, v. 12, n. 2, p. 157-166, 2010.

MAO, J. et al. Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord of rats associated with tolerance to the analgesic effects of morphine. **Brain. Res.**, v. 677, n. 2, p. 257-267, 1995.

MCLACHLAN, E. M. et al. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. **Nature**, v. 363, n. 6429, p. 543-546, 1993.

MELCHIORRI, P. et al. Long-term sensitization to the activation of cerebral delta-opioid receptors by the deltorphin Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂ in rats exposed to morphine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 89, n. 9, p. 3696-3700, 1992.

MELIEF, E. J. et al. Ligand-directed c-Jun N-terminal kinase activation disrupts opioid receptor signaling. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 107, n. 25, p. 11608-11613, 2010.

MERSKEY, H. Logic, truth and language in concepts of pain. **Qual. Life. Res.**, v. 3, p. S69-76, 1994.

MESSINGER, R. B. et al. In vivo silencing of the Ca(V)_{3.2} T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy. **Pain**, v. 145, n. 1-2, p. 184-195, 2009.

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

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

MILLIGAN, E. D. et al. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. **Brain. Res.**, v. 861, n. 1, p. 105-116, 2000.

MINAMI, M.; SATOH, M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. **Neurosci. Res.**, v. 23, n. 2, p. 121-145, 1995.

MINDEN, A. et al. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. **Mol. Cell Biol.**, v. 14, n. 10, p. 6683-6688, 1994.

MOCHLY-ROSEN, D.; KAUVAR, L. M. Modulating protein kinase C signal transduction. **Adv. Pharmacol.**, v. 44, p. 91-145, 1998.

MORIYAMA, T. et al. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. **Mol. Pain**, v. 1, p. 3, 2005.

MOUSA, S. A. et al. Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. **J. Neuroimmunol.**, v. 126, n. 1-2, p. 5-15, 2002.

MOUSA, S. A. et al. beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. **J. Neuroimmunol.**, v. 115, n. 1-2, p. 71-78, 2001.

NAGAKURA, Y. et al. Determination of current threshold for paw withdrawal with sine-wave electrical stimulation in rats: effect of drugs and alteration in acute inflammation. **Pain**, v. 134, n. 3, p. 293-301, 2008.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacology**, v. 135, p. 145-153, 1987.

NARITA, M. et al. Lack of the involvement of mu1-opioid receptor subtype on motivational effects induced by the endogenous mu-opioid receptor ligands endomorphin-1 and -2 in the mouse. **Neurosci. Lett.**, v. 308, n. 1, p. 17-20, 2001.

NASSAR, M. A. et al. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, n. 34, p. 12706-12711, 2004.

NEGRI, M. et al. Plasma opioid levels during extracorporeal gallstone lithotripsy. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 88, n. 7, p. 1093-1096, 1993.

NEGUS, S. S. et al. Kappa opioid antagonist effects of the novel kappa antagonist 5'-guanidinonaltrindole (GNTI) in an assay of schedule-controlled behavior in rhesus monkeys. **Psychopharmacology (Berl.)**, v. 163, n. 3-4, p. 412-419, 2002.

NORTH, R. A. Twelfth Gaddum memorial lecture. Drug receptors and the inhibition of nerve cells. **Br. J. Pharmacol.**, v. 98, n. 1, p. 13-28, 1989.

NORTH, R. A.; EGAN, T. M. Actions and distributions of opioid peptides in peripheral tissues. **Br. Med. Bull.**, v. 39, n. 1, p. 71-75, 1983.

OBARA, I. et al. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. **Pain**, v. 141, n. 3, p. 283-291, 2009.

OCANA, M. et al. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 500, n. 1-3, p. 203-219, 2004.

OLSSON, Y. Microenvironment of the peripheral nervous system under normal and pathological conditions. **Crit. Rev. Neurobiol.**, v. 5, n. 3, p. 265-311, 1990.

PARADA, C. A. et al. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to Nav1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 100, n. 5, p. 2923-2928, 2003.

PERSSON, A. I. et al. Comparison of immunoblotted delta opioid receptor proteins expressed in the adult rat brain and their regulation by growth hormone. **Neurosci. Res.**, v. 52, n. 1, p. 1-9, 2005.

PICOLO, G. **Participação de receptores opióides, óxido nítrico e de canais para potássio no efeito antinociceptivo induzido pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus***. 2002. 100 f. Tese (Departamento de Farmacologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

PICOLO, G. et al. Activation of peripheral ATP-sensitive K⁺ channels mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 469, n. 1-3, p. 57-64, 2003.

PICOLO, G.; CURY, Y. Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, a delta- and kappa-opioid receptor agonist. **Life Sci.**, v. 75, n. 5, p. 559-573, 2004.

PICOLO, G. et al. The antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom is mainly due to a supraspinally integrated response. **Toxicon**, v. 36, n. 1, p. 223-227, 1998.

PICOLO, G.; GIORGI, R.; CURY, Y. Delta-Opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 391, p. 55-62, 2000b.

PIERCE, K. L. et al. Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 25, p. 23155-23160, 2001.

PIOVEZAN, A. P. et al. Endothelins potentiate formalin-induced nociception and paw edema in mice. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 75, n. 6, p. 596-600, 1997.

PIROS, E. T. et al. Functional analysis of cloned opioid receptors in transfected cell lines. **Neurochem. Res.**, v. 21, n. 11, p. 1277-1285, 1996.

POLAKIEWICZ, R. D. et al. A mitogen-activated protein kinase pathway is required for mu-opioid receptor desensitization. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 20, p. 12402-12406, 1998.

POLAKIEWICZ, R. D. et al. mu-Opioid receptor activates signaling pathways implicated in cell survival and translational control. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 36, p. 23534-23541, 1998.

POLGAR, E. et al. The types of neuron which contain protein kinase C gamma in rat spinal cord. **Brain. Res.**, v. 833, n. 1, p. 71-80, 1999.

POONYACHOTI, S. et al. Chemical coding of neurons expressing delta- and kappa-opioid receptor and type I vanilloid receptor immunoreactivities in the porcine ileum. **Cell Tissue Res.**, v. 307, n. 1, p. 23-33, 2002.

PORRECA, F. et al. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 96, n. 14, p. 7640-7644, 1999.

PORRECA, F. et al. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci.**, v. 25, n. 6, p. 319-325, 2002.

PRZEWLOCKA, B. et al. Differential effects of opioid receptor agonists on nociception and cAMP level in the spinal cord of monoarthritic rats. **Life Sci.**, v. 50, n. 1, p. 45-54, 1992.

PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Opioids in chronic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 429, n. 1-3, p. 79-91, 2001.

PUEHLER, W. et al. Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction. **Neuroscience**, v. 129, n. 2, p. 473-479, 2004.

QUIRION, R. Pain, nociception and spinal opioid receptors. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 8, n. 4-6, p. 571-579, 1984.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesia activity on inflamed tissue. **Arch. Inst. Pharmacodyn.**, v. 111, p. 209-219, 1957.

RECHTHAND, E.; RAPOPORT, S. I. Regulation of the microenvironment of peripheral nerve: role of the blood-nerve barrier. **Prog. Neurobiol.**, v. 28, n. 4, p. 303-343, 1987.

REGAN, J. W. et al. Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. **Mol. Pharmacol.**, v. 46, n. 2, p. 213-220, 1994.

REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. The primary afferent nociceptor as pattern generator. **Pain**, v. 6, p. S103-109, 1999.

REISINE, T. et al. Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G proteins and effector systems. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 780, p. 168-175, 1996.

REXED, B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. **J. Comp. Neurol.**, v. 100, n. 2, p. 297-379, 1954.

SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, n. 10, p. 3680-3685, 2004.

SAEGUSA, H.; MATSUDA, Y.; TANABE, T. Effects of ablation of N- and R-type Ca(2⁺) channels on pain transmission. **Neurosci. Res.**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2002.

SASAMURA, T. et al. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 441, n. 3, p. 185-191, 2002.

SCHAEFFER JR, R. C. et al. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) of size-selected crotalid venom antigens by Wyeth's polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 26, n. 1, p. 67-76, 1988.

SCHAFER, M. et al. Inflammation enhances peripheral mu-opioid receptor-mediated analgesia, but not mu-opioid receptor transcription in dorsal root ganglia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 279, n. 2-3, p. 165-169, 1995.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch. Surg.**, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SCHEMELZ, M. et al. Sensitization of intensive branches of C nociceptors in human skin. **J. Physiology**, v. 480, p. 389-394, 1994.

SCHMIDT, R. et al. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. **J. Neurosci.**, v. 15, n. 1 Pt 1, p. 333-341, 1995.

SCHNITZLER, A.; PLONER, M. Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. **J. Clin. Neurophysiol.**, v. 17, n. 6, p. 592-603, 2000.

SCHULTZ, J.; GROSS, G. Opioids and cardioprotection. **Pharmac. Ther.**, v. 89, p. 123-137, 2001.

SCHWEI, M. J. et al. Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 24, p. 10886-10897, 1999.

SEGAWA, K. et al. Inhibitory effects of nicorandil on rat mesangial cell proliferation via the protein kinase G pathway. **Nephron**, v. 87, n. 3, p. 263-268, 2001.

SEGOND VON BANCHET, G. et al. Prostaglandin E2 increases the expression of the neurokinin1 receptor in adult sensory neurones in culture: a novel role of prostaglandins. **Br. J. Pharmacol.**, v. 139, n. 3, p. 672-680, 2003.

SELLEY, D. E. et al. Modification of G protein-coupled functions by low-pH pretreatment of membranes from NG108-15 cells: increase in opioid agonist efficacy by decreased inactivation of G proteins. **Mol. Pharmacol.**, v. 44, n. 4, p. 731-741, 1993.

SELTZER, Z. et al. Modulation of neuropathic pain behavior in rats by spinal disinhibition and NMDA receptor blockade of injury discharge. **Pain**, v. 45, n. 1, p. 69-75, 1991.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205-218, 1990.

SHAHABI, N. A. et al. delta opioid receptors stimulate Akt-dependent phosphorylation of c-jun in T cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, n. 2, p. 933-939, 2006.

SHAQURA, M. A. et al. Characterization of mu opioid receptor binding and G protein coupling in rat hypothalamus, spinal cord, and primary afferent neurons during inflammatory pain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 308, n. 2, p. 712-718, 2004.

SHIMOYAMA, M. et al. A mouse model of neuropathic cancer pain. **Pain**, v. 99, n. 1-2, p. 167-174, 2002.

SHIMOYAMA, M. et al. Change of dorsal horn neurochemistry in a mouse model of neuropathic cancer pain. **Pain**, v. 114, n. 1-2, p. 221-230, 2005.

SMITH, J. A. et al. Characterization of prostanoid receptor-evoked responses in rat sensory neurones. **Br. J. Pharmacol.**, v. 124, n. 3, p. 513-523, 1998.

SNEDECOR, G. W. et al. **Statistical methods Biometry**. New York: Owa State University Press.p.859, 1946.

SOARES, A. C.; DUARTE, I. D. Dibutyl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K(+) channels in the rat PGE2-induced hyperalgesic paw. **Br. J. Pharmacol.**, v. 134, n. 1, p. 127-131, 2001.

SOARES, A. C. et al. Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 400, n. 1, p. 67-71, 2000.

SOUTHALL, M. D.; VASKO, M. R. Prostaglandin receptor subtypes, EP3C and EP4, mediate the prostaglandin E2-induced cAMP production and sensitization of sensory neurons. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 19, p. 16083-16091, 2001.

STEIN, C. et al. Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, n. 16, p. 1123-1126, 1991.

STEIN, C. et al. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin. **J. Neurosci.**, v. 10, n. 4, p. 1292-1298, 1990.

STEIN, C.; GRAMSCH, C.; HERZ, A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 87, n. 15, p. 5935-5939, 1990.

STEIN, C. et al. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 248, n. 3, p. 1269-1275, 1989.

STEIN, C.; SCHAFER M.; MACHELCKA, K. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nat. Med.**, v. 9, n. 8, p. 1003-1008, 2003.

SUGIMOTO, Y. et al. Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 10, p. 6463-6466, 1992.

SWAYNE, L. A.; BOURINET, E. Voltage-gated calcium channels in chronic pain: emerging role of alternative splicing. **Pflugers Arch.**, v. 456, n. 3, p. 459-466, 2008.

SWEATT, J. D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 14, n. 3, p. 311-317, 2004.

TAIWO, Y. O. et al. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience**, v. 32, n. 3, p. 577-580, 1989.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Kappa- and delta-opioids block sympathetically dependent hyperalgesia. **J. Neurosci.**, v. 11, n. 4, p. 928-932, 1991.

TEGEDER, I. et al. Peripheral opioid analgesia in experimental human pain models. **Brain**, v. 126, n. Pt 5, p. 1092-1102, 2003.

TEIXEIRA, M. J. **Dor: Conceitos Gerais.** São Paulo: Limay.72, 1994.

THOMAS, G. M.; HUGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 5, n. 3, p. 173-183, 2004.

TODD, A. J.; KOERBER, H. R. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: MCMAHON, S. B. e KOLTZENBURG, M. (Ed.). **Textbook of Pain.** Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, p. 2006.

TRUONG, W. et al. Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. **Ann. Neurol.**, v. 53, n. 3, p. 366-375, 2003.

TZELLOS, T. G. et al. Efficacy of pregabalin and gabapentin for neuropathic pain in spinal-cord injury: an evidence-based evaluation of the literature. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 64, n. 9, p. 851-858, 2008.

URBAN, J. D. et al. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 320, n. 1, p. 1-13, 2007.

VAN DER VRIES, E. et al. Evaluation of a rapid molecular algorithm for detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus and screening for a key oseltamivir resistance (H275Y) substitution in neuraminidase. **J. Clin. Virol.**, v. 47, n. 1, p. 34-37, 2010.

VANDERAH, T. W. Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain. **Clin. J. Pain**, v. 26 p. S10-15, 2010.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. **Pain**, v. 85, n. 1-2, p. 9-18, 2000.

VASKO, M. R. Prostaglandin-induced neuropeptide release from spinal cord
In: NYBERG, F.;SHARMA, H. S. e WIESENFELD-HALLIM, A. (Ed.). **Progress in Brain Research**, v.104, p. 1995.

VELAZQUEZ, K. T. et al. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. **Pharmacol. Res.**, v. 55, n. 6, p. 578-589, 2007.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic? **Br. J. Anaesth.**, v. 105 Suppl 1, p. i69-85,

WATABE, A. et al. Cloning and expression of cDNA for a mouse EP1 subtype of prostaglandin E receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 27, p. 20175-20178, 1993.

WENK, H. N.; HONDA, C. N. Immunohistochemical localization of delta opioid receptors in peripheral tissues. **J. Comp. Neurol.**, v. 408, n. 4, p. 567-579, 1999.

WHITE, R. E. Cyclic GMP and ion channel regulation. **Adv. Second Messenger Phosphoprotein. Res.**, v. 33, p. 251-277, 1999.

WIESELER-FRANK, J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Glial activation and pathological pain. **Neurochem. Int.**, v. 45, n. 2-3, p. 389-395, 2004.

WIESENFELD-HALLIN, Z. Sex differences in pain perception. **Gend. Med.**, v. 2, n. 3, p. 137-145, 2005.

WILLIS, A. L.; CORNELSEN, M. Repeated injection of prostaglandin E2 in rat paws induces chronic swelling and a marked decrease in pain threshold. **Prostaglandins**, v. 3, n. 3, p. 353-357, 1973.

WITTERT, G. et al. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 218, n. 3, p. 877-881, 1996.

WOOD, P. L. The significance of multiple CNS opioid receptor types: a review of critical considerations relating to technical details and anatomy in the study of central opioid actions. **Peptides**, v. 9 Suppl 1, p. 49-55, 1988.

WOOLF, C. J. Pain. **Neurobiol. Dis.**, v. 7, n. 5, p. 504-510, 2000.

WOOLF, C. J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Ann. Intern. Med.**, v. 140, n. 6, p. 441-451, 2004.

YAKSH, T. L. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. **Trends Pharmacol Sci**, v. 20, n. 8, p. 329-337, 1999.

YAKSH, T. L.; RUDY, T. A. Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. **Pain**, v. 4, n. 4, p. 299-359, 1978.

YAMDEU, R. S. et al. p38 Mitogen-activated protein kinase activation by nerve growth factor in primary sensory neurons upregulates mu-opioid receptors to enhance opioid responsiveness toward better pain control. **Anesthesiology**, v. 114, n. 1, p. 150-161, 2010.

YOSHIMURA, M.; NORTH, R. A. Substantia gelatinosa neurones hyperpolarized in vitro by enkephalin. **Nature**, v. 305, n. 5934, p. 529-530, 1983.

ZAMPONI, G. W. et al. Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. **Brain. Res. Rev.**, v. 60, n. 1, p. 84-89, 2009.

ZHANG, H. W. et al. Mechanical hypersensitivity and alterations in cutaneous nerve fibers in a mouse model of skin cancer pain. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 91, n. 2, p. 167-170, 2003.

ZHANG, X. et al. Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. **Neuroscience**, v. 82, n. 1, p. 223-240, 1998.

ZHANG, Y. et al. Intrathecal morphine reduces allodynia after peripheral nerve injury in rats via activation of a spinal A1 adenosine receptor. **Anesthesiology**, v. 102, n. 2, p. 416-420, 2005.

ZHENG, H. et al. Agonist-selective signaling of G protein-coupled receptor: mechanisms and implications. **IUBMB Life**, v. 62, n. 2, p. 112-119,

ZHUANG, Z. Y. et al. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 13, p. 3551-3560, 2006.

ZIMMERMANN, K. et al. Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. **Nature**, v. 447, n. 7146, p. 855-858, 2007.

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

ZOLLNER, C. et al. Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain. **J. Clin. Invest.**, 2008.

ZOLLNER, C. et al. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. **Mol. Pharmacol.**, v. 64, n. 2, p. 202-210, 2003.