



GILSON GONÇALVES DOS SANTOS

**INVOLVEMENT OF CANNABINOIDS CB1, CB2 RECEPTORS AND K_{ATP}
CHANNEL IN THE ANTI-HIPERLGESIC EFFECT MEDIATED BY THE
DIPYRONE AND ITS BIOACTIVES METABOLITES.**

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CANABINÓIDES CB-1 E CB-2 E
CANAIS K_{ATP} DO TECIDO PERIFÉRICO NA ANALGESIA MEDIADA PELA
DIPIRONA E SEUS METABÓLITOS BIOATIVOS**

Campinas, 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
GILSON GONÇALVES DOS SANTOS



**INVOLVEMENT OF CANNABINOIDS CB1, CB2 RECEPTORS AND K_{ATP}
CHANNEL IN THE ANTI-HIPERLGESIC EFFECT MEDIATED BY
THE DYPIRONE AND ITS BIOACTIVES METABOLITES**

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CANABINÓIDES CB-1 E CB-2 E
CANALIS K_{ATP} DO TECIDO PERIFÉRICO NA ANALGESIA MEDIADA PELA
DIPIRONA E SEUS METABÓLITOS BIOATIVOS**

This Dissertation presented to the in Institute of Biology of University of Campinas in partial fulfillment the requirements for the degree of Master in Functional and Molecular Biology, in physiology area.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida pelo aluno Gilson Gonçalves dos Santos, e orientado pelo Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Campinas, 2014

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

D741e Dos Santos, Gilson Goncalves, 1986-
Involvement of cannabinoids CB1, CB2 receptors and K_{ATP} channel in the anti-hyperalgesic effect mediated by dipyron and its bioactive metabolites / Gilson Goncalves dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Carlos Amílcar Parada.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Dipirona. 2. Metabolitos. 3. Receptores de canabinóides. 4. Proteínas quinases dependentes de GMP cíclico. 5. Canais K_{ATP} . I. Parada, Carlos Amílcar, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Envolvimento dos receptores canabinóides CB-1 e CB-2 e canais K_{ATP} do tecido periférico na analgesia mediada pela dipirona e seus metabólitos bioativos

Palavras-chave em inglês:

Dipyrone
Metabolites
Receptors, Cannabinoid
Cyclic GMP-dependent protein kinases
 K_{ATP} channels

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Amílcar Parada [Orientador]
Josi Godoy Figueredo
Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Data de defesa: 18-12-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

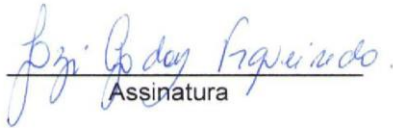
Campinas, 18 de dezembro de 2014

BANCA EXAMINADORA

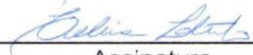
Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada
(Orientador)


Assinatura

Profª. Drª. Jozi Godoy Figueredo


Assinatura

Profª. Drª. Celina Monteiro da Cruz Lotufo


Assinatura

Prof. Dr. Cesar Renato Sartori

Assinatura

Profª. Drª. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Assinatura

RESUMO

A dipirona (metamizol) é um pró-fármaco analgésico utilizado no controle da dor moderada, sendo metabolizada em dois metabolitos bioativos: 4-metil-aminoantipirina (4-MAA) e 4-aminoantipirina (4-AA). O objetivo deste estudo foi investigar a participação de receptores canabinóides periféricos, CB1, CB2 e canais de K_{ATP} sobre o efeito anti-hiperalgésico da dipirona, 4-MAA ou 4-AA. Para indução de hiperalgesia, PGE_2 (100 ng/pata) foi administrada localmente na pata traseira de ratos Wistar machos, e o limiar hiperalgésico mecânico foi quantificado por Von-Frey eletrônico, antes e três horas após a injeção. Dipirona, 4-MAA ou 4-AA foram administrados 30 minutos antes do Von Frey. Os antagonistas seletivos do receptor CB1 (AM251), CB2 (AM630) e glibenclamida, um bloqueador K_{ATP} (80 ug) ou ODQ um inibidor de cGMP (32 μ g) foram administrados 30 minutos antes da Dipirona, 4-MAA ou 4-AA. O ODN-antisense para reduzir a expressão do receptor CB1 (30 μ g) foi administrado por via intratecal, uma vez por dia durante quatro dias consecutivos. A hiperalgesia mecânica induzida pela PGE_2 foi reduzida pela dipirona, 4-MAA, e 4-AA de maneira dose-dependente. AM251 ou ODN-antisense contra o receptor neuronal CB1, mas não AM630, reduziu o efeito anti-hiperalgésico mediado por 4-AA, mas não da dipirona ou 4-MAA. Por outro lado, o efeito anti-hiperalgésico da dipirona, ou 4-MAA foi revertido por glibenclamida ou ODQ. Os resultados sugerem que a ativação de receptores neuronal CB1, mas não do receptor CB2, no tecido periférico esteja envolvido no efeito anti-hiperalgésico do metabólito 4-AA. Além disso, a dipirona e 4-MAA possui um efeito anti-hiperalgesico dependente de cGMP e consequente abertura K_{ATP} .

Palavras-chave: Dipirona; 4 metil-amianoantipirina; 4 aminoatipirina, receptores canabinóides; cGMP; K_{ATP} .

ABSTRACT

Dipyrone (metamizole) is an analgesic pro-drug used to control moderate pain. It is metabolized in two bioactive metabolites: 4-methylaminoantipyrine (4-MAA) and 4-aminoantipyrine (4-AA). The aim of this study was to investigate the participation of peripheral CB1 and CB2 cannabinoid receptors activation on the anti-hyperalgesic effect of Dipyrone, 4-MAA or 4-AA. For induction of hyperalgesia, PGE₂ (100 ng) was locally administrated in hindpaw of male Wistar rats, and the mechanical nociceptive threshold was quantified by electronic von-Frey, before and 3 hours after its injection. Dipyrone, 4-MAA or 4-AA was administrated 30 minutes before the von-Frey test. The selective CB1 receptor antagonist AM251, CB2 receptor antagonist AM630, cGMP inhibitor ODQ (32 µg) or K_{ATP} blocker glibenclamide (80 µg) was administrated 30 minutes before Dipyrone, 4-MAA or 4-AA. The antisense-ODN against CB1 receptor expression (30 µg) was intrathecally administrated once a day during four consecutive days. PGE₂-induced mechanical hyperalgesia was inhibited by dypirone, 4-MAA, and 4-AA in a dose-response manner. AM251 or ODN anti-sense against neuronal CB1 receptor, but not AM630, reversed the anti-hyperalgesic effect mediated by 4-AA, but not by dypirone or 4-MAA. On the other hand, the anti-hyperalgesic effect of dypirone or 4-MAA was reversed by Glibenclamide or ODQ. These results suggest that the activation of neuronal CB1, but not CB2 receptor, in the peripheral tissue is involved in the anti-hyperalgesic effect of 4-aminoantipyrine. In addition, 4-methylaminontipyrine mediates anti-hyperalgesic effect by the cGMP activation and the K_{ATP} opening.

Keywords: Dipyrone; 4-methylamianotipyrine; 4-aminoatipyrine cannabinoid receptors; cGMP; K_{ATP}

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	XIII
AGRADECIMENTOS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico da dor.....	2
1.2 Hiperalgesia inflamatória	3
1.3 Controle Farmacológico da dor	6
1.4 Dipirona e seus metabólitos	10
II – PROPOSIÇÃO	14
III – CAPITULO	15
IV – CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS	56

DEDICATÓRIA

À Deus, pela dádiva da vida pelas bênçãos concedidas e por sempre iluminar meu caminho;

Aos meus pais, Inês e Ivanildo, por todo amor, dedicação incansável e por serem precursores da minha vida, educação e maneira de ver o mundo.

Aos meus irmãos, frateros e os que adquiri ao longo da minha jornada, que de algum modo contribuíram para o meu crescimento.

Aos meu companheiros de casa da moradia, que estavam ao meu lado, que me escutavam nas preparações de seminários e desta defesa.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador **Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada**, pela sua acessibilidade, pelo apoio, confiança, e pela oportunidade de conhecer esta linha de pesquisa;

Aos **Amigos de Laboratório** que me receberam quando eu sabia apenas pipetar, dispondo tempo, horas a fio para ensinarem o que sabiam e mesmo o que não sabiam. Ainda, pelos momentos de cumplicidade e divertidos, que ajudaram a amenizar as dificuldades diárias;

Ao **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro nesta pesquisa;

Aos **professores do Departamento Biologia Funcional e Molecular**, pelas aulas ministradas e pelo exemplo e dedicação à pesquisa;

Aos **membros da banca examinadora do Exame de Qualificação**, Prof^a. Dr^a. Celina Monteiro C. Lotufo e a Prof^a. Dr^a. Jozi Godoy Figueredo por aceitarem avaliar este trabalho, enriquecendo-o com suas sugestões e colocações;

.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-AA	4-aminoantipirina
4-MAA	4-Metil-aminoantipirina
AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
Ca ²⁺	Cálcio
CB1	Receptor Canabinóide 1
CB2	Receptor Canabinóide 2
COX	Ciclooxigenase
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
h	Hora
IL-1	Interleucina 1Beta
K ⁺	Potássio
K _{ATP}	Canais de Potássio sensíveis ao ATP
kD	KiloDalton
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
Na ⁺	Sódio
NaCL	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
SAL	Salina
SNC	Sistema nervoso centra
SNP	Sistema nervoso periférico
SP	Substância P
µg	Micrograma
µL	Microlitro

1 *INTRODUÇÃO*

1.1 Histórico da dor

Estudos tem demonstrado que a dor é um dos problemas mais sérios da nossa sociedade e uma das principais causas da procura pela assistência à saúde, em todos os níveis de assistência a saúde (Walsh et al., 1992; Deyo et al., 1991). Dentre os vários tipos de dor, a de origem inflamatória é a mais comum, o que tem motivado o desenvolvimento de estudos sobre os mecanismos envolvidos no desencadeamento da dor inflamatória bem como compreender o mecanismo de ação de drogas que possuem um efeito analgésico.

Contextualizando a dor na história da humanidade, na pré-história a dor era entendida como sendo causada por espíritos malignos, e o tratamento era feito por xamãs, feiticeiros e curandeiros, que exorcisavam o doente, além de utilizarem ervas, pedras, trepanações e magias para auxiliar na cura. Na antiguidade, o homem primitivo também interpretava a dor como resultado de possessão que interiorava nas pessoas de alguma forma, com isto era desenvolvido rituais religiosos, como sacrifício, exorcismo e até mesmo a sangria para retirada desta “*possessão*” que levaria ao alívio da dor (Bonica, 1990). Já Aristóteles, acreditava que a dor era interpretada pelo coração como sensação desagradável, oposta ao prazer, essa idéia foi apoiada por diversos pensadores durante 23 séculos. Por outro lado, Descartes, acreditava que vias nervosas específicas conduziam a dor da periferia até o cérebro, onde era então interpretada (Bonica, 1990).

Dor pode ser definida como uma percepção desagradável associada à nocicepção. Essa definição envolve dois componentes: percepção e nocicepção.

Percepção dolorosa é uma função integrativa, modulada por condições motivacionais, emocionais, psicológicas e pela história pregressa individual (Merskey, 2004). A hiperalgesia resulta da ativação de uma população específica de neurônios aferentes primários que transmitem informação nociceptiva para o sistema nervoso central (Millan, 1999; Julius & Basbaum, 2001).

1.2 Hiperalgesia Inflamatória

A hiperalgesia inflamatória é resultado da excitação de nociceptores previamente sensibilizados. A sensibilização dos nociceptores é caracterizada pela diminuição do limiar de excitabilidade neuronal de modo a facilitar a estimulação dessas vias nociceptivas (Riedel & Neeck, 2001). A hiperalgesia é um fenômeno de sensibilização neuronal, que ocorre pela ativação de receptores dos nociceptores, resultando em uma consequente ativação de vias de sinalização intracelular, cuja ação é modular a expressão de canais iônicos nos nociceptores (Hartmann et al., 2004). Assim, o bloqueio direto ou indireto destas vias de sinalização pode levar ao estado de analgesia também conhecido como anti-hiperalgesia.

A excitabilidade dos neurônios é controlada por condutâncias iônicas através da membrana plasmática e os canais iônicos são os alvos finais de segundos mensageiros, tais como PKA e PKC, que levam à sensibilização dos neurônios aferentes primários (Sachs et al., 2009). Os canais de potássio (K^+) e de sódio (Na^+) presentes nas membranas celulares são os principais responsáveis pela atividade elétrica que conduz a

informação neuronal e, portanto, os principais candidatos a estarem envolvidos na sensibilização dos nociceptores (Conti et al., 1977).

Alguns dos principais componentes inflamatórios são mostrados na figura abaixo (Fig.1 Julius & Basbaum, 2001), incluindo péptidos (bradicinina), lípidos (prostaglandinas), neurotransmissores (serotonina (5-HT) e ATP) e as neurotrofinas (NGF). Cada um destes fatores levam a sensibilização neuronal (diminuição do limiar) ou excita os terminais do nociceptor, através da interação com os receptores da superfície celular expressos por estes neurônios. A ativação do nociceptor transmite mensagens aferentes para o corno dorsal da medula espinhal que são conduzidas até o cérebro, onde a nocicepção passa então a ser compreendida como dor, ou seja uma percepção desagradável associada à hiperalgesia (Julius & Basbaum, 2001).

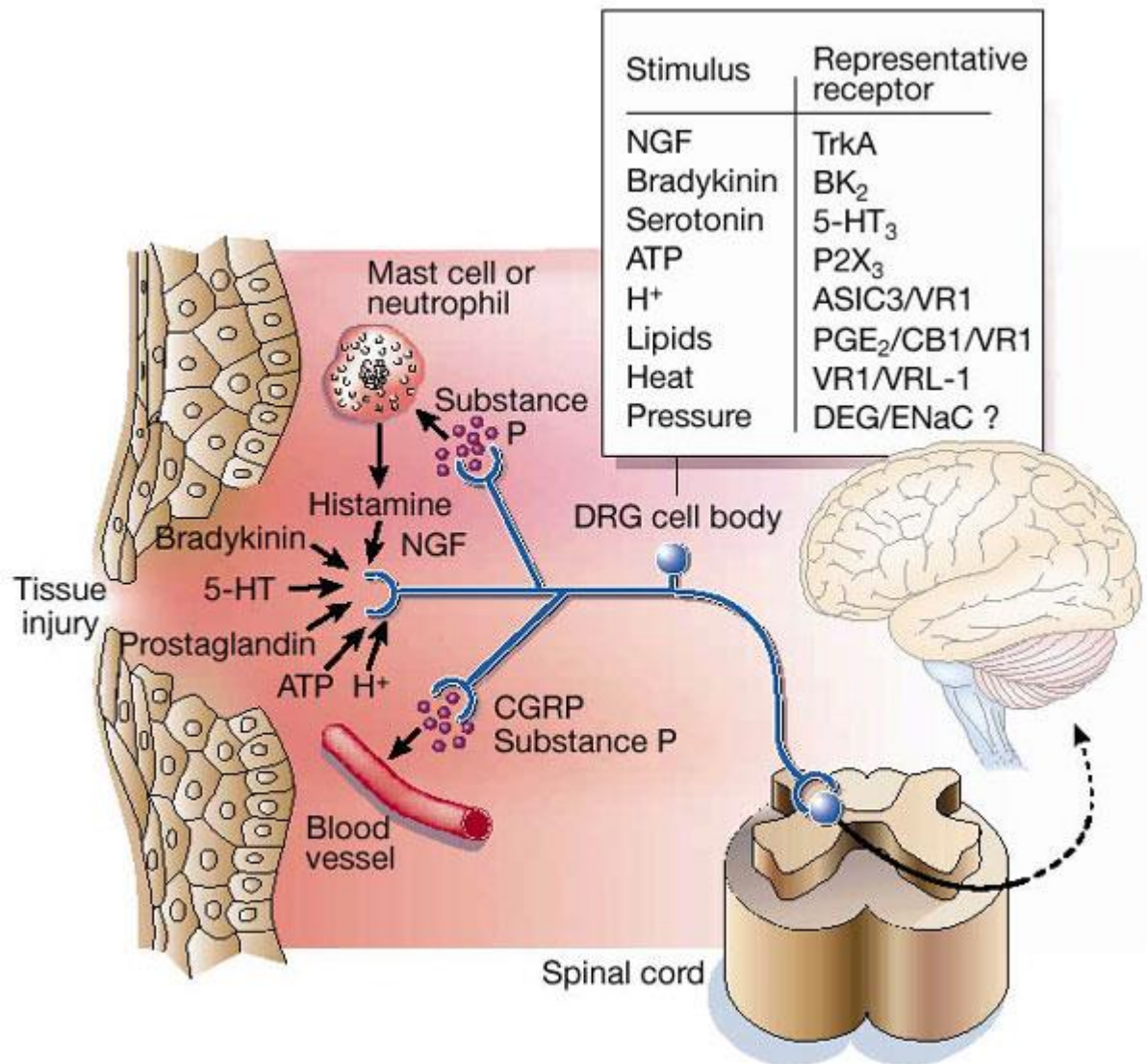


Fig.1 (Fonte Julius & Basbaum, 2001). Alguns dos principais componentes são mostrados como bradicinina, prostaglandinas serotonina (5-HT) e ATP e NGF. Cada um destes fatores de sensibilizar (diminuir o limiar) ou excita os terminais do nociceptor, através da interação com os receptores da superfície celular expressos por estes neurónios. A ativação do nociceptor transmite mensagens aferentes para o corno dorsal da medula espinal para o cérebro.

Entre os mediadores inflamatórios que levam a sensibilização neuronal esta bem caracterizados os prostanóides que são os produtos da via da ciclo-oxigenase do metabolismo do ácido araquidônico. Os prostanóides atuam como mediadores locais em vários tecidos, em condições fisiológicas e fisiopatológicas (Narumiya et al., 1999). Desde Vane (1971), o primeiro trabalho que relatou que drogas como a aspirina impede o

desenvolvimento de inflamação pelo bloqueio da síntese de prostanóides, tem sido amplamente aceito que prostanóides estão envolvidos na dor, febre, edema e vários outros aspectos da inflamação. Entre eles, a prostaglandina E_2 (PGE_2) é considerado como sendo o principal prostanóide pró-inflamatório e desempenha um papel importante no processamento nociceptivo na espinal medula, assim como na periferia (Yaksh et al., 1999), pois participa na sensibilização direta dos nociceptores (Ferreira et al., 1993). É importante enfatizar que a PGE_2 leva a sensibilização de neurônios aferentes primários em função de sua ativação direta sobre os receptores EP, portanto neste modelo a hiperalgesia ocorre sem a participação do componente inflamatório.

As prostaglandinas são mediadores importantes da inflamação, febre e dor. São sintetizados pela enzima constitutiva, ciclo-oxigenase-1 (COX-1), e a sua isoforma COX-2, ambas são ativadas no tecidos periféricos por citocinas, fatores de crescimento e outros estímulos inflamatórios. Ainda não é claro o mecanismo preciso pelo qual as prostaglandinas altera a excitabilidade do neurônios sensoriais. Embora seja bem aceito que prostaglandinas podem induzir o aumento dos níveis de AMPc levando assim a uma sensibilização do nociceptor pela redução do limiar dos canais de sódio via proteína quinase A (England et al., 1996; Kidd & Urban, 2001).

1.3. Controle Farmacológico da Dor

Apesar da importância fisiológica da dor, quando a dor se instala, torna-se um problema clínico e a intervenção farmacológica é necessária para preservar a saúde e qualidade de vida do indivíduo. Desde épocas remotas a dor vem sendo estudada por ser um fenômeno que afeta pessoas em qualquer estágio da vida, bem como impondo

limitações em níveis sociais e econômicos. Diante disso, a intervenção farmacológica é extremamente importante para reestabelecer de maneira integral a saúde do indivíduo (Taylor, 2011;Phillips & Harper, 2011).

As drogas analgésicas podem ser divididas em dois grupos: drogas que previnem a sensibilização do nociceptor e drogas que reverterem a sensibilização já instalada. O primeiro grupo produz analgesia através da inibição da síntese ou do bloqueio da ação de mediadores hiperalgésicos intermediários, tais como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e o antagonista endógeno de IL-1 (IL-1ra) (Cunha et al, 2000; Verri et al, 2008). Estas drogas reduzem a produção de mediadores hiperalgésicos restaurando assim do limiar do nociceptor.

Mesmo sendo utilizados há bastante tempo, apenas em 1971 foi proposto que o mecanismo de ação dessas drogas (conhecidas como *aspirin-like*, ou do tipo da aspirina) estava ligado à inibição da síntese de PGs por inibição da enzima responsável por sua produção, a ciclooxigenase (COX) (Vane, 1971). Dessa forma, por reduzirem a formação de mediadores hiperalgésicos finais, essas drogas previnem a sensibilização dos nociceptores e, conseqüentemente, reduzem a hiperalgesia inflamatória (Vane., 1971).Embora os AINEs sejam largamente empregados na prática clínica no tratamento de dores inflamatórias, o uso de AINEs esta relacionado com o desenvolvimento de graves problemas gástricos e cardíacos devido ao bloqueio da COX-1 e COX-2, respectivamente (Cunha et al., 2008).

O segundo grupo de drogas são aquelas que reverterem à sensibilização já instalada. Estas produzem analgesia por uma modulação direta ou indireta bloqueando

canais iônicos presentes na membrana celular do nociceptor. Drogas como morfina e dipirona (Duarte & Ferreira, 1992) e os bloqueadores de canais de sódio voltagem dependentes (Swanwick et al, 2010) reverterem, dessa forma, a sensibilização já instalada no nociceptor.

Os opióides são utilizados há muitos anos para o alívio da dor. Recentemente após reformulação nas leis que liberam sua prescrição, sua utilização tem sido bastante expressiva (Manchikanti, et al 2010). Primeiramente acreditava-se que sua ação era exclusiva no SNC através dos receptores do tipo μ (Tremblay & Hamet, 2010) posteriormente estudos demonstraram que opióides exógenos e endógenos induzem efeito antinociceptivo central e periférico através da interação com receptores opióides presentes em nervos sensitivos do tecido inflamado com os receptores μ , Kappa e beta (Iwaszekiewicz et al., 2013).

Os ligantes endógenos dos receptores opióides conhecidos são as encefalinas, dinorfinas e endorfinas. Receptores Kappa possuem afinidade elevada por dinorfina A indicando ser este o ligante endógeno deste receptor. Por outro lado, estudos têm sugerido não só afinidade, como também co-distribuição entre encefalinas e a expressão de receptores μ e α . Enquanto que as beta-endorfinas, por sua vez, liga-se diretamente a μ e α (Iwaszekiewicz et al., 2013).

Entretanto, a utilização de opióides está diretamente relacionada com graves efeitos adversos, dentre eles, depressão do sistema imunológico tolerância e dependência (Manchikanti et al., 2010; Yu et al, 2011).

A literatura tem proposto uma estreita interação entre os sistemas opióides e canabinóides tanto os receptores opióides quanto canabinóides produzem anti-

nocicepção através de mecanismo dependente de proteína G, que bloqueiam a liberação de neurotransmissores nociceptivos no cérebro e medula espinhal (Machado et al., 2014). Ambos os sistemas atuam em locais comuns, sendo que seus receptores estão co-distribuídos e co-expressos em áreas importantes para o controle da dor como o corno da medula, substância cinzenta periaquedutal, núcleo da rafe e núcleo talâmico, ainda, parecem potencializar um ao outro indicando uma interação sinérgica entre eles (Machado et al., 2014).

Os receptores canabinóides são uma classe de receptores da membrana celular pertencentes à superfamília de receptores acoplados à proteína G. Existem atualmente dois subtipos conhecidos de receptores canabinóides, designados CB1 e CB2. Os canabinóides em geral estão ligados à atividade anti-nociceptiva em modelo de dor inflamatória e neuropática (Walker & Hohmann, 2005; Guindon & Hohmann, 2009; Uhelski et al., 2013; Zogopoulos et al., 2013). Contudo, o mecanismo molecular implicado na redução da dor pelos canabinóides, bem como a interação com outros sistemas ainda permanece em discussão (Dos santos et al., 2014).

Ambos receptores canabinóides CB1 e CB2 são receptores acoplados à proteína G e exercem seus efeitos fisiológicos pela inibição da atividade da adenilato ciclase e consequente diminuição dos níveis intracelulares de AMPc. Além disso, a ativação de receptores canabinóides pode ativar uma cascata de proteínas quinases ativadas por mitogeno (MAPK) (Walker & Hohmann, 2005; Guindon & Hohmann, 2009)

Os receptores CB1 são amplamente expressos em diversas estruturas encefálicas, medula espinhal, gânglios da medula dorsal, sistema nervoso entérico, adipócitos, células endoteliais, hepatócitos, tecido muscular e trato gastrointestinal.

Pode-se considerar que os receptores CB1 se encontram distribuídos amplamente por todo o cérebro em níveis comparáveis aos encontrados para os receptores ligados a canais iônicos, sendo os receptores acoplados à proteína G de maior abundância no SNC (Machado et al., 2014).

Já os receptores CB2, são predominantemente expressos no sistema imunológico, células T, células B, baço e amígdalas (Machado et al., 2014). Por consequência, estão intimamente ligados a funções imunes, onde regulam a liberação de citocinas e a migração de células, podendo ser também encontrados em diversos tecidos linfóides fora e dentro do SNC (Carolé et al., 2014; Machado et al., 2014). Os receptores CB2 podem exercer seu efeito através da transdução de sinal via uma proteína heterodimérica ativando a fosfolipase C, que quebra o fosfatodilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 interage com os canais de cálcio do retículo sarcoplasmático liberando o cálcio no citoplasma (Carolé et al., 2014).

Estudos recentes têm sugerido que o sistema canabinóide endógeno, está envolvidos no efeito anti-hiperalgésico da dipirona, já que a administração de antagonistas deste sistema reduz a atividade anti-hiperalgésica da dipirona (Escobar et al., 2003; Rogosch et al., 2012).

1.4. Dipirona e seus metabolitos

Dipirona (metamizol; nome químico: N-(2,3-dimetil-5-oxo-1-fenil-3-pirazolina-4-yl)-N-metilaminometanosulfonato, usualmente na forma mono-hidratada) foi inicialmente comercializada como medicamento na Alemanha em 1922 (Edwards et al., 2010). Sua

eficácia e baixa toxicidade a tornou um medicamento muito usado no controle da dor em países da Europa e América Latina (Edwards et al., 2010).

A partir de 1974 seu uso foi proibido em países como Estados Unidos, Japão, Austrália, Suécia e vários outros países integrantes da União Européia devido a um estudo que relacionava o uso da dipirona com discrasias sanguíneas (Hinz et al., 2007).

Nesse estudo, realizado em 1932, os autores estabeleceram uma relação entre o uso de aminopirina e o surgimento de agranulocitose. Em 1937, a antipirina, que tinha mostrado um perfil bastante adverso no que concerne à incidência de casos de agranulocitose e anemia aplástica, foi retirada do mercado pelo “Food and Drug Administration” (FDA) nos Estados Unidos. Pelo mesmo caminho, a proibição da dipirona nestes países se deu devido ao seu infausto parentesco com a aminopirina. Embora não exista nenhuma comprovação científica sistematizada que a dipirona induza agranulocitose, estudos mais recentes mostram que uma possível incidência de agranulocitose relacionada ao uso de dipirona seria de 56 casos por 30 milhões de exposições, ou seja, 1,5 caso por milhão, o que, em termos de saúde pública, pode ser considerado um risco muito baixo (Ibáñez et al., 2005).

Drogas tais como, clozapina, ticlopidina, sulfazalcina, sulfametazol, carmabazepina, deferiprona, dentre outras, também são consideradas indutoras de agranulocitose idiossincrática, também independente da dose (Garbe, 2007; Pontikoglous et al., 2010). É importante ressaltar, contudo, que estudos recentes têm demonstrado que o uso de dipirona impõe menos riscos ao paciente que o uso de paracetamol, outro analgésico não-opióide cuja administração em altas doses ou prolongada induz toxicidade hepática grave (Schug et al., 2007).

A dipirona é caracterizada por um rápido metabolismo em 4-metilaminoantipirina (4-MAA), que é metabolizado em seguida a 4-formilaminoantipirina (4-FAA), 4-aminoantipirina (4-AA) e 4-acetilaminoantipirina (4-AAA) (Hinz et al., 2007). Os metabolitos, 4-MAA e 4-AA, são considerados bioativos, uma vez que os mesmos possuem atividade analgésica, antipirética (Hinz et al., 2007; Rogosch et al., 2012; Malvar et al., 2014) e maiores concentrações no plasma humano depois da administração oral de dipirona (Pierre et al., 2007).

A metabolização da dipirona é significativamente rápida, sendo que cerca de 15 min após a administração oral o metabolito 4-MAA é encontrado na circulação, esta metabolização é uma reação não enzimática e dependente apenas de fatores como concentração, pH e temperatura. Ao passo que a metabolização de 4-MAA para 4-AA se dá por uma reação enzimática que ocorre nos hepatócitos (Dos santos et al., 2014)

Embora existam vários dados mostrando os prováveis mecanismos de ação relacionados com o efeito analgésico da dipirona, tais mecanismos ainda não estão esclarecidos. Evidências demonstram que a dipirona tem ação analgésica tanto no Sistema Nervoso periférico quanto central (Beirith et al., 1998; Abbot et al., 2000; Vazquez et al., 2007) devido, em parte, à inibição da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) que diminui a síntese de PGE₂ (Pierre et al., 2007). Entretanto, no tecido periférico a dipirona possui mecanismos de ação independente da síntese de PGE₂, uma vez que a dipirona possui efeito analgésico em modelo de hiperálgia induzida por PGE₂ (Dos santos et al., 2014).

Outros mecanismos de ação da dipirona além da diminuição na síntese de PGE₂ têm sido descritos. Estudos tem associado o efeito anti-hiperalgésico da dipirona com a ativação da via L-arginina-NO-cGMP e subsequente abertura de canais K_{ATP} no tecido

periférico. A abertura destes canais leva a uma hiperpolarização neuronal, diminuindo assim a excitabilidade neuronal e consequente percepção da dor (Lorenzetti & Ferreira 1996; Duarte et al., 1992).

Ainda, com relação à atividade analgésica da dipirona, recentemente foi sugerido que dois dos metabólitos bioativos da dipirona: 4-metilaminoantipirina e 4-aminoantipirina (Fig. 2) induzem analgesia dependente de receptores canabinóides CB-1 e CB-2 (Rogosch et al., 2012). Porém não se conhece a atividade destes metabólitos na analgesia da dipirona no tecido periférico, nem tão pouco o envolvimento dos receptores canabinóides.

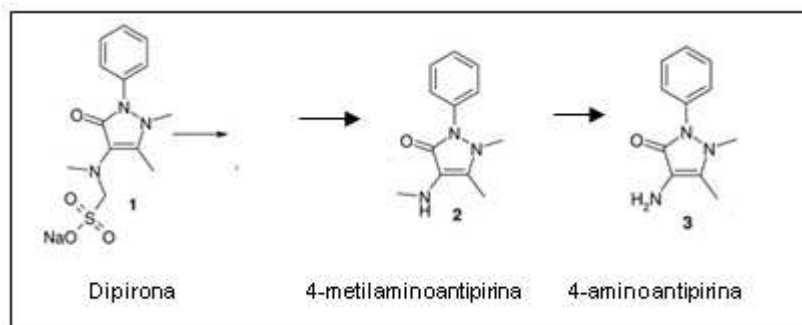


Fig. 2. Metabólitos ativos da dipirona (adaptado de Rogosch et al., 2012)

Dados obtidos em nosso laboratório demonstram que tanto a ativação de receptor CB-1 (Oliveira et al., 2012) quanto de CB-2 (Silva et al., 2012) no tecido periférico inibem a hiperalgesia inflamatória, porém a analgesia induzida pela ativação de CB-2 parece ser mediada por um mecanismo indireto que envolve a liberação de endorfina no tecido periférico.

Assim, estes dados levavam a hipótese de que o efeito analgésico da dipirona e seus metabólitos seja mediado por receptores canabinóides e canais de K_{ATP} presentes no tecido periférico.

II – PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi verificar a participação dos receptores canabinóides CB1/CB2 e canais K_{ATP} do tecido periférico na analgesia mediada pela dipirona e seus metabólitos bioativos.

Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito analgésico da dipirona, 4-MAA e 4-AA em modelo de hiperalgesia induzida por PGE_2 .
- Avaliar o efeito de antagonistas seletivos de CB1 e CB2 sobre o efeito analgésico da dipirona, 4-MAA e 4-AA em modelo de hiperalgesia induzida por PGE_2 .
- Avaliar o efeito de antagonista de K_{ATP} e um inibidor de GMPc no efeito analgésico da dipirona, 4-MAA e 4-AA em modelo de hiperalgesia induzida por PGE_2 .

O presente estudo está apresentado em formato alternativo, conforme deliberação da Comissão Central de Pós-graduação (CCPG) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) nº 001/98

III – CAPÍTULO

O presente artigo foi publicado no periódico “European Journal of Pharmacology”.

The analgesic effect of dipyrrone in peripheral tissue involves two different mechanisms: neuronal K_{ATP} channel opening and CB1 receptor activation.

Santos G.G., Teixeira J.M., Dias E.V., Athie, M.C.P., Bonet I.J.M., Tambeli C.H., Parada C.A.

Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, CP 6109, University of Campinas – UNICAMP, CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brazil; (+55) (19) 3521-6201

* Correspondence: Tel.: (+55) (19) 3521-6195 / caparada@unicamp.br, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Rua Monteiro Lobato, 255 - Campinas - SP – Brazil.

Background and aim: Dipyrrone (metamizole) is an analgesic pro-drug used to control moderate pain. It is metabolized in two major bioactive metabolites: 4-methylaminoantipyrine (4-MAA) and 4-aminoantipyrine (4-AA). The aim of this study was to investigate the participation of peripheral CB1 and CB2 cannabinoid receptors activation in the anti-hyperalgesic effect of dipyrrone, 4-MAA or 4-AA.

Methods: PGE₂ (100 ng/50 µL/paw) was locally administered in the hindpaw of male Wistar rats, and the mechanical nociceptive threshold was quantified by electronic von Frey test, before and 3 hours after its injection. Dipyrrone, 4-MAA or 4-AA was administered 30 minutes before the von Frey test. The selective CB1 receptor antagonist AM251, CB2 receptor antagonist AM630, cGMP inhibitor ODQ or K_{ATP} channel blocker glibenclamide was administered 30 minutes before dipyrrone, 4-MAA or

4-AA. The antisense-ODN against CB1 receptor expression was intrathecally administered once a day during four consecutive days.

Results: PGE₂-induced mechanical hyperalgesia was inhibited by dipyrone, 4-MAA, and 4-AA in a dose-response manner. AM251 or ODN anti-sense against neuronal CB1 receptor, but not AM630, reversed the anti-hyperalgesic effect mediated by 4-AA, but not by dipyrone or 4-MAA. On the other hand, the anti-hyperalgesic effect of dipyrone or 4-MAA was reversed by glibenclamide or ODQ.

Conclusion: These results suggest that the activation of neuronal CB1, but not CB2 receptor, in peripheral tissue is involved in the anti-hyperalgesic effect of 4-aminoantipyrine. In addition, 4-methylaminoantipyrine mediates the anti-hyperalgesic effect by cGMP activation and K_{ATP} opening.

Keywords: Dipyrone; 4-methylaminoantipyrine; 4-aminoantipyrine; cannabinoid receptors; cGMP; K_{ATP} channel

Introduction

Dipyrone is an analgesic pro-drug widely used in clinical practice due to its low toxicity and efficacy, however, its mechanism of action is not fully understood (Edwards et al., 2010). It is characterized by fast metabolism (Pierre et al., 2007) to 4-methylaminoantipyrine (4-MAA) which is then metabolized to 4-formylaminoantipyrine (4-FAA), 4-aminoantipyrine (4-AA), and 4-acetylaminoantipyrine (4-AAA). Two of these four metabolites, 4-AA and 4-MAA, are bioactive metabolites and can be identified in human plasma after its oral administration. Dipyrone was banned in some countries due to a supposed association of 4-AA with blood dyscrasias, however, the risk for blood

dyscrasias depends on factors such as dose, duration and concomitant medication (Maj et al., 2004; Ibanez et al., 2005).

Evidences demonstrated that dipyrone has analgesic action in both peripheral tissue and the central nervous system (Beirith et al., 1998; Abbot et al., 2000; Vazquez et al., 2007) partially due to inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2), decreasing the PGE₂ synthesis (Pierre et al., 2007). In addition, other mechanisms underlying the analgesic effect of dipyrone has been described. Studies have associated the dipyrone anti-hyperalgesic effect with the activation of the L-arginine-NO-cGMP pathway and the subsequent opening of K_{ATP} channel in peripheral tissue (Lorenzetti et al., 1996; Duarte et al., 2003)

In the central nervous system it has been suggested that the activation of cannabinoid CB1 and CB2 receptors is involved in the analgesic effect of dipyrone and its metabolites (Escobar et al., 2012; Rogosch et al., 2012). Indeed, the anti-hyperalgesic effect of dipyrone administered in gray periaqueductal was reversed by the administration of AM251, a CB1 receptor antagonist (Vazquez-Rodriguez et al., 2008). The cannabinoid receptors are located primarily in the central nervous system, but other studies indicate that CB1 receptor is also expressed in dorsal root ganglion (DRG) (Hohman & Hekenham, 1999; Ahluwalia et al., 2000) and in cutaneous terminals of nociceptive primary afferent neurons (Ständer et al, 2005; Amaya et al., 2006; Agarwal et al., 2007). Therefore, the aim of this study was to verify the involvement of peripheral cannabinoid CB1 and CB2 receptors in the anti-hyperalgesic effect of dipyrone and its bioactive metabolites, 4-MAA and 4-AA. We also verified whether the K_{ATP} potassium

channel or cGMP activation is involved in the anti-hyperalgesic effect mediated by these molecules.

Methods

Animals

Wistar albino rats weighing 150-200 g were used, and experiments were conducted according to the guidelines of the IASP on the use of laboratory animals (Zimmermann, 1983). All experimental procedures and animal protocols were approved by the Committee for Multidisciplinary Research in Biological Science Area of Laboratory Animals (CEMIB), in accordance with the guidelines of the Ethics Committee for Animal Research, State University of Campinas. Animal suffering and the number of animals per group were kept to a minimum.

Drugs and doses

The following drugs were used: PGE₂ (100 ng/paw); AM251 a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist (26.6, 80 and 240 µg/paw, Reis et al., 2011; Romero et al., 2013) AM630 a selective cannabinoid CB2 receptor antagonist (16.6, 50 and 150 µg/paw, Machado et al., 2013; Romero et al., 2013), dipyrrone (8, 80, 160 and 320 µg/paw, (Alves et al., 2002; Parada et al., 2003), 4-AA (4-aminoantipyrine; 8, 80, 160 and 320 µg/paw); 4-MAA (4-methylaminoantipyrine; 8, 80, 160 and 320 µg/paw), cGMP inhibitor ODQ (8 and 32 µg/paw, Alves et al., 2002) or K_{ATP} channel blocker glibenclamide (80 µg/paw, Alves et al., 2002). AM251, AM630, ODQ and glibenclamide were dissolved in propylene glycol and 10% DMSO; dipyrrone and 4-AA were dissolved

in 0.9% NaCl. All drugs were obtained from Sigma-Aldrich (MO, USA), except 4-MAA that was obtained from TLC-USA.

Subcutaneous injection

Drugs or vehicle was injected subcutaneously in the rat hindpaw (intraplantar) with a needle BD *Ultra-Fine*® (30 gauge) of insulin syringe (30 units). The animals were quickly contained and the volume of 50 µl was injected.

Intrathecal injection

The method for intrathecal injection of ODN-antisense was based on Papir-Kricheli (1987). Briefly, for each injection, the rats were anesthetized with 5% halothane (Le Bars et al., 1979). A 29 gauge needle was inserted into the subarachnoid space on the midline between the vertebrae L4 and L5. ODN was injected at 1 µl/s. The animals recovered consciousness about 1 min after discontinuation of anesthesia. A dose of 30 µg of antisense-ODN against CB1 receptor was administered intrathecally in a volume of 10 µl, once daily for 4 days (Barclay et al., 2002). The behavioral assessment was conducted on the day following the last day of injection.

Nociceptive paw electronic pressure-meter test for rats

In a quiet room, rats were placed in acrylic cages (12 × 20 by 17 cm high) with a wire grid floor, 15–30 min before testing. During this adaptation period, the paws were tested

2–3 times. The test consisted of provoking a hindpaw flexion reflex with a hand-held force transducer with a 0.5 mm² polypropylene tip (electronic von Frey hair, TC Inc. Life Science Instruments, U.S.A.). A tilted mirror below the grid provided a clear view of the rat hindpaw. The investigator was trained to apply the tip between the five distal footpads with a gradual increase in pressure. The maximal applied force was 80 g. The stimulus was repeated (up to six times, but usually, three times) until the animal presented two similar measurements. The end point was the paw withdrawal followed by a clear flinch response. The animal was discarded if it did not present a consistent response. The measurement of the pressure (calibrated in grams) was automatically recorded when the paw was withdrawn. The results, intensity of hyperalgesia, were presented as Δ withdraw threshold. The intensity of hyperalgesia was obtained by subtracting values measured at the defined time interval from those obtained in the control period, that is, before the injections.

Antisense oligodeoxynucleotides (ODNs)

The functional blockade of the CB1 receptor expression in peripheral sensory neurons was carried out by intrathecal injection of antisense-ODN (Oliveira et al., 2009; Yu et al., 2009; Prado et al., 2012). The following antisense-ODN sequence was used: 5'-GAGACAACAGAGTTCTAAG-3', the mismatch-ODN sequence, 5'-GAGACATCAGAGAGATCTAAT-3', corresponded to the antisense sequence except that six bases were changed. A search of the NCBI database to *Rattus norvegicus* did not identify other homologous sequences. The lyophilized ODN was purchased from

Alere (SP, Brazil) and reconstituted in 0.9% NaCl. The ODN was aliquoted and stored at -20°C.

Western blotting analysis of CB1 receptor expression

For analysis of the expression of cannabinoid CB1 receptor, after intrathecal administration of antisense-ODN we collected L4-L5 DGR. The ganglia were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use for analysis of the expression of CB1 receptor. Previously stored samples L4-L5 DRG were homogenized with an ultrasonic homogenizer (Sonic Corporation, USA) in a buffer containing 1% Triton X-100, 50 mM phosphate buffer pH 7.4, 8 M urea, 2 M thiourea, 1 mM EDTA, 1% protease inhibitor mix complete (P8340, Sigma, USA) at 4°C. After 20 minutes incubation at 4°C, samples were centrifuged at 12000 g for 15 min at 4°C and the resulting supernatant was transferred to a new tube. Protein concentration was determined by the Bradford method and 70 µg of total proteins for each sample were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane according to standard techniques. The membranes were stained with Ponceau S USB™ and photodocumented to quantify the total protein content as a control of protein loading (Romero-Calvo et al., 2010; Ignarro et al., 2013).

Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk solution in PBS containing 0.1% tween-20, and incubated overnight with goat polyclonal CB1 receptor antibody (1:1000; SAB2500190; Sigma-Aldrich, MO, USA), followed by rabbit anti-goat HRP conjugated secondary antibody (1:10000; 81620; Zymed - Life Technologies; CA, USA).

Immunoreactive bands were detected by using chemiluminescence kit SuperSignal West Pico (Pierce), photodocumented and quantified (GeneTools Software, Syngene). Thus, for each sample, it was calculated the ratio between the optical density (OD) of CB1 band and the OD corresponding to all protein bands stained with Ponceau S. This procedure allowed the use of OD value of all protein bands as an internal control.

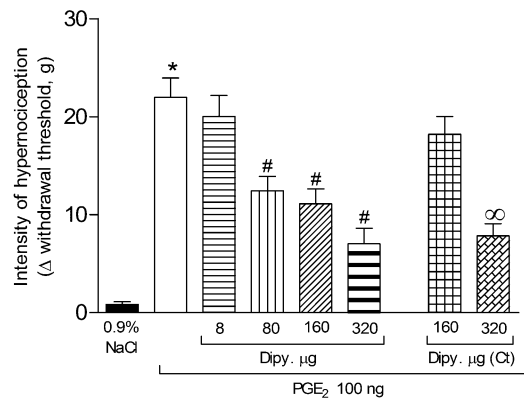
Statistical analysis

To determine if there were significant differences ($p < 0.05$) between groups, one-way ANOVA or unpaired *t*-test was performed. The statistical analysis of the results obtained was performed in the GraphPad Prism v4.00 for Windows (GraphPad Software). The results were presented as the mean $\pm$ SEM of six rats per group. The differences between the groups were compared using one-way ANOVA to obtain the degree of significance, followed by the Tukey multiple comparison test to compare the groups and doses (behavioral experiments). The data from Western blot were expressed in arbitrary units.

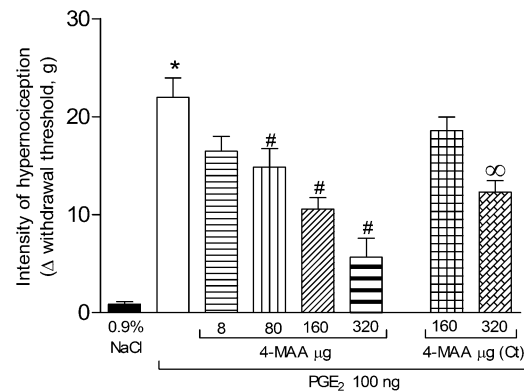
Results

1. Local administration of dipyrone, 4-methylaminoantipyrine (4-MAA) or 4-aminoantipyrine (4-AA) in peripheral tissue reduces the PGE₂-induced hyperalgesia. Local administration of PGE₂ (100 ng/paw) in subcutaneous tissue of rat hindpaw induced mechanical hyperalgesia measured 3 hours after its injection. Dipyrone or its metabolites, 4-MAA or 4-AA (all 8; 80; 160 or 320 µg/paw), was administered at the same site 2.5 hours after PGE₂. As shown in figure 1, dipyrone (Fig.1A), 4-MAA (Fig. 1B) or 4-AA (Fig. 1C) decreased the mechanical hyperalgesia in a dose-related manner (one-way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$). The administration of 160 µg/paw of dipyrone, 4-MAA or 4-AA in the contralateral hindpaw did not change the mechanical withdrawal threshold, ruling out their systemic effect. This dose was used in the following experiments.

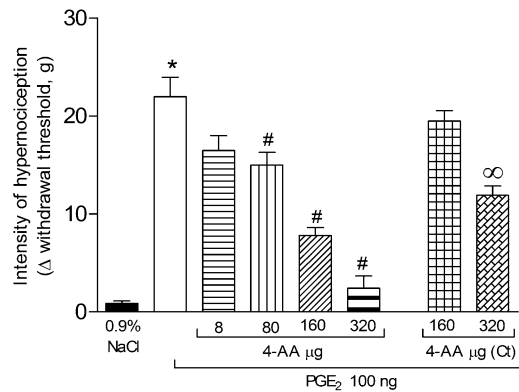
A



B



C



Fi

Figure 1. Local administration of dipyrone, 4-methylaminoantipyrine (4-MAA) or 4-aminoantipyrine (4-AA) in peripheral tissue reduces the PGE₂-induced hyperalgesia. Dipyrone (Dipy), 4-AA or 4-MAA administered in the hindpaw 2.5 hours after PGE₂ inhibited in a dose-dependent manner the mechanical hyperalgesia evaluated 30 min later (respectively Fig 1A, 1B, 1C). Dipyrone, 4-MAA and 4-AA 160 μg/paw, but not 320 μg/paw, administered in contra-lateral paw (Ct) did not change the mechanical withdrawal threshold, ruling out its systemic effect. The symbol * means different from control group (0.9% NaCl administration; 50 μL), # and ∞ means different from PGE₂ group (one-way ANOVA, Tukey test, p<0.05).

2. The anti-hyperalgesic effect of dipyrone is mediated by cGMP activation and K_{ATP} potassium channel opening, but not by cannabinoid CB1 or CB2 receptor activation.

The local administration of dipyrone (160 μg/paw) in the subcutaneous tissue reduced the PGE₂-induced mechanical hyperalgesia. As shown in the figure 2A, this reduction

was reversed by local administration of ODQ (8 or 32 $\mu\text{g/paw}$) or glibenclamide (80 $\mu\text{g/paw}$), 30 minutes before dipyrone injection (one-way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$). The pretreatment with AM251 (Figure 2B; 26.6, 80 and 240 $\mu\text{g/paw}$) or AM630 (Figure 2C; 16.6, 50 and 150 $\mu\text{g/paw}$) 30 minutes before dipyrone injection did not reverse its anti-hyperalgesic effect (one-way ANOVA, Tukey test, $p > 0.05$). The local administration of AM251 (80 $\mu\text{g/paw}$) or AM630 (50 $\mu\text{g/paw}$) by itself has no effect on PGE_2 -induced mechanical hyperalgesia (Fig. 2B and 2C, respectively).

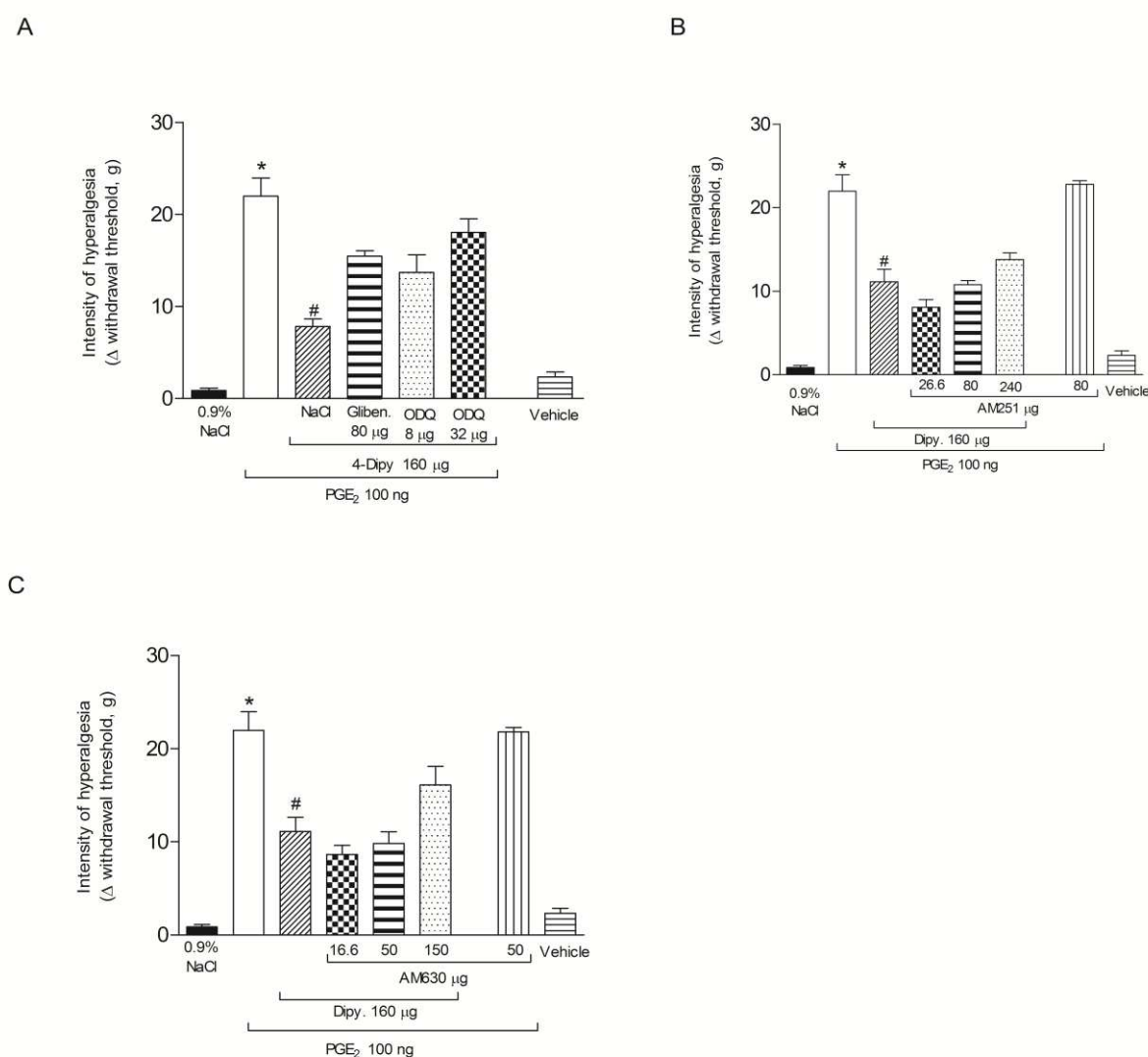


Figure 2. Anti-hyperalgesic effect of dipyrone mediated by cGMP and K_{ATP} , but not CB1 or CB2 receptor activation. Local administration of PGE_2 in rat's hindpaw induced mechanical hyperalgesia 3 h after, which

is decreased with dipyrrone administered 2.5 h after PGE₂. This anti-hyperalgesic effect was reversed by glibenclamide or ODQ (**2A**), but not by AM251 (**2B**) or AM630 (**2C**). AM251 or AM630 have no effect on PGE₂-induced mechanical hyperalgesia (figures **2B** and **2C**). The symbol * means different from control group (0.9% NaCl; 50 µL), # means different from others groups (one-way ANOVA, Tukey test, p<0.05). The administration of vehicle does not change the mechanical withdraw threshold by itself.

3. The anti-hyperalgesic effect of 4-methylaminoantipyrine is mediated by cGMP activation and K_{ATP} potassium channel opening, but not by cannabinoid CB1 or CB2 receptor activation.

The local administration of 4-MAA (160 µg/paw) in the subcutaneous tissue reduced the PGE₂-induced mechanical hyperalgesia. As shown in the figure 3A, this reduction was reversed by local administration of ODQ (8 or 32 µg/paw) or glibenclamide (80 µg/paw), 30 minutes before 4-MAA injection (one-way ANOVA, Tukey test, p<0.05). The pretreatment with AM251 (Figure 3 B; 26.6, 80 and 240 µg/paw) or AM630 (Figure 3C; 16.6, 50 and 150 µg/paw) 30 minutes before 4-MAA injection did not reverse its anti-hyperalgesic effect (one-way ANOVA, Tukey test, p>0.05).

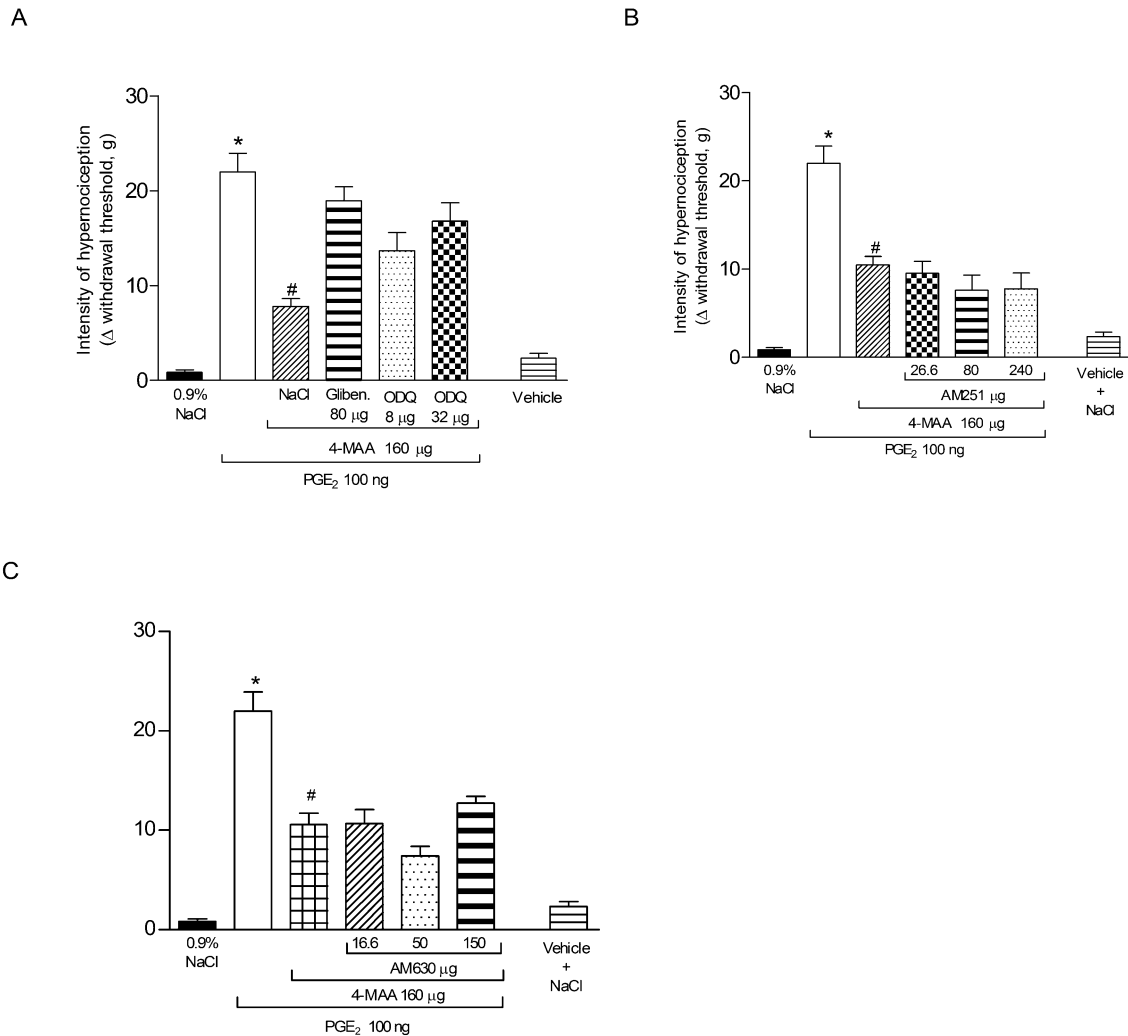


Figure 3. Anti-hyperalgesic effect of 4-methylaminoantipyrine mediated by cGMP and K_{ATP} , but not CB1 or CB2 receptor activation. Local administration of PGE₂ in rat's hindpaw induced mechanical hyperalgesia 3 h after, which is decreased with 4-MAA administered 2.5 h after PGE₂. This anti-hyperalgesic effect was reversed by glibenclamide or ODQ (**3A**), but not by AM251 (**3B**) or AM630 (**3C**). The symbol * means different from control group (0.9% NaCl; 50 μL), # means different from others groups (one-way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$). The administration of vehicle does not change the mechanical withdraw threshold by itself.

4. The anti-hyperalgesic effect of 4-aminoantipyrine is mediated by cannabinoid CB1 receptor activation, but not CB2 or cGMP activation and K_{ATP} potassium channel opening. The local administration of 4-AA (160 μg/paw) in the subcutaneous tissue reduced the PGE₂-induced mechanical hyperalgesia. As shown in

the figure 4A, this reduction was reversed by local administration of selective antagonist of cannabinoid CB1 receptors AM251 (80 and 240 $\mu\text{g/paw}$). The pretreatment with antagonist of cannabinoid CB2 receptors AM630 (Figure 4B; 16.6, 50 and 150 $\mu\text{g/paw}$), ODQ or glibenclamide (8 and 32 $\mu\text{g/paw}$ or 80 $\mu\text{g/paw}$, respectively; Figure 4C) 30 minutes before 4-MAA injection did not reverse its anti-hyperalgesic effect (One-way ANOVA, Tukey test, $p>0.05$).

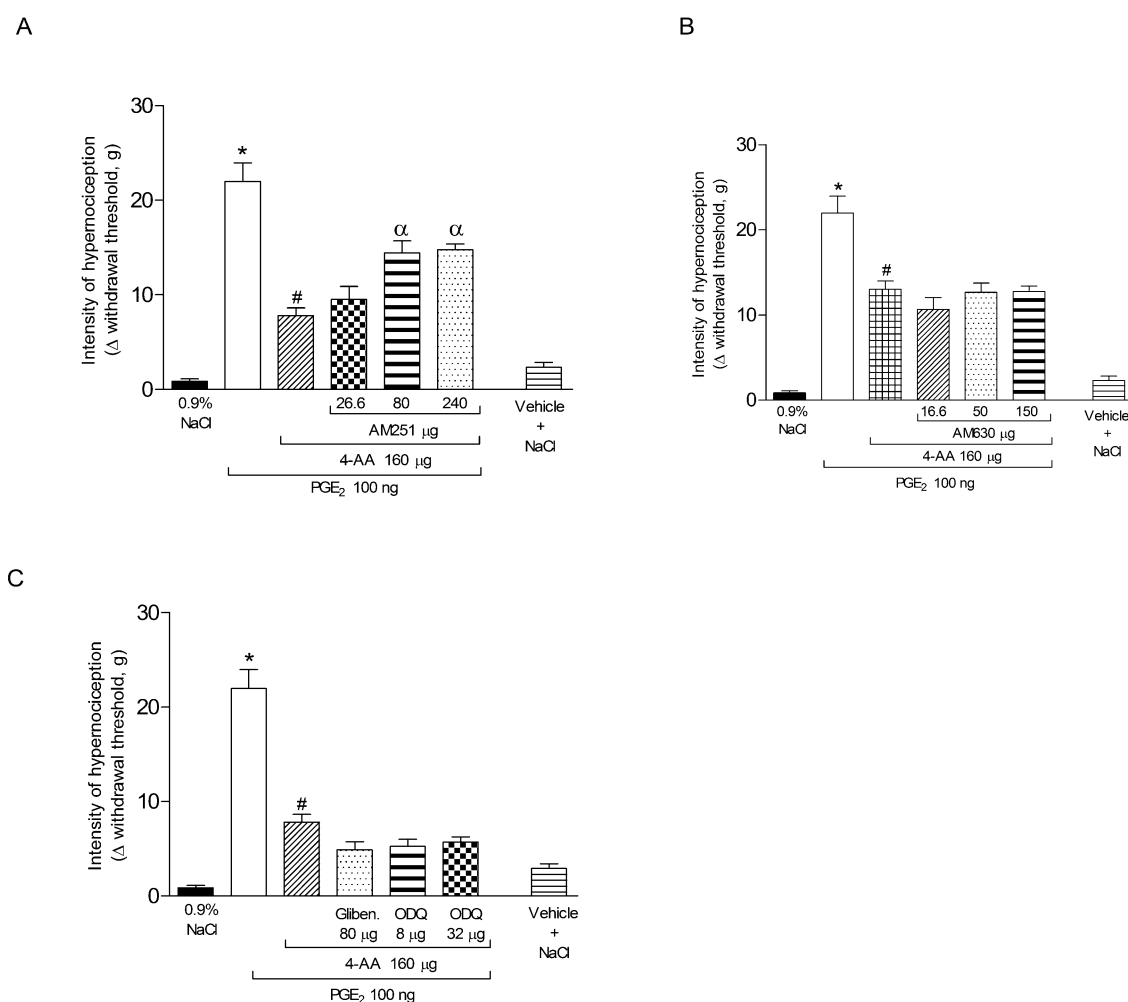
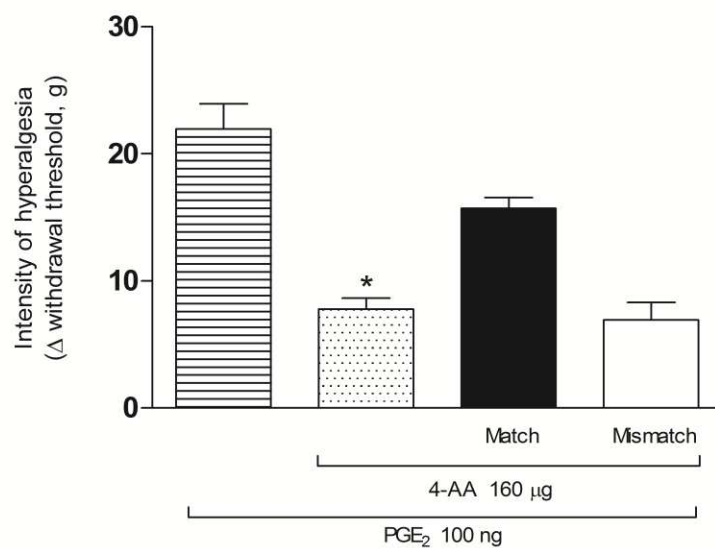


Figure 4. Anti-hyperalgesic effect of 4-aminoantipyrine mediated by CB1 receptor activation but not CB2 or cGMP and K_{ATP} . Local administration of PGE₂ in rat's hindpaw induced mechanical hyperalgesia 3 h after, which is decreased with 4-AA administered 2.5 h after PGE₂. This anti-hyperalgesic effect was reversed by AM251 (3A) but not by AM630 (3B); glibenclamide or ODQ (3C). The symbol * means different from control group (0.9% NaCl; 50 μL), # means different from PGE₂ group (one-way ANOVA, Tukey test, $p<0.05$). The administration of vehicle does not change the mechanical withdraw threshold by itself.

5. The intrathecal treatment with antisense-ODN against cannabinoid CB1 receptor in peripheral tissue reduce anti-hyperalgesic effect of 4-AA. The local administration of 4-AA (160 µg/paw) in the subcutaneous tissue reduced the PGE₂-induced mechanical hyperalgesia. As shown in the figure 5A, this reduction was reversed by intrathecal administration of antisense ODN against CB1 receptor (30 µg/10 µl once daily for 4 days), but not its mismatch (One-way ANOVA, Tukey test, $p > 0.05$). The administration of antisense-ODN reduced CB1 receptor expression on DRG as shown by Western blotting (Figure 5B; $p < 0.05$, unpaired t-test).

A



B

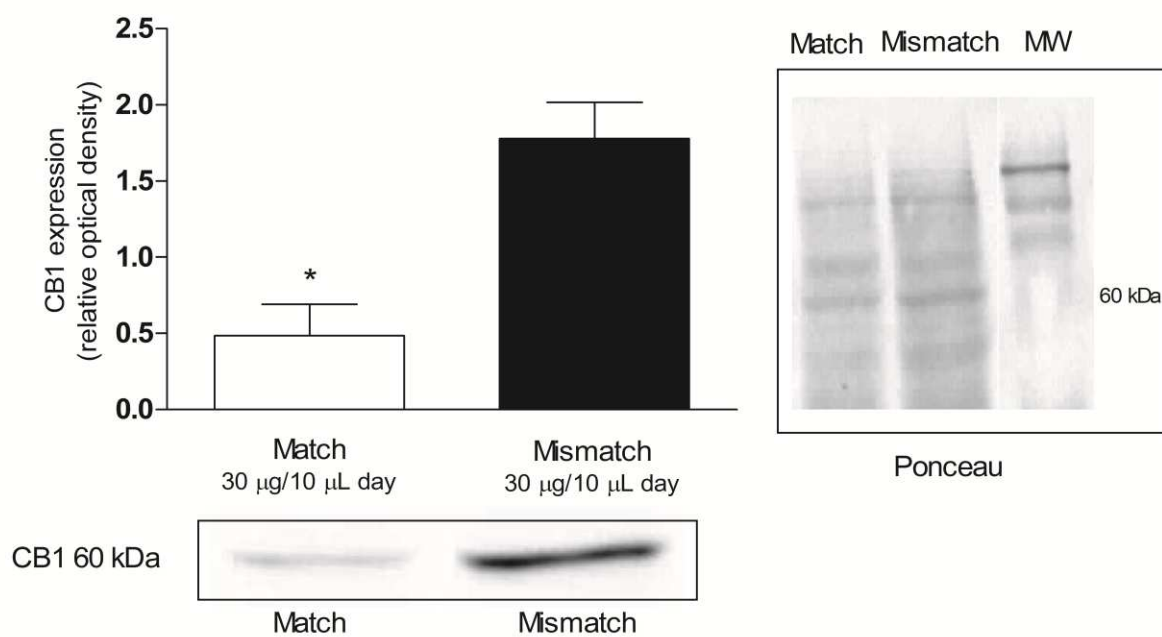


Figure 5. *Intrathecal treatment with antisense-ODN against CB1 cannabinoid receptor in peripheral tissue reduces anti-hyperalgesic effect of 4-AA.* Local administration of PGE₂ in rat's hindpaw induced mechanical hyperalgesia 3 h after, which is decreased with 4-AA administered 2.5 h after PGE₂. This anti-hyperalgesic effect was reversed by intrathecal administration with antisense-ODN, as indicated by symbols * (**Fig. 5A**, one-way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$). The administration of antisense-ODN reduces CB1 receptor expression in dorsal root ganglion, as indicated by symbols * (**Fig. 5B**, $p < 0.05$, unpaired t -test). On the right of the graph, a Ponceau S stained membrane showing total protein for each group. For CB1 expression analysis, the optical density value of the whole lane was considered as the internal control for the respective group. MW: molecular weight. Values are presented as mean $\pm$ S.E.M. (Student's t -test, $*p < 0.05$).

Discussion and Conclusions

Dipyrone is a pro-drug, widely marketed since 1922, due to its potent analgesic and antipyretic effects (Ferreira et al., 2002; Parada et al., 2003; Tatsu et al., 2007). Dipyrone is rapidly hydrolyzed (Pierre et al., 2007; Rogosch et al., 2012) in 4-methylaminoantipyrine (4-MAA) which is then metabolized to 4-formylaminoantipyrine (4-FAA), 4-aminoantipyrine (4-AA), and 4-acetylaminoantipyrine (4-AAA). 4-MAA and 4-AA are the bioactive metabolites mostly detected in human plasma after oral administration, presenting analgesic effect (Volz et al.; 1980; Zylber-Katz et al., 2002).

Our results confirm literature data showing that dipyrone, 4-MAA and 4-AA locally administered in peripheral tissue inhibit the hyperalgesia induced by PGE₂ (Ferreira et al., 2002; Assis et al., 2013). The profile of the anti-hyperalgesic effect mediated by dipyrone and 4-MAA is quite similar, however it is important to note that the hydrolysis of dipyrone to 4-MAA is a non-enzymatic reaction and depends on concentration, pH and temperature (Pierre et al., 2007). Therefore, it is plausible that the anti-hyperalgesic effect of dipyrone, at least in part, is mediated by 4-MAA resulting of local dipyrone hydrolysis.

It has been proposed that cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition plays an important role in the pharmacological effects of dipyrene in the CNS (Hinz et al., 2007). In fact, all metabolites of dipyrene show a low binding to plasma proteins and are distributed homogeneous and quickly throughout the body due to their ability to easily cross the blood-brain barrier. Furthermore dipyrene preferentially decreases COX-2 activity but not COX-1 in the peripheral tissue (Hinz et al., 2007; Pierre et al., 2007). However, in spite of its COX-2 inhibitory effect, this study confirms that dipyrene reverses the hyperalgesia induced by PGE₂ (Ferreira et al., 2002) demonstrating that its analgesic effect does not depend on its anti-inflammatory effect. In addition, the analgesic doses of dipyrene are significantly lower than their anti-inflammatory doses (Coersmeier et al., 1986). The anti-hyperalgesic effect of dipyrene has been associated to the L-arginine-NO-cGMP pathway activation and the subsequent opening of K_{ATP} channel in peripheral afferent nociceptor (Lorenzetti et al., 1996; Duarte et al., 2003).

The findings of this study showed that, similarly to dipyrene, the anti-hyperalgesic effect of 4-MAA metabolite is mediated by cGMP activation and K_{ATP} channel opening, demonstrating that the L-arginine-NO-cGMP-K_{ATP} pathway activation underlies its effect. This fact reinforces the hypothesis that the effect of dipyrene may be mediated by its hydrolyzed metabolite 4-MAA. In contrast, the anti-hyperalgesic effect of 4-AA does not depend on cGMP activation neither K_{ATP} channel opening, suggesting that L-arginine-NO-cGMP-K_{ATP} pathway is not involved in its mechanism of action.

Data of this study demonstrated that the anti-hyperalgesic effect of 4-AA, but not dipyrene or 4-MAA, is associated with cannabinoid CB1 receptor activation. In fact, it has been shown that the endogenous cannabinoid system may play a role in the

dipyrone effects (Escobar et al., 2003; Rogosch et al., 2012). In addition, this study showed that cannabinoid CB2 receptor did not mediate the anti-hyperalgesic effect of dipyrone, 4-MAA or 4-AA on PGE₂-induced hyperalgesia. However, these findings do not exclude a possible involvement of cannabinoid CB2 receptor in the dipyrone-induced analgesia once previous studies using formalin (Hanus et al., 1996) and carrageenan (Clayton et al., 2002) demonstrated that the activation of cannabinoid CB2 receptor contributes to analgesia. It is important to emphasize that PGE₂ directly acts on EP receptors of primary afferent nociceptors sensitizing them. Since cannabinoid CB2 receptor is not expressed in neurons, the present study is not able to reveal the effect of cannabinoid CB2 receptor activation. Thus, these data suggest that, in spite of the indirect action of dipyrone and its metabolites activating cannabinoid CB2 receptor, the activation of cannabinoid CB1 receptor or the activation of L-arginine-NO-cGMP-K_{ATP} pathway is enough to induce anti-hyperalgesic effect.

The activation of cannabinoid CB1 receptors by dipyrone was previously demonstrated (Escobar et al., 2003; Rogosch et al., 2012), however agreeing with the findings of this study, only 4-AA activates cannabinoid CB1 receptors. To confirm the involvement of neuronal cannabinoid CB1 receptor in primary afferent nociceptor, rats were treated with anti-sense ODN to knock down this protein only in neurons of peripheral tissue. As demonstrated in this study, rats with low levels of CB1 expression in DRG were less responsive to local administration of 4-AA in the peripheral tissue.

It has been demonstrated that CB1 receptor activation negatively modulates transient receptors potential vanilloid TRPV1 channels (Yang et al., 2013; Gabor et al., 2009). Indeed, PGE₂ acting on neuronal EP receptor positively modulates adenylyl cyclase

activity and subsequently cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) (Ferreira et al., 1979; Villarreal et al., 2009). In contrast, CB1 receptor activation reduces adenylyl cyclase activity and subsequently PKA. Once PGE₂-induced PKA phosphorylates TRPV1, contributing to neuronal sensitization (Schnitzler et al., 2008), it is plausible to hypothesize that CB1 receptor activation by 4-AA reduces inflammatory hyperalgesia by the reduction of PKA activity and the subsequently TRPV1 phosphorylation. Our results, however, have shown that local administration of dipyrone, but not 4-AA, reduces the capsaicin-induced nociception in rats hindpaw (unpublished data). This finding suggests that CB1 receptor activation by 4-AA negatively modulates (Gabor et al., 2009; Yang et al., 2013), but does not prevent the TRPV1 receptor activation in primary afferent nociceptor. In addition CB1 receptor activation on immune cells of peripheral tissue can also negatively modulate the inflammatory hyperalgesia (Gaffal et al., 2013).

In summary, the findings of the present study suggest that dipyrone induces analgesia by two different mechanism of action in the peripheral tissue: activation of L-arginine-NO-cGMP-K_{ATP} pathway by 4-MAA and neuronal cannabinoid CB1 receptor activation by 4-AA.

Acknowledgements

This work was funded by CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Abbott FV, Hellemans KG. Phenacetin, acetaminophen and dipyron: analgesic and rewarding effects. *Behav Brain Res*, v.112(1- 2), p.177-186, 2000.

Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, Rubino T, Michalski CW, Marsicano G, Monory K, Mackie K, Marian C, Batkai S, Parolaro D, Fischer MJ, Reeh P, Kunos G, Kress M, Lutz B, Woolf CJ, Kuner R. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci*, v. 10(7), p. 870-9, 2007.

Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S, Nagy I. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience*, v.100(4), p. 685-8, 2000.

Alves D, Duarte I. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron. *Eur J Pharmacol*. v.24;444(1-2), p.47-52, 2002.

Amaya F, Shimosato G, Kawasaki Y, Hashimoto S, Tanaka Y, Ji RR, Tanaka M. Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates anti-hyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. *Pain*, v. 124(1-2), p. 175-83, 2006.

Assis, D. C. R. ; Malvar, D. C ; VAZ, A.L.L. ; Melo, M.C.C. ; RAE, Giles A ; CLOSOSKI, G. C. ; SOUZA, G. E. P. Antinociceptive effect of dipyron and its metabolites on hyperalgesia induced by carragenan and prostaglandin E2.. In: 45 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2013, Ribeirão Preto. Program, p. 30-30, 2013.

Barclay J, Patel S, Dorn G, Wotherspoon G, Moffatt S, Eunson L, et al. Functional downregulation of P2X3 receptor subunit in rat sensory neurons reveals significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain. *J Neurosci*, v.22:81, p.39-47, 2002.

Beirith A, Santos AR, Rodrigues AL, Creczynski-Passa TB, Calixto JB. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur J Pharmacol*, v. 345(3), p. 233-45, 1998.

Duarte ID, Dos Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol*, v.217(2-3), p.225-227, 1992.

Edwards J, Meseguer F, Faura C, Moore RA, McQuay HJ, Derry S. Single dose dipyron for acute postoperative pain. *Cochrane Database Syst Rev*, v. 8;(9), 2010.

Elmas P, Ulugol A. Involvement of cannabinoid CB1 receptors in the antinociceptive effect of dipyron. *J Neural Transm*, v. 120(11), p. 1533-8, 2013.

Ferreira SH. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. *Int J Clin Pract*, v.128, p.2-10, 2002.

Gaffal E, Cron M, Glodde N, Bald T, Kuner R, Zimmer A, Lutz B, Tüting T. Cannabinoid 1 receptors in keratinocytes modulate proinflammatory chemokine secretion and attenuate contact allergic inflammation. *J Immunol*. v. 15;190(10), p.4929-36, 2013.

Gábor T, László S. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol*. v. 44, p. 75-85, 2009.

Ferreira SH, Nakamura M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandins*. v.18(2), p.179-90, 1979.

Hinz, B., Cheremina, O., Bachmakov, J., Renner, B., Zolk, O., Fromm, M.F., Brune, K. Dipyron elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. *The FASEB Journal*. Vol. 21, 2007.

Hohmann AG, Herkenham M. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience*. v.1171-5, p. 92(4), 1999.

Ibáñez L, Vidal X, Ballarín E, Laporte JR. Agranulocytosis associated with dipyron (metamizol). *Eur J Clin Pharmacol*, v.60(11), p.821-9, 2004.

Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah TW, Mata HP, Malan TP Jr. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 22, p.102(8), 2005.

Ignarro RS, Vieira AS, Sartori CR, Langone F, Rogério F, Parada CA. JAK2 inhibition is neuroprotective and reduces astrogliosis after quinolinic acid striatal lesion in adult mice. *J Chem Neuroanat*. v.48-49, p.14-22, 2013.

Katsuyama S, Mizoguchi H, Kuwahata H, Komatsu T, Nagaoka K, Nakamura H, Bagetta G, Sakurada T, Sakurada S. Involvement of peripheral cannabinoid and

opioid receptors in β -caryophyllene-induced antinociception. *Eur J Pain*. v. 17(5), p.664-75, 2013.

Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain*. v.6(283), p.304. 1979.

Lorenzetti BB, Ferreira SH. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrone-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflamm Res*. v.45(6), p.308-311, 1996.

Machado F C, V O Zambelli¹, A C O Fernandes, A S Heimann, Y Cury, G Picolo. Peripheral interactions between cannabinoid and opioid systems contribute to the antinociceptive effect of crotalphine¹. *Br J Pharmacol*. v.171(4), p.961-72, 2014.

Millns PJ, Chapman V, Kendall DA. Cannabinoid inhibition of the capsaicin-induced calcium response in rat dorsal root ganglion neurones. *Br J Pharmacol*, v. 132(5), p.969-71, 2001.

Maj S, Centkowski P. A prospective study of the incidence of agranulocytosis and plastic anemia associated with the oral use of metamizole sodium in Poland. *Med Sci Monit*. v.10(9) p.93-5, 2004.

Oliveira MC, Pelegrini-da-Silva A, Tambeli CH, Parada CA. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X_{3,2/3} receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Pain*. v.141(1-2), p.127-34, 2009.

Papir-Kricheli D, Frey J, Laufer R, Gilon C, Chorev M, Selinger Z, et al. Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists. *Pain*. v.31, p.263-76, 1987.

Parada CA, Yeh JJ, Joseph EK, Levine JD. Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. *Eur J Neurosci*. v.17:18, p.47-52, 2003.

Prado FC, Araldi D, Vieira AS, Oliveira-Fusaro MC, Tambeli CH, Parada CA. Neuronal P2X₃ receptor activation is essential to the hyperalgesia induced by prostaglandins and sympathomimetic amines released during inflammation. *Neuropharmacol*. v. 67, p.252-8, 2013.

Phillips, C and Harper, C. The economics associated with persistent pain. *Pain nonmalignant disease*. v.5, p. 127-130, 2011.

Pierre SC, Schmidt R, Brenneis C, Michaelis M, Geisslinger G, Scholich K. Inhibition of cyclooxygenases by dipyrone. *Br J Pharmacol*. v.151(4), p.494-503, 2007.

Reis GM, Ramos MA, Pacheco Dda F, Klein A, Perez AC, Duarte ID. Endogenous

cannabinoid receptor agonist anandamide induces peripheral antinociception by activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Life Sci.* v. 1(88), p.15-16, 2011.

Rogosch T, Sinning C, Podlewski A, Watzer B, Schlosburg J, Lichtman AH, Cascio MG, Bisogno T, Di Marzo V, Nusing R, Imming P. Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol). *Bioorg Med Chem.* v.20(1), p.101-107, 2012.

Romero TR, Resende LC, Duarte ID. The neuronal NO synthase participation in the peripheral antinociception mechanism induced by several analgesic drugs. *Nitric Oxide*, v.25(4), p.431-435, 2011.

Romero TR, Resende LC, Guzzo LS, Duarte ID. CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonists induce peripheral antinociception by activation of the endogenous noradrenergic system. *Anesth Analg.* v.(2), p.463-72, 2013.

Rezende RM, D S França, G B Menezes, W G P dos Reis, Y S Bakhle, and J N Francischi. Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyrone in a rat model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol.* v.153(4), p.760–768 2008.

Schnizler K, Shutov LP, Van Kanegan MJ, Merrill MA, Nichols B, McKnight GS, Strack S, Hell JW, Usachev YM. Protein kinase A anchoring via AKAP150 is essential for TRPV1 modulation by forskolin and prostaglandin E2 in mouse sensory neurons. *J Neurosci.* v. 7; 28(19), p.4904-17, 2008.

Ständer S, Schmelz M, Metze D, Luger T, Rukwied R. Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J Dermatol Sci*, v. 38(3), p. 177-88, 2005.

Silva LC, Romero TR, Guzzo LS, Duarte ID. Participation of cannabinoid receptors in peripheral nociception induced by some NSAIDs. *Braz J Med Biol Res*, v.45(12), p. 1240-3, 2012.

Taylor, M.L. The impact of the "business of Pain Medicine on Patient Care. *Pain Medicine*. Wiley Periodicals. v.12, p.763-72, 2011.

Vazquez E, Escobar W, Ramirez K, Vanegas H. A nonopioid analgesic acts upon the PAG-RVM axis to reverse inflammatory hyperalgesia. *Eur J Neurosci.* v. 25(2), p. 471-9, 2007.

Vazquez-Rodriguez, E., Escobar, W., Ramirez, K., Avila, C. & Vanegas, The Anti-hyperalgesic Effect of PAG-Microinjected Metamizol is Mediated by Endocannabinoids in the PAG-RVM Axis. 12th World Congre on Pain, Glasgow, IASP Press, Seattle, Abstract no. 2515, 2008.

Vieira AS, Rezende AC, Grigoletto J, Rogério F, Velloso LA, Skaper SD, Negro A, Langone F. Ciliary neurotrophic factor infused intracerebroventricularly shows reduced catabolic effects when linked to the TAT protein transduction domain. *J Neurochem.* v. 110(5), p.1557-66, 2009.

Villarreal CF, Sachs D, Funez MI, Parada CA, de Queiroz Cunha F, Ferreira SH. The peripheral pro-nociceptive state induced by repetitive inflammatory stimuli involves continuous activation of protein kinase A and protein kinase C epsilon and its Na(V)1.8 sodium channel functional regulation in the primary sensory neuron. *Biochem Pharmacol.* v. 1;77(5), p.867-77, 2009.

Volz M, Kellner HM. Kinetics and metabolism of pyrazolones (propyphenazone, aminopyrine and dipyron). *Br J Clin Pharmacol.* p.2:299-308, 1980.

Yu B, Zhao X, Lee LJ, Lee RJ. Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics. *AAPS.* v.11(1): p.195-203, 2009.

Yang Y, Yang H, Wang Z, Varadaraj K, Kumari SS, Mergler S, Okada Y, Saika S, Kingsley PJ, Marnett LJ, Reinach PS. Cannabinoid receptor 1 suppresses transient receptor potential vanilloid 1-induced inflammatory responses to corneal injury. *Cell Signal.* v. 25(2) p.501-11, 2013.

Zylber-Katz E, Granit L, Levy M. Formation and excretion of dipyron metabolites in man. *Eur J Clin Pharmacol.* v. 42(2); p. 187-91,1992.

2 CONCLUSÕES

Diversos estudos tem buscado elucidar o mecanismo de ação anti-hiperalgésico da dipirona (Lorenzetti & Ferreira, 1985; Sachs et al, 2004; Vazquez et al, 2005; Ortiz et al, 2003; Romero et al, 2011; Rogosch et al, 2012; Malvar et al, 2011; Escobar et al, 2012). A dipirona é uma pró-droga com potente efeito antipirético e analgésico, no entanto, com um baixo efeito anti-inflamatório (Lorenzetti & Ferreira, 1985, Hinz et al., 2007). Após sua administração oral, ainda no estômago, hidrolizada em 4-metilaminoantipirina (4-MAA), sendo então absorvida. Em seguida o 4-MAA é oxidado a 4-formilaminoantipirina (4-FAA) ou demetilado a 4-aminoantipirina (4-AA) no fígado. Finalmente, o 4-AA é metabolizado a 4-Acetilaminoantipirina (4-AAA) (Hinz et al., 2007; Wessel et al, 2006).

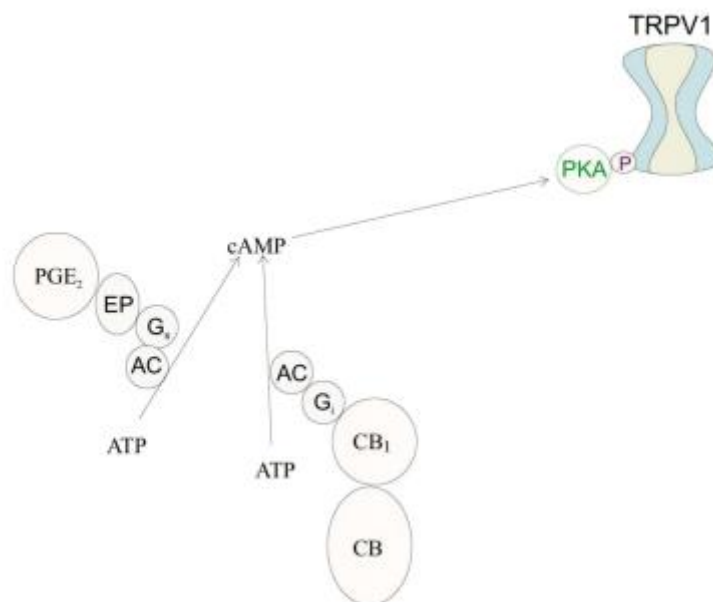
Por se tratar de uma pró-droga que possui um mecanismo de ação dependente de fatores como via de administração, condição de dor a ser avaliada, formação de metabolitos bioativos, o estudo realizado com a própria dipirona pode não levar a uma resposta conclusiva (Lorenzetti & Ferreira, 1985; Sachs et al, 2004; Vazquez et al, 2005; Romero et al, 2011; Escobar et al, 2012; Rogosh et al., 2013, Dos santos et al., 2014).

Alguns estudos indicam que o mecanismo de ação anti-hiperalgésico e antipirético da dipirona, seja através da inibição da síntese de PGE_2 (Shimada et al, 1994, Kanashiro et al., 2009). Ainda de acordo com esta proposta, estudos *ex vivo* e *in vitro* demonstram que a dipirona inibe as enzimas COX-1 e COX-2 (Pierre et al, 2007; Hinz et al, 2007) por ação somente de dois dos seus metabólitos, 4-MAA e 4-AA. Entretanto, no tecido periférico a dipirona possui mecanismos de ação independente da síntese de PGE_2 , uma vez que em a dipirona possui efeito analgésico no modelo de hiperálgia induzida por PGE_2 (Dos santos et al., 2014).

Outros mecanismos de ação da dipirona além da diminuição na síntese de PGE_2 têm sido descritos. Estudos tem associado o efeito anti-hiperalgésico da dipirona com a ativação da via L-arginina-NO-cGMP e subsequente abertura de canais K_{ATP} no tecido periférico, a abertura destes canais leva a uma hiperpolarização neuronal, diminuindo assim a sua excitabilidade e consequente percepção da dor (Lorenzetti & Ferreira 1996; Duarte et al., 1992; Rogosch et al., 2012).

No presente estudo demonstramos que a dipirona, 4-MAA e 4-AA, possuem um efeito analgésico similar de maneira dose dependente. E quanto ao mecanismos de ação a dipirona induz analgesia por duas vias no tecido periférico: (1) Ativação da via L-arginina-NO-cGMP- K_{ATP} por 4-MAA levando a uma hiperpolarização neuronal, (2) o metabolito 4-AA leva ativação neuronal de CB1.

Quanto a ativação de CB1, estudos recentes tem demonstrado que a ativação deste receptor leva a modulação negativa de receptores vaniloides de potencial transiente TRPV1 (Yang et al. De 2013 e Gabor e László, 2009). De fato, a PGE_2 ativa receptores neuronal EP, modulando positivamente a atividade de adenilil-ciclase e, subsequentemente, PKA proteína quinase dependente de dependente do AMPc (Ferreira e Nakamura, 1979 e Villarreal et ai., 2009). Em contraste, a ativação do receptor CB1 reduz a atividade de adenilil-ciclase e, subsequentemente, redução da fosforilação de PKA. Uma vez a fosforilação de TRPV1 via ativação de PKA, contribui para a sensibilização neuronal (Schnizler et al., 2008), é plausível a hipótese de que a ativação do receptor CB1 por 4-AA reduz a hiperalgesia inflamatória pela redução da atividade da PKA e fosforilação TRPV1 (Fig.3).



(Adaptado Fein et al., 2006)

Quanto a ativação da via L-arginina-NO-cGMP é bem conhecido que leva a uma hiperpolarização neuronal, diminuindo assim a sua excitabilidade e consequente percepção da dor. Este é o mecanismo pelo qual a morfina induz seu efeito anti-hiperalgésico (Lorenzetti & Ferreira 1996; Duarte et al., 1992; Rogosch et al., 2012). Como sugerido anteriormente (Lorenzetti & Ferreira 1996; Duarte et al., 1992) o efeito anti-hiperalgésico da dipirona é de fato dependente de canais K_{ATP} no tecido periférico. No presente estudos acrescentamos que além da dipirona o seu metabolito 4-MAA tem efeito-anti hiperalgésico por ativação desta mesma via (Dos Santos et al., 2014).

3 *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Abbott FV, Hellemans KG. Phenacetin, acetaminophen and dipyrrone: analgesic and rewarding effects. *Behav Brain Res*, v.112(1- 2), p.177-186, 2000.

Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, Amaya F, Constantin CE, Brenner GJ, Rubino T, Michalski CW, Marsicano G, Monory K, Mackie K, Marian C, Batkai S, Parolaro D, Fischer MJ, Reeh P, Kunos G, Kress M, Lutz B, Woolf CJ, Kuner R. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci*, v. 10(7), p. 870-9, 2007.

Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S, Nagy I. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience*, v.100(4), p. 685-8, 2000.

Alves D, Duarte I. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrrone. *Eur J Pharmacol*. v.24;444(1-2), p.47-52, 2002.

Amaya F, Shimosato G, Kawasaki Y, Hashimoto S, Tanaka Y, Ji RR, Tanaka M. Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates anti-hyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. *Pain*, v. 124(1-2), p. 175-83, 2006.

Assis, D. C. R. ; Malvar, D. C ; Vaz A.L.L. ; Melo, M.C.C. ; RAE, Giles A ; Clososki, G. C.; Souza, G. E. P. Antinociceptive effect of dipyrrone and its metabolites on hyperalgesia induced by carragenan and prostaglandin E2.. In: 45 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2013, Ribeirão Preto. Program, p. 30-30, 2013.

Benyamin,R ., Trescot, A.M., Datta, S., Buenaventura, R., Adlaka, R., Sehgal, N., Glaser, S.E., Vallejo, R. Opioid Complications and Side Effects. *Pain Physician: Opioid Special Issue*: v.11, p.S105-S120, 2008

Garbe E. Non-chemotherapy drug-induced agranulocytosis. *Expert Opin Drug Saf*. v.6(3):323-35, 2007.

Anand P, Whiteside G, Fowler CJ, Hohmann AG. Targeting CB2 receptors and the endocannabinoid system for the treatment of pain. *Brain Res Rev*. v. 60(1),p.255-6, 2009.

Bonica JJ. Evolution and current status of pain programs. *J Pain Symptom Manage*. v.5(6) p.368-74. 1990.

Barclay J, Patel S, Dorn G, Wotherspoon G, Moffatt S, Eunson L, et al. Functional downregulation of P2X3 receptor subunit in rat sensory neurons reveals significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain. *J Neurosci*, v.22:81, p.39-47, 2002.

Beirith A, Santos AR, Rodrigues AL, Creczynski-Passa TB, Calixto JB. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur J Pharmacol*, v. 345(3), p. 233-45, 1998.

Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* v. 7; 72:248-254, 1976.

Cichewicz DL. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. *Life Sci*. v.74(11), p.1317-24, 2004.

Conti F, Hill B, Neumcje B, Nonner W, Stampfli R. Measurement of the conductance of the sodium channel from current fluctuations at the node of Ranvier, *J Physiol*, v.262(3), p.699-727, 1976.

Cunha TM, Barsante MM, Guerrero AT, Verri WA Jr, Ferreira SH, Coelho FM, Bertini R, Di Giacinto C, Allegretti M, Cunha FQ, Teixeira MM. Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. *Br J Pharmacol*;154(2):460-70. 2008.

Duarte ID, Dos Santos IR, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol*, v.217(2-3), p.225-227, 1992.

Gábor T, László S. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol*. v. 44, p. 75-85, 2009.

Guindon J, Hohmann AG. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. v.8(6), p.403-21, 2009

Da Cunha J,M, Rae GA, Ferreira S.H, Cunha F.Q. Endothelins induce ETB receptor-mediated mechanical hypernociception in rat hindpaw: roles of cAMP and protein kinase C. *Eur J Pharmacol* 6; 501(1-3):87-94, 2004.

Deyo, R.A., Cherkin, D., Conrad,D., Volinn, E. Cost, Controversy, Crisis: Low Back Pain and the Health of the Public. *Annu. Rev. Publ. Health*. v.12, p.141- 56, 1991.

Duarte ID, Ferreira SH. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol*, v.221(1), p.171-174, 1992.

Edwards J, Meseguer F, Faura C, Moore RA, McQuay HJ, Derry S. Single dose dipyrone for acute postoperative pain. *Cochrane Database Syst Rev*, v. 8;(9), 2010.

Elmas P, Ulugol A. Involvement of cannabinoid CB1 receptors in the antinociceptive effect of dipyrone. *J Neural Transm*, v. 120(11), p. 1533-8, 2013.

England S, Bevan S, Docherty RJ. 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. 1;495, p.429-40, 1996.

Escobar W, Ramirez K, Avila C, Limongi R, Vanegas H, Vazquez E. Metamizol, a non-opioid analgesic, acts via endocannabinoids in the PAG-RVM axis during inflammation in rats. *Eur J Pain*, 2011.

Ferreira SH. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. *Int J Clin Pract*, v.128, p.2-10, 2002.

Ferreira SH. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. *Drugs*, v.46 Suppl 1:1-9, 1993.

Ferreira SH, Nakamura M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandins*. v.18(2), p.179-90, 1979.

Gaffal E, Cron M, Glodde N, Bald T, Kuner R, Zimmer A, Lutz B, Tüting T. Cannabinoid 1 receptors in keratinocytes modulate proinflammatory chemokine secretion and attenuate contact allergic inflammation. *J Immunol.* v. 15;190(10), p.4929-36, 2013.

Kidd BL & Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth* v.87, p.3–11, 2001

Hinz, B., Cheremina, O., Bachmakov, J., Renner, B., Zolk, O., Fromm, M.F., Brune, K. Dipyron e licits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. *The FASEB Journal*. Vol. 21, 2007.

Hohmann AG, Herkenham M. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience*. v.1171-5, p. 92(4), 1999.

Hartman B, Ahamadi S, Heppenstall PA, Lewin GR, Schott C, Borchardt T, Seeburg PH, Zeilhofer HU, Sprengel R, Kuner R. The AMPA receptor subunits GluR-A and GluR-B reciprocally modulate spinal synaptic plasticity and inflammatory pain. *Neuron*, v.44(4), p.637-650, 2004.

Ibáñez L, Vidal X, Ballarín E, Laporte JR. Agranulocytosis associated with dipyron e (metamizol). *Eur J Clin Pharmacol*, v.60(11), p.821-9, 2005.

Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah TW, Mata HP, Malan TP Jr. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 22, p.102(8), 2005.

Ignarro RS, Vieira AS, Sartori CR, Langone F, Rogério F, Parada CA. JAK2 inhibition is neuroprotective and reduces astrogliosis after quinolinic acid striatal lesion in adult mice. *J Chem Neuroanat.* v.48-49, p.14-22, 2013.

Iwaszkiewicz K. S., Schneider J. J., Hua S. Targeting peripheral opioid receptors to promote analgesic and anti-inflammatory actions. *Front. Pharmacol.* v.4:1, p. 3210.3389, 2013.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* v.13;413(6852, p.203-10, 2001

Katsuyama S, Mizoguchi H, Kuwahata H, Komatsu T, Nagaoka K, Nakamura H, Bagetta G, Sakurada T, Sakurada S. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β -caryophyllene-induced antinociception. *Eur J Pain.* v. 17(5), p.664-75, 2013.

Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain.* v.6(283), p.304. 1979.

Lorenzetti BB, Ferreira SH. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyron-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflamm Res.* v.45(6), p.308-311, 1996.

Machado F C, V O Zambelli¹, A C O Fernandes, A S Heimann, Y Cury, G Picolo. Peripheral interactions between cannabinoid and opioid systems contribute to the antinociceptive effect of crotalphine¹. *Br J Pharmacol.* v.171(4), p.961-72, 2014.

Maj S, Centkowski P. A prospective study of the incidence of agranulocytosis and plastic anemia associated with the oral use of metamizole sodium in Poland. *Med Sci Monit.* v.10(9) p.93-5, 2004.

Malvar Ddo C, Soares DM, Fabrício AS, Kanashiro A, Machado RR, Figueiredo MJ, Rae GA, de Souza GE. The antipyretic effect of dipyron is unrelated to inhibition of PGE(2) synthesis in the hypothalamus. *Br J Pharmacol*, v.162(6), p.1401-9, 2011.

Malvar Ddo C, Aguiar FA, Vaz Ade L, Assis DC, de Melo MC, Jabor VA, Kalapothakis E, Ferreira SH, Clososki GC, de Souza GE. Dipyron metabolite 4-MAA induces hypothermia and inhibits PGE2 -dependent and -independent fever while 4-AA only blocks PGE2 -dependent fever. *Br J Pharmacol*, v.171(15), p.3666-79, 2014.

Manchikanti L, Fellows B, Ailinani H, Pampati V. Therapeutic use, abuse, and nonmedical use of opioids: a ten-year perspective. *Pain Physician.* v.13(5), p.401-35, 2010.

Millan, M.J. The induction of pain: a integrative review. *Prog. Neurobiol.* v.57 (1), p.1-164. 1999.

Narumya S., Sugimoto Y., Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* v.79, p.1193–1226, 1999

Merskey H, Bogduk N. Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms, IASP Press - Seattle, p. 210, 1994.

Mestre, C. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, v.32, n.4, p.197-200, 1994.

Millns PJ, Chapman V, Kendall DA. Cannabinoid inhibition of the capsaicin-induced calcium response in rat dorsal root ganglion neurones. *Br J Pharmacol*, v. 132(5), p.969-71, 2001.

Oliveira MC, Pelegrini-da-Silva A, Tambeli CH, Parada CA. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X_{3,2/3} receptors in the development of inflammatory hyperalgesia. *Pain*. v.141(1-2), p.127-34, 2009.

Papir-Kricheli D, Frey J, Laufer R, Gilon C, Chorev M, Selinger Z, et al. Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists. *Pain*. v.31, p.263-76, 1987.

Parada CA, Yeh JJ, Joseph EK, Levine JD. Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. *Eur J Neurosci*. v.17:18, p.47-52, 2003.

Phillips, C and Harper, C. The economics associated with persistent pain. *Pain nonmalignant disease*. v.5, p. 127-130, 2011.

Pierre SC, Schmidt R, Brenneis C, Michaelis M, Geisslinger G, Scholich K. Inhibition of cyclooxygenases by dipyrone. *Br J Pharmacol*. v.151(4), p.494-503, 2007.

Prado FC, Araldi D, Vieira AS, Oliveira-Fusaro MC, Tambeli CH, Parada CA. Neuronal P2X₃ receptor activation is essential to the hyperalgesia induced by prostaglandins and sympathomimetic amines released during inflammation. *Neuropharmacol*. v. 67, p.252-8, 2013.

Pontikoglou C, Papadaki HA. Idiosyncratic drug-induced agranulocytosis: the paradigm of deferiprone. *Hemoglobin*. v.34(3), p.291-304, 2010.

Reis GM, Ramos MA, Pacheco Dda F, Klein A, Perez AC, Duarte ID. Endogenous cannabinoid receptor agonist anandamide induces peripheral antinociception by activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Life Sci*. v. 1(88), p.15-16, 2011.

Rogosch T, Sinning C, Podlewski A, Watzer B, Schlosburg J, Lichtman AH, Cascio MG, Bisogno T, Di Marzo V, Nusing R, Imming P. Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol). *Bioorg Med Chem*. v.20(1), p.101-107, 2012.

Romero TR, Resende LC, Duarte ID. The neuronal NO synthase participation in the peripheral antinociception mechanism induced by several analgesic drugs. *Nitric Oxide*, v.25(4), p.431-435, 2011.

Romero TR, Resende LC, Guzzo LS, Duarte ID. CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonists induce peripheral antinociception by activation of the endogenous noradrenergic system. *Anesth Analg*. v.(2), p.463-72, 2013.

Rezende RM, D S França, G B Menezes, W G P dos Reis, Y S Bakhle, and J N Francischi. Different mechanisms underlie the analgesic actions of paracetamol and dipyrone in a rat model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol*. v.153(4), p.760–768 2008.

Parada CA, Vivancos GG, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. 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. (5), p.2923-298, 2003.

Riedel W, Neeck G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol*, v.60(6), p.404-415, 2001.

Schnitzler K, Shutov LP, Van Kanegan MJ, Merrill MA, Nichols B, McKnight GS, Strack S, Hell JW, Usachev YM. Protein kinase A anchoring via AKAP150 is essential for TRPV1 modulation by forskolin and prostaglandin E2 in mouse sensory neurons. *J Neurosci*. v. 7; 28(19), p.4904-17, 2008.

Ständer S, Schmelz M, Metze D, Luger T, Rukwied R. Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J Dermatol Sci*, v. 38(3), p. 177-88, 2005.

Silva LC, Romero TR, Guzzo LS, Duarte ID. Participation of cannabinoid receptors in peripheral nociception induced by some NSAIDs. *Braz J Med Biol Res*, v.45(12), p. 1240-3, 2012.

Sachs D, Villarreal C, Cunha F, Parada C, Ferreira SH. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. *Br J Pharmacol*, v.156(5), p.826-834, 2009.

Sagar DR, Kelly Y S, Millns PJ, O'shaughnessy CT, Kendal DA, Chapaman V. Inhibitory effects of CB1 and CB2 receptor agonists on responses of DRG neurons and dorsal horn neurons in neuropathic rats. *Eur J Neurosci*, v.22(2), p.371-379, 2005.

Schug SA, Manopas A. Update on the role of non-opioids for postoperative pain treatment. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, v. 21(1), p.15-30, 2007.

Silva CI, Mecanismos envolvidos na inibição da hiperhiperalgesia por canabinóides. Ribeirão Preto: FMRP/USP, 2007. 97p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-

graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

Taylor, M.L. The impact of the "business of Pain Medicine on Patient Care. *Pain Medicine*. Wiley Periodicals. v.12, p.763-72, 2011.

Tatsuo MA, Carvalho WM, Silva CV, Miranda AE, Ferreira SH, Francischi JN. Analgesic and antiinflammatory effects of dipyrone in rat adjuvant arthritis model. *Inflammation*, v.18(4), p.399-405, 2004.

Uhelski ML, Cain DM, Harding-Rose C, Simone DA. The non-selective cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 attenuates responses of C-fiber nociceptors in a murine model of cancer pain. *Neuroscience*. v.5;247:84-94, 2013.

Vazquez E, Escobar W, Ramirez K, Vanegas H. A nonopioid analgesic acts upon the PAG-RVM axis to reverse inflammatory hyperalgesia. *Eur J Neurosci*. v. 25(2), p. 471-9, 2007.

Vazquez-Rodriguez, E., Escobar, W., Ramirez, K., Avila, C. & Vanegas, The Anti-hyperalgesic Effect of PAG-Microinjected Metamizol is Mediated by Endocannabinoids in the PAG-RVM Axis. 12th World Congre on Pain, Glasgow, IASP Press, Seattle, Abstract no. 2515, 2008.

Vivancos GG, Verri WA JR, Cunha TM, Schivo IR, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res*; 37(3):391-9, 2004

Vieira AS, Rezende AC, Grigoletto J, Rogério F, Velloso LA, Skaper SD, Negro A, Langone F. Ciliary neurotrophic factor infused intracerebroventricularly shows reduced catabolic effects when linked to the TAT protein transduction domain. *J Neurochem*. v. 110(5), p.1557-66, 2009.

Villarreal CF, Sachs D, Funez MI, Parada CA, de Queiroz Cunha F, Ferreira SH. The peripheral pro-nociceptive state induced by repetitive inflammatory stimuli involves continuous activation of protein kinase A and protein kinase C epsilon and its Na(V)1.8 sodium channel functional regulation in the primary sensory neuron. *Biochem Pharmacol*. v. 1;77(5), p.867-77, 2009.

Volz M, Kellner HM. Kinetics and metabolism of pyrazolones (propyphenazone, aminopyrine and dipyrone). *Br J Clin Pharmacol*. p.2:299-308, 1980.

Zylber-Katz E, Granit L, Levy M. Formation and excretion of dipyrone metabolites in man. *Eur J Clin Pharmacol*. v. 42(2); p. 187-91,1992.

Yu B, Zhao X, Lee LJ, Lee RJ. Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics. *AAPS*. v.11(1): p.195-203, 2009.

Yang Y, Yang H, Wang Z, Varadaraj K, Kumari SS, Mergler S, Okada Y, Saika S, Kingsley PJ, Marnett LJ, Reinach PS. Cannabinoid receptor 1 suppresses transient receptor potential vanilloid 1-induced inflammatory responses to corneal injury. *Cell Signal*. v. 25(2) p.501-11, 2013.

Walsh, K., Cruddas, M., Coggon, D. Low back pain in eight areas of Britain. *Journal of Epidemiology and Community Health*; v.46, p.227-230, 1992

Yaksh TL, Hua XY, Kalcheva I, Nozaki-Taguchi N, Marsala M. The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.96, p.7680–6, 1999.

Verri WA Jr, Guerrero AT, Fukada SY, Valerio DA, Cunha TM, Xu D, Ferreira SH, Liew FY, Cunha FQ. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.19;105(7), p. 2723-8, 2008.

Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. v.23;231(25), p.232-5, 1971.

Swanwick, R.S., Pristerá, A., Okuse, K. The trafficking of NaV1.8. *Neurosci Lett*. v.10; (2-13), p.78–83, 2010.

Tremblay J, Hamet P. Genetics of pain, opioids, and opioid responsiveness. *Metabolism*. v. 59, p. 1:S5-8, 2010.

Walker JM, Huang SM. Cannabinoid analgesia. *Pharmacol Ther*. v.95(2), p.127-35, 2002 Aug;. Review. PubMed PMID: 12182960.

4 *ANEXOS*

Anexo 1. Para melhor compreensão de alguns protocolos, foi adicionado um material suplementar com imagens e descrição da técnica:

Administração intratecal e Coleta de Gânglios.

Para analisar o bloqueio funcional do receptor CB1, foram realizados os seguintes passos:

Primeiro a administração intratecal do ODN-antisense contra CB1 (30µg/10µl durante 4 dias). Para a administração os animais foram anestesiados, por via inalatória com isoflurano logo após tricotomizados na região dorsal na altura das cristas ilíacas (Forane, Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.) e posicionados em decúbito ventral sobre um cilindro, para que sua região lombar fique hiperfletida. Em seguida, uma agulha para insulina BD *Ultra-Fine® 30U* (29G) contendo antisense contra CB1 ou veículo foi inserida no espaço subaracnóide, entre as vértebras L4-L5 (± 1) em ângulo de aproximadamente 45°, e o volume de 30 µl foi injetado. A correta localização da punção no espaço subaracnóide pode ser verificada pela observação de um reflexo na cauda do animal.

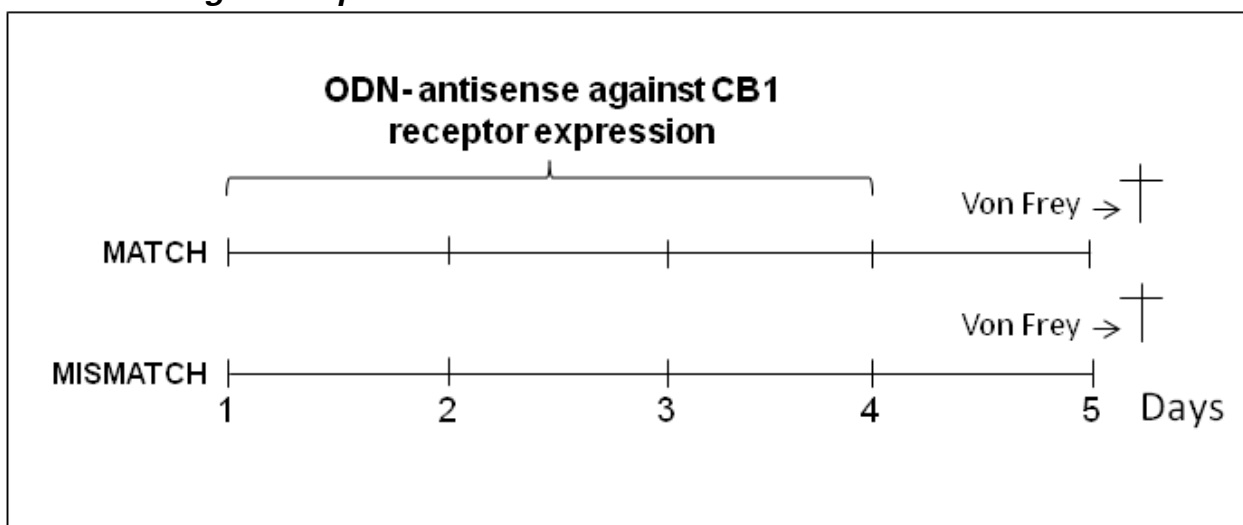
Posicionamento e administração intratecal



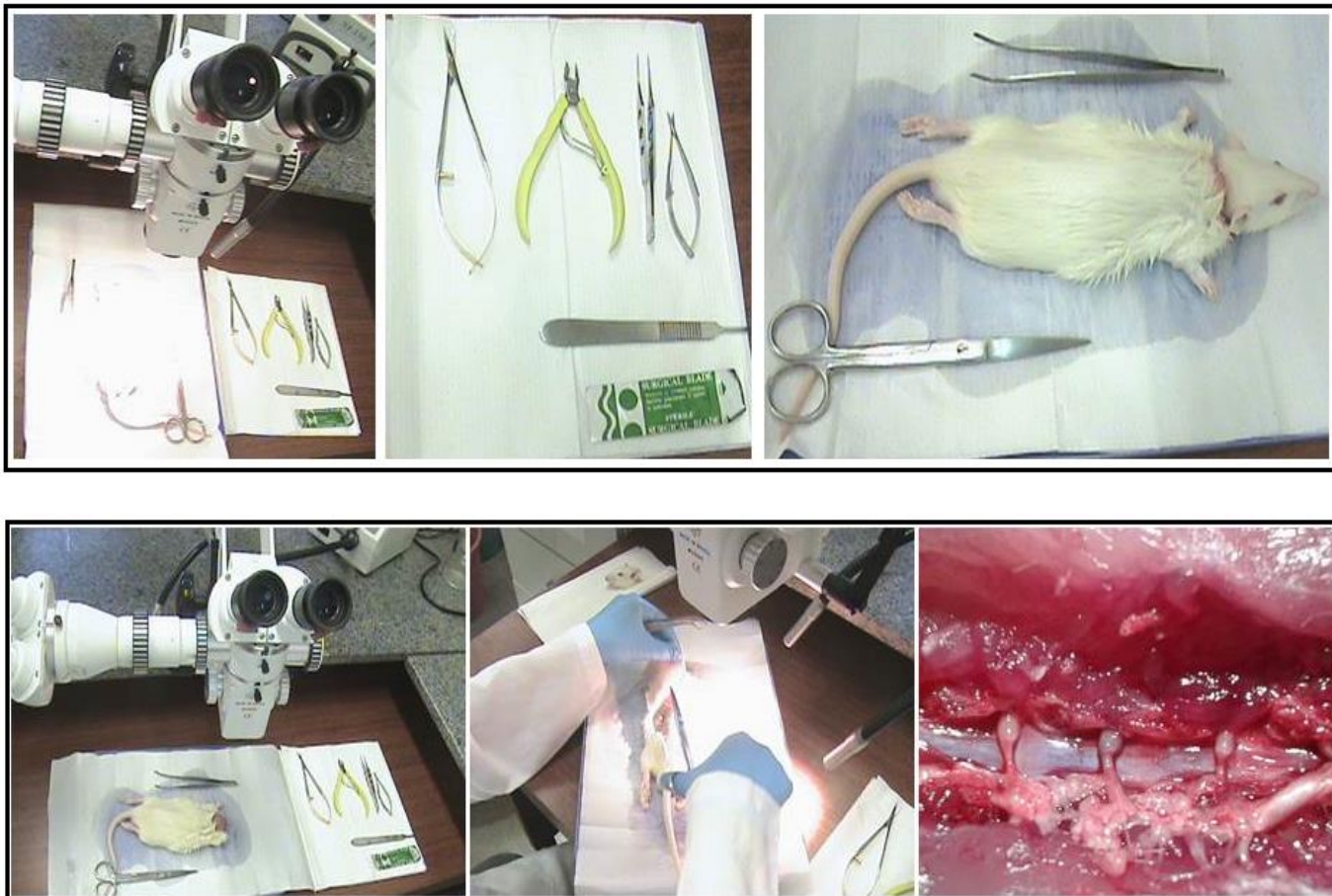
No dia 1 os animais foram acondicionados e realizado o teste comportamental Von Frey para análise de baseline nociceptivo. Logo em seguida começou-se a administração do ODN-antisense que perdurou por 4 dias. No quinto dia foi realizado o teste Von Frey, em seguida os animais foram perfundidos e procedido a coleta dos gânglios L4 e L5 (DGR), armazenados a -80°C e após foi analisada a expressão de CB1 por western blotting.

Todo o procedimento desde a administração intratecal até a coleta de gânglios foram delineados no quadro abaixo:

Delinemento geral do procedimento



Coleta de Gânglios.



Anexo 2. Para melhor compreensão de alguns protocolos, foi adicionado um material suplementar com imagens e descrição da técnica:

Von Frey Eletrônico.

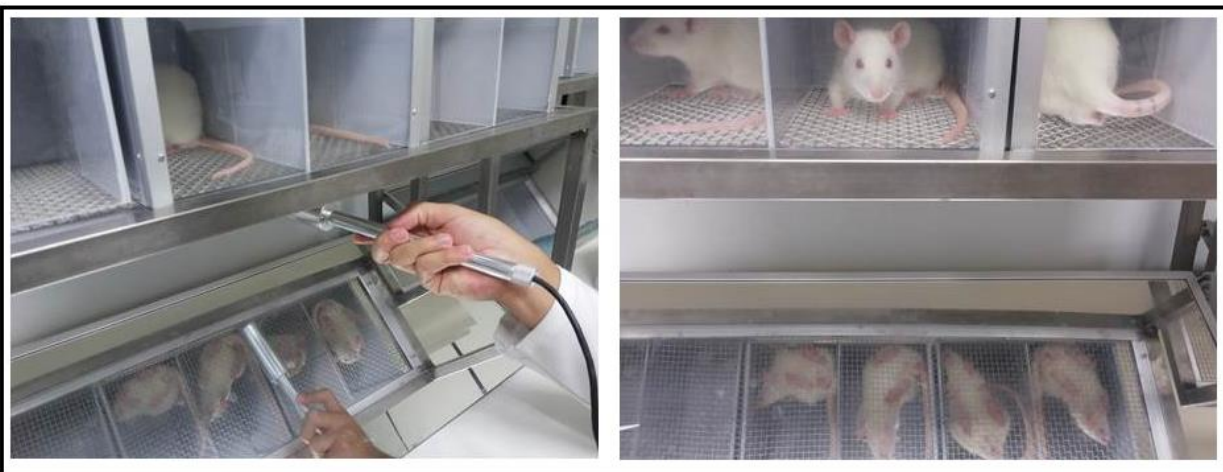
Para analisar o limiar nociceptivo dos animais a técnica utilizada foi o Von Frey Eletrônico. Seguindo basicamente o protocolo e figuras abaixo:

Este teste é realizado para avaliar a sensibilização dos neurônios nociceptivos. O uso de von Frey eletrônico é um método utilizado para avaliar o limiar hiperalgésico. Esse método foi adaptado para um equipamento eletrônico usado inicialmente em humanos e posteriormente adaptado para ratos. No presente trabalho, os experimentos foram realizados com um analgesímetro eletrônico (EFF 301 Analgesímetro Digital, Insight, Brasil), que consiste em um transdutor de força conectado a um contador digital que expressa força em gramas (g). Os animais foram colocados em caixas, cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5 mm², de arame não maleável de 1 mm de espessura. Os ratos permaneceram nas caixas durante 15 minutos para habituação antes do início do teste comportamental.

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

O limiar mecânico de retirada da pata, expresso em gramas (grama-força), é medido no tempo 0 hora (antes da administração das nanopartículas ou veículos, o que se denomina de basal) e pós respectivos tratamentos.

Teste comportamental Von Frey Eletrônico



Aprovação do Comitê de Ética



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CANABINÓIDES CB-1 E CB-2 DO TECIDO PERIFÉRICO NA ANALGESIA MEDIADA PELA DAPIRONA E SEUS METABÓLITOS BIOATIVOS EM RATOS" (protocolo nº 2799-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada / Gilson Gonçalves dos Santos, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 30 de julho de 2012.

Campinas, 30 de julho de 2012.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>