



Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Farmacologia

Nayrton Flávio Moura Rocha

**Efeito sinérgico da associação entre L-triptofano e analgésicos não-opioides
em modelos de nocicepção experimental em camundongos.**

Fortaleza
2013

NAYRTON FLÁVIO MOURA ROCHA

**Efeito sinérgico da associação entre L-triptofano e analgésicos não-opioides
em modelos de nocicepção experimental em camundongos**

Tese submetida ao programa de pós-graduação em farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.

Fortaleza

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

R574e Rocha, Nayrton Flávio Moura.
Efeito sinérgico da associação entre L-triptofano e analgésicos não-
opióides em modelos de nocicepção experimental em camundongos /
Nayrton Flávio Moura Rocha. – 2013.
137 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de
Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza,
2013.

Orientação: Prof^a Dr^a Francisca Cléa Florenço de Sousa

1. Serotonina. 2. Dipirona. 3. Acetaminofen. 4. Sinergismo
Farmacológico. 5. Medição da Dor I. Título.

CDD: 615.1

NAYRTON FLÁVIO MOURA ROCHA

Efeito sinérgico da associação entre L-triptofano e analgésicos não-opioides em modelos de nocicepção experimental em camundongos.

Tese submetida ao programa de pós-graduação em farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: / / .

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Francisco Washington Araújo Barros
Universidade da Integração internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus.

Ao meu maior orgulho e amor: minha família.

À todas as pessoas que passaram na minha vida e me fizeram acreditar.

AGRADECIMENTOS

À profa.Dra. **Francisca Cléa Florenço de Sousa**, pelo convívio e valorosa orientação na realização deste trabalho.

Aos professores doutores: **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, Nylane Maria Nunes de Alencar, Francisco Washington Araújo Barros e Ana Maria Assreuy** por comporem a banca examinadora deste trabalho.

Às **PROFAS. DRAS. Marta Maria de França Fonteles, Danielle Silveira Macêdo e Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos**, e aos demais colegas de trabalho e amigos do Laboratório de Neurofarmacologia (NEURO) da Universidade Federal do Ceará: **Arnaldo, Brinell, Cerqueira, Charliane, Edith Teles, Eduardo, Laura, Fernando, Giuliana, Helvira, Isabelle, Júnia, Kelly Rose, Mariana, M^a do Carmo, Patrícia Gomes, Patrícia Freire, Aline, Thiciane, Valdécio, Viviane, Iris e Auriana**.

Ao meu grande amigo e pós-graduando **Emiliano Ricardo**, com quem dividi vários momentos de discussões científicas e descontração desde a graduação até hoje. Muito obrigado, meu irmão.

Aos meus outros três irmãos de laboratório **Leonardo, Alyne Mara e Marília** que, com toda certeza, sabem da importância que tiveram na realização deste trabalho, como pós-graduandos e como amigos.

À **Dona Lena e Vilani** técnicas e amigas.

À **Natacha Queiroz**, pela amizade e companhia neste último ano, além da imensa ajuda em vários aspectos deste trabalho.

Aos demais professores do departamento de fisiologia e farmacologia pela transmissão de parte de seus conhecimentos.

Ao meu pai **Antônio Flávio**, pelos exemplos, amizade, convívio, amor e transmissão de valores.

À minha mãe, ser vivente que carrega a maior parcela do meu amor, e uma inspiração eterna na confiança de que existe um Deus que comanda toda existência universal.

À minhas irmãs **Nayana e Nayara**, que sempre me influenciaram positivamente.

À **Paula Nágela**, pela amizade, carinho e paciência.

Aos amigos e pós-graduandos **Claudênio, Webertty, Jânio, Natália e Talita**, pela amizade e ótimo convívio.

Aos meus amigos **Ângelo** (Jason), **Éderson, Fábio, Matheus, Marcelo, Tiago e Roque**.

Aos excepcionais funcionários do Dep. Fisiologia e Farmacologia: **Alana, Márcia e Aura**, pelo compromisso, convívio e ajuda.

Aos demais funcionários do Dep. Fisiologia e Farmacologia da U.F.C.
À todos o meu: Muito Obrigado!

"A diversidade das nossas opiniões não provém do fato de uns serem mais racionais do que outros, mas tão somente em razão de conduzirmos o nosso pensamento por diferentes caminhos e não considerarmos as mesmas coisas. Pois não basta ter um espírito bom: o essencial é aplicá-lo bem."

René Descartes – Discours de la Méthode
(1637)

RESUMO

Introdução: A combinação de drogas para atingir um efeito clínico maior, ou reduzir efeitos adversos, é prática corrente no tratamento de várias condições mórbidas. Os analgésicos de uso corrente possuem efeitos adversos potencialmente perigosos que merecem ressalvas quanto ao seu uso, pois se apresentam prevalentes nas doses terapêuticas usuais. **Objetivos:** estudar a interação entre L-triptofano e os analgésicos não opióides dipirona, cetoprofeno e paracetamol via intragátrica e intraperitoneal em modelos de nocicepção em camundongos, verificando a importância do bloqueio da neurotransmissão serotoninérgica (Síntese e receptores 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃) bem como o bloqueio de receptores alfa-2 adrenérgicos, melatonina (MT-1 e MT-2) e canais de potássio dependentes de ATP (K⁺ATP). A interação com ácido quinurênico, um metabólito das vias das quinureninas também foi analisada. **Resultados:** O L-triptofano (i.g ou i.p.) não possui atividade antinociceptiva isoladamente, mesmo sendo capaz de aumentar a concentração central de 5-HT. Quando administrada via intragátrica, dipirona ou paracetamol apresentaram ED₅₀=128,7 mg/kg (92,78-178,6 mg/kg) e ED₅₀=281 mg/kg (204,1 – 387,0 mg/kg) para o efeito antinociceptivo, respectivamente. O tratamento conjunto (realizado na mesma administração via intragátrica, i.g.) com L-triptofano nas proporções (peso/peso) de 1:1,4 com dipirona e 1:1,5 com paracetamol reduz significativamente os valores de ED₅₀ para 33,30 mg/kg (28,05 – 39,54 mg/kg)* e 50,99 mg/kg (41,96,– 61,96mg/kg)*, respectivamente. O tratamento prévio i.p com L-triptofano (definido como tratamento combinado) reduz as ED₅₀ para o efeito analgésico da dipirona (nas proporções de 1:1 e 1:2), paracetamol (proporções de 1:4,12) ou cetoprofeno (proporções de 5,7:1), para 30,90 mg/kg (23.10-43,56 mg/kg)* e 18,07 mg/kg (13,25- 24,67 mg/kg)*, 47,30 mg/kg (34.00 - 65.82 mg/kg)* e 2,09 mg/kg (1,355-3,224 mg/kg)*, respectivamente, quando comparado aos tratamentos isolados de dipirona ED₅₀=91,20 mg/kg (77.39 - 95.78 mg/kg), Paracetamol ED₅₀=96,18 mg/kg (76.23 - 121.3 mg/kg) e Cetoprofeno= 10,25 mg/kg (6,729 to 15,61mg/kg) no teste de contorções induzidas pelo ácido acético. O tratamento com L-triptofano aumenta as concentrações centrais de serotonina, mas não influencia na concentrações de Dopamina ou Noradrenalina. O L-triptofano 25 ou 50 mg/kg não influencia na concentração cortical de glutamato, no entanto o tratamento combinado via i.p. com doses não-efetivas de dipirona e paracetamol reduz a concentração desse neurotransmissor. O tratamento conjunto de L-triptofano com doses não antinociceptivas (i.g) de dipirona e paracetamol exibiu efeito antinociceptivo no teste de lambadura induzido pela formalina em ambas as fases do teste. A associação de L-triptofano e dipirona (i.p.) mostrou-se efetiva quando testada frente ao teste de nocicepção induzida pela capsaicina, mas a associação com paracetamol falhou neste teste. O bloqueio da síntese de 5-HT, através do tratamento com o inibidor PCPA(p-clorofenilalanina) antagoniza o efeito sinérgico da associação entre L-triptofano e dipirona no teste de contorções abdominais. O ácido quinurênico exerce efeito sinérgico com a dipirona e paracetamol nos testes de contorções. O bloqueio dos receptores 5-HT₂ e 5-HT₃ não exercem influência sobre o sinergismo do L-triptofano com a dipirona, cetoprofeno ou paracetamol no modelo de contorções. O bloqueio de receptores de 5-HT₁ parece ser importante para o efeito sinérgico do L-triptofano com paracetamol e cetoprofeno, não exercendo efeito sobre o sinergismo com a dipirona. O bloqueio de receptores α₂ adrenérgicos influencia no sinergismo do L-triptofano com o paracetamol. A interação sinérgica com a dipirona é atenuada com o bloqueio de receptores de melatonina. **Conclusão:** Os nossos resultados mostraram que existe uma relação sinérgica entre o L-triptofano e a atividade antinociceptiva do cetoprofeno, paracetamol e dipirona. O mecanismo subjacente a esta interação parece ser diferente para a dipirona em relação a mecanística desse efeito para o paracetamol e cetoprofeno, embora para ambos os casos pareça ser necessária a metabolização do L-triptofano à serotonina e, possivelmente, a ácido quinurênico.

Palavras-Chave: L-triptofano, 5-HT, Dipirona, Paracetamol, Ácido quinurênico, Sinergismo, Nocicepção, Dor

ABSTRACT

Introduction: the drug combination to reach greater clinical outcomes or reduce side effects is usual practice in the managing of several morbid conditions. The current painkillers have side effects potentially dangerous that should be monitoring during its utilization. Objective: to study the interaction between L-tryptophan and non-opioids analgesics dipyrone, ketoprofen or paracetamol, by oral or intraperitoneal route, in models of nociception in mice, including the investigation about the importance of blockage of serotonergic neurotransmission as well as alfa-2, melatonin and ATP-dependent potassium channel. The interaction with kynurenic acid was analyzed too. Results: The L-tryptophan (p.o. or i.p) does not possess antinociceptive activity as solely agent but it is capable to increase central 5-HT amount. The ED₅₀ for antinociceptive effect of dipyrone or paracetamol were ED₅₀=128,7 mg/kg (92,78-178,6 mg/kg) e ED₅₀=281 mg/kg (204,1 – 387,0 mg/kg), respectively. The oral co-treatment (on the same administration) with L-triptophan in the proportion (weight/weight) 1:1,4 with dipyrone and 1:1,5 with paracetamol decrease with significance the ED₅₀ to 33,30 mg/kg (28,05 – 39,54 mg/kg)* and 50,99 mg/kg (41,96 – 61,96 mg/kg)*, respectively. The previous intraperitoneal treatment with L-tryptophan (defined here as combined treatment) reduces the ED₅₀ for analgesic effect of dipyrone (in the proportions of 1:1 and 1:2), paracetamol (1:4,12) or ketoprofen (5,7:1), to 30,90 mg/kg (23.10-43,56 mg/kg)* e 18,07 mg/kg (13,25- 24,67 mg/kg)*, 47,30 mg/kg (34.00 - 65.82 mg/kg)* e 2,09 mg/kg (1,355-3,224 mg/kg)*, respectively compared to solely treatment with dipyrone ED₅₀=91,20 mg/kg (77.39 - 95.78 mg/kg), Paracetamol ED₅₀=96,18 mg/kg (76.23 - 121.3 mg/kg) or Cetoprofeno= 10,25 mg/kg (6,729 to 15,61mg/kg) on the abdominal writhing test induced by acetic acid. The treatment with L-tryptophan increases the central concentration of serotonin, but not influence the concentrations of noradrenaline or dopamine. L-tryptophan 25 or 50 mg/kg does not influence the concentration of cortical amount of glutamate. However, the combined treatment i.p. with non-effective doses of dipyrone and paracetamol reduces the concentration of this neurotransmitter. The combined treatment of L-tryptophan with non antinociceptive doses (i.g.) dipyrone and paracetamol exhibited antinociceptive effect in the formalin-induced licking test in both phases. The combination of L-tryptophan and dipyrone (i.p.) was effective when tested against the test nociception induced by capsaicin, but the association with paracetamol failed this test. Blockage of 5-HT synthesis by treatment with the inhibitor PCPA (p-chlorophenylalanine) antagonizes the synergistic effect of the L-tryptophan association with dipyrone in the writhing test. Kynurenic acid exerts a synergistic effect with dipyrone and paracetamol in the writhing test. The blockage of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptor have no influence on the synergism of L-tryptophan and dipyrone, ketoprofen, paracetamol or writhing model. The 5-HT₁ receptor blockage seems to be important for the synergistic effect of L-tryptophan ketoprofen with paracetamol and not having an effect on the synergism and dipyrone. The blockage of the α₂ adrenergic receptor channels influences the synergism of L-tryptophan with paracetamol. The synergistic interaction with dipyrone is attenuated by blocking melatonin receptors. Conclusion: Our results showed that there is a synergistic relationship between L-tryptophan and antinociceptive activity of ketoprofen, paracetamol and dipyrone. The mechanism underlying this interaction appears to be different for dipyrone in relation to this mechanistic effect on ketoprofen and paracetamol, although in both cases it seems important the metabolism of L-tryptophan to serotonin and, possibly, kynurenic acid.

Key words: L-tryptophan, 5-HT, Dipyrone, Paracetamol, Kynurenic acid, Sinergism, Nociception, Pain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Trato neoespinotalâmico(esquerda) e paleoespinotalâmico (direita)..	27
Figura 2	Neurônio nociceptivo primário. A β , A δ e C referem-se às fibras nervosas condutoras de estímulos, conforme descrito na Tabela 1.....	28
Figura 3	Via descendente envolvendo PAG, NMR e Medula espinhal.	31
Figura 4	Síntese de 5-hidroxitriptamina (5-HT ou Serotonina).....	35
Figura 5	Metabolismo de L-triptofano pela via das quinureninas	37
Figura 6	Fluxo de tratamento no teste de contorções induzidas pelo ácido acético.....	55
Figura 7	Fluxo de tratamento no teste de contorções induzidas pelo ácido acético – tratamentos conjuntos	57
Figura 8	Fluxo de tratamento no teste de contorções induzidas pelo ácido acético – tratamentos combinados	58
Figura 9	Teste de lambedura induzida pela formalina.	62
Figura 10	Efeito da administração intragástrica de L-triptofano (25 – 200 mg/kg) sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	68
Figura 11	Efeito da administração intragástrica de Dipirona e paracetamol sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	69
Figura 12	Efeito da administração intraperitoneal de L-triptofano, e dipirona, B, sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	70
Figura 13	Efeito da administração intraperitoneal de cetoprofeno, e paracetamol, sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	71
Figura 14	Relação dose resposta da dipirona isolada e em associação com o L-triptofano.	72
Figura 15	Relação dose resposta do paracetamol isolado e em associação com o L-triptofano.	73
Figure 16	Relação dose resposta da dipirona isolada e em associação com o L-triptofano.	74

Figure 17 Relação dose resposta do cetoprofeno isolado e em associação com o L-triptofano.	75
Figure 18 Relação dose resposta do paracetamol isolado e em associação com o L-triptofano.	76
Figure 19 Efeito do tratamento combinado de L-triptofano e dipirona sobre a resposta antinociceptiva no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.	77
Figure 20 Efeito da depleção de 5-HT sobre o efeito antinociceptivo do L-triptofano, Dipirona e combinação.	78
Figure 21 Efeito do tratamento com L-triptofano e Dipirona sob a concentração de 5-HT.	79
Figure 22 Efeito do tratamento com L-triptofano sob as concentrações centrais de noradrenalina e dopamina	80
Figure 23 Efeito do tratamento combinado com paracetamol e dipirona com L-triptofano sob as concentrações corticais de glutamato.	81
Figure 24 Efeito do tratamento prévio com Ondasentrona sobre o efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano e dipirona ii.p. (Dip).	82
Figure 25 Efeito do tratamento prévio com Ondasentrona sobre o efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano e paracetamol, i.p.	83
Figure 26 Efeito do tratamento prévio com Ondasentrona sobre efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano e cetoprofeno, i.p.	84
Figure 27 Efeito do tratamento prévio com ritanserina sobre efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano e dipirona, i.p.	85
Figure 28 Efeito do tratamento prévio com ritanserina sobre o efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano e paracetamol, i.p.	86
Figure 29 Efeito do tratamento prévio com ritanserina sobre o efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano e cetoprofeno, i.p.	87
Figure 30 Efeito do tratamento prévio com NAN-190 sobre o efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano e dipirona, i.p.	88

Figure 31 Efeito do tratamento prévio com NAN-190 sobre efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano e paracetamol, i.p.....	89
Figure 32 Efeito do tratamento prévio com NAN-190 sobre o efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano e cetoprofeno, i.p.	90
Figure 33 Efeito do tratamento prévio com loimbina sobre o efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano e paracetamol, i.p.....	91
Figure 35 Efeito do tratamento prévio com Luzindol sobre efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano e dipirona, i.p.....	92
Figure 36 Efeito da coadministração de L-triptofano e dipirona ou paracetamol no teste de nocicepção induzido por administração intraplantar de formalina 2%.	93
Figure 37 Curso da resposta ao estímulo térmico na placa quente ($55 \pm 0,5$ °C) dos animais tratados com L-triptofano e Dipirona isoladamente.....	94
Figure 38 Curso da resposta ao estímulo térmico na placa quente ($55 \pm 0,5$ °C) dos animais tratados com L-triptofano previamente a Dipirona.....	95
Figure 39 Efeito do tratamento com Dipirona, Paracetamol e combinação de ambos com L-triptofano no teste de nocicepção induzida pela capsaicina.	96
Figure 40 Efeito da administração intraperitoneal de ácido quinurênico (6,25 – 50 mg/kg) sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	97
Figure 41 Relação dose resposta da dipirona isolada e em associação com o ácido quinurênico (A.Q.).....	98
Figure 42 Relação dose resposta do paracetamol isolado e em associação com o ácido quinurênico (A.Q.).....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fibras nervosas e velocidades de condução.....	29
Tabela 2	Doses utilizadas nos tratamentos conjuntos de L-triptofano e dipirona ou paracetamol.....	56
Tabela 3	Tratamento combinado intraperitoneal com L-triptofano e dipirona.....	58
Tabela 4	Tratamento combinado intraperitoneal com L-triptofano e Cetoprofeno ou Paracetamol.	58
Tabela 5	Tratamento combinado intraperitoneal com ácido quinurênico e dipirona.	64
Tabela 6	Tratamento combinado intraperitoneal com ácido quinurênico e paracetamol.....	65
Tabela 7	Valores de ED ₅₀ para tratamento isolado e combinado com dipirona e L-triptofano.	72
Tabela 8	Valores de ED ₅₀ para tratamento isolado e combinado com dipirona e L-triptofano.	73
Tabela 9	Valores de ED ₅₀ para tratamento isolado e combinado com dipirona e L-triptofano.	74
Tabela 10	Valores de ED ₅₀ para tratamento isolado e combinado com cetoprofeno e L-triptofano.	75
Tabela 11	Valores de ED ₅₀ para tratamento isolado e combinado com cetoprofeno e L-triptofano.	76
Tabela 12	Valores de ED ₅₀ para tratamento isolado e combinado com dipirona e ácido quinurênico.	98
Tabela 13	Valores de ED ₅₀ para tratamento isolado e combinado com paracetamol e ácido quinurênico.....	99

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** Requisitos para registro de Nova Associação em Dose Fixa no país. **.45**
- Quadro 2** Resumo das ação das substâncias empregadas nesse trabalho. **.....53**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Dor	21
1.2. Mediadores centrais do processo nociceptivo.	32
1.3. Sinergismo farmacológico	42
1.4. Dipirona	47
1.5. Paracetamol	48
1.6. Cetoprofeno	49
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.	51
3 OBJETIVOS.....	52
3.1. Geral	52
3.2. Específicos.....	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1. Animais	53
4.2. Preparo de substâncias e aplicação.....	53
4.3. Material.....	54
4.4 Teste de Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.	55
4.4.1 Tratamentos isolados.....	55
4.4.2. Tratamentos conjuntos	56
4.4.3. Tratamentos combinados.....	57
4.5 Avaliação do papel da biotransformação do L-triptofano em serotonina no efeito sinérgico com a dipirona.	59
4.6 Quantificação de Noradrenalina, Dopamina e 5-HT no cérebro dos animais tratados com L-triptofano.....	59
4.7. Quantificação de glutamato nos córtices dos animais tratados com dipirona ou paracetamol combinado com L-triptofano.....	60
4.8. Avaliação do bloqueio de receptores serotoninérgicos (5-HT ₁ ; 5-HT ₂ ; 5-HT ₃) sobre o efeito sinérgico do L-triptofano com a dipirona, paracetamol ou cetoprofeno.	60
4.9. Avaliação do bloqueio de receptores noradrenérgicos alfa-2 no efeito sinérgico do L-triptofano com o paracetamol.	60
4.10. Avaliação do bloqueio de receptores de melatonina (MT1 e MT2) no efeito sinérgico do L-triptofano com a dipirona.....	61

4.11. Teste de nocicepção induzida pela formalina.	61
4.12. Teste de nocicepção térmica na placa quente.	62
4.13. Avaliação do efeito sinérgico do tratamento combinado de L-triptofano e dipirona ou paracetamol sobre a nocicepção induzida por capsaicina.....	63
4.14. Avaliação do efeito antinociceptivo do ácido quinurênico no teste de contorções induzidos por ácido acético.	63
4.15. Avaliação do efeito sinérgico do tratamento combinado de ácido quinurênico e dipirona no teste de contorções induzidas pelo ácido acético	63
4.16. Avaliação do efeito sinérgico do tratamento combinado de ácido quinurênico e paracetamol no teste de contorções induzida pelo ácido acético	64
4.17. Análise dos dados e estatística.....	65
4.17.1. Análise do sinergismo entre L-triptofano e dipirona, paracetamol ou cetoprofeno no teste de contorções induzidas pelo ácido acético, curvas dose-respostas.	65
4.17.2. Comparações entre grupos no teste de contorções e nos testes da formalina e de lambadura.....	66
4.17.3. Análise do efeito sinérgico entre ácido quinurênico e dipirona ou paracetamol.	66
4.17.4. Apresentação dos dados.	66
5 RESULTADOS.....	68
5.1 Efeito do tratamento intragástrico com L-triptofano sobre a resposta nociceptiva no teste de contorções abdominais.	68
5.2 Efeito do tratamento intragástrico com dipirona ou paracetamol sobre a resposta nociceptiva no teste de contorções abdominais	69
5.3 Efeito do tratamento intraperitoneal com L-triptofano ou dipirona sobre a resposta nociceptiva no teste de contorções abdominais	70
5.4. Efeito do tratamento intraperitoneal com cetoprofeno ou paracetamol sobre a resposta nociceptiva no teste de contorções abdominais	71
5.5 Dose-resposta do efeito antinociceptivo do tratamento intragástrico com dipirona isoladamente e conjuntamente com L-triptofano.....	72
5.6. Dose-resposta do efeito antinociceptivo do tratamento intragástrico com paracetamol isoladamente e conjuntamente com L-triptofano.....	73
5.7 Dose-resposta do efeito antinociceptivo do tratamento com dipirona isoladamente e combinado com L-triptofano	74
5.8 Dose-resposta do efeito antinociceptivo do tratamento com cetoprofeno isoladamente e combinado com L-triptofano	75
5.9 Dose-resposta do efeito antinociceptivo do tratamento com paracetamol isoladamente e combinado com L-triptofano	76
5.10 Efeito do tratamento combinado de L-triptofano e dipirona sobre a resposta nociceptiva no teste de contorções abdominais.....	77

5.11. Influência da depleção de serotonina no efeito antinociceptivo do tratamento combinado de L-triptofano e dipirona no teste de contorções abdominais	78
5.12 Efeito do tratamento com L-triptofano e dipirona sobre a concentração central de 5-HT em cérebro total	79
5.13. Efeito do tratamento com L-triptofano sobre as concentrações centrais de noradrenalina e dopamina em cérebro total.....	80
5.14. Efeito do tratamento com Paracetamol e Dipirona combinado com L-triptofano sobre as concentrações corticais de glutamato nos animais submetidos ao teste de contorção abdominal	81
5.15. Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT ₃ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com a dipirona no teste de contorções induzidos pelo ácido acético.	82
5.16 Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT ₃ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com paracetamol no teste de contorções induzidos pelo ácido acético.	83
5.17 Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT ₃ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com cetoprofeno no teste de contorções induzidos pelo ácido acético	84
5.18 Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT ₂ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com a dipirona no teste de contorções induzidos pelo ácido acético	85
5.19 Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT ₂ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com a paracetamol no teste de contorções induzidos pelo ácido acético	86
5.20 Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT ₂ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com a cetoprofeno no teste de contorções induzidos pelo ácido acético	87
5.21. Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT ₁ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com a dipirona no teste de contorções induzidos pelo ácido acético	88
5.22. Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT ₁ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com paracetamol no teste de contorções induzidos pelo ácido acético	89
5.23. Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT ₁ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com a cetoprofeno no teste de contorções induzidos pelo ácido acético	90
5.24 Efeito do bloqueio de receptores adrenérgicos α_2 sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com paracetamol no teste de contorções induzidos pelo ácido acético	91
5.25. Efeito do bloqueio de receptores de melatonina (MT ₁ e MT ₂) sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com Dipirona no teste de contorções induzidos pelo ácido acético	92
5.26. Efeito do tratamento conjunto via intragástrica de L-triptofano com dipirona ou paracetamol no teste de nocicepção induzida pela formalina	93

5.27 Efeito do tratamento com L-triptofano ou dipirona sobre a resposta nociceptiva no teste de nocicepção térmica na placa quente.....	94
5.28 Efeito do tratamento combinado de L-triptofano e dipirona sobre a resposta antinociceptiva frente a nocicepção térmica na placa quente	95
5.29 Efeito do tratamento combinado de L-triptofano com dipirona ou paracetamol sobre a resposta antinociceptiva frente a nocicepção química induzida por capsaicina	96
5.30 Efeito do ácido quinurênico sobre o número de contorções induzidos pelo ácido acético	97
5.31 Efeito sinérgico do pré-tratamento intraperitoneal com ácido quinurênico sobre a resposta antinociceptiva da dipirona no teste de contorções induzidos pelo ácido acético	98
5.32 Efeito sinérgico do pré-tratamento intraperitoneal com ácido quinurênico sobre a resposta antinociceptiva do paracetamol no teste de contorções induzidos pelo ácido acético.....	99
6 DISCUSSÃO	100
7 CONCLUSÃO	114
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
REFERÊNCIAS.....	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor

A dor é definida pela *International Association For Study of Pain* - IASP como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tissular, potencial ou real, ou mesmo a nenhuma lesão, embora, ainda assim, descrita com termos sugestivos de que o dano tecidual tivesse de fato ocorrido. A dor é sempre subjetiva, cada indivíduo aprende a aplicação da palavra através de experiências relacionadas com lesões no início da vida (IASP, 2011).

A dor pode ser classificada de diversas formas, a depender dos critérios utilizados. Em relação ao aspecto temporal, pode-se considerar como transitória (onde os receptores da dor são ativados mesmo sem haver dano tecidual), aguda (resposta normal causada por dano tecidual, com ativação de receptores, de modo que a dor pode ser revertida antes mesmo da total restauração fisiológica do local afetado) ou crônica (onde a lesão ou a patologia causadora da dor supera a capacidade do organismo em restaurar o tecido afetado) (LOESER; MELZACK, 1999).

Em relação à localização do processo doloroso, podemos classificá-la em dor somática (onde os estímulos que geram a sensação dolorosa são oriundos da periferia do organismo, podendo ser superficial, cutânea ou profunda) ou dor visceral (quando os estímulos dolorosos são provenientes dos órgãos internos) (RAJA *et al.*, 1999).

Quando avaliada a origem do processo doloroso, podemos classificá-lo como nociceptivo, ou dor nociceptiva (desencadeada pela estimulação dos nociceptores localizados em várias partes do organismo). Este termo é usado para descrever a dor que ocorre com o funcionamento normal do sistema nervoso somatossensorial e contrasta com a função anormal associada a dor neuropática. Esta é decorrente de lesão tecidual ou alguma doença no sistema nervoso somatossensorial, podendo ser ainda de origem central ou periférica. Existe também a dor originada a partir de um processo ou condição inflamatória. Neste caso, em resposta a um trauma, infecção ou disfunção, várias substâncias e mediadores inflamatórios são liberados de células

inflamatórias (macrófagos ou neutrófilos, por exemplo) ou não (células endoteliais, por exemplo) sensibilizando e/ou ativando os neurônios nociceptivos, levando ao desenvolvimento de sensações dolorosas, alodinia e hiperalgesia (MILLAN, 1999; KENNEDY, 2007; IASP, 2011).

A alodinia, dor associada a estímulos geralmente inócuos, ou não-nóxicos, e a hiperalgesia que é o aumento da sensibilidade à dor, são sintomas comuns associados a várias doenças que, do ponto de vista fisiológico, podem ser úteis para a preservação de tecidos vulneráveis (SANDKÜHLE, 2009).

A sensibilização local e fisiológica, principalmente relacionada com a presença de mediadores inflamatórios e neuromoduladores é qualificada como hiperalgesia primária. Outras regiões não envolvidas pelo estímulo nociceptivo inicial podem sofrer pela expansão desta hiperalgesia, de modo que o limiar para desencadear a dor nestes novos locais se torna mais baixo, estabelecendo-se uma dor generalizada, caracterizando a hiperalgesia secundária (MARQUES, 2004).

Cada tipo de dor possui características clínicas e epidemiológicas distintas, mas, no geral, os dados mostram que de 50 a 60% dos indivíduos atingidos por condições dolorosas tornam-se parcial ou totalmente incapacitados para exercer suas atividades, de maneira transitória ou permanente, contribuindo negativamente para sua qualidade de vida (SBED, 2005).

Em termo de dor aguda, podemos dizer que ela representa um fenômeno quase universal como cita Teixeira e Siqueira (2009) sendo sua epidemiologia variada de acordo com o tipo de condição (visceral ou musculoesquelética, por exemplo). Os dados de prevalência de estados crônicos de dor variam de 7 à 40 % na população em geral (ANDERSEN, WORM-PEDERSEN, 1987; TEIXEIRA, SIQUEIRA, 2009). Somente nos Estados Unidos da América (E. U. A), em função de dias de ausência ao trabalho e redução na capacidade produtiva, estima-se uma perda anual de US\$ 50-70 bilhões em consequência de estados dolorosos crônicos (BRENNAN *et al.*, 2007).

A dor visceral tem sido referida como tipo de dor mais prevalente em adultos podendo ocorrer quando algum órgão interno encontra-se inflamado, doente ou lesionado. Este tipo de dor está tanto associado a leves condições dolorosas, como

um desconforto gastrointestinal, bem como à intensas dores, como as cólicas renais decorrente de cálculos ou pedras nestes órgãos. As descrições clínicas comuns são relatadas como dores profundas, em aperto, incômodas ou doentias (URCH, SUZUKI, 2008; COLLET, 2013).

A dor visceral possui características únicas, sendo diferente da dor somática principalmente em relação à localização incerta referenciada pelo paciente. Dessa forma, dores associadas a diversos órgãos como a vesícula biliar, esôfago, coração, bexiga e cólon possuem considerável sobreposição, criando problemas óbvios no que diz respeito aos diagnósticos diferenciais (GEBHART 1993; COLLET, 2013).

A compreensão atual sobre esse tipo de dor enfatiza alguns pontos principais: primeiro, a dor por si só não surge de todas as vísceras (por exemplo, parênquima hepático), mas a dor associada com tais vísceras surge quando a cápsula que contém essa víscera distende ou se torna inflamada. Segundo, a lesão tecidual (ou ameaça de tal lesão) pode não ser necessária para a produção de dor visceral, como é para a dor das estruturas cutâneas. Assim, ao contrário da dor somática, os estímulos adequados para a produção de sensibilidade visceral, incluindo dor, ainda não estão totalmente compreendidos. Terceiro, em relação à localização difusa referida pelo paciente neste tipo de dor, deve-se ter em mente que múltiplas vísceras frequentemente convergem para os mesmos neurônios da medula espinal, que também recebem aferências de estruturas cutâneas, o que pode explicar a hiperalgesia em estruturas somáticas superficiais próximas dos segmentos espinhais acometidos. Lesões estruturais distintas ou anormalidades bioquímicas explicam este tipo de dor em apenas uma parte dos pacientes. Outra parte de acometidos experimentam dores viscerais, geralmente muito intensas na natureza, sem qualquer evidência de razão estrutural ou histopatológica para tais sintomas, sendo a dor atribuída a sintomas funcionais (CERVERO, 1988; NESS, GEBHART, 1988; GEBHART, 1993; GSCHOSSMANN, 2002; COLLET, 2013).

Dados epidemiológicos destacam a grande prevalência de dor visceral. Pesquisas têm mostrado taxas de prevalência entre adultos de 25% para dor abdominal intermitente, 20% para a dor torácica e 16-24% para dor pélvica nas mulheres. Apesar de dores nessas regiões constituírem indicações de doença subjacente específica, em muitos casos todos os testes de diagnóstico são normais

ou negativos, sendo, então, definidas como dores não específicas (HALDER, LOCK, 2009).

A prevalência de dor pélvica não cíclica persistente foi estimada em cerca de 16% em estudos populacionais nos EUA e no Reino Unido. Cerca de um terço das mulheres com dor pélvica não possuem diagnóstico de patologias ginecológicas óbvias e até um terço terá dor persistente apesar de histerectomia. Dores viscerais também estão amplamente presentes na infância, tendo taxas de prevalência variando de 22-40% (COLLET, 2013).

Dores somáticas e síndromes dolorosas específicas possuem imensos impactos individuais e sociais, por exemplo, as dores lombares ou lombalgias representam um dos maiores problemas de saúde do mundo. Cerca de 70 a 85% da população sofrerá com algum tipo de lombalgia alguma vez em sua vida. Nos Estados Unidos da América, a lombalgia é a principal causa de incapacitação de indivíduos abaixo de 45 anos, sendo a segunda motivação mais comum de visitas ao médico, como também a quinta causa mais comum de internações hospitalares (ANDERSSON, 1999; IMAMURA *et al.*, 2009).

Também muito impactante são as dores cervicais ou cervicalgias, incluindo dores no pescoço, que ocorrem anualmente em 30-50% da população geral. Essas dores são experimentados por mais de 3 meses em até 15% da população, e estão intimamente relacionadas a determinados fatores de risco, que incluem o trabalho repetitivo, longos períodos de flexão cervical, estresse aumentado no trabalho, fumo, e traumatismos prévios do pescoço e ombros (IASP, 2009).

Síndrome de difícil manejo clínico e ainda com a etiologia não totalmente compreendida que possui relevantes impactos na vida do paciente, a fibromialgia ou síndrome fibromiálgica apresenta prevalência de 2-10% na população geral, sendo cinco vezes mais comum que a artrite reumatóide, é uma condição dolorosa crônica difusa do sistema musculoesquelético, não-articular, caracterizada pela presença de dor a palpação em locais predeterminados, podendo ser acompanhada de: fadiga crônica, distúrbios do sono, rigidez matinal de curta duração, sensação subjetiva de edema, parestesias, cefaleia, fenômeno de Raynaud, assim como a associação com depressão, síndrome do pânico e ansiedade. Essa condição é mais prevalente no

sexo feminino, sendo de até 10,4 % em determinada população. O custo efetivo médio anual de tratamento da fibromialgia calculado nos Estados Unidos foi de 12 – 15 bilhões de dólares (ROIZENBLATT *et al.*, 1997; WOLFE *et al.*, 1997; WEINSTENIN *et al.*, 2000; WHITE *et al.*, 2003).

Condição e sintoma clínico importante, e muito comum em medicina, são as cefaléias, tanto secundárias, sendo componentes de determinadas condições patológicas subjacentes, como as cefaléias primárias que por si só correspondem a doenças. Os dados epidemiológicos mostram uma prevalência média de 46% na população global. Nos países da Europa, Ásia, nos Estados Unidos e Austrália as prevalências apresentam-se próximas de 50%, enquanto nos países da África, Américas do Sul e Central apresentam números próximos de 40%. Dentre as cefaléias primárias, a migrânea ou enxaqueca aparece na 19ª posição no ranking das doenças causadoras de incapacidade, sendo atribuída a essa condição taxas de prevalência de 11-16% durante a vida (STOVNER *et al.*, 2007; FLEMING, PEREIRA JUNIOR, 2009).

Esses dados mostram a grande prevalência de estados dolorosos na população, sendo a busca por tratamentos mais eficazes para reduzir o impacto e as incapacitações transitórias ou permanentes um grande estímulo para o estudo da fisiofarmacologia desse processo.

Por definição, a dor inclui um aspecto emocional e subjetivo. De fato, a subjetividade deste processo o torna sobremaneira mais difícil de estudá-lo, restando-se para o método científico concentrar-se em parâmetros eletrofisiológicos, fisiopatológicos e comportamentais sugestivos de sensação dolorosa, sendo a unidade observacional na maioria das vezes um roedor (BENTLEY *et al.*, 1983; YEOMANS, PROUDFIT, 1996; STEPANOVIC-PETROVIC *et al.*, 2008; ZANBOORI *et al.*, 2008; CHO *et al.*, 2012).

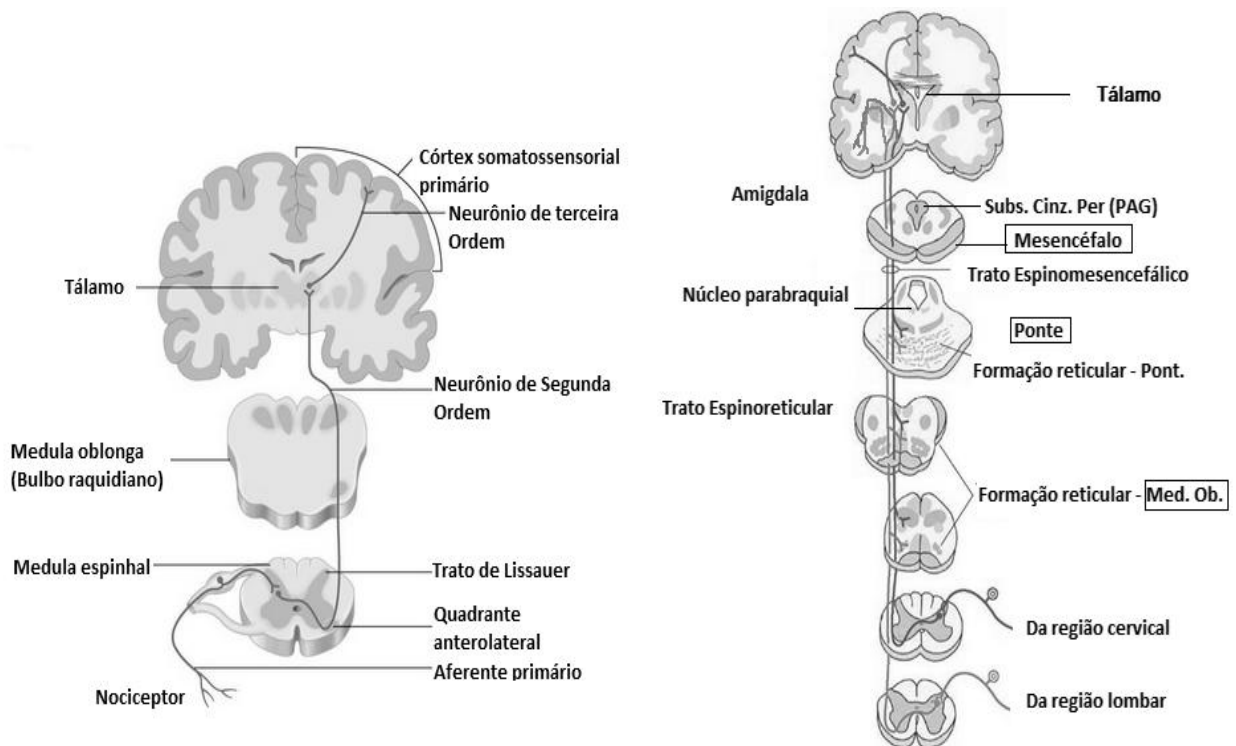
Esses parâmetros relacionados ao estudo da dor residem primariamente nas vias nervosas envolvidas na transdução, codificação, transmissão e integração dos estímulos (nóxicos e não-nóxicos), bem como na sensibilização dessas vias por neurotransmissores ou mediadores inflamatórios. Entende-se por estímulo nóxico,

aquele potencialmente lesivo, que pode levar a danos tissulares e não-nóxico, aquele estímulo geralmente inofensivo.

A via envolvida no transporte das informações da periferia para o córtex, onde o estímulo torna-se percepção de dor, envolve, segundo a abordagem clássica, três neurônios, em um trato espino-tálamo-cortical: *Neurônio aferente primário*, tendo o seu corpo situado nos gânglios da raiz dorsal, esse neurônio é bifurcado, do tipo pseudo-unipolar. Este neurônio possui o terminal pré-sináptico no corno dorsal da medula, que recebe o estímulo. A região de transdução do estímulo nocivo na periferia deste neurônio é onde estão localizados os nociceptores, definido pela IASP (2011) como “*Receptor sensorial de alto limiar do sistema nervoso periférico somatossensorial que é capaz de transduzir e codificar estímulos nocivos*”. A noção de transdução, neste contexto, compreende a transformação do estímulo nocivo em potencial de receptor que, então, é propagado pela fibra nervosa (A δ e C, principalmente) (LAWSON, 2002; LAWSON, DJOUHRI, 2004).

Após o aferente primário penetrar no corno dorsal da medula ele faz sinapse com o *segundo neurônio* que então cruza a linha média da medula e ascende aos núcleos talâmicos, podendo projetar-se para o núcleo ventroposterolateral (VPL) ou outros núcleos talâmicos como central medial, central lateral, medial dorsal e complexo posterior do tálamo. Um *terceiro neurônio* então se projeta para as estruturas corticais. O VPL projeta-se para córtex sensorial primário e secundário estando intimamente ligado aos componentes *sensorial discriminativos* da dor (localização, duração, qualidade e intensidade). As projeções para o córtex que partem dos núcleos mediais talâmico e complexo posterior são mais difusas e envolvem os córtices insulares e cingulados, estando associados ao componente motivacional-afetivo (sensação desagradável) e fazem parte da via paleoespinalâmica de condução dos estímulos nociceptivos/dolorosos (Figura 1.) (SLUKA, 1997).

Figura 1- Trato neoespinotalâmico(esquerda) e paleoespinotalâmico (direita).

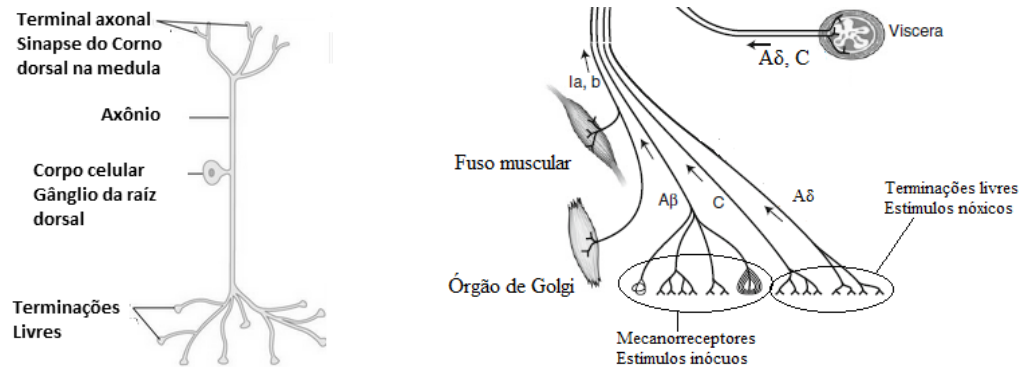


Fonte: Baseado em Dafny (2013).

A via espinotalâmica faz parte do sistema nervoso somatossensorial, que é responsável pela captação de estímulos, nocivos ou inofensivos, seu processamento e envio a regiões encefálicas superiores responsáveis pela percepção da sensação ligada a determinado estímulo, por exemplo, dor ou cócegas (DAFNY, 2013).

No entanto, diferentemente do modo como são recebidos ou 'sentidos' os estímulos inofensivos ou não-nóxicos, as fibras aferentes que conduzem os estímulos potencialmente lesivos não possuem estruturas especializadas, como os corpúsculos de Meissner ou Paccini, que detectam pressão cutânea inócua (Figura 2). No caso dos aferentes nociceptivos (que conduz estímulos nocivos ou nóxicos), a estrutura sensitiva é a terminação nervosa livre, sendo neurônios com alto limiar de ativação (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004; FEIN, 2011).

Figura 2. Neurônio nociceptivo primário. A β , A δ e C referem-se às fibras nervosas condutoras de estímulos, conforme descrito na Tabela 1.



Fonte: Baseado em Julius & Basbaum (2001) and Sluka (2009).

As fibras que conduzem os estímulos elétricos em resposta aos estímulos nócicos ou potencialmente nócicos pertencem ao Grupo III (fibras A δ) e IV (fibras C), ou seja, são neurônios aferentes pouco mielinizados ou não-mielinizados, respectivamente. Já as informações sensoriais relacionadas com a propriocepção ou estiramento muscular são transduzidas por estruturas especializadas como, por exemplo: os fusos musculares ou o órgão tendinoso de golgi e são conduzidas por fibras aferentes do Grupo I (a e b) que são fibras muito mielinizadas e com velocidade de condução de sinal bem superior as outras fibras sensitivas. As fibras que conduzem as modificações, deslocamentos ou deformações mecânicas no terminal nervoso cutâneo através de estruturas especializadas como os corpúsculos de Paccini, corpúsculos de Meissner, disco de Merkel e Terminações de Ruffini, pertencem ao Grupo II (fibras A β), que são fibras mielinizadas, com velocidades de condução intermediária entre as fibras dos grupos I e III (SLUKA, 2009).

As fibras nervosas responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC são mostradas, na Tabela 1 (JULIUS, BASBAUM, 2001).

Sendo assim, o termo *nocicepção* pode ser definido como o processo que se refere à recepção de sinais no S.N.C. evocados pela ativação de nociceptores, ativação esta proveniente de dano tissular potencial, ou seja, o processo neural de codificação do estímulo nócico. O impulso nervoso gerado por tal(is) estímulo(s) se propaga pela fibra nervosa até a medula espinhal, desta para o centro supra espinhal e córtex cerebral, onde serão comandadas e geradas as respostas fisiológicas, emocionais e comportamentais (MUIR III, 1998, IASP, 2011).

Tabela 1. Fibras nervosas e velocidades de condução.

Fibra aferente	Velocidade Diâmetro	Localização	Estímulo
Grupo II - A β	25-70 m/s 10 μ m	Pele, articulações, músculos.	Toque, Pressão, vibração. (Inócuo)
Grupo III - A δ	2-25 m/s 2 - 6 μ m	Pele, articulações, músculos, disco intervertebral, ossos.	Estímulos nóxicos (Lesivo)
Grupo IV - C	< 2 m/s 0,4 – 1,2 μ m	Pele, articulações, músculos, disco intervertebral, ossos.	Estímulos nóxicos (lesivo)

Fonte: Baseado em Julius & Basbaum (2001) and Sluka (2009).

Uma importante superfamília de receptores, chamados de receptores transientes possui papéis bem descritos na geração de estímulos nociceptivos. Esses receptores formam uma grande família de canais iônicos divididos em várias subfamílias, como os receptores de potencial vanilóide (TRPV), de potencial melastatina (TRPM), e de potencial anquirina (TRPA), por exemplo. Tratam-se de canais iônicos responsivos a diversos estímulos e podem ser expressos em grande quantidade nos neurônios sensitivos (YEATS et al., 1992; LIU, SIMON, 1994; CATERINA et al., 2001).

Dentro desta superfamília, de longe, o mais estudado é o TRPV1, que pode ser ativado tanto pela substância pungente ativa da pimenta, a capsaicina, como pelo calor acima de 43°C. Além disso, a redução do pH até 6.3 potencializa a abertura desses canais por quantidades subefetivas de capsaicina, embora o pH ácido não seja suficiente para ativação desses receptores isoladamente (CATERINA et al., 2001). A topologia dos receptores vanilóides prevê que haja um segmento de formação de poros (denominado P-loop) por subunidade. Como é provável que mais

de uma P-loop é necessária para formar um poro condutor de íons funcional, achase que os receptores vanilóides são proteínas multiméricas. O canal de cátion dos (TRPV1) é o receptor da capsaicina. O TRPV1 é altamente seletivo ao Ca^{2+} embora seja permeável a outros íons mono e divalente na seguinte ordem de seletividade $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ = \text{K}^+ = \text{Cs}^+$. Em culturas de neurônios sensoriais, a análise eletrofisiológica das respostas evocadas por vanilóide mostraram-se ser cineticamente complexas (LIU & SIMON, 1994; YEATS et al., 1992) além de a estimulação sustentada levar a dessensibilização do canal. Em análise, a dessensibilização parece estar associada à presença de Ca^{2+} , de acordo com estudos eletrofisiológicos em cultura de neurônios sensoriais, a ausência de Ca^{2+} não torna a estimulação sustentada de capsaicina capaz de dessensibilizar este receptor (HOLZER, 1993).

Em revisão, Ramsey et al. (2006) cita que os TRPV1 parecem ser sensibilizados pelas Proteino-quinases A e C (PKA e PKC), bem como pela Fosfolipase C (PLC) ativada por receptores (PREMKUMAR & AHERN, 2000; CHUANG et al., 2001; MOHAPATRA, NAU, 2003; AHERN, 2003). O fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP2) parece ligar-se diretamente ao TRPV1, causando a inibição do canal que é, então, desinibido pela hidrólise catalisada pela PLC do PIP2. Os truncamentos da porção Carboxi-terminal (C-terminal) do TRPV1 compromete o sítio de ligação do PIP2 e prejudica a capacidade de resposta térmica *in vivo* em ratos (VLACHOVA et al., 2003), o que corrobora para a descrição do papel crucial desses receptores na hiperalgesia térmica.

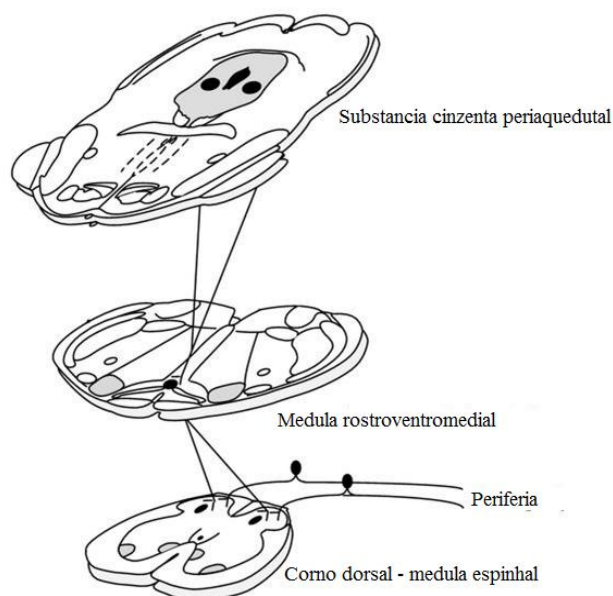
Assim, é elementar associar a resposta da aplicação de capsaicina à produção de dor em queimação. Nos modelos animais, a administração de capsaicina na pata de camundongos produz um comportamento sugestivo de dor caracterizado por intensa lambedura da pata, o que tem sido extensivamente utilizado como modelo para estudo da dor e prospecção de moléculas de origem natural.

A resposta sensorial a um estímulo nociceptivo envolve muito mais do que as vias que conduzem os impulsos elétricos aos centros superiores, na realidade, esse processo é intensamente modulado por diferentes vias, ascendentes e descendentes, capazes de inibir ou facilitar a condução de um estímulo

potencialmente nóxico. Assim, podemos citar várias estruturas supra espinais envolvidas nas vias inibitórias descendentes, como a *substância cinzenta periaquedutal* (PAG), sendo um núcleo situado ao redor do aqueduto cerebral no mesencéfalo; *Núcleo Magno da Rafe* (NMR), constituindo-se de um núcleo serotoninérgico localizado na medula oblonga, ou bulbo raquidiano, na região rostral ventromedial (RVM). Córtex cerebral, tálamo, núcleo rubro, região parabraquial, amigdala, hipotálamo, núcleo pr-tectal e tegmentum lateral pontino também estão envolvidos na supressão da dor quando ativados. O *Locus Coeruleos* (LC), núcleo noradrenérgico, situado na região pontina do tronco encefálico, tem importante participao inibitória descendente no controle da dor (SEGAL, SANDBERG, 1977; DESALLES et al., 1985; HARDY, 1985; ROBERT, REES, 1986; NEUGEBAUER et al., 1995; DAFNY et al., 1996; SLUKA, REES, 1997; WILLIS, WESTLUND, 1997).

É fato que a estimulao elétrica da substância cinzenta periaquedutal (PAG) produz analgesia, além disso, os opioides são capazes de ativar os neurônios da PAG, e produzir seus efeitos neste local. Na realidade, a PAG participa na supressão de estímulos nociceptivos enviando projeções descendentes para núcleos como o *Locus coeruleos* ou medula rostroventromedial – núcleo magno da rafe (RVM) que, então, sinaliza para o corno dorsal da medula (Figura 3).

Figura 3. Via descendente envolvendo PAG, NMR e Medula espinhal.



Fonte: Retirado e traduzido de Loyd & Murphy (2009).

Beitz (1982) concluiu que a PAG recebe projeções a partir de uma diversidade de sistemas neurais, incluindo o sistema límbico, sistema motor, sistema sensorial e sistema autonômico. Assim sendo, esta região provavelmente está relacionada não apenas com a supressão dolorosa, mas, também, com sua resposta comportamental (SEWARDS, SEWARDS, 2002).

1.2. Mediadores centrais do processo nociceptivo.

Nas vias envolvidas nos processos nociceptivos, vários são os neurotransmissores e mediadores inflamatórios capazes de induzir, reduzir ou modificar a nocicepção. Glutamato, Substância P, GABA, Encefalinas, 5-HT, Noradrenalina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), bradicinina, interleucinas, citocinas e prostaglandinas são alguns dos atores neste cenário. Para o processo de transdução e condução da dor, algumas dessas substâncias exercem efeitos mais proeminentes, são elas:

O *glutamato* é um importante aminoácido neurotransmissor excitatório e seus receptores ionotrópicos são essenciais para a transmissão nociceptiva e sensibilização dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal (DOUGHERTY et al. 1992; YOSHIMURA & NISHI, 1995; LEEM et al. 1996;. LU, PERL 2003; CHEN, PAN 2004;). O *Glutamato* está presente nas fibras aferentes primárias possuindo receptores nos terminais dos nociceptores e medula espinhal, mediando a sinapse excitatória entre a fibra aferente primária e o segundo neurônio no corno dorsal da medula espinhal (WESTLUND et al., 1992; CARLTON et al., 1995), além do Sistema Nervoso Central (SNC), onde possui reconhecido papel como neurotransmissor excitatório. O glutamato age sobre receptores acoplados a canais iônico (NMDA, AMPA e Cainato) bem como receptores acoplados a proteínas G (mGlu) (KEW, KEMP, 2005). A administração periférica (BEIRITH et al., 2002) e intratecal (SHIM et al., 2007) de glutamato gera resposta comportamental sugestiva de dor, o que demonstra a ligação da neurotransmissão glutamatérgica tanto na periferia como em estruturas supra-espinhais. Neste sentido, Quintero et al. (2012) demonstrou que a

estimulação via elétrica ou por estímulo químico nóxico (formalina) é capaz de aumentar o glutamato extracelular no córtex somatossensorial dos ratos estudados.

O envolvimento do glutamato nos processos nociceptivos parece ser mediada por mais de um tipo de receptor, tendo a ativação de receptores NMDA ou AMPA importâncias diferentes dependendo do modelo de dor estudado. Assim, a administração de antagonista dos receptores NMDA é capaz de bloquear a *hiperalgesia* inflamatória induzida por carragenina, o que não é observado com o bloqueio dos receptores do tipo AMPA. Por outro lado, a administração de antagonista dos receptores NMDA (MK-801) não exerce efeito sobre a hiperalgesia pós-operatória em ratos, inversamente ao que ocorre com bloqueador de receptores AMPA que demonstraram ser efetivos na reversão desse tipo de hiperalgesia (ZAHN, BRENNAN, 1998; ZAHN et al., 1998). De forma interessante, alguns resultados sugerem que o bloqueio de receptores não-NMDA na medula espinhal é o mecanismo primário, e necessário, de analgesia induzida por drogas capazes de antagonizar a via glutamatérgica no modelo de nocicepção térmica de retirada da cauda (tail-flick test) sendo o bloqueio de receptores do tipo NMDA sem efeito neste modelo (LUTFY et al., 1997).

O ácido γ -aminobutírico, GABA, é historicamente reconhecido como o mais importante neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. Este aminoácido tem sido objeto de estudo, e muito já foi descrito acerca do seu envolvimento na nocicepção de diversas origens.

O GABA age sobre receptores ionotrópicos (GABA_A) e metabotrópicos (GABA_B), sendo o primeiro um complexo receptor-canal iônico permeável a íons cloreto, enquanto o segundo trata-se de um receptor com sete alças transmembrana acoplado a proteína G (um típico GPCR-*G-Protein-Coupled-Receptor*). Ambos os receptores estão presentes tanto no corno dorsal da medula espinhal como em neurônios aferentes primários sensíveis a capsaicina (DIRIG, YAKSH 1995; MALCANGIO et al., 1996; KNABL et al., 2008; MUNRO et al., 2008; REICHL et al., 2012).

Em uma série de experimentos Reichl et al. (2012) demonstraram a importância da neurotransmissão gabaérgica na inibição da hiperalgesia térmica e

mecânica induzida por incisão intraplantar. Neste estudo, a ativação de receptores GABA_A e GABA_B por via intratecal é capaz de reduzir a hiperalgesia associada à incisão plantar, no entanto, a administração periférica no local da incisão não possui o mesmo efeito, sugerindo que, no caso da hiperalgesia por incisão, o efeito inibidor do GABA parece se dar em nível medular.

Dirig e Yaksh (1995) demonstraram a capacidade de agonistas de ambos os receptores para GABA de diminuir a nocicepção química bifásica induzida pela formalina em ratos, sendo seus efeitos revertidos por antagonistas específicos. No mesmo estudo, a administração intratecal de midazolan (benzodiazepínico que se liga em sítio específico dos receptores GABA_A, e potencializa a ação do GABA) não demonstrou efeito antinociceptivo, o que, sugere o autor, pode ser explicado pela necessidade de GABA disponível para a atividade da droga – Benzodiazepínicos só exercem efeitos sobre receptores-canais iônicos de GABA_A quando agem conjuntamente com o neurotransmissor inibitório GABA).

As *encefalinas* (Met ou Leu-encefalina) são peptídeos opióides endógenos, com efeitos antinociceptivos e anti-alodínico. Seus efeitos ocorrem em níveis espinhais ou supra-espinhais mediados por receptores δ_1 e δ_2 , respectivamente (TAKEMORI, PORTOGHESE, 1993). Apesar de outros núcleos possuírem neurônios encefalinérgicos, de grande importância é a região da PAG, visto ser um dos locais de ação da morfina, além de estar diretamente envolvida nas vias descendentes de inibição da dor. Na realidade, parece existir um sistema de inibição tônica envolvendo neurônios GABAérgicos na liberação de *met-encefalina* na PAG. Assim, o GABA inibe as projeções encefalinérgicas da PAG, no entanto, a nocicepção é capaz de sobrepujar essa inibição resultando em maior excitabilidade dos neurônios descendentes da PAG responsáveis pela antinocicepção (WILLIAMS et al., 1995).

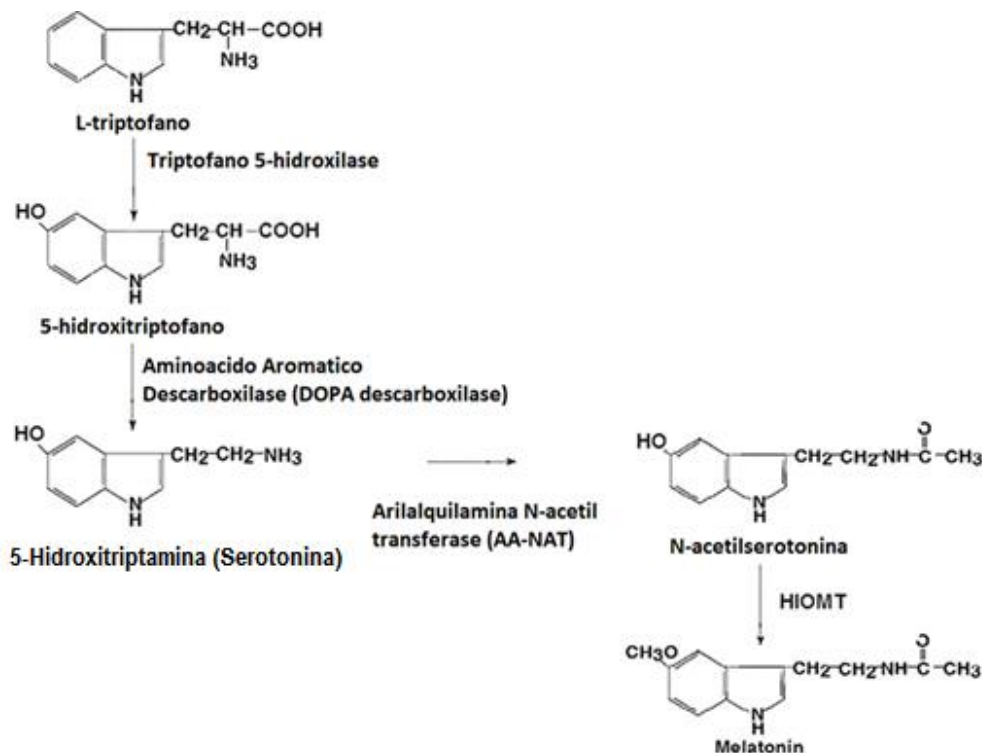
Substância P (SP) é um neuropeptídeo fortemente envolvido no processo de nocicepção sensorial primário. As fibras C de neurônios utilizam principalmente o glutamato como neurotransmissor e SP como co-trasmissores (MALMBERG, YAKSH, 1992; HORNFELDT, LARSON, 1994).

Interneurônios eferentes serotoninérgicos espinhais modulam negativamente a transmissão da substância P (LARSON et al., 1989; EIDE, HOLE, 1991).

Concentrações aumentadas de SP no cérebro parece aumentar a quantidade de 5-HT na medula espinhal, enquanto 5-HT diminui a liberação de SP para a medula espinhal (MOLDOFSKY, 1982; MURPHY, ZEMLAN, 1987; SHARMA *et al.*, 1990; WALKER *et al.*, 1991). Isto pode ser interpretado como um ciclo de feedback negativo: os níveis elevados de SP poderiam levar a uma liberação de seu antagonista 5-HT.

A via *Serotoninérgica* (5-hidroxitriptamina, 5-HT) está envolvida na modulação da emoção, cognição e funções motoras, bem como ritmos circadiano e neuroendócrino (HEILS *et al.*, 1996). 5-HT é sintetizada a partir de seu precursor, o *L-triptofano* e metabolizada em ácido 5-hidroxiindoilacético (5-HIAA) (Figura 4). A etapa limitante da síntese de serotonina é a hidroxilação pela triptofano hidroxilase, por conta da sua baixa concentração no SNC (TANIS *et al.*, 2008), no entanto, a administração de *L-triptofano* é capaz de aumentar a síntese cerebral de 5-HT de acordo com Gibbons (1979) e observações do nosso laboratório publicadas (ROCHA *et al.*, 2013) e não publicadas.

Figura 4. Síntese de 5-hidroxitriptamina (5-HT ou Serotonina),



Fonte: Baseado em Stone & Darlington (2002).

O L-triptofano é um aminoácido neutro de grande importância para o metabolismo humano, pois além de precursor metabólico do neurotransmissor serotonina e do neuro hormônio melatonina, participa da síntese da vitamina B3 (niacina) e da formação das quinureninas.

A serotonina é o principal neurotransmissor utilizado pelos neurônios dos núcleos da rafe. Nestes núcleos, os conjuntos de neurônios serotoninérgicos podem ser alocados, com base na sua distribuição e principais projeções, em dois grupos: o grupo rostral, confinado ao mesencéfalo e ponte rostral, com grandes projeções para o cérebro, e o grupo caudal, que se estende a partir da porção caudal da ponte para a parte caudal da medula oblonga, com grandes projeções para as porções caudais do tronco cerebral e da medula espinhal. Esta divisão ântero-posterior em duas populações foi recentemente corroborada por estudos genéticos que revelam as suas origens em populações precursoras separadas (DING et al., 2003). Como assinalado anteriormente, as projeções serotoninérgicas oriundas do núcleo magno da rafe exercem importantes efeitos sobre a supressão dos estímulos nociceptivos nas sinapses medulares.

A diminuição da concentração sérica de 5-HT e triptofano tem sido observado em pacientes com síndromes dolorosas como a fibromialgia e enxaqueca (RUSSEL et al., 1992; HRYCAJ et al., 1993; STRATZ et al., 1993; HEILS et al., 1996; WOLFE et al., 1997; SUPORNSILPCHAI et al., 2006). Têm sido postulado que a diminuição dos níveis de 5-HT pode estar ligado a um aumento na percepção da dor e a estados de insônia (MOLDOFSKY, 1982).

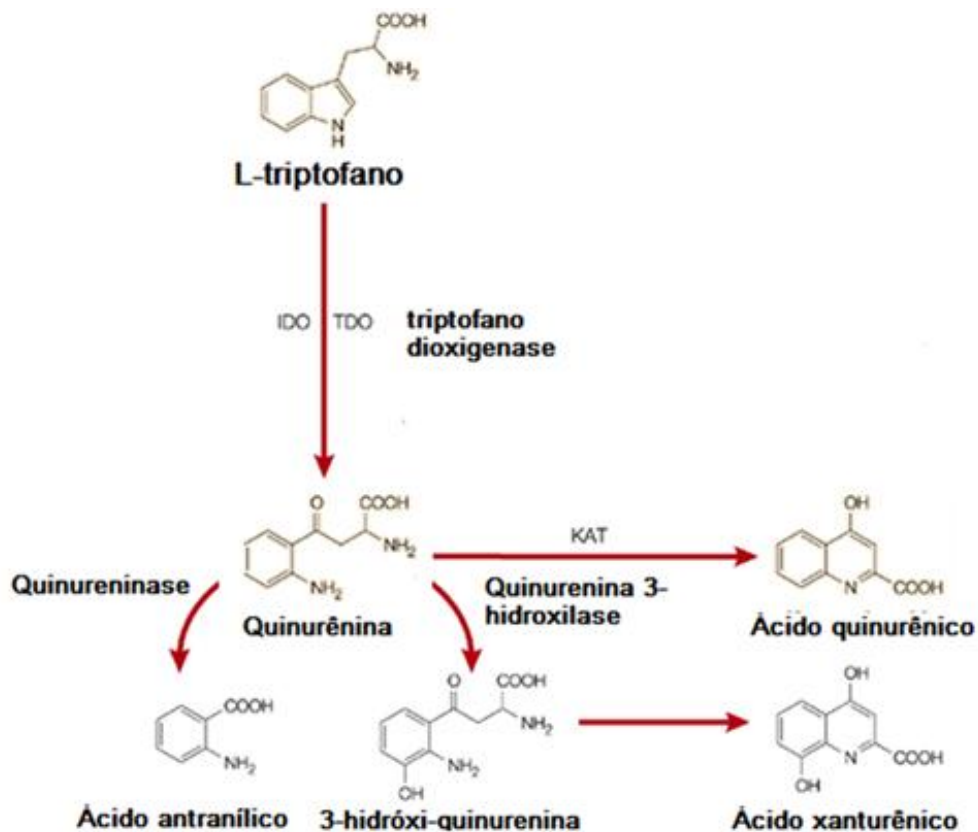
Quando coadministrado ou realizado tratamento prévio, junto com outros analgésicos, o comportamento do triptofano é pouco preditivo. O L-triptofano parece exercer efeito potencializador sobre a antinocicepção induzida por estimulação via eletrôdos em mesencéfalo de animais (MOROZOVA, VAL'DMAN, 1979). No entanto, a administração intraperitoneal de L-triptofano é capaz de atenuar a analgesia associada à morfina, segundo HO *et al.* (1975). O L-triptofano já foi descrito como substância antinociceptiva, nas doses de 300 e 600 mg/Kg no teste da placa quente (HEYLIGER *et al.*, 1998).

L-triptofano, que é um aminoácido essencial, indispensável na alimentação, pois não é sintetizado pelas células humanas, foi descoberto em 1901, e já foi descrito como co-adjuvante no tratamento da depressão e como suplemento

nutricional, bem como sedativo (SIMAT, STEINHART, KOCHEN, 1994) e agente indutor do sono (GEORGE *et al.*, 1989).

Apesar de ser precursor na síntese de serotonina e melatonina (RIOS *et al.*, 2010), a maior via de metabolização do L-triptofano leva à biossíntese de derivados do ácido quinurênico, como visto na figura 5 (PETERS, 1991). Esta via de metabolização do L-triptofano ocorre tanto no cérebro quanto na periferia e é conhecida como via das quinureninas.

Figura 5. Metabolismo de L-triptofano pela via das quinureninas



Baseado em Stone & Darlington (2002)

Esta é a principal via de metabolismo do L-triptofano, levando à geração de uma família de metabólitos, incluindo: 3-hidroxiquinurenina, ácido antranílico, ácido 3-hidroxi-antranílico, ácido xanturênico, ácido quinolínico e ácido quinurênico (KYNA), todos com propriedades biológicas (LAPIN, 1978; PETER, 1991). Desta forma, esta via gera substâncias deletérias tais como o ácido 3-hidroxi-quinurênico e 3-hidroxi-antranílico que aumenta o stress oxidativo e pode causar morte neuronal, e

ácido quinolínico, agonista do receptor de NMDA, que pode exercer efeitos excitotóxicos (CARVALHO et al., 1996). Em contraste, o KYNA foi descrito por Heyliger et al. (1998) como substância antinociceptiva nos testes de nocicepção térmica provavelmente pela capacidade de bloquear receptores de glutamato (BERTOLINO et al., 1989).

No controle da dor as doses mais elevadas de L-triptofano (> 300 mg / kg) foram associadas com efeito antinociceptivo em alguns modelos de nocicepção em ratos (HEYLIGER et al., 1998). Este estudo contradiz o trabalho realizado por Dennis, Melzack (1980), pois este último falha ao mostrar efeito analgésico do L-triptofano no teste da placa quente. Malin et al. (2002) descreveu um importante efeito potencializador de L-triptofano sobre o efeito antinociceptivo de eletroestimulação transcraniana de baixa corrente. Em todo caso, a administração intratecal de 5-HT ou L-triptofano tem sido descrita como capaz de modular o comportamento da dor.

Vários relatos têm sido publicados sobre o efeito antinociceptivo da melatonina, no entanto, a influência de 5-HT no controle da dor é complexa, desde o envolvimento dos receptores serotoninérgicos aos resultados em modelos animais de dor.

Existem vários receptores responsivos à serotonina, possuindo maior importância clínica e experimental, neste momento, as famílias de receptores 5-HT₁, 5-HT₂ e o receptor 5-HT₃, que é um canal iônico regulado por ligante.

A família dos receptores 5-HT₁ compreende cinco subtipos de receptores diferentes (receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}), que partilham 40-63% de identidade de sequência e agem acoplados a proteína Gi para inibir a formação de AMPc. 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} agem como auto-receptores somatodendrítico e terminais, respectivamente, no entanto, estes receptores também são expressos em todo o SNC (BARNES et al., 2012).

A família 5-HT₂ compreende três receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C} que exibem 42-51% de identidade de sequência de aminoácidos global e se acoplam a proteína Gq para aumentar a hidrólise de fosfatos de inositol e elevar o cálcio

citossólico. Além disso, Gq/G11 parece se acoplar com outras vias de transdução, por exemplo, PI3K/Akt e ERK (BARNES et al., 2012)

O receptor 5-HT₃ contrasta com todos os outros receptores 5-HT identificados, sendo um receptor acoplado a um canal iônico, que exhibe estreitas relações estruturais com o receptor nicotínico de acetilcolina, GABA-A, os receptores ionotrópicos. Os receptores 5-HT₃ medeiam respostas de despolarização rápidas que são propensas a dessensibilização com a ativação agonista prolongada. O complexo receptor é composto por cinco subunidades que circundam o canal iônico integrante em arranjo de anel. A primeira subunidade a ser identificada, 5-HT_{3A}, forma um receptor eficiente homomérico funcional que apresenta muitas das características de alguns receptores 5-HT₃ nativos. As subunidades que foram identificadas (5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D}, subunidades 5-HT_{3E}), que não aparecem para formar receptores funcionais homoméricos, contudo são integrantes da montagem dos receptores heteroméricos 5-HT₃, juntamente com a subunidade 5-HT_{3A} (BARNES *et al.*, 2012)

Yaksh e Wilson (1979) demonstraram que a injeção intratecal de serotonina em rato, coelho, gato produz uma elevação no limiar nociceptivo em várias medidas comportamentais. Na mesma obra, os autores demonstraram que o bloqueio de receptor por metisergida (antagonista misto de 5-HT₁ e 5-HT₂) exerce efeito antinociceptivo. No entanto, Schmauss et al. (1983) demonstrou a ausência de envolvimento do receptor 5-HT₂ sobre a atividade antinociceptiva de 5-HT administrado por via intratecal em teste de retirada da cauda. Outra pesquisa descreveu o envolvimento de receptores 5-HT₃ sobre o controle da dor. Bardin et al. (2000) demonstraram que o antagonismo do receptor 5-HT₃ por tropisetron reverte a ação antinociceptiva da 5-HT, bem como a administração intratecal de agonista de 5-HT₃ mostra o efeito antinociceptivo.

Podemos, então, entender que a via de transmissão serotoninérgica exerce importantes efeitos sobre o processamento do estímulo nóxico, embora ainda não seja definitiva a importância que cada tipo, ou subtipo, de receptor serotoninérgico possui no controle da dor.

A *bradicinina* é um peptídeo derivado do plasma pela ação da calicreína sobre o seu precursor o cininogênio de alto peso molecular (CAPM ou HMWK). Esse mediador está envolvido na sinalização da dor, inflamação e coagulação, além de possuir ações vasculares e renais. Junto com a calidina, a bradicinina forma o sistema de cininas plasmáticas. Estas agem sobre receptores específicos denominados B1 e B2. A bradicinina parece se ligar mais facilmente aos receptores B2, estes por sua vez, parecem mediar a maioria das respostas a bradicinina e calidina na ausência de processo inflamatório. Os receptores de bradicinina B2 podem ser encontrados em neurônios sensoriais (STERANKA & BURCH et al, 1997) e a sua ativação conduz à excitação neuronal e a geração de dor (DRAY, 1995).

Alguns estudos sugeriram que os receptores B1 da bradicinina poderiam ter também um papel na geração e manutenção da hiperalgesia em condições que envolvem inflamação de longa duração (PERKINS et al., 1993; , KELLY, 1993; DAVIS, PERKINS, 1994). De fato, esses receptores parecem mediar a hiperalgesia resultante de processos inflamatórios, no entanto, os resultados de Davis et al. (1996) mostraram que neurônios do gânglio da raiz dorsal não respondem a estimulação de agonistas específicos de receptores do tipo B2 de animais previamente estimulados com indutores do processo inflamatório. Essa observação considerada juntamente com o fato de os receptores B1 serem expressos em células inflamatórias como macrófagos e sua ativação levar a produção dos mediadores inflamatórios TNF- α e IL-1 β (DRAY, 1995), leva a sugerir que as ações pró-nociceptivas mediadas pelo receptor B2 não provêm da estimulação direta desses receptores nos nervos sensitivos.

A *Noradrenalina* é uma amina simpática que possui diversas funções orgânicas imprescindíveis para manutenção da homeostase, participando na regulação da pressão arterial, agindo nos vasos e no coração. As ações centrais da noradrenalina estão ligadas ao histórico postulado entre quantidades baixas de noradrenalina no SNC e quadros depressivos. Essa visão é fortalecida pela noção que a inibição da recaptação ou metabolismo desta substância é o mecanismo de ação de antidepressivos clássicos como tricíclicos e inibidores da monoaminoxidase(MAO) (POTTERHOLLISTER, 2008).

No controle da dor existem consideráveis evidências que apontam para uma interferência dessas monoaminas no controle das vias nociceptivas. Clinicamente, a amitriptilina, um inibidor da recaptação de noradrenalina e serotonina e, portanto, capaz de aumentar a sua disponibilidade, tem sido usada para o controle da enxaqueca (SILBERSTEIN, US Headache Consortium, 2005) e quadros dolorosos advindos da neuropatia diabética (BANSAL et al., 2009) e tendo sido relatada também efetividade do tratamento da dor crônica associado a desordens da articulação temporomandibular (RIZZATTI-BARBOSA et al., 2003).

No corno dorsal da medula existem receptores alfa-adrenérgicos do tipo 2, α -2. Além disso, o núcleo magno da rafe possui neurônios não serotoninérgicos e a estimulação desse núcleo produz antinocicepção bloqueável tanto por metisergida, antagonista serotoninérgico, quanto por fentolamina, antagonista noradrenérgico (HAMMOND, YAKSH, 1984; JONES, LIGHT, 1992).

Outras evidências como aquelas levantadas pelos trabalhos de Sagen et al. (1983) e Reddy e Yaksh (1980) sugerem a modulação da noradrenalina nas vias descendentes de controle da dor. Esses autores mostraram que lesões medulares por 6-hidroxidopamina, que leva a uma queda no conteúdo de noradrenalina, causa hipernocicepção, assim como a injeção intratecal de noradrenalina produz um efeito analgésico.

As *Prostaglandinas* são mediadores derivados do ácido araquidônico com diversas funções biológicas. As prostaglandinas são descritas como fatores protetores gástricos, mediadores nos processos nociceptivos, inflamatórios e febris. O ácido araquidônico é biotransformado a prostaglandina pela ação da cicloxigenase(COX), enzima que ocorre pelo menos em três isoformas, ou seja, COX-1, COX-2 e COX-3). Todas as isoformas catalisam a mesma reação sendo diferenciada pela expressão constitutiva/fisiológica da COX-1 e da expressão induzida/patológica da COX-2. A COX-3 é uma variação da COX-1, localizada principalmente no tecido cerebral, mais especificamente no córtex (DRAY, 1995; CHANDRASEKHARAN et al., 2002; RANG et al., 2006; BOTTING, 2006).

Entre os muitos mediadores da inflamação, as prostaglandinas (PGs) possuem importância especial. Elas são liberadas por quase todo tipo de estímulos químicos ou mecânicos e sempre acompanham a resposta inflamatória.

A COX-2 é a isoenzima induzida em células inflamatórias mediante estímulo inflamatório. A PGE₂ torna a célula neural hipersensível a estímulos dolorosos e interage com citocinas na geração de febre durante processos infecciosos. A PGD₂ é o principal metabólito da via da COX nos mastócitos e, juntamente com PGE₂ e PGI₂, causa vasodilatação e potencializa a formação de edema pela ação sinérgica entre as substâncias endógenas que causam o aumento da permeabilidade vascular, como a bradicinina e histamina (DRAY, 1995; RANG et al., 2003; BOTTING, 2006).

1.3. Sinergismo farmacológico

A combinação de drogas para atingir um efeito clínico maior é prática corrente no tratamento de várias condições mórbidas. Assim, são padronizados protocolos de combinações de drogas antineoplásicas, de antibióticos bem como para o tratamento da dor. O objetivo maior de combinar drogas analgésicas é, sem dúvida, reduzir em proporção ainda maior o estado doloroso quando comparado com o tratamento isolado. No entanto, nessas estratégias pode-se obter além de um efeito maior, uma redução no potencial tóxico quando a associação permite uma redução considerável nas doses das drogas administradas conjuntamente.

Na maioria dos casos a combinação de duas drogas analgésicas reportem resultados simplesmente de adição de efeitos, ou seja, o efeito da administração é a soma algébrica dos efeitos das drogas isoladas, como no caso descrito por Taber et al. (1969) na coadministração de analgésicos opióides morfina e metadona. Porém, em alguns casos, notadamente quando se combinam drogas com mecanismos de ação diferentes, pode-se obter um efeito maior do que a simples soma de ações, efeito maior do que o aditivo, chamado de efeito sinérgico, como os descritos por Tallarida et al. (2003) e Miranda et al. (2006).

Algumas combinações de analgésicos têm sido estudadas e rotineiramente revistas na prática clínica. A associação de paracetamol e codeína no alívio da dor oral associada a cirurgia de extração do terceiro molar é efetiva quando o estado doloroso se apresenta de forma mais severa, enquanto o paracetamol se mostra efetivo apenas no alívio da dor moderada, administrado em doses acima de 500 mg. No entanto, análise de vários estudos, revisto por Mehlisch (2002) sugere uma relação aditiva desta combinação no controle deste tipo de dor. Relata, ainda, Ong et al. (2010) que uma combinação de paracetamol e determinados AINEs pode proporcionar analgesia superior do que qualquer uma das drogas isoladamente no tratamento da dor pós-operatória.

Esses relatos sobre a maior efetividade no tratamento de condições dolorosas com combinações de drogas são ainda mais importantes quando se analisa os insucessos relativos das drogas mais recentes, não tão novas assim, lançadas para o tratamento de condições dolorosas como osteoartrite e dor muscular. Tomemos como exemplo duas drogas integrantes da classe dos Coxibs, antiinflamatórios não esteróides que inibem seletivamente a enzima cicloxigenase do tipo 2(COX-2), o rofecoxib (Vioxx®) e valdecoxib(Bextra®). Aprovadas em 1999 para uso nos Estados Unidos, essas drogas foram retiradas do mercado norte-americano em 2004 e 2005, respectivamente, por ação do órgão regulamentador, o FDA (Food and Drug administration), conjuntamente com as indústrias produtoras, Merck Co. Inc.® e Pfizer®, respectivamente, sob a alegação de aumentar o risco de eventos tromboembólicos cardiovasculares, ou seja, os benefícios do seu uso não superam os riscos associados (FDA, 2012).

Os dois principais estudos clínicos que avaliaram a maior segurança quanto a eventos adversos gastrointestinais dos medicamentos rofecoxib e celecoxib, o VIGOR - *Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research* (BOMBARDIER et al, 2000) e o CLASS - *Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study* (SILVERSTEIN et al., 2000), demonstraram eficácia semelhante das novas drogas frente a AINES tradicionais como o Diclofenaco ou Ibuprofeno para o controle dos sintomas da artrite. Neste caso, é relatada uma reduzida incidência de efeitos gastrintestinais como lesões gástricas e complicações de úlcera como perfurações e hemorragias, no entanto, nada foi descrito acerca do risco de efeitos cardiovasculares.

Esses estudos foram publicados nos dois periódicos voltados a pesquisa clínica e terapêutica mais importantes na atualidade e motivaram tomadas de atitudes de várias agências regulatórias em todo mundo, inclusive no Brasil, no sentido de aprovação desses produtos e posterior advertências sobre seus efeitos sobre eventos cardiovasculares tromboembólicos. No entanto, a análise crítica mais pertinente no contexto desse trabalho é a constatação de que todo o investimento das grandes indústrias em atividade nos países desenvolvidos a fim de descobrir novas drogas para o controle da dor inflamatória retornaram a produtos com eficácia terapêutica semelhante a produtos no mercado há mais de 50 anos e com efeitos adversos potenciais maiores que os associados aos antigos AINEs, com exceção dos efeitos adversos no trato gastrointestinal.

Em síntese, mesmo com as modernas ferramentas das ciências químicas e biomédicas, o desenvolvimento de uma molécula clinicamente mais eficaz por via oral e com perfil de efeitos colaterais menor não logrou êxito no campo do controle da dor inflamatória, restando como ferramenta terapêutica o melhor manejo dessas condições com moléculas já existentes, ou novas drogas de imitação.

Neste sentido, a utilização concomitante de duas drogas planejadas de forma racional e com doses e proporções ideais parece ser uma alternativa não tão atraente em termos invencionais, mas, talvez, clinicamente mais útil e segura quando comparadas com as estratégias atualmente empregadas.

Essa ideia não é tão sofisticada quanto à tendência de alguns grupos de pesquisadores e empreendedores, de adicionar à molécula de um analgésico um radical capaz de agir na redução de efeitos adversos, como o desenvolvimento de NO-AINES (analgésicos e anti-inflamatórios usados como carreadores e liberadores de óxido nítrico). No entanto, parece ser um atalho na geração de novos produtos com maior segurança, principalmente quando se leva em consideração as facilidades de registros desses produtos nas agências regulatórias quando utilizando drogas já em uso. Tudo isto torna mais fácil a translação dos resultados da bancada até a clínica.

Ao investigar a interação de duas moléculas quanto ao efeito antinociceptivo, a importância principal é tão somente a descrição desse efeito de forma cientificamente convincente. Diferente do que se possa imaginar, o fenômeno da

interação sinérgica é algo imprevisível tanto nos modelos experimentais atualmente empregados para o estudo da dor, quanto na prática clínica.

Do quadro a seguir pode-se depreender que o registro de produtos na forma de associação em dose fixa pode pular várias fases clínicas, podendo ser requisitado, para alguns produtos integrantes da situação 01, apenas ensaios de bioequivalência relativa/biodisponibilidade (BRASIL, 2010)

Quadro 1. Requisitos para registro de Nova Associação em Dose Fixa (ADF) no país. BRASIL, 2010.

Situação 1	Situação 2
A ADF possui os mesmos princípios ativos, nas mesmas concentrações e posologia que um regime de tratamento com uso concomitante das monodrogas que possuem seu perfil de segurança e eficácia estabelecido por meio de evidência científica disponível na literatura.	As monodrogas registradas possuem perfil de eficácia e segurança bem estabelecido, mas a associação ainda não foi estudada nas doses e para as indicações terapêuticas que se pretende pleitear, ou seu perfil de eficácia e segurança não está estabelecido por meio de evidência científica disponível na literatura.
Requisitos para registro	Requisitos para registro
Poderá ser apresentado relatório clínico baseado em dados de literatura publicados em revistas indexadas, desde que atendidos os requisitos estabelecidos.	Nesse caso, sempre será necessária a condução de estudo clínico Fase III, e eventualmente de estudos clínicos Fase II com a associação.

Tallarida *et al.* (2003) descrevem o sinergismo existente entre a glicosamina e ibuprofeno no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. De outra forma, mesmo trabalho demonstra que a glicosamina bloqueia o efeito antinociceptivo do paracetamol nesse modelo. Na clínica, Genovese *et al.* (2004) demonstraram que o uso combinado de etanercept (Enbrel[®]) e anakinra (Kineret[®]), respectivamente uma imunoglobulina solúvel com receptor para Fator de Necrose

Tumoral (TNF) e um antagonista do receptor de Interleucina-1 (IL-1), não possuem vantagens quando comparado ao uso isolado de qualquer um para o tratamento de pacientes com artrite reumatoide que não tiveram resposta satisfatória com o metotrexato.

Assim, o sinergismo entre drogas não é uma propriedade classe-dependente e não há como prever esse comportamento farmacológico, caracterizado pela potencialização do efeito clínico ou de uma resposta a um teste pré-clínico de uma substância em tratamento conjunto com outra baseando-se em mecanismos principais de ação dessas drogas, mesmo quando a teoria aponta para isso, como no uso de etanercept e anakinra.

Uma aplicação de sucesso utilizando apenas conceitos de sinergismo entre drogas analgésicas foi o desenvolvimento da associação, hoje clinicamente disponível, entre o analgésico opióide tramadol e o paracetamol (Ultracet[®]) desenvolvido a partir de um estudo publicado em 1996 por Ronald Tallarida e Robert Raffa onde o método de avaliação da atividade antinociceptiva foi, e nada além, o teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético descrito por Collier et al. em 1968 e o tratamento matemático adequado dos dados experimentais (COLLIER, 1968; TALLARIDA, RAFFA, 1996).

Assim como o paracetamol, a dipirona também é comercialmente disponível em combinações com outras substâncias, como por exemplo: Dorflex[®], Benegripe[®] e Apracur[®], drogas indicadas principalmente para o tratamento de dores musculares, cefaleias e estados gripais. Embora a dipirona não esteja disponível comercialmente associada a analgésicos opióides, dados pré-clínicos mostram a capacidade dessa substância em potencializar o efeito do tramadol em modelo de nocicepção térmica na placa quente (RODRÍGUEZ-SILVERIO *et al.*, 2009) e parece exibir associação sinérgica com a cafeína em modelo de nocicepção química induzida pela formalina (DIAZ-REVAL *et al.*, 2008).

Essas duas substâncias, Paracetamol e Dipirona, têm em comum a capacidade de bloquear seletivamente a produção central de prostaglandinas, possuindo ação nula sobre tecidos periféricos (CHANDRASEKHARAM *et al.*, 2002), diferentemente do que ocorre com outros AINES como cetorolaco e cetoprofeno que

são capazes de inibir a síntese periférica e central de prostaglandinas (SHUKURI et al., 2011). Nesse contexto, dipirona e paracetamol pareceram ser capazes de potencializar o efeito de alguns analgésicos opióides e não-opióides (TALLARIDA et al., 2003; MIRANDA et al., 2006) o que pode sugerir que o bloqueio central da síntese de prostaglandinas é uma importante ferramenta de incremento da analgesia de outras drogas

1.4. Dipirona

Dipirona é uma droga analgésica historicamente utilizada no Brasil e um dos antitérmicos mais utilizados na prática clínica. Trata-se de derivado pirazolônico, não-esteróide e com pronunciada atividade analgésica, sendo amplamente utilizada em algumas partes do mundo como um analgésico, inclusive na Europa e América do Sul. Em outras regiões seu uso foi proibido por causa de sua controversa relação com agranulocitose (EDWARDS, McQUAY, 2002). Essa associação foi principalmente evidenciada nos Estados Unidos da América e outros países desenvolvidos (DORR, COOK, 1996; HEDENMALM, SPIGSET, 2002; EDWARDS, McQUAY, 2002). No entanto, vários estudos demonstraram a segurança da dipirona em diferentes populações (MALUF, 1999; MARTÍNEZ-MARTÍN *et al.*, 2001; TULUNAY et al., 2004; BASAK et al., 2010). No Brasil a dipirona é uma substância presente em vários medicamentos vendidos sem receita médica, alguns deles estão entre os mais vendidos do país. Em contrapartida, as discrasias sanguíneas como a anemia aplástica e agranulocitose são raras, o que fez a dipirona ser definida como droga segura pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BENSEÑOR, 2001; HAMERSCHLAK *et al.*, 2005; SOUZA et al., 2012).

A dipirona é classificada como um anti-inflamatório não esteroide (AINE), no entanto, apesar das suas atividades antipiréticas e analgésicas, possui efeito quase desprezível em termos anti-inflamatórios e fraca capacidade de inibição frente a ambas as isoformas de cicloxigenases COX-1 ou COX-2 (BOTTING, 2000). A capacidade analgésica e antitérmica da dipirona parece estar relacionada intimamente com a capacidade de inibição da COX-3 pelo seu metabólito ativo 4-metilaminoantipirina (CHANDRASEKHARAM *et al.*, 2002). Apesar disso, há evidência do envolvimento de outros mediadores como óxido nítrico periférico e

central e glutamato (BEIRITH *et al.*, 1998). Em animais, a dosagem mínima para se obter efeitos antinociceptivos com a dipirona em modelos de dor utilizando roedores é um pouco acima de 350 mg/kg (BEIRITH *et al.*, 1998; PAKULSKA *et al.*, 2003; DÍAZ-REVAL *et al.*, 2008). Considerando-se que a redução desta dose pode ser uma estratégia para diminuir os possíveis efeitos adversos, a avaliação de qualquer ferramenta, a fim de manter a atividade antinociceptiva da dipirona em doses menores é útil e pode ser uma forma de fornecer um fármaco analgésico eficaz para várias populações aparentemente mais suscetíveis aos efeitos colaterais da dipirona.

1.5. Paracetamol

O paracetamol é um dos analgésicos de comprovada eficácia mais utilizados no mundo, principalmente quando se leva em consideração o fato da dipirona ser prescrita em diversos países, marcadamente em países desenvolvidos. Contudo, as doses mais elevadas estão associadas a efeitos tóxicos graves. É hepatotóxico para os seres humanos em doses acima de 125 mg/kg (BUCKLEY, 2007) e sua overdose, tanto intencionais como não intencionais, continua a ser uma preocupação de saúde pública, registrando uma média anual (2000-2006) de 33,520 internações somente nos EUA.

Paracetamol é a denominação internacional recomendada para o bem conhecido nos Estados Unidos e Europa acetaminofeno. Essa substância foi sintetizada pela primeira vez em 1878 por Morse (1878) e usada clinicamente pela primeira vez por Von Mering em 1887 (1893). Nesta época foi preterido e descartado em favor da fenacetina. Os estudos de Brodie e Axelrod (1948) levaram à sua "redescoberta" de marketing na década de 1950 nos Estados Unidos como um analgésico substituto para a fenacetina, que fora "condenada" por sua nefrotoxicidade. Algumas preocupações da ONU não-fundamentadas sobre a segurança do paracetamol atrasou sua ampla aceitação até o ano de 1970. A partir de então, o paracetamol se tornou uma das drogas mais populares e amplamente utilizada no mundo para o tratamento da dor e febre, provavelmente, o medicamento mais comumente prescrito para crianças (BENTLEY & MACKIE, 1995; RIANO-GALAN *et al.* 1998; PANDOLFINI, 2005; BERTOLINI *et al.*, 2006). Paracetamol

ocupa uma posição única entre as drogas analgésicas, tanto para o tipo de dor aliviada e para os efeitos secundários. Assim, por exemplo, ao contrário de outros AINEs, o paracetamol é quase unanimemente considerado ineficaz na dor inflamatória, bem como no tratamento da dor intensa. Ao contrário dos opiáceos, é ineficaz em dor decorrente de espasmo do músculo liso visceral e não tem efeito depressor sobre a respiração. Além disso, ao contrário de outros AINES o paracetamol não produz danos gastrointestinais ou efeitos adversos cardiorenais. O mecanismo de ação do paracetamol é o bloqueio central da síntese de prostaglandinas através da inibição da COX-3 (COX-1b) (CHANDRASEKHARAM et al., 2002). Recentemente foi aventada a possibilidade do paracetamol e seus metabólitos atuarem como agonistas de canais iônicos situados centralmente como TRPV1 (MALLET *et al.*, 2010) e TRPA1 (ANDERSSON *et al.*, 2011).

Em síntese, é um analgésico e antitérmico amplamente prescrito, que, apesar de não necessitar de receitas médicas para sua aquisição, está ligado a eventos hepatotóxicos importantes e a redução de sua disponibilidade pode ser uma estratégia de diminuição de eventos adversos e mortes por suicídios.

1.6. Cetoprofeno

O Cetoprofeno é um clássico anti-inflamatório não esteroide (AINE) pertencente à família dos derivados propiônicos com atividades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas que possui os mesmos problemas que seus congêneres de classe tais quais aqueles associados com um aumento do risco de desenvolvimento de úlceras no trato gastrointestinal e suas complicações, como, por exemplo, hemorragias e perfurações, (SZABO et al., 1985; SCHOENFELD et al., 1999). Relata em revisão, Sarzi-Puttini et al. (2010), que o cetoprofeno tem sido amplamente utilizado no manejo de estados dolorosos oriundos de dano tecidual e no tratamento da dor no pós-operatório, é eficaz também em pacientes com dor reumática aguda, incluindo bursite relacionada, tendinites e dor lombar, sendo observado um rápido início de atividade analgésica.

Essa droga é uma mistura racêmica, onde apenas o isômero-S possui atividade biológica, enquanto que o isômero R é muito menos potente (CABRÉ et al., 1998; BARBANOJ et al., 2001). O principal mecanismo de ação analgésica do

cetoprofeno é a inibição não seletiva das ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) e, conseqüentemente, diminuição da produção de prostaglandina E₂ (PGE₂). Em adição aos seus efeitos sobre a ciclo-oxigenase, o cetoprofeno também inibe a lipoxigenase, a via da cascata do ácido araquidônico (WALKER, 1980) que conduz a uma diminuição da síntese de leucotrienos.

Um estudo conduzido por Fiorentino e colaboradores (1996), avaliando a eficácia do cetoprofeno como profilaxia da osteopenia induzida por imobilização da cauda em roedores, sugere que os AINEs, cetoprofeno em particular, podem reduzir a reabsorção óssea, e não alteram significativamente a formação óssea em doses subefetivas para efeito anti-inflamatório. É conhecido que imobilização conduz a uma perda de massa óssea tanto em animais como em seres humanos, assim como é umas das complicações associadas a cirurgias ortopédicas.

Estudo clínico verificou que o uso de cetoprofeno parece ser capaz de reduzir as necessidades de administração de analgésicos opióides como o fentanil nos pacientes em tratamento pós cirurgia ortopédica. O mesmo estudo não descreve essa propriedade para o paracetamol (SARZI-PUTTINI *et al.*, 2010).

Os efeitos adversos do cetoprofeno, como os outros AINES, são dependentes de dose e de tempo de tratamento, sendo clinicamente importante reduzir a carga de ingestão dessa droga mantendo-se suas atividades analgésicas, o que pode ser conseguido, em tese, potencializando seu efeito com o uso de uma droga menos tóxica, tal como sua ação frente ao fentanil (SCHOENFELD *et al.*, 1999; SARZI-PUTTINI *et al.*, 2010).

2 Relevância e justificativa.

Condições dolorosas são altamente presentes na sociedade, variando de uma simples dor associada à dismenorreia a dores intensas como cólicas renais ou dores associadas a neoplasias. Alguns desses estados são refratários ao uso de analgésicos, ou o uso de analgésicos levam ao aparecimento de efeitos adversos potencialmente graves.

Combinar analgésicos de eficácia comprovada é uma estratégia que se destina a atingir um ou mais objetivos terapêuticos tais como a facilitar a adesão do paciente, simplificar a prescrição, melhorar a eficácia sem aumentar os efeitos adversos, ou diminuir os efeitos adversos sem perda de eficácia (RAFFA, 2001).

Interferir em mais de uma via de um processo fisiológico ou fisiopatológico como o processo noceptivo/doloroso é uma estratégia racional de se combinar analgésicos buscando debelar a dor. Assim, a possível potencialização de vias moduladoras inibitórias cérebro-espinhais serotoninérgicas pela administração de L-triptofano pode servir de plano de fundo para potencializar o efeito de analgésicos não-opioides como a dipirona ou paracetamol, tendo em vista essas drogas agirem inibindo o processo nociceptivo em outro ponto. Essas drogas já foram descritas como poupadoras de morfina, reduzindo a dose necessária para a morfina exibir antinocicepção/analgesia (KORPELA et al., 1999; HERNÁNDEZ-DELGADILLO et al., 2002)

Dessa forma, o estudo do sinergismo entre o L-triptofano e a dipirona, paracetamol ou cetoprofeno pode servir de base para instituição de novas terapias de manejo da dor, possibilitando reduzir os riscos de eventos adversos dose-dependentes ou aumentar a eficácia dos tratamentos.

3 Objetivos

3.1. Geral

O principal objetivo deste trabalho foi demonstrar a capacidade do L-triptofano de interagir sinergicamente com os analgésicos não-opioides dipirona, paracetamol e cetoprofeno.

3.2. Específicos

- Estudar o efeito do L-triptofano em administração conjunta, em doses fixas, via oral, com a dipirona e paracetamol, bem como o efeito do tratamento prévio com L-triptofano, em doses fixas, intraperitoneais, com a dipirona, paracetamol e cetoprofeno frente ao teste de contorções induzidas pelo ácido acético.
- Verificar o efeito do L-triptofano em administração conjunta com a dipirona e paracetamol via oral frente ao teste de nocicepção induzida pela formalina.
- Demonstrar o efeito da interação entre L-triptofano e dipirona via intraperitoneal no teste de nocicepção térmica na placa quente, bem como a interação entre L-triptofano e dipirona ou paracetamol, via intraperitoneal no teste de nocicepção induzida pela capsaicina.
- Analisar a influência do L-triptofano sobre as quantidades centrais de Noradrenalina, Serotonina (5-HT) e Dopamina. Assim como definir a influência do tratamento combinado com L-triptofano e dipirona ou paracetamol sobre as quantidades corticais de glutamato.
- Investigar a influência do bloqueio de receptores 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃ sobre o efeito sinérgico do L-triptofano combinado com a dipirona, paracetamol e cetoprofeno frente ao teste de contorções induzidas pelo ácido acético.
- Definir a ação do bloqueio da síntese de 5-HT sobre o efeito sinérgico do L-triptofano combinado com a dipirona.
- Verificar o bloqueio de receptores de melatonina sobre o efeito sinérgico do L-triptofano combinado com a dipirona.

- Estudar o efeito antinociceptivo do ácido quinurênico e sua interação com a dipirona e paracetamol frente a nocicepção induzida pelo ácido acético.

4 Materiais e métodos

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos e fêmeas em todos os experimentos pesando entre 24 e 31 g. Os animais oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará foram mantidos na sala de manutenção do laboratório de neurofarmacologia em temperatura aproximada de 25°C em caixas de plástico rígido sendo alimentados com ração para camundongos e água da rede pública (torneiras). A utilização dos animais seguiu o plano discriminado no projeto aprovado pela comissão de ética em pesquisa animal (CEPA) da instituição, sob o número 63/2012.

4.2. Preparo de substâncias e aplicação.

L-triptofano, ácido acético, luzindol, ácido quinurênico, capsaicina, p-cloro fenilalanina(PCPA), ritanserina e NAN-190 foram adquiridos de empresas pertencentes ao grupo SIGMAALDRICH Co. Dipirona, paracetamol e cetoprofeno foram adquiridos da EMS, Boehringer Ingelheim do Brasil e Sanofi-Aventis, respectivamente. O quadro abaixo (Quadro 2) resume as atividades de cada substância.

Quadro 2. Resumo das ação das substâncias empregadas nesse trabalho.

Substância	Ação
Ácido acético	Indutor de nocicepção visceral
Ácido quinurênico	Metabólito do L-triptofano (via quinureninas)
Capsaicina	Agonista de receptores TRPV1
L-triptofano,	Aminoácido essencial
Luzindol	Antagonista de receptores de Melatonina
NAN-190	Antagonista de receptores 5-HT _{1A}
Ondasentron	Antagonista de receptores 5-HT ₃
p-cloro fenilalanina (PCPA)	Inibidor da síntese de 5-HT
Ritanserina	Antagonista de receptores 5-HT _{2A/2C}

As substâncias aplicadas intraperitonealmente (i.p.) foram diluídas com solução salina estéril ou água destilada e aplicadas no volume de 10 ml para cada 1 kg de peso do animal. As substâncias aplicadas via intragástrica (i.g.) foram diluídas em água destilada. Dessa forma, as doses de 50 e 25 mg/kg, i.p. ou i.g., por exemplo, foram obtidas aplicando os respectivos tratamentos nas concentrações de 5 e 2,5 mg/ml. Diluições de L-triptofano acima de 10 mg/ml foram realizadas com auxílio de um sonicador. As drogas e demais substâncias utilizadas foram preparadas no momento de uso.

Os tratamentos intraperitoneais quando realizados mais de uma vez, foram feitos em regiões distintas dos animais. Utilizou-se seringas intradérmicas adquiridas no comércio local, com capacidade de volume de 1ml e agulhas 12,7 mm x 0,33 mm (29 G) da marca BD Ultra-Fine[®]

4.3. Material

Para preparo de substâncias e reagentes: béqueres de 5, 10 e 50 mL; Pipetas labmate soft[®] 10-100µl e 1-1000 µl; balança analítica Shimadzu[®] AUW220D; Sonicador Ultracleaner, frascos de vidro âmbar; Bastões de vidro e papel alumínio. Para o procedimento de pesagem observou-se o peso da amostra em comparação com o recipiente utilizado para a pesagem, não sendo admitido o recipiente utilizado ter massa superior a 10% do peso da amostra.

Para os ensaios: foram utilizados funis grandes com 27 cm de diâmetro para a observação das contorções, placa quente Ugo Basile[®] e cronômetros ChronoBio[®].

Para quantificação de monoaminas: Cromatógrafo Shimadzu[®] Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE – HPLC).

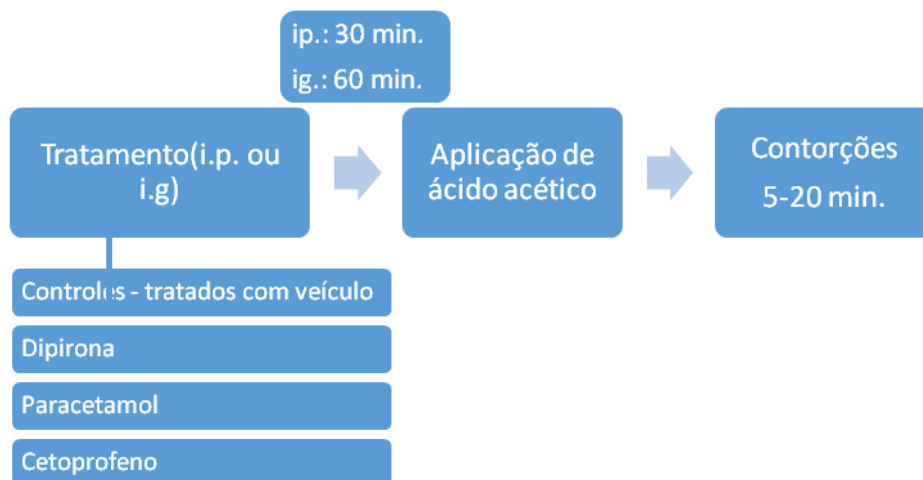
4.4 Teste de Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

4.4.1 Tratamentos isolados

O teste baseia-se na quantificação das contorções abdominais induzidas pela aplicação intraperitoneal de ácido acético 0,6% (v/v). O animal exibe um comportamento sugestivo de dor – nociceptivo caracterizado pela contorção do abdômen seguido da extensão das patas traseiras. Foi utilizada uma modificação do teste descrito por Collier et al. (1968) e Koster et al. (1979), decorridos 5 minutos da aplicação de ácido acético foi contado o número de contorções no intervalo de 15 minutos subsequentes. O número de contorções foi o parâmetro utilizado para avaliar o potencial antinociceptivo dos tratamentos neste teste. A aplicação do ácido acético ocorreu sempre 30 min. após o último tratamento intraperitoneal ou 60 min. após o tratamento via oral.

Para a avaliação das respostas aos tratamentos intraperitoneais (i.p.) isolados, os animais foram tratados com L-triptofano nas doses de 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg; dipirona 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg; paracetamol 50, 75, 150 e 300 mg/kg e cetoprofeno 3, 10, 30, 90 e 180 mg/kg e então submetidos ao teste para obtenção da curva dose resposta e a respectiva ED₅₀. Foram utilizados grupos contendo de 6-10 animais (Figura 6).

Figura 6. Fluxo de tratamento no teste de contorções induzidas pelo ácido acético.



Para a avaliação das respostas aos tratamentos intragástricos via oral (i.g.) isolados, os animais foram tratados com L-triptofano nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg; dipirona, nas doses de 25, 75, 175 e 350 mg/kg e Paracetamol, nas doses de 25, 100, 200 e 400 mg/kg e, então, submetidos ao teste para obtenção da curva dose resposta e a respectiva ED₅₀. Foram utilizados grupos de 5-10 animais (Figura 4).

4.4.2. Tratamentos conjuntos

Para avaliação dos tratamentos conjuntos via i.g., os animais receberam conjuntamente, na mesma administração, L-triptofano com dipirona ou paracetamol. (Figura 7). Foram construídas curvas dose-respostas dos tratamentos combinados utilizando proporções fixas entre as drogas. Dessa forma, os tratamentos combinados com L-triptofano e dipirona foram realizados nas proporções de 1:1,4 (peso:peso, mg/kg) entre L-triptofano e dipirona. Para o paracetamol a relação foi 1:1,5, também em peso/peso em termos de mg/kg de animal.

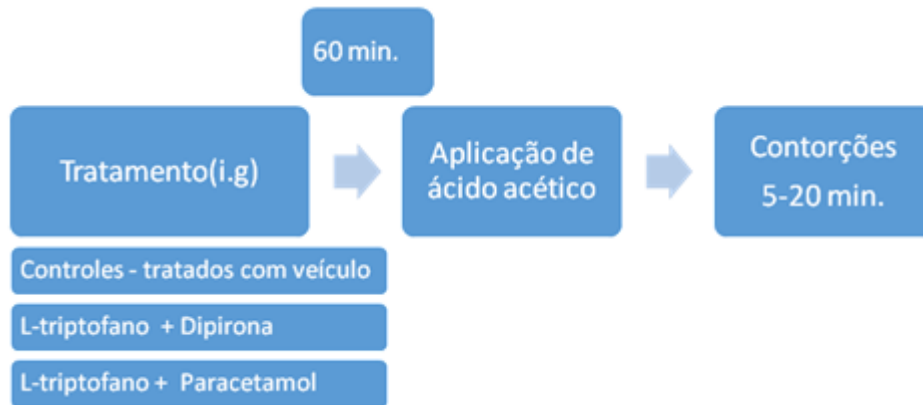
Tabela 2. Doses utilizadas nos tratamentos conjuntos de L-triptofano e dipirona ou paracetamol.

Tratamento conjunto (1: 1,4)		Tratamento conjunto (1: 1,5)	
L-triptofano	+ Dipirona	L-triptofano	+ Paracetamol
50	+ 70 mg/kg	50	+ 75 mg/kg
25	+ 35 mg/kg	25	+ 37,5 mg/kg
12,5	+ 17,5 mg/kg	12,5	+ 18,5 mg/kg
4,2	+ 6 mg/kg	6,25	+ 9,25 mg/kg

As proporções nas combinações foram escolhidas a partir de testes pilotos utilizando doses não efetivas conjuntamente com as doses testadas de L-triptofano

(25, 50 e 100 mg/kg). As proporções utilizadas foram as verificadas como mais promissoras em termos de atividade analgésica.

Figura 7. Fluxo de tratamento no teste de contorções induzidas pelo ácido acético – **tratamentos conjuntos.**



4.4.3. Tratamentos combinados

Para avaliação dos tratamentos combinados via i.p., foram realizados tratamentos prévios com L-triptofano 30 minutos antes da injeção i.p. de dipirona, cetoprofeno e paracetamol (Figura 8). Foram construídas curvas dose-respostas dos tratamentos combinados utilizando proporções fixas entre as drogas. As proporções nas combinações foram escolhidas a partir de testes pilotos utilizando doses não efetivas combinadas com as doses testadas de L-triptofano (12,5, 25 e 50 mg/kg). As proporções utilizadas foram as verificadas como mais promissoras em termos de atividade analgésica. Assim, os tratamentos combinados com L-triptofano e dipirona foram realizados nas proporções de 1:1 e 1:2 (peso:peso, mg/kg) entre L-triptofano e dipirona. Para o cetoprofeno a relação foi 1:5,75 entre cetoprofeno e L-triptofano e 4,12:1 entre paracetamol e L-triptofano, ambas também em peso/peso em termos de mg/kg de animal. Seguindo os tratamentos descritos a seguir:

Tabela 3. Tratamento combinado intraperitoneal com L-triptofano e dipirona

Tratamento combinado (1:1)	Tratamento combinado (1:2)
L-triptofano + Dipirona	L-triptofano + Dipirona
100 + 100 mg/kg	50 + 100 mg/kg
50 + 50 mg/kg	25 + 50 mg/kg
25 + 25 mg/kg	12,5 + 25 mg/kg
12,5 + 12,5 mg/kg	6,25 + 12,5 mg/kg

Figura 8. Fluxo de tratamento no teste de contorções induzidas pelo ácido acético – **tratamentos combinados.**

Tabela 4. Tratamento combinado intraperitoneal com L-triptofano e Cetoprofeno ou Paracetamol.

Tratamento combinado (5,75:1)	Tratamento combinado (1: 4.12)
L-triptofano + Cetoprofeno	L-triptofano + Paracetamol
50 + 8,7 mg/kg	25 + 103 mg/kg
25 + 4,36 mg/kg	12,5 + 51,5 mg/kg
12,5 + 2,18 mg/kg	6,25 + 25,7 mg/kg
6,25 + 1,09 mg/kg	3,125 + 12,8 mg/kg

4.5 Avaliação do papel da biotransformação do L-triptofano em serotonina no efeito sinérgico com a dipirona.

Grupos de animais receberam PCPA (p-cloro-fenil-alanina, 100 mg/kg, i.p.) uma vez ao dia durante os três dias prévios a realização do experimento e no dia do procedimento experimental para depleção de 5-HT. Um dos grupos recebeu apenas PCPA e tratado com veículo i.p. 3 horas após o tratamento com PCPA sendo, então, submetido ao teste 30 minutos após. Grupos de animais receberam L-triptofano 50 mg/kg i.p. 3 horas depois do tratamento com PCPA e, 30 minutos depois do tratamento com L-triptofano, recebeu dipirona 50 mg/kg i.p. (dose não-antinociceptiva) ou dipirona 100 mg/kg i.p. (dose antinociceptiva). Esses animais foram submetidos ao teste 30 minutos após o tratamento com dipirona. Foi ainda avaliado o efeito do PCPA sobre animais tratados com dipirona 100 mg/kg i.p.

4.6 Quantificação de Noradrenalina, Dopamina e 5-HT no cérebro dos animais tratados com L-triptofano.

Os animais foram decapitados 30 minutos após tratamento com L-triptofano 25 ou 100 mg/kg. Foram produzidos homogenatos a 10 % em ácido perclórico (HClO_4) e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 μL do sobrenadante foi então injetada no equipamento de HPLC.

Animais tratados com dipirona 25, 50 ou 100 mg/kg ou PCPA 100 mg/kg por 3 dias também tiveram as concentrações centrais de 5-HT mensuradas.

Para a análise de 5-HT, foi utilizado um equipamento de CLAE – HPLC (Shimadzu®) com uma coluna BDS HYPERSIL C18 (comprimento de 250 mm, calibre 4,6 mm e de partícula de 5 μm) da Thermo Scientific. A fase móvel utilizada era composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico (SOS) 0,69 M, como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4 % v/v e tetrahidrofurano 1,7 % v/v. A 5-HT foi eletronicamente detectada usando um detector amperométrico (Modelo LECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl (HALLMAN; JONSSON, 1984).

4.7. Quantificação de glutamato nos córtices dos animais tratados com dipirona ou paracetamol combinado com L-triptofano

Os animais foram decapitados imediatamente após o teste de contorções. Foram avaliados os tratamentos com L-triptofano 50 mg/kg, L-triptofano 25mg/kg + dipirona 12,5 mg/kg ou L-triptofano 25 mg/kg + paracetamol 20 mg/kg. Foram feitos homogenatos a 10 % dos córtices em ácido perclórico (HClO₄) e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC.

4.8. Avaliação do bloqueio de receptores serotoninérgicos (5-HT₁; 5-HT₂; 5-HT₃) sobre o efeito sinérgico do L-triptofano com a dipirona, paracetamol ou cetoprofeno.

Para avaliar o bloqueio dos receptores 5-HTs foram realizados tratamentos intraperitoneais com Dipirona 25 mg/kg; L-triptofano 25 mg/kg + dip 25 mg/kg; Antagonista seletivo + L-trip 25 mg/kg + dip 25 mg/kg ou controles. Nestes experimentos o L-triptofano foi administrado 30 min. antes da dipirona.

NAN-190 1 mg/kg, Ritanserina, 1 mg/kg ou Ondasentron 0,75 mg/kg foram usados como antagonistas seletivos para bloquear os receptores 5-HT₁, 5-HT₂ ou 5-HT₃ respectivamente, em experimentos diferentes.

Nos experimentos com receptores 5-HTs bloqueados, em cada caso, NAN-190, Ritanserina ou Ondasentrona foram administrado intraperitonealmente 15 minutos antes do tratamento com L-triptofano. Decorridos 30 min. após o tratamento com L-triptofano foi realizado o tratamento com dipirona.

O mesmo procedimento foi realizado para a investigação do bloqueio de receptores de 5-HT sobre o efeito sinérgico envolvendo o Paracetamol 50 mg/kg ou Cetoprofeno 2,18 mg/kg.

4.9. Avaliação do bloqueio de receptores noradrenérgicos alfa-2 no efeito sinérgico do L-triptofano com o paracetamol.

Para avaliar o bloqueio dos receptores alfa foram realizados tratamentos intraperitoneais com paracetamol 50 mg/kg; L-triptofano 12,5 mg/kg + paracetamol

50 mg/kg; Ioimbina 1,5 mg/kg + L-trip 12,5 mg/kg + paracetamol 50 mg/kg ou controles. Nestes experimentos o L-triptofano foi administrado 30 min. antes do Paracetamol. A ioimbina foi usada para bloquear os receptores alfa-2.

No grupo com receptor alfa-2 bloqueado, a ioimbina foi administrada intraperitonealmente 15 minutos antes do tratamento com L-triptofano. Decorridos 30 min. após o tratamento com L-triptofano foi realizado o tratamento com Paracetamol.

4.10. Avaliação do bloqueio de receptores de melatonina (MT1 e MT2) no efeito sinérgico do L-triptofano com a dipirona

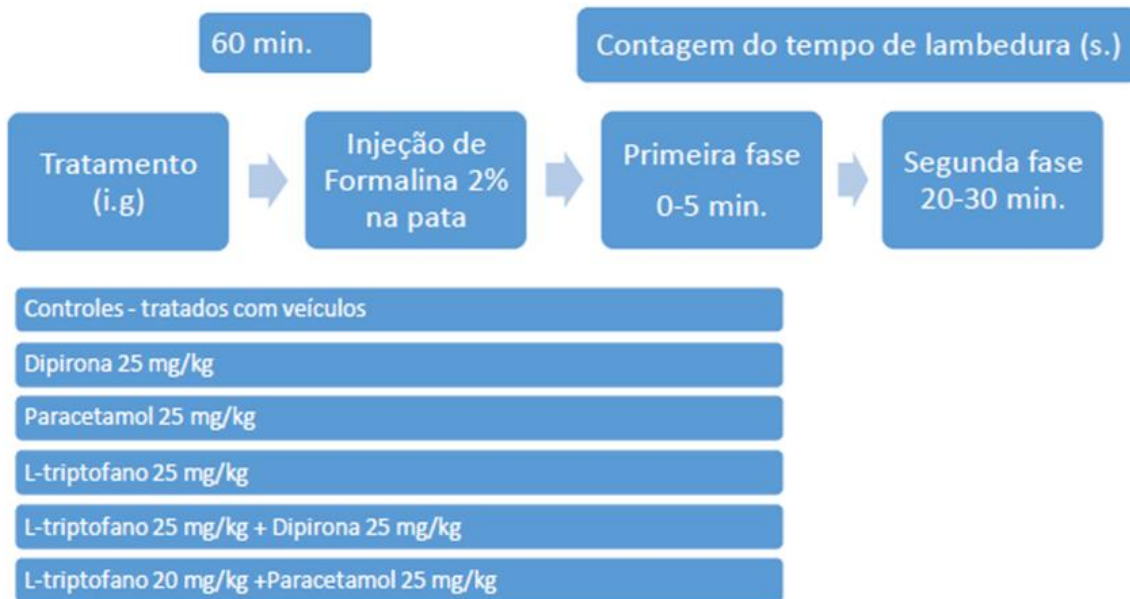
Para avaliar o bloqueio dos receptores de melatonina foram realizados tratamentos intraperitoneais com dipirona 25 mg/kg; L-triptofano 25 mg/kg + dipirona 25 mg/kg; Luzindol 10 mg/kg + L-trip 25 mg/kg + dipirona 25 mg/kg ou controles. Nestes experimentos o L-triptofano foi administrado 30 min. antes da dipirona. O Luzindol foi usado para bloquear a melatonina (*MT1* e *MT2*).

No grupo com receptor de melatonina bloqueado, o luzindol foi administrado intraperitonealmente 15 minutos antes do tratamento com L-triptofano. Decorridos 30 min. após o tratamento com L-triptofano foi realizado o tratamento com dipirona.

4.11. Teste de nocicepção induzida pela formalina.

A aplicação de solução de formalina a 2% na pata traseira direita de roedores leva a um comportamento sugestivo de dor, lambe e/ou morder a pata, bifásico, onde a primeira fase ocorre do momento da aplicação até o quinto minuto subsequente e a segunda ocorre entre o 20^o e 30^o minuto seguintes à aplicação intraplantar de formalina. Os animais foram tratados oralmente com doses não-antinociceptivas de Dipirona e Paracetamol, 25 mg/kg cada, via intragástrica, assim como tratados conjuntamente com L-triptofano 25 e 20 mg/kg, i.g., respectivamente, os tratamentos ocorreram 60 minutos antes da aplicação de formalina. O tempo de lambadura foi registrado em segundos e a redução desse tempo foi considerado como evidencia de atividade antinociceptiva (HUNSKAARS & HOLE, 1987). Foram utilizados grupos de 6-9 animais. (Figura 9).

Figura. 9. Teste de lambedura induzida pela formalina.



4.12. Teste de nocicepção térmica na placa quente.

O teste de nocicepção térmica na placa quente baseia-se no tempo de latência para a expressão de resposta ao calor, lambem a pata traseira ou pular. Este teste foi descrito por Eddy e Leimbach (1959). Neste ensaio, os animais são expostos ao calor na placa quente $55 \pm 0,5$ °C antes e nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos após o tratamento. São admitidos apenas animais com tempo de resposta ao calor de até 30 segundos, portanto, para essa triagem, os animais foram submetidos a placa quente no dia anterior ao ensaio e apenas os animais que exibiram respostas até o tempo limite foram selecionados para o experimento. Antes do teste os animais receberam inicialmente tratamentos com L-triptofano 25, 50, 100 e 200 mg/kg, i.p., ou dipirona 25, 50, 100 e 200 mg/kg, i.p. para definir doses antinociceptivas e não-antinociceptivas. Posteriormente, os animais receberam aplicações intraperitoneais de doses não-antinociceptivas de L-triptofano 30 minutos antes da aplicação via i.p. de doses não-antinociceptivas de dipirona para verificar a interação positiva dessas substâncias nesse teste.

4.13. Avaliação do efeito sinérgico do tratamento combinado de L-triptofano e dipirona ou paracetamol sobre a nocicepção induzida por capsaicina.

Os animais foram tratados intraperitonealmente com paracetamol 25 mg/kg; L-triptofano 50 mg/kg; L-trip 50 mg/kg + paracetamol 25 mg/kg; vermelho de rutênio 3 mg/kg ou controles. Quando combinado, o L-triptofano foi administrado 30 min. antes do paracetamol. Os animais foram submetidos ao teste 30 min. após os últimos tratamentos. Os controles foram tratados com veículo 30 min. antes do teste

Em outro experimento, os animais foram tratados intraperitonealmente com Dipirona 50 mg/kg; L-triptofano 50 mg/kg; L-trip 50 mg/kg + Dipirona 50 mg/kg; vermelho de rutênio 3 mg/kg ou controles.

L-triptofano foi administrado 30 min. antes da dipirona. Os animais foram submetidos ao teste 30 min. após os últimos tratamentos. Os controles foram tratados com veículo 30 min. antes do teste

Neste teste, os animais receberam injeção intraplantar de 20 µl/pata de uma solução contendo 1,6 µmols de capsaicina na pata direita traseira. Após a aplicação foi observado o tempo de lambertura durante 5 minutos. O tempo de lambertura foi utilizado como parâmetro de nocicepção/dor.

4.14. Avaliação do efeito antinociceptivo do ácido quinurênico no teste de contorções induzidos por ácido acético.

O ácido quinurênico, metabólito do L-triptofano foi testado nas doses de 6,25; 12,5; 18,5; 25 e 50 mg/kg no teste de contorções induzidas pelo ácido acético. Foram realizados tratamentos intraperitoneais 30 min. antes do teste. O teste foi realizado similarmente ao descrito anteriormente.

4.15. Avaliação do efeito sinérgico do tratamento combinado de ácido quinurênico e dipirona no teste de contorções induzidas pelo ácido acético

Para avaliar a interação sinérgica entre o ácido quinurênico e a dipirona, foram realizados intraperitonealmente tratamentos combinados com ácido quinurênico e dipirona conforme descrito na tabela a abaixo, ou controles. O ácido quinurênico foi administrado 15 minutos antes da dipirona. Subsequindo, 30 minutos após o tratamento com dipirona os animais foram submetidos ao teste de contorções induzidas pelo ácido acético, sendo contados o número de contorções durante 15 minutos, tendo uma latência de início do teste de 5 minutos, conforme descrito anteriormente.

Tabela 5. Tratamento combinado intraperitoneal com ácido quinurênico e dipirona.

Tratamento combinado (1:2)	
Ácido quinurênico	+ Dipirona
1,5625	+ 3,13 mg/kg
3,125	+ 6,25 mg/kg
6,25	+ 12,5 mg/kg
12,5	+ 25 mg/kg

4.16. Avaliação do efeito sinérgico do tratamento combinado de ácido quinurênico e paracetamol no teste de contorções induzida pelo ácido acético

Para avaliar a interação sinérgica entre o ácido quinurênico e a paracetamol, foram realizados intraperitonealmente, tratamentos combinados com ácido quinurênico e paracetamol conforme descrito na tabela a abaixo, ou controles. O ácido quinurênico foi administrado 15 minutos antes do paracetamol. Subsequentemente, 30 minutos após o tratamento com paracetamol os animais foram submetidos ao teste de contorções induzidas pelo ácido acético, sendo contados o número de contorções durante 15 minutos, tendo uma latência de início do teste de 5 minutos, conforme descrito anteriormente.

Tabela 6. Tratamento combinado intraperitoneal com ácido quinurênico e paracetamol.

Tratamento combinado (1: 4,05)	
Ácido quinurênico	+ Paracetamol
1,5625	+ 6,25 mg/kg
3,125	+ 12,5 mg/kg
6,25	+ 25 mg/kg
12,5	+ 50 mg/kg
18,5	+ 75 mg/kg

4.17. Análise dos dados e estatística

4.17.1. Análise do sinergismo entre L-triptofano e dipirona, paracetamol ou cetoprofeno no teste de contorções induzidas pelo ácido acético, curvas dose-respostas.

Após os tratamentos com dipirona (i.p. ou i.g.), paracetamol (i.p. ou i.g.) ou cetoprofeno i.p. isoladamente e em combinação de proporções fixas com o L-triptofano (i.p. ou i.g) foram calculadas as ED₅₀ desses tratamentos no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. As ED₅₀ foram calculadas por regressão não-linear das curvas dose-repostas normalizadas (soma dos quadrados extras) para o teste de contorções abdominais. A normalização neste teste foi realizada definindo como nocicepção 100% o número de contorções do grupo controle e antinocicepção 100% a ausência de contorções. As respostas aos tratamentos foram dadas em porcentagem de redução dessa nocicepção induzida pelo ácido acético em relação a média dos controles. Assim, foram geradas curvas dose-respostas normalizadas em termos de porcentagem de antinocicepção. As curvas foram, então, analisadas e as ED₅₀ dos tratamentos isolados foram comparadas com as obtidas com o tratamento combinado com o L-triptofano. A comparação das curvas (elevação e interceptos) foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA).

4.17.2. Comparações entre grupos no teste de contorções e nos testes da formalina e de lambadura

Para a comparação de grupos foi utilizada análise de variância e testes *post-hoc* (Dunnet e Student-Neumann-Keuls). Para o experimento de nocicepção térmica na placa quente os dados foram analisados por análise de variância de duas vias utilizando o teste de Bonferroni como teste *post-hoc*. Os parâmetros foram considerados diferentes quando $p < 0,05$.

4.17.3. Análise do efeito sinérgico entre ácido quinurênico e dipirona ou paracetamol.

Para a análise do efeito sinérgico entre o ácido quinurênico e dipirona ou paracetamol, foi realizada a análise isobolográfica. As ED_{50} do ácido quinurênico e dipirona ou paracetamol foram plotadas no gráfico com uma linha reta entre elas – linha de aditividade (Add). Os valores sobre essas linhas são valores teóricos de aditividade, ou seja, onde o efeito é a simples soma dos efeitos de cada uma das drogas (Tallarida et al., 2000).

$Add = (f) ED_{50}, \text{ Dipirona ou Paracetamol} + (1-f) ED_{50}, \text{ a. quinurênico}$, onde f é a fração de dipirona ou paracetamol na mistura.

As ED_{50} dos tratamentos combinados foram calculadas e comparadas com os tratamentos isolados e com os valores teóricos de aditividade a partir da equação acima (THAM et al., 2005). As variâncias dos valores teóricos calculados foram derivadas dos tratamentos isolados seguindo Raffa et al. (2010):

$$\text{Var } ED_{50} \text{ ad} = (0.5)^2 * \text{Var } ED_{50} \text{ a. quinurênico} + (0.5)^2 * \text{Var } ED_{50} \text{ Dipirona ou Paracetamol.}$$

Foi utilizado test t para comparação entre o valor teórico de aditividade das combinações e valor obtido experimentalmente.

4.17.4. Apresentação dos dados.

Para a plotagem dos gráficos foram utilizados a média e erro padrão da média (EPM) nos gráficos de coluna ou a porcentagem de redução média (porcentagem de

antinocicepção) e EPM. As ED_{50} são apresentadas juntamente com seus intervalos de confiança 95% (IC 95%). Os parâmetros foram considerados diferentes quando $p < 0,05$. Nos gráficos que mostram os efeitos dos tratamentos combinados as doses são descritas em relação a dipirona, cetoprofeno e paracetamol.

5 Resultados

5.1 Efeito do tratamento intragástrico com L-triptofano sobre a resposta nociceptiva no teste de contorções abdominais.

Efeito da administração intragástrica de L-triptofano ou dipirona sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos. Neste teste, a administração de L-triptofano não altera a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético quando comparado ao controle (tratados com solução salina) nas doses avaliadas (25; 50; 100 e 200 mg/kg, i.p.), não exercendo efeito antinociceptivo.

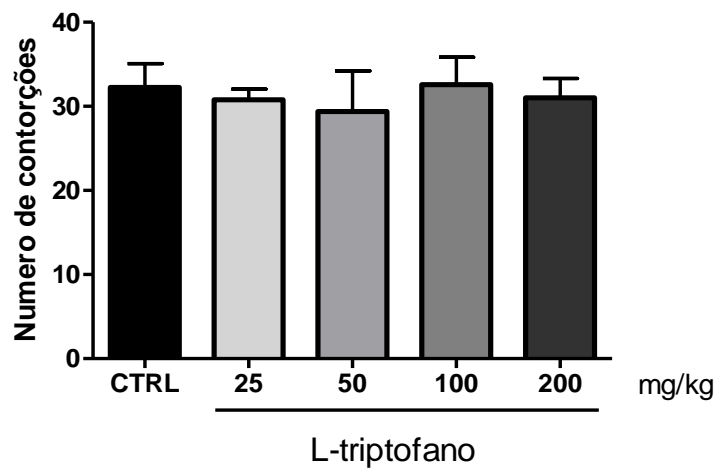


Fig. 10. Efeito da administração intragástrica de L-triptofano (25 – 200 mg/kg) sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos. CTRL (Controles) representa animais tratados com salina. O gráfico mostra a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs CTRL (ANOVA, seguido de Student-Newmann-Keuls como *post hoc*).

5.2 Efeito do tratamento intragástrico com dipirona ou paracetamol sobre a resposta nociceptiva no teste de contorções abdominais

Efeito da administração intragástrica de dipirona (A) ou paracetamol (B) sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos. Neste teste, a administração de dipirona altera a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético quando comparado ao controle (CTRL - tratados com solução salina) nas doses acima de 175 mg/kg, i.g., exercendo efeito antinociceptivo nessas doses. O tratamento com paracetamol nas doses acima de 200 mg/kg, i.g., altera a resposta nociceptiva do animal ao ácido acético, reduzindo a média do número de contorções em relação ao controle.

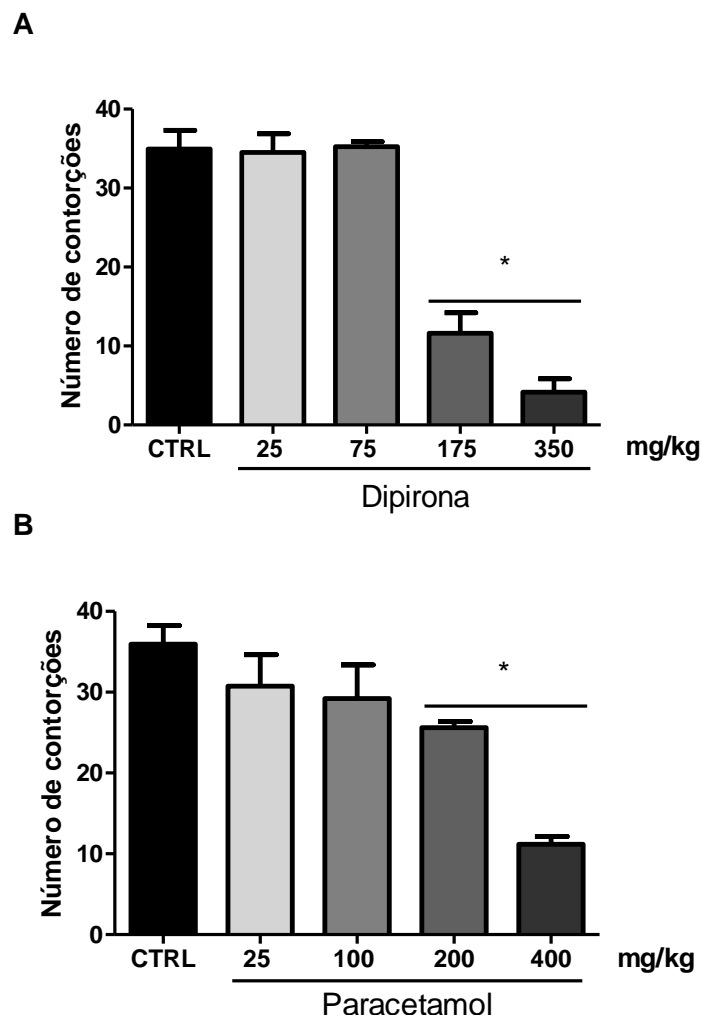
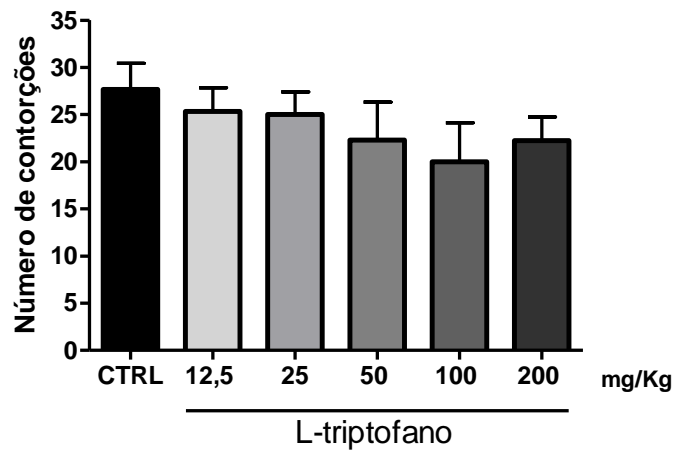


Fig. 11. Efeito da administração intragástrica de Dipirona, A, (25 – 350 mg/kg) e paracetamol, B, (25 – 400 mg/kg) sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos. CTRL representa o controle com animais tratados com salina. O gráfico mostra a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs CTRL (ANOVA, seguido de Student-Newmann-Keuls como *post hoc*).

5.3 Efeito do tratamento intraperitoneal com L-triptofano ou dipirona sobre a resposta nociceptiva no teste de contorções abdominais

Efeito da administração intraperitoneal de L-triptofano ou dipirona sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos. Neste teste, a administração de L-triptofano não altera a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético quando comparado ao controle (tratados com solução salina) nas doses avaliadas (12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg, i.p.), não exercendo efeito antinociceptivo (A). De outra forma, o tratamento com dipirona nas doses avaliadas, 100 e 200 mg/kg, i.p., altera a resposta nociceptiva do animal ao ácido acético, reduzindo a média do número de contorções em relação ao controle de $24,31 \pm 2,88$, para $7,00 \pm 0,843$ e $5,33 \pm 1,245$ respectivamente (B).

A



B

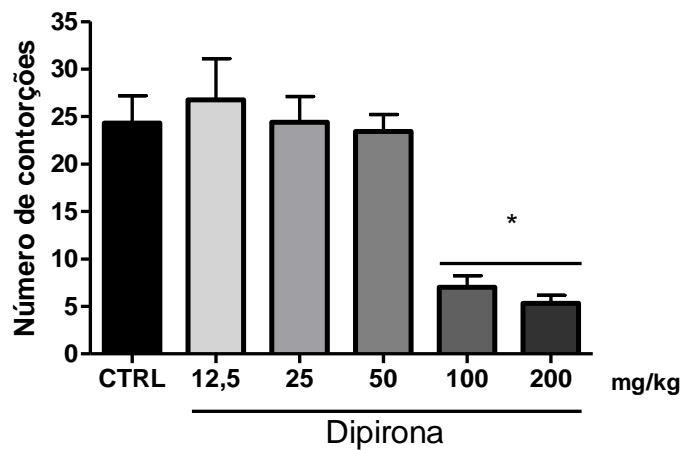
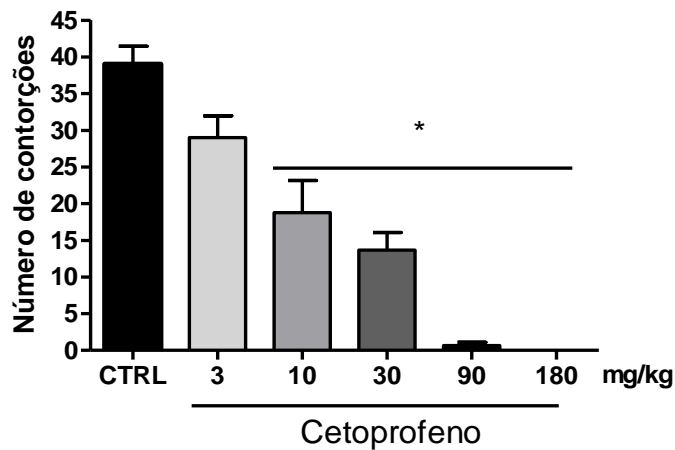


Fig. 12. Efeito da administração intraperitoneal de L-triptofano, A, (12,5 – 200 mg/kg) e dipirona, B, (12,5 – 200 mg/kg) sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos. CTRL (Controles) representa animais tratados com salina. O gráfico mostra a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs CTRL (ANOVA, seguido de Student-Newmann-Keuls como *post hoc*).

5.4. Efeito do tratamento intraperitoneal com cetoprofeno ou paracetamol sobre a resposta nociceptiva no teste de contorções abdominais

Efeito da administração intraperitoneal de cetoprofeno ou paracetamol sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos. Neste teste, a administração de cetoprofeno foi capaz de diminuir a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético quando comparado ao controle (tratados com solução salina) nas doses de 10, 30, 90 e 180 mg/kg, exercendo, essas doses, efeito antinociceptivo (A). Da mesma forma, o tratamento com paracetamol nas doses avaliadas, 50, 75, 150 e 300 mg/kg, altera a resposta nociceptiva do animal ao ácido acético, reduzindo a média do número de contorções em relação ao controle. (B)

A



B

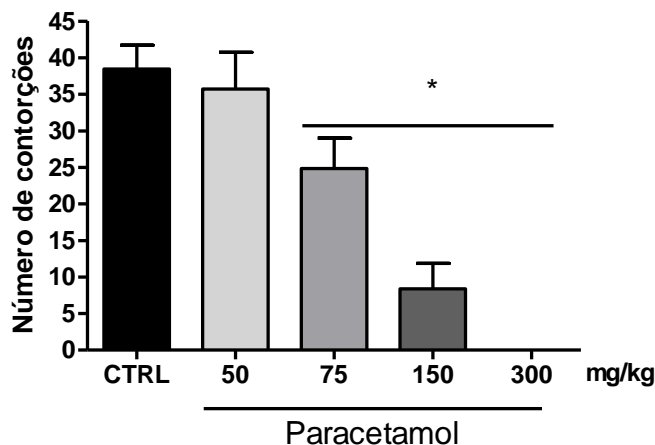


Fig. 13. Efeito da administração intraperitoneal de cetoprofeno, A, (3 – 180 mg/kg) e paracetamol, B, (50 – 300 mg/kg) sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos. CTRL representa o controle com animais tratados com salina. O gráfico mostra a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs CTRL (ANOVA, seguido de Student-Newmann-Keuls como *post hoc*).

5.5 Dose-resposta do efeito antinociceptivo do tratamento intragástrico com dipirona isoladamente e conjuntamente com L-triptofano

Curva dose-resposta do efeito antinociceptivo produzido pelo tratamento com dipirona i.g. isoladamente e conjuntamente com L-triptofano (i.g., na mesma administração) na proporções de 1:1,4, 1h antes do experimento. A análise da regressão mostra que as curvas são diferentes para o tratamento isolado e em associação caracterizando um efeito sinérgico, ou supra aditivo. A dose necessária para obtenção de 50% da resposta máxima (ED_{50}) foi calculada em 128,7 (92,78 – 178,6) mg/kg enquanto a ED_{50} para a dipirona administrada conjuntamente com L-triptofano na razão de 1:1,4 foi de 33,30 (28,05 – 39,54) mg/kg. Demonstrando uma importante redução neste parâmetro.

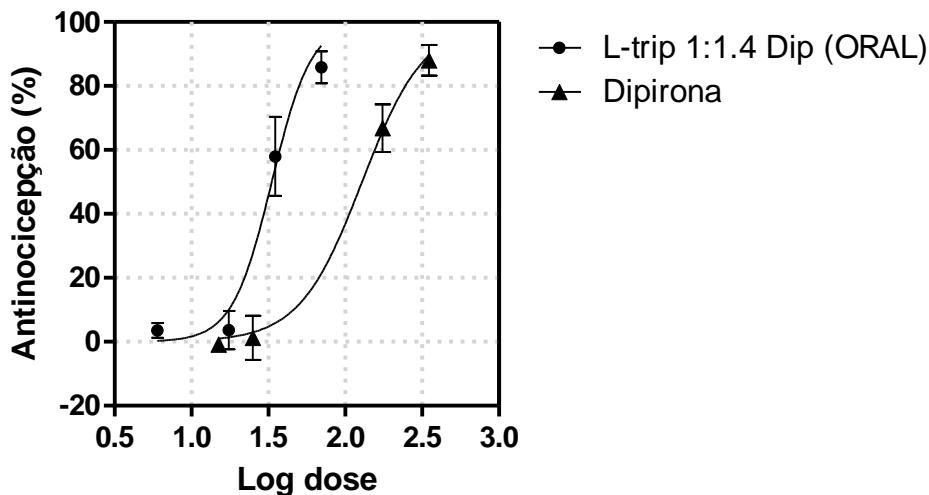


Fig. 14. A curva mostra a regressão para a relação dose resposta da dipirona isolada e em associação com o L-triptofano. Os dados mostrados são as médias da porcentagem de redução no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (antinociceção %) \pm E.P.M em comparação com a média dos animais controles.

Tabela. 7. Valores de ED_{50} para tratamento isolado e combinado com dipirona e L-triptofano.

Tratamento	Razão	ED_{50} (mg/kg)
Dipirona	-	128,7 (92,78 – 178,6)
L-trip + Dipirona	1:1,4	33,30 (28,05 – 39,54)*

Tabela 7. Dose necessária para reduzir em 50% o número de contorções induzidas pelo ácido acético em comparação com grupos controles (ED_{50}). O tratamento conjunto com L-triptofano reduz a ED_{50} quando comparado ao tratamento com dipirona isolado. Os dados são expressos como ED_{50} (IC 95%). * $p < 0,05$ vs Dipirona (ANOVA, Soma de quadrados extra – F teste)

5.6. Dose-resposta do efeito antinociceptivo do tratamento intragástrico com paracetamol isoladamente e conjuntamente com L-triptofano

Curva dose-resposta do efeito antinociceptivo produzido pelo tratamento com paracetamol i.g. isoladamente e conjuntamente com L-triptofano (i.g., na mesma administração) na proporções de 1:1,5, 1h antes do experimento. A análise da regressão mostra que as curvas são diferentes para o tratamento isolado e em associação caracterizando um efeito sinérgico, ou supra aditivo. A dose necessária para obtenção de 50% da resposta máxima (ED_{50}) com paracetamol isolado foi calculada em 281 (204,1 – 387,0) mg/kg enquanto a ED_{50} para o paracetamol administrado conjuntamente com L-triptofano na razão de 1:1,5 foi de 50,99 (41,96 – 61,96) mg/kg. Demonstrando uma importante redução neste parâmetro.

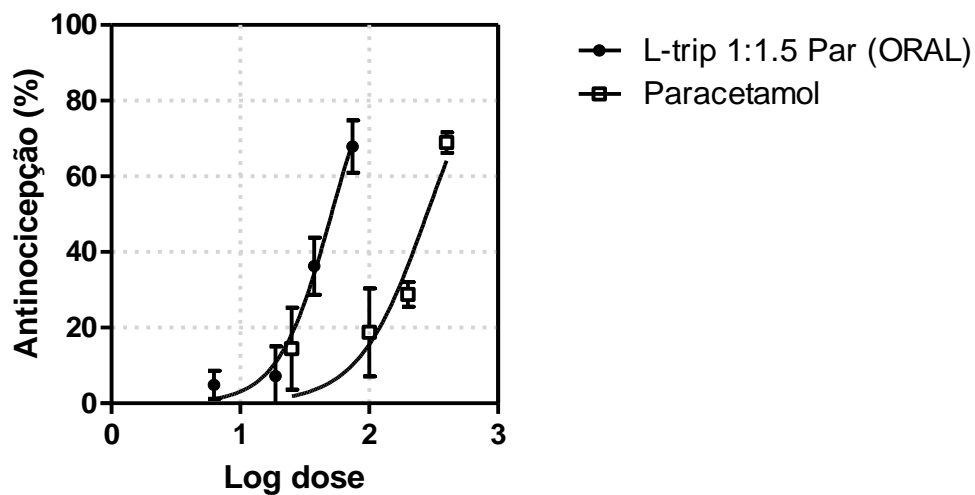


Fig. 15. A curva mostra a regressão para a relação dose resposta do paracetamol isolado e em associação com o L-triptofano. Os dados mostrados são as médias da porcentagem de redução no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (antinociceção %) ± E.P.M em comparação com a média dos animais controles.

Tabela. 8 Valores de ED_{50} para tratamento isolado e combinado com dipirona e L-triptofano.

Tratamento	Razão	ED_{50} (mg/kg)
Paracetamol	-	308.1 (256.1–370.8)
L-trip + Paracetamol	1:1,5	50,99 (41,96,– 61,96)*

Tabela 8. Dose necessária para reduzir em 50% o número de contorções induzidas pelo ácido acético em comparação com grupos controles (ED_{50}). O tratamento conjunto com L-triptofano reduz a ED_{50} quando comparado ao tratamento com paracetamol isolado. Os dados são expressos como ED_{50} (IC 95%). * $p < 0,05$ vs Dipirona (ANOVA, Soma de quadrados extra – F teste)

5.7 Dose-resposta do efeito antinociceptivo do tratamento com dipirona isoladamente e combinado com L-triptofano

Curva dose-resposta do efeito antinociceptivo produzido pelo tratamento com dipirona isoladamente e em combinação (tratamento prévio) com L-triptofano em proporções de 1:1 e 2:1. A análise da regressão mostra que as curvas são diferentes para o tratamento isolado e em associação caracterizando um efeito sinérgico, ou supra aditivo. A dose necessária para obtenção de 50% da resposta máxima (ED_{50}) foi calculada em 91,20 (77.39 - 95.78) mg/kg enquanto a ED_{50} para a dipirona associada ao tratamento prévio com L-triptofano na razão de 1:1 e 2:1 foi de 30,90 (21,33-42,56) e 18,07 (9,21-25,94), respectivamente. Demonstrando uma importante redução neste parâmetro.

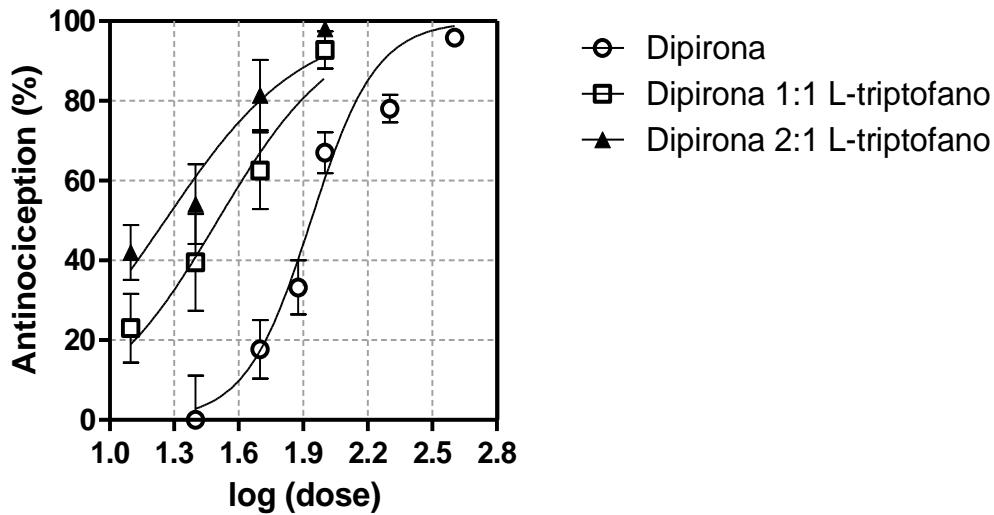


Fig. 16. A curva mostra a regressão para a relação dose resposta da dipirona isolada e em associação com o L-triptofano. Os dados mostrados são as médias da porcentagem de redução no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (antinociceção %) \pm E.P.M em comparação com a média dos animais controles.

Tabela 9. Valores de ED_{50} para tratamento isolado e combinado com dipirona e L-triptofano.

Tratamento	Razão	ED_{50} (mg/kg)
Dipirona	-	91,20 (77.39 - 95.78)
L-triptofano + Dipirona	1:1	30,90 (23.10- 43,56)*
L-triptofano + Dipirona	1:2	18,07 (13,25- 24,67)*

Tabela 9. Dose necessária para reduzir em 50% o número de contorções induzidas pelo ácido acético em comparação com grupos controles(ED_{50}). Os tratamentos prévios com L-triptofano reduzem as ED_{50} quando comparados com o tratamento com dipirona isolado. Os dados são expressos como ED_{50} (IC 95%). * $p < 0,05$ vs Dipirona (ANOVA, Soma de quadrados extra – F teste)

5.8 Dose-resposta do efeito antinociceptivo do tratamento com cetoprofeno isoladamente e combinado com L-triptofano

Curva dose-resposta do efeito antinociceptivo produzido pelo tratamento com cetoprofeno isoladamente e em combinação (tratamento prévio) com L-triptofano na proporção de 1:5,73. A análise da regressão mostra que as curvas são diferentes para o tratamento isolado e em associação caracterizando um efeito sinérgico, ou supra aditivo. A dose necessária para obtenção de 50% da resposta máxima (ED_{50}) foi calculada em 10,25 (6,73-15,61) mg/kg para o cetoprofeno, enquanto a ED_{50} para cetoprofeno associada ao tratamento prévio com L-triptofano na razão de 1:5,73 foi de 2,09 (1,355 to 3,224) mg/kg. Demonstrando uma importante redução neste parâmetro.

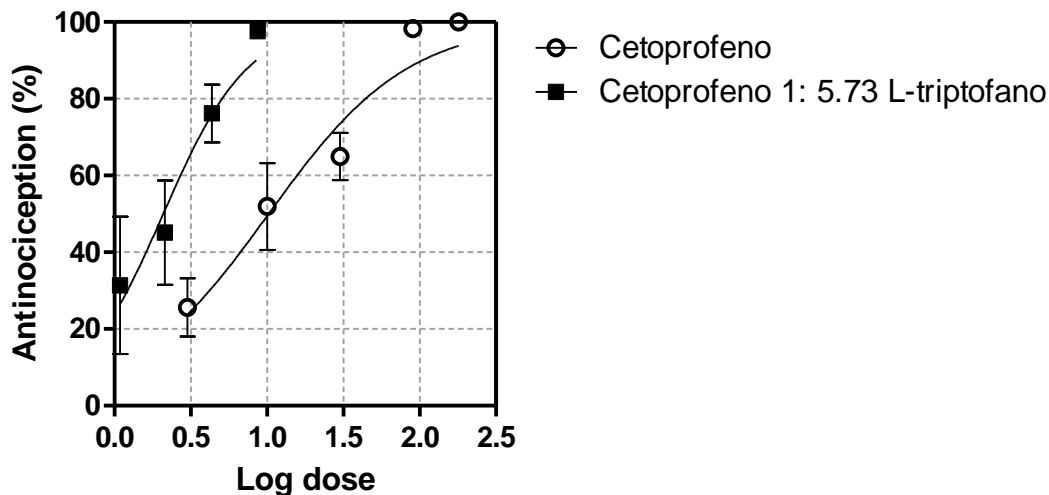


Fig. 17. A curva mostra a regressão para a relação dose resposta do cetoprofeno isolado e em associação com o L-triptofano. Os dados mostrados são as médias da porcentagem de redução no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (antinociceção %) \pm E.P.M em comparação com a média dos animais controles.

Tabela 10. Valores de ED_{50} para tratamento isolado e combinado com cetoprofeno e L-triptofano.

Tratamento	Razão	ED_{50} (mg/kg)
Cetoprofeno	-	10,25 (6,729 - 15,61)
L-triptofano + Cetoprofeno	5,7:1	2,09 (1,355 - 3,22)*

Tabela 10. Dose necessária para reduzir em 50% o número de contorções induzidas pelo ácido acético em comparação com grupos controles (ED_{50}). Os tratamentos prévios com L-triptofano reduzem as ED_{50} quando comparados com o tratamento com cetoprofeno isolado. Os dados são expressos como ED_{50} (IC 95%). * $p < 0,05$ vs Cetoprofeno (ANOVA, Soma de quadrados extra – F teste)

5.9 Dose-resposta do efeito antinociceptivo do tratamento com paracetamol isoladamente e combinado com L-triptofano

Curva dose-resposta do efeito antinociceptivo produzido pelo tratamento com paracetamol isoladamente e em combinação (tratamento prévio) com L-triptofano na proporção de 4,12:1. A análise da regressão mostra que as curvas são diferentes para o tratamento isolado e em associação caracterizando um efeito sinérgico, ou supra aditivo. A dose necessária para obtenção de 50% da resposta máxima (ED_{50}) foi calculada em 96,18 (76,23-121,3) mg/kg enquanto a ED_{50} para o paracetamol associada ao tratamento prévio com L-triptofano na razão de 4,12:1 foi de 47,30 (34,00-65,82). Demonstrando uma importante redução neste parâmetro.

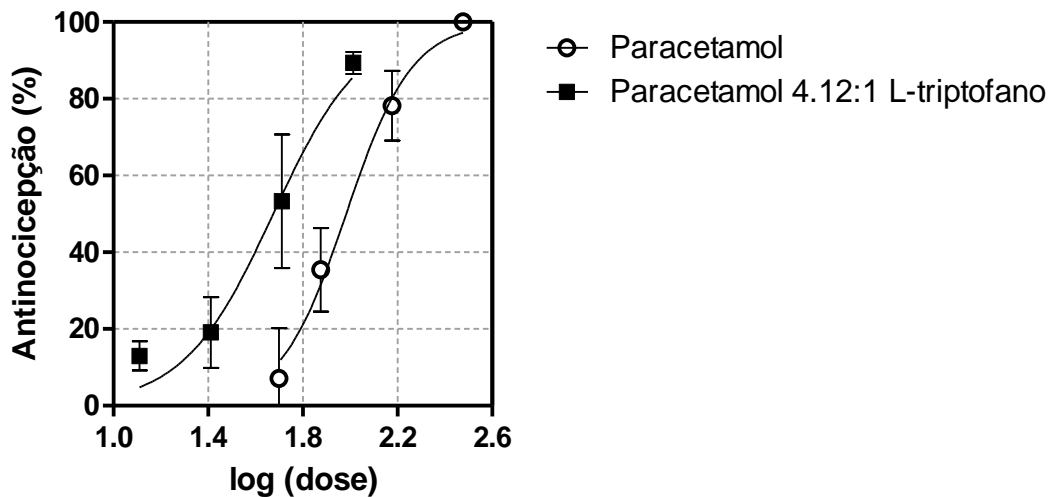


Fig. 18. A curva mostra a regressão para a relação dose resposta do paracetamol isolado e em associação com o L-triptofano. Os dados mostrados são as médias da porcentagem de redução no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (antinociceção %) \pm E.P.M em comparação com a média dos animais controles.

Tabela. 11. Valores de ED_{50} para tratamento isolado e combinado com cetoprofeno e L-triptofano.

Tratamento	Razão	ED_{50} (mg/kg)
Paracetamol	-	96,18 (76.23 - 121.3)
L-triptofano + Paracetamol	1:4,12	47,30 (34.00 - 65.82)*

Tabela 11. Dose necessária para reduzir em 50% o número de contorções induzidas pelo ácido acético em comparação com grupos controles (ED_{50}). Os tratamentos prévios com L-triptofano reduzem as ED_{50} quando comparados com o tratamento com paracetamol isolado. Os dados são expressos como ED_{50} (IC 95%). * $p < 0,05$ vs paracetamol (ANOVA)

5.10 Efeito do tratamento combinado de L-triptofano e dipirona sobre a resposta nociceptiva no teste de contorções abdominais

O tratamento combinado produz resposta antinociceptiva ao reduzir o número de contorções induzido por ácido acético comparado com controle nas doses avaliadas descritas nas fig. 19. O tratamento combinado causa uma redução no número de contorções, desde combinações de 1/8 da dose efetiva de dipirona, 12,5 mg/kg ($18,71 \pm 2,46$), em comparação com controles ($28,48 \pm 2,419$).

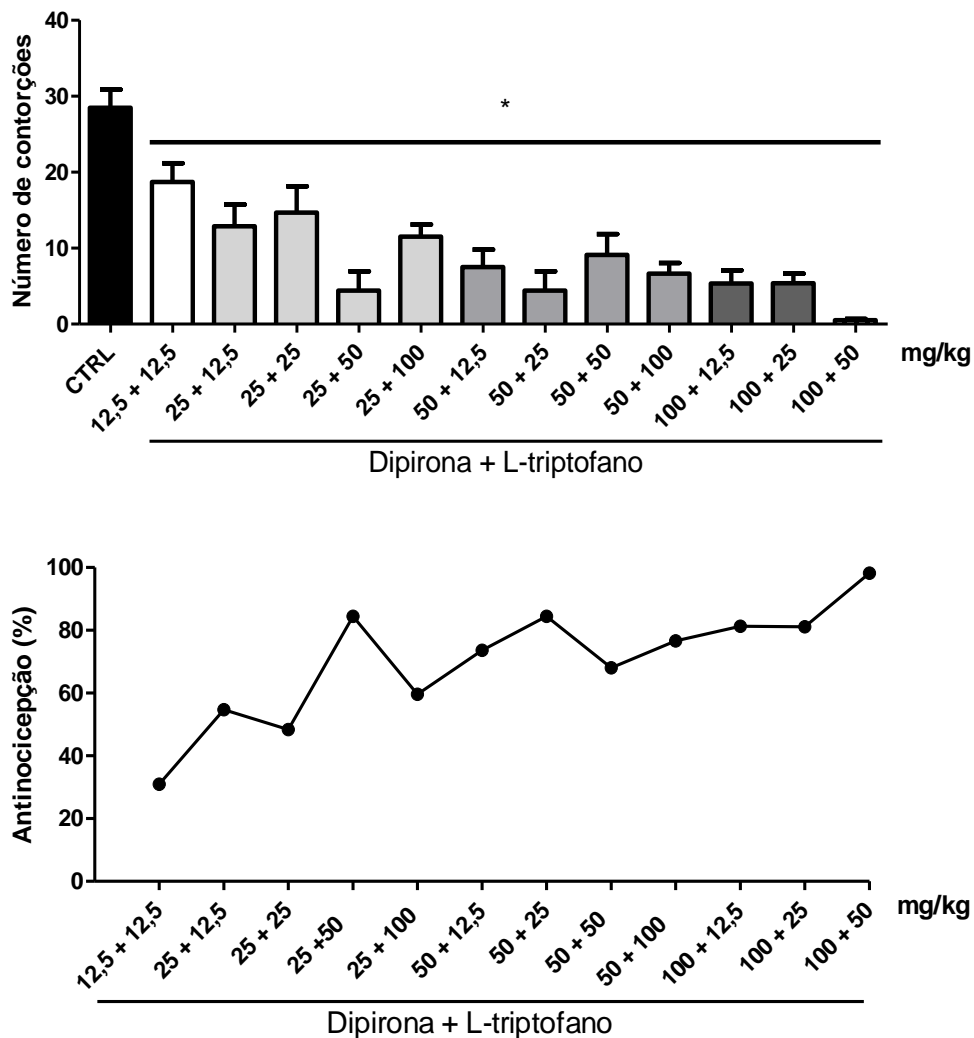
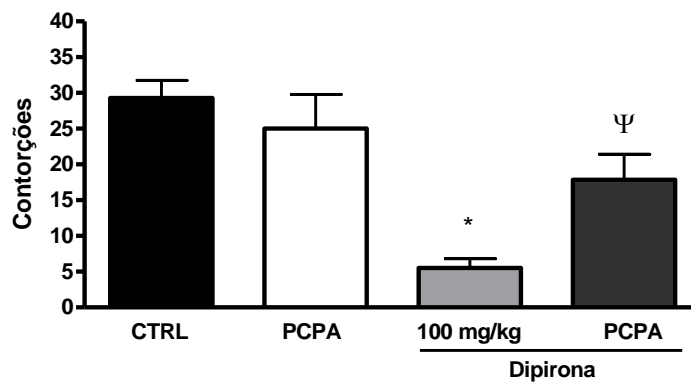


Fig. 19. Efeito do tratamento combinado de L-triptofano e dipirona sobre a resposta antinociceptiva no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O gráfico cima mostra que todas as combinações exibem médias do número de contorções menores que os animais não tratados controles (CTRL) ($p < 0,05$). Dados expressos como média \pm E.P.M. O gráfico abaixo mostra a porcentagem de redução no número de contorções associados a cada combinação em comparação com os controles. * $p < 0,05$ vs CTRL; ANOVA, teste de múltiplas comparações de Dunnet)

5.11. Influência da depleção de serotonina no efeito antinociceptivo do tratamento combinado de L-triptofano e dipirona no teste de contorções abdominais

A depleção de 5-HT (via tratamento com PCPA) antagoniza a atividade antinociceptiva da dipirona em dose efetiva isoladamente (100 mg/kg) (A). A depleção de 5-HT nos animais tratados aumenta o número de contorções ($17,83 \pm 3,59$) em relação ao tratamento com dipirona isolado ($5,50 \pm 1,32$), no entanto, o número de contorções é significativamente menor que a média dos controles ($29,29 \pm 2,45$). A depleção de 5-HT pelo PCPA bloqueia parcialmente o efeito antinociceptivo do tratamento combinado com L-triptofano *plus* dipirona, 50 mg/kg cada, ($20,33 \pm 3,35$). O tratamento prévio com PCPA bloqueia parcialmente o efeito antinociceptivo da associação L-triptofano 50 mg/kg + Dipirona 100 mg/kg, sendo a resposta antinociceptiva menor que o tratamento sem PCPA ($0,43 \pm 0,20$) e maior que os controle (B).

A



B

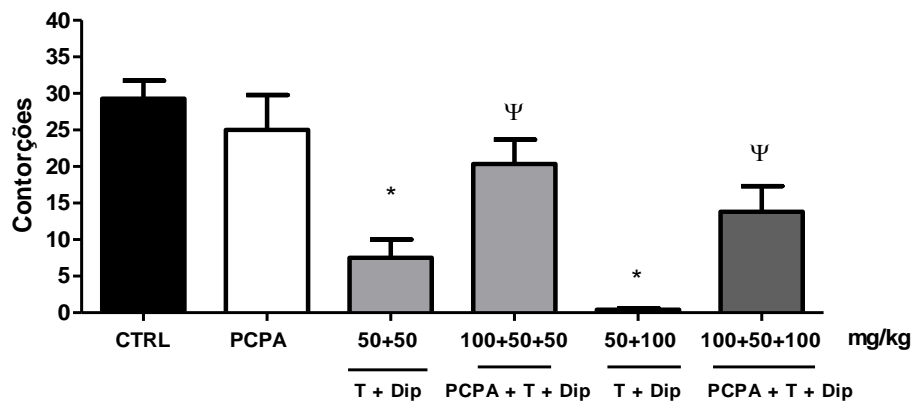
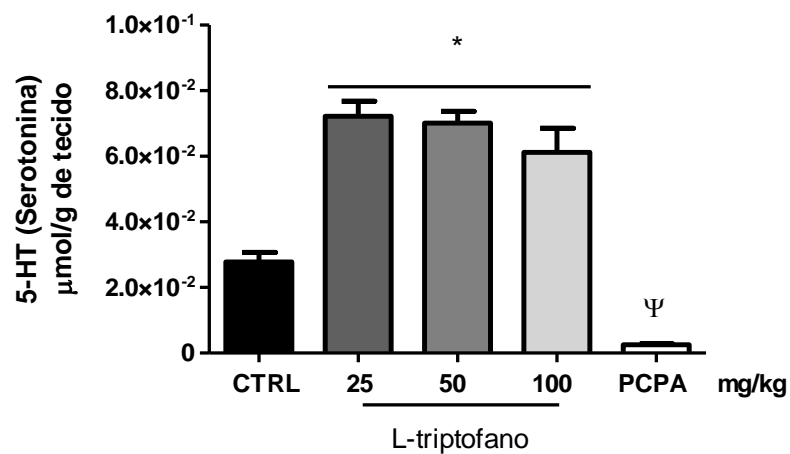


Fig. 20. Efeito da depleção de 5-HT sobre o efeito antinociceptivo do L-triptofano(T), Dipirona (Dip) e combinação. Os dados são apresentados como Média ± E.P.M. * $p < 0,05$ vs Controle(CTRL); $\Psi p < 0,05$ vs Controle e tratamentos sem PCPA (p-Cloro-fenilalanina). (ANOVA, seguido de teste de múltiplas comparações de Dunnet).

5.12 Efeito do tratamento com L-triptofano e dipirona sobre a concentração central de 5-HT em cérebro total

O tratamento com L-triptofano aumenta a concentração de 5-HT no cérebro de animais em comparação aos controles ($0,028 \pm 0,0030 \mu\text{mol/g}$ de tecido) nas doses de 25 mg/kg à 100 mg/kg ($0,072 \pm 0,0046$ e $0,061 \pm 0,0074$, respectivamente). O tratamento com PCPA(p-clorofenilalanina) por 100 mg/kg por 4 dias seguidos depleta o cérebro de 5-HT ($0,0026 \pm 0,0002205 \mu\text{mol/g}$ de tecido) (A). Na parte de baixo da figura é mostrada a capacidade da dipirona de aumentar a concentração de 5-HT na dose de 100 mg/kg, dose antinociceptiva. ($0,07705 \pm 0,0221 \mu\text{mol/g}$ de tecido) (B).

A



B

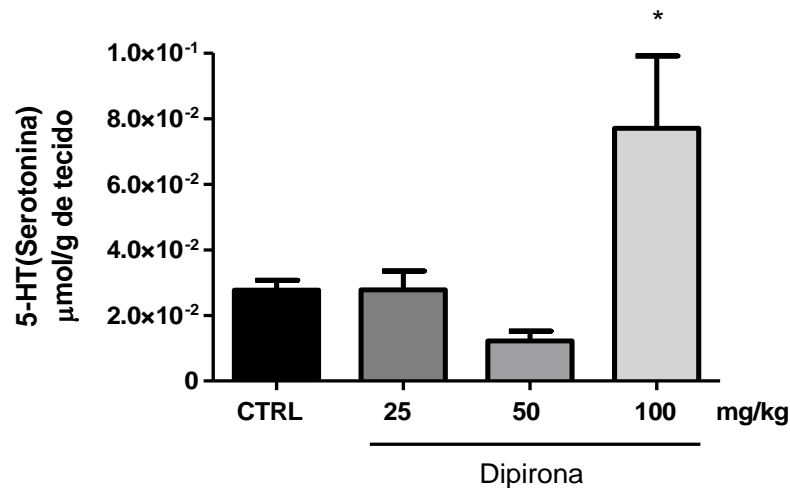
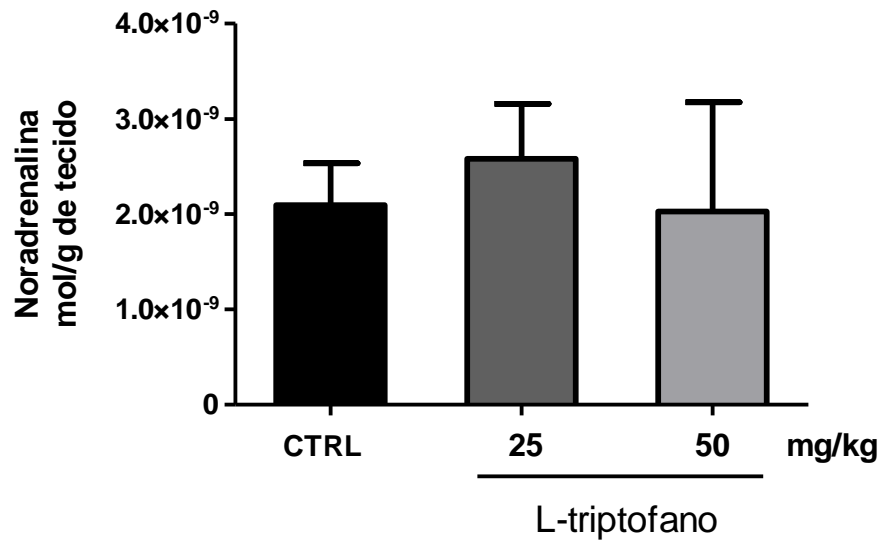


Fig. 21. Efeito do tratamento com L-triptofano e Dipirona sob a concentração de 5-HT. Os dados são mostrados como média \pm E.P.M *p, $\Psi < 0,05$ vs Controle(CTRL) (ANOVA, seguido de Student-Neumann-Keuls).

5.13. Efeito do tratamento com L-triptofano sobre as concentrações centrais de noradrenalina e dopamina em cérebro total

O tratamento com L-triptofano não altera as concentração de noradrenalina (A) ou dopamina (B) nos cérebro de animais em comparação aos controles nas doses de 25 mg/kg e 50 mg/kg.

A



B

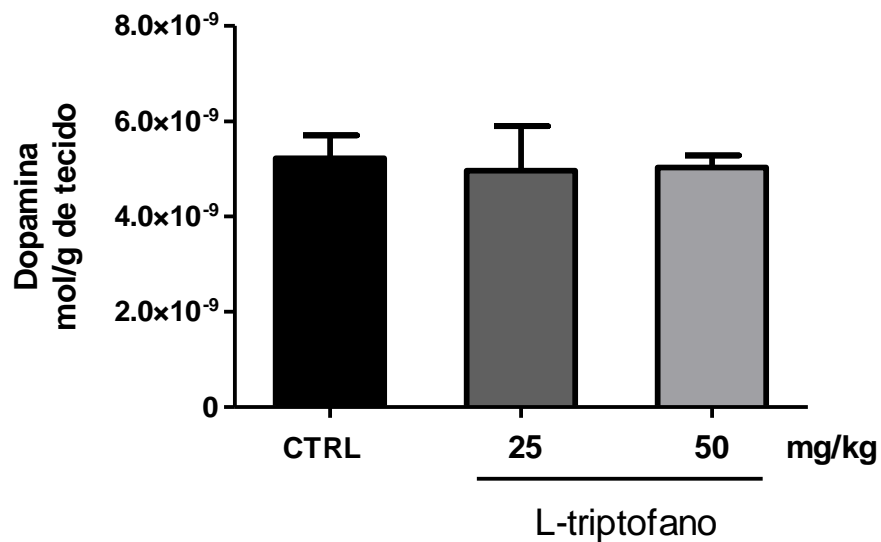


Fig. 22. Efeito do tratamento com L-triptofano sob as concentrações de noradrenalina (A) e dopamina (B). Os dados são mostrados como média \pm E.P.M.

5.14. Efeito do tratamento com Paracetamol e Dipirona combinado com L-triptofano sobre as concentrações corticais de glutamato nos animais submetidos ao teste de contorção abdominal

O tratamento combinado com paracetamol e dipirona com L-triptofano (25 mg/kg) diminui a concentração de glutamato no córtex de animais em comparação aos controles nas doses de 25 mg/kg e 50 mg/kg.

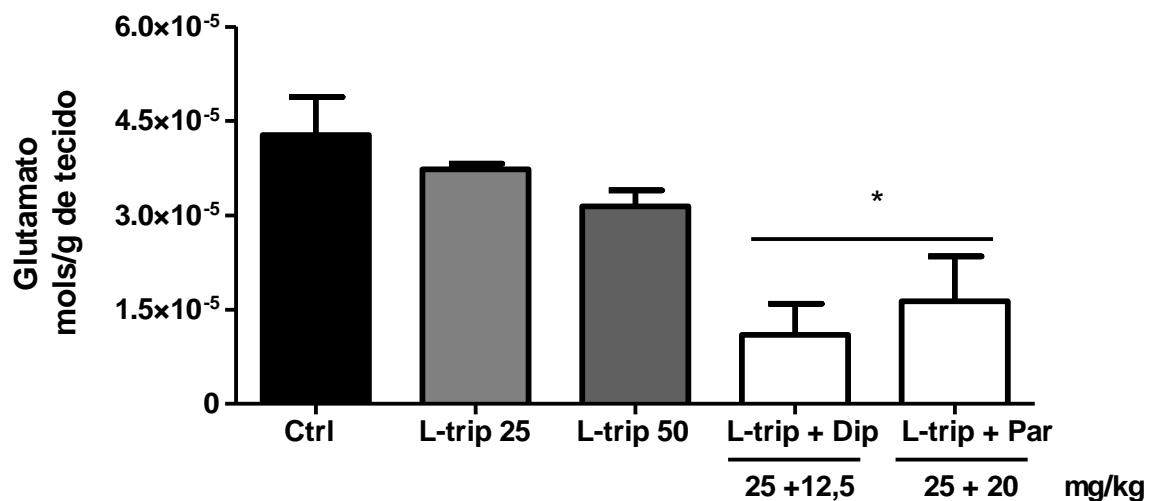


Fig. 23. Efeito do tratamento combinado com paracetamol e dipirona com L-triptofano sob as concentrações corticais de glutamato. Os dados são mostrados como média \pm E.P.M * $p < 0,05$ vs Controle(CTRL) (ANOVA, seguido de Student-Neumann-Keuls).

5.15. Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT₃ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com a dipirona no teste de contorções induzidos pelo ácido acético.

O tratamento com ondasetrona 0,75 mg/kg, antagonista de receptores de Serotonina 5-HT₃, não altera o efeito sinérgico da associação de L-triptofano 25 mg/kg, i.p. 30 minutos antes da dipirona 25 mg/kg, i.p. O número de contorções é igual entre os grupos tratados com ondasetrona 15 minutos antes de receberem L-triptofano 25 mg/kg, i.p. e dipirona 25 mg/kg ($16,50 \pm 3,65$) i.p., e não pré-tratados com ondasetrona ($16,25 \pm 4,47$). Ambos diferentes do controle ($32,10 \pm 2,48$).

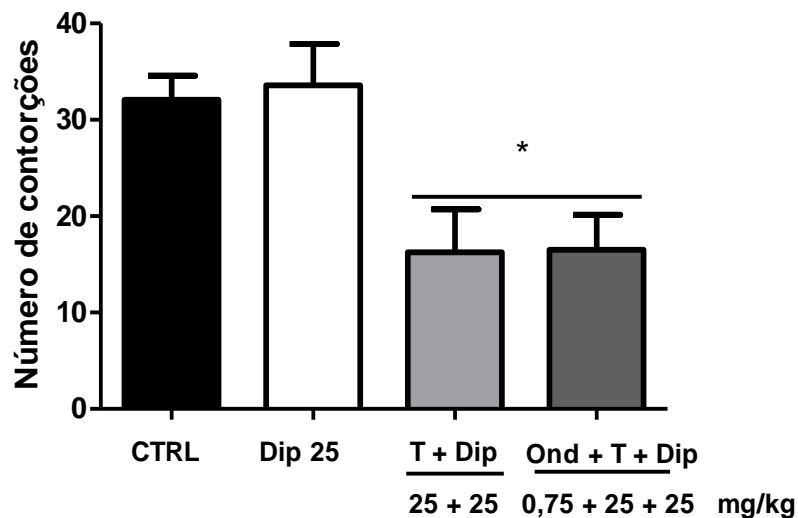


Fig. 24. Efeito do tratamento prévio com Ondasetrona (Ond) na dose de 0,75 mg/kg sobre o efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano 25 mg/kg, i.p. (T) 30 minutos antes da administração de dipirona 25 mg/kg, i.p. (Dip). Os dados são mostrados como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ vs Controle(CTRL) (ANOVA, seguido de Student-Neumann-Keuls)

5.16 Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT₃ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com paracetamol no teste de contorções induzidos pelo ácido acético.

O tratamento com ondasetrona 0,75 mg/kg, antagonista de receptores de Serotonina 5-HT₃, não altera o efeito sinérgico da associação de L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. 30 minutos antes da administração de paracetamol 50 mg/kg, i.p. O número de contorções é igual entre os grupos tratados com ondasetrona 15 minutos antes de receberem L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. e paracetamol 50 mg/kg (13,60 ± 1,78) i.p., e não pré-tratados com ondasetrona (12,33 ± 4,79). Ambos diferentes do controle (30,60 ± 2,43).

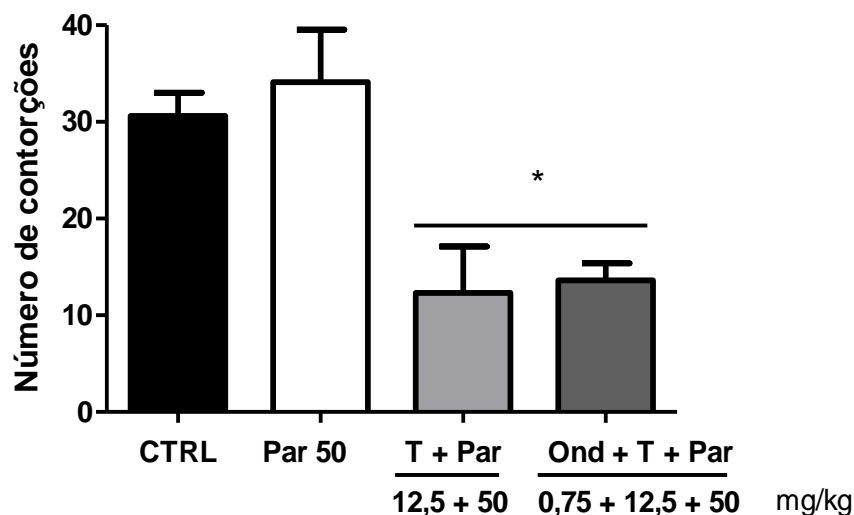


Fig 25. Efeito do tratamento prévio com Ondasetrona (Ond) na dose de 0,75 mg/kg sobre o efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. (T) 30 minutos antes da administração de paracetamol 50 mg/kg, i.p. (Par). Os dados são mostrados como média ± E.P.M. *p<0,05 vs Controle(CTRL) (ANOVA, seguido de Student-Neumann-Keuls)

5.17 Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT₃ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com cetoprofeno no teste de contorções induzidos pelo ácido acético

O tratamento com ondasetrona 0,75 mg/kg, antagonista de receptores de Serotonina 5-HT₃, não altera o efeito sinérgico da associação de L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. 30 minutos antes da administração de cetoprofeno 2,18 mg/kg, i.p. O número de contorções é igual entre os grupos tratados com ondasetrona 15 minutos antes de receberem L-triptofano 25 mg/kg, i.p. e dipirona 25 mg/kg (18,40 ± 2,90) i.p., e não pré-tratados com ondasetrona (15,86 ± 3,22). Ambos diferentes do controle (29,64 ± 1,88).

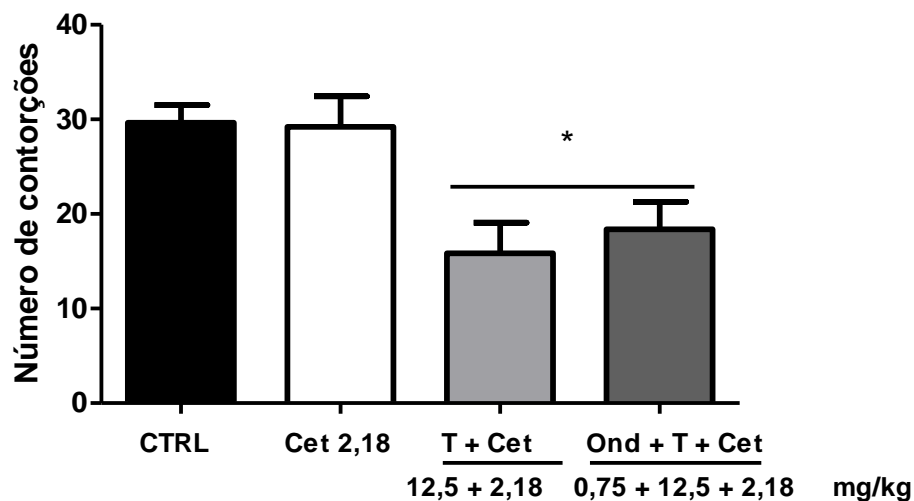


Fig. 26. Efeito do tratamento prévio com Ondasetrona (Ond) na dose de 0,75 mg/kg sobre o efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. (T) 30 minutos antes da administração de cetoprofeno 2,18 mg/kg, i.p. (Cet). Os dados são mostrados como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ vs Controle(CTRL) (ANOVA, seguido de Student-Neumann-Keuls)

5.18 Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT₂ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com a dipirona no teste de contorções induzidos pelo ácido acético

O tratamento com Ritanserina 1 mg/kg, antagonista de receptores de Serotonina 5-HT₂, não altera o efeito sinérgico da associação de L-triptofano 25 mg/kg, i.p. 30 minutos antes da dipirona 25 mg/kg, i.p. O número de contorções é igual entre os grupos tratados com ritanserina 15 minutos antes de receberem L-tripfano 25 mg/kg, i.p. e dipirona 25 mg/kg ($16,83 \pm 3,33$) i.p., e não pré-tratados com ritanserina ($16,50 \pm 5,73$). Ambos diferentes do controle ($35,82 \pm 2,85$).

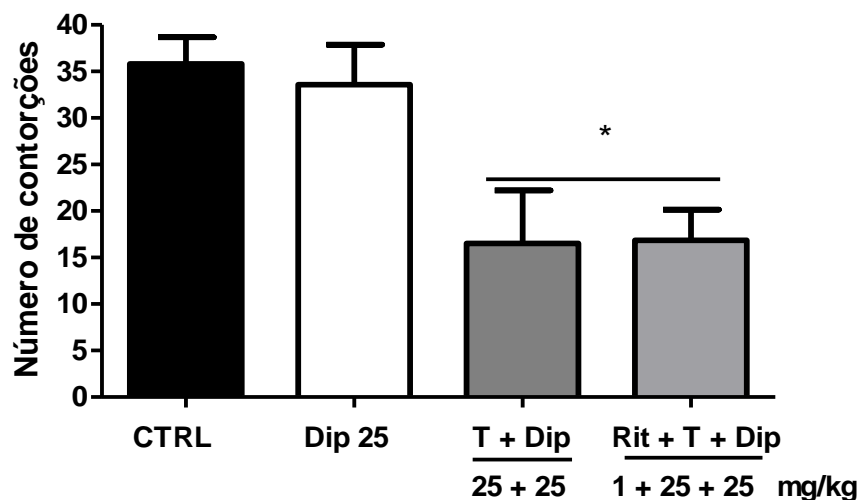


Fig. 27. Efeito do tratamento prévio com ritanserina (Rit) na dose de 1 mg/kg no efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano 25 mg/kg, i.p. (T) 30 minutos antes da administração de dipirona 25 mg/kg, i.p. (Dip). Os dados são mostrados como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ vs Controle(CTRL) (ANOVA, seguido de Student-Neumann-Keuls)

5.19 Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT₂ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com a paracetamol no teste de contorções induzidos pelo ácido acético

O tratamento com Ritanserina 1 mg/kg, antagonista de receptores de Serotonina 5-HT₂, não altera o efeito sinérgico da associação de L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. 30 minutos antes do paracetamol 50 mg/kg, i.p. O número de contorções é igual entre os grupos pré-tratados com ritanserina 15 minutos antes de receberem L-tripfano 12,5 mg/kg, i.p. e paracetamol 50 mg/kg ($20,38 \pm 4,09$), i.p., e não pré-tratados com ritanserina ($12,33 \pm 4,78$). Ambos diferentes do controle. ($35,82 \pm 2,85$).

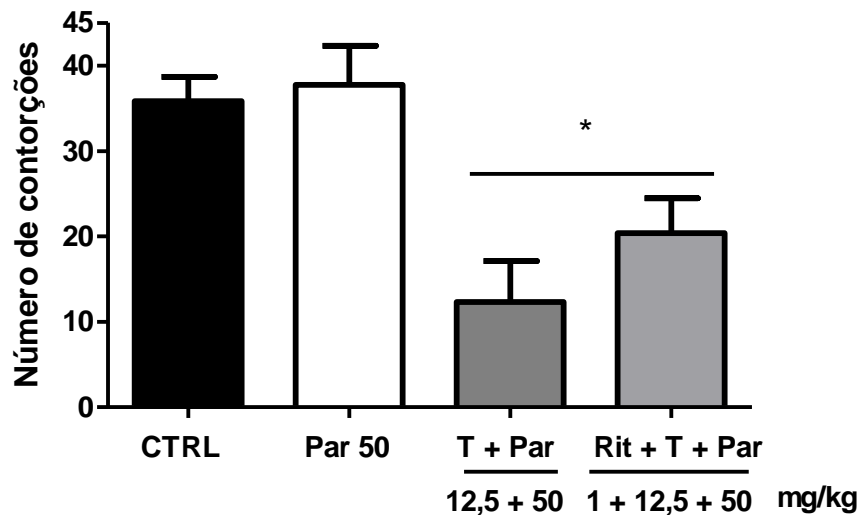


Fig. 28. Efeito do tratamento prévio com ritanserina (Rit) na dose de 1 mg/kg no efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. (T) 30 minutos antes da administração de paracetamol 50 mg/kg, i.p. (Par). Os dados são mostrados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs Controle(CTRL) (ANOVA, seguido de Student-Neumann-Keuls)

5.20 Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT₂ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com a cetoprofeno no teste de contorções induzidos pelo ácido acético

O tratamento com Ritanserina 1 mg/kg, antagonista de receptores de Serotonina 5-HT₂, não altera o efeito sinérgico da associação de L-tripfano 12,5 mg/kg, i.p. 30 minutos antes da administração de cetoprofeno 3 mg/kg, i.p. O número de contorções é igual entre os grupos pré-tratados com ritanserina 15 minutos antes de receberem L-tripfano 12,5 mg/kg, i.p. e cetoprofeno 2,18 mg/kg, i.p. ($14,14 \pm 3,86$), e não pré-tratados com ritanserina ($17,43 \pm 3,66$). Ambos diferentes do controle ($35,82 \pm 2,85$).

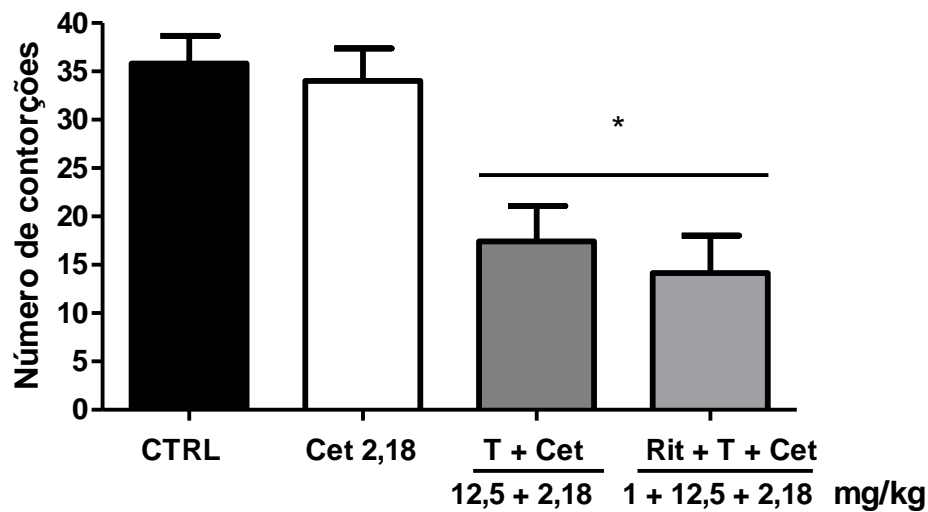


Fig. 29. Efeito do tratamento prévio com ritanserina (Rit) na dose de 1 mg/kg sobre o efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. (T) 30 minutos antes da administração de cetoprofeno 2,18 mg/kg, i.p. (Cet). Os dados são mostrados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs Controle(CTRL) (ANOVA, seguido de Student-Neumann-Keuls)

5.21. Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT₁ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com a dipirona no teste de contorções induzidos pelo ácido acético

O tratamento com NAN-190 1 mg/kg, antagonista de receptores de Serotonina 5-HT₁, não altera o efeito sinérgico da associação de L-triptofano 25 mg/kg, i.p. 30 minutos antes da administração de dipirona 25 mg/kg, i.p. O número de contorções é igual entre os grupos tratados com NAN-190 15 minutos antes de receberem L-triptofano 25 mg/kg, i.p. e dipirona 25 mg/kg ($10,00 \pm 4,75$) i.p., e não pré-tratados com NAN-190 ($16,50 \pm 5,73$). Ambos diferentes do controle ($34,90 \pm 4,79$).

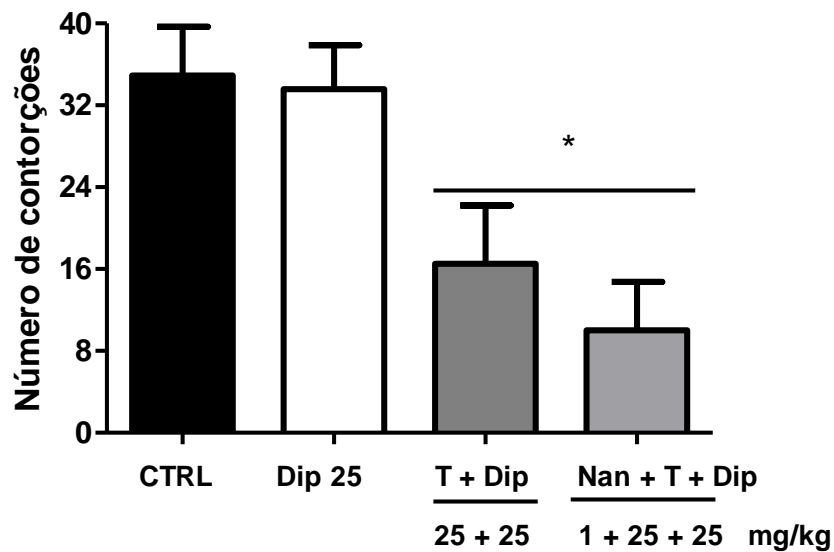


Fig. 30. Efeito do tratamento prévio com NAN-190 na dose de 1 mg/kg sobre o efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano 25 mg/kg, i.p. (T) 30 minutos antes da administração de dipirona 25 mg/kg, i.p. (Dip). Os dados são mostrados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs Controle(CTRL) (ANOVA, seguido de Student-Neumann-Keuls).

5.22. Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT₁ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com paracetamol no teste de contorções induzidos pelo ácido acético

O tratamento com NAN-190 1 mg/kg, antagonista de receptores de Serotonina 5-HT₁, altera o efeito sinérgico da associação de L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. 30 minutos antes da administração de paracetamol 50 mg/kg, i.p. O número de contorções é diferente entre os grupos pré-tratados com NAN-190 15 minutos antes de receberem L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. e paracetamol 50 mg/kg (25,71 ± 4,40), i.p., e não pré-tratados com NAN-190 (9,25 ± 4,19). O grupo pré-tratado com NAN-190 não difere do grupo controle (34,90 ± 4,79). Inversamente, o tratamento combinado nas doses acima, quando não pré-tratados com NAN-190, exhibe efeito antinociceptivo.

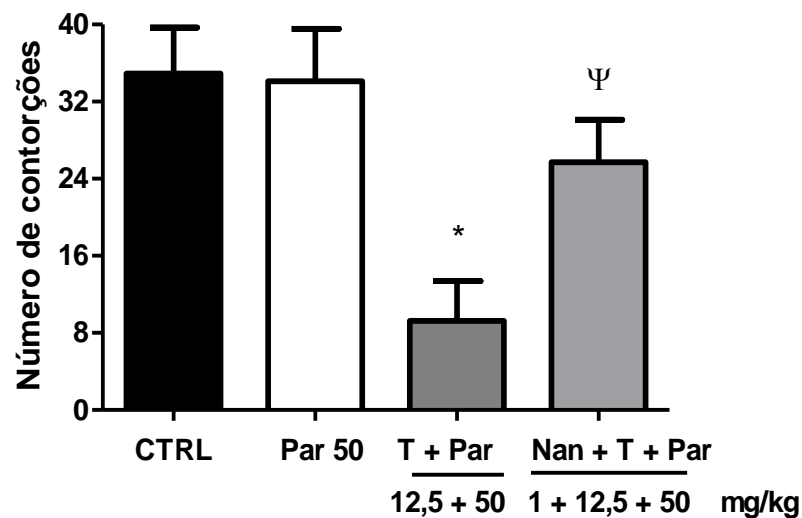


Fig. 31. Efeito do tratamento prévio com NAN-190(NAN) na dose de 1 mg/kg no efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p.(T) 30 minutos antes do paracetamol 50 mg/kg, i.p. (Par). Os dados são mostrados como média ± E.P.M. *p<0,05 vs Controle(CTRL). *p<0,05 vs. CTRL, Ψp<0,05 vs. T + Par. (ANOVA, seguido de Student-Neumann-Keuls)

5.23. Efeito do bloqueio de receptores de Serotonina 5-HT₁ sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com a cetoprofeno no teste de contorções induzidos pelo ácido acético

O tratamento com NAN-190 1 mg/kg, antagonista de receptores de Serotonina 5-HT₁, altera o efeito sinérgico da associação de L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. 30 minutos antes da administração de Cetoprofeno 2,18 mg/kg, i.p. O número de contorções é diferente entre os grupos pré-tratados com NAN-190 15 minutos antes de receberem L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. e cetoprofeno 2,18 mg/kg (27,00 ± 1,16), i.p., e não pré-tratados com NAN-190 (15,86 ± 3,22). O grupo pré-tratado com NAN-190 não difere do grupo controle (32,33 ± 4,52). Inversamente, o tratamento combinado nas doses acima, quando não pré-tratados com NAN-190, exibe efeito antinociceptivo.

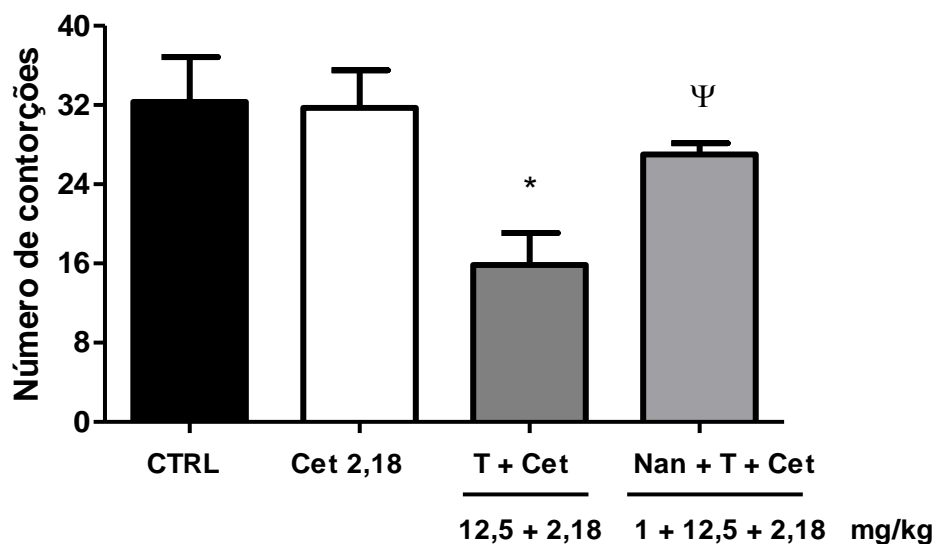


Fig. 32. Efeito do tratamento prévio com NAN-190(NAN) na dose de 1 mg/kg sobre o efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p.(T) 30 minutos antes da administração de cetoprofeno 2,18 mg/kg, i.p. (Cet). Os dados são mostrados como média ± E.P.M. *p<0,05 vs Controle(CTRL). *p<0,05 vs. CTRL, Ψp<0,05 vs. T + Cet. (ANOVA, seguido de Student-Neumann-Keuls).

5.24 Efeito do bloqueio de receptores adrenérgicos α_2 sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com paracetamol no teste de contorções induzidos pelo ácido acético

O tratamento com ioimbina na dose de 1,5 mg/kg, antagonista de receptores de adrenérgicos α_2 , altera o efeito sinérgico da associação de L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. 30 minutos antes da administração de paracetamol 50 mg/kg, i.p. O número de contorções é maior entre os grupos pré-tratados com ioimbina 15 minutos antes de receberem L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. e paracetamol 50 mg/kg ($28,50 \pm 5,26$), i.p., em comparação aos não pré-tratados com ioimbina ($11,110 \pm 3,70$). O grupo pré-tratado com ioimbina não difere do grupo controle ($26,13 \pm 3,13$). Inversamente, o tratamento combinado nas doses acima, quando não pré-tratados com ioimbina, exhibe efeito antinociceptivo.

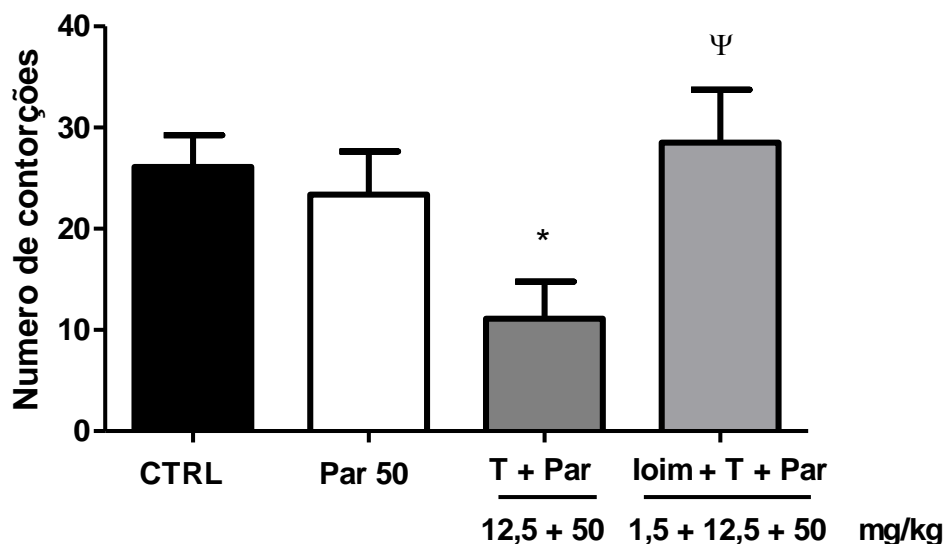


Fig. 33. Efeito do tratamento prévio com ioimbina (Ioim) na dose de 1,50 mg/kg no efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano 12,5 mg/kg, i.p. (T) 30 minutos antes da administração de paracetamol 50 mg/kg, i.p. (Par). Os dados são mostrados como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs Controle(CTRL); $\Psi p < 0,05$ vs tratamento sem ioimbina (ANOVA, seguido de Student-Neumann-Keuls)

5.25. Efeito do bloqueio de receptores de melatonina (MT₁ e MT₂) sobre o efeito sinérgico da associação do L-triptofano com Dipirona no teste de contorções induzidos pelo ácido acético

O tratamento com Luzindol 10 mg/kg, antagonista de receptores de melatonina, altera o efeito sinérgico da associação de L-triptofano 25 mg/kg, i.p. 30 minutos antes da administração de dipirona 25 mg/kg, i.p. O número de contorções é diferente entre os grupos pré-tratados com Luzindol 15 minutos antes de receberem L-triptofano 25 mg/kg, i.p. e dipirona 25 mg/kg ($30,29 \pm 4,83$), i.p., e não pré-tratados com Luzindol ($13,83 \pm 4,785$). O grupo pré-tratado com Luzindol também difere do grupo controle ($41,14 \pm 2,48$). Inversamente, o tratamento combinado nas doses acima, quando não pré-tratado com Luzindol, exibe efeito antinociceptivo.

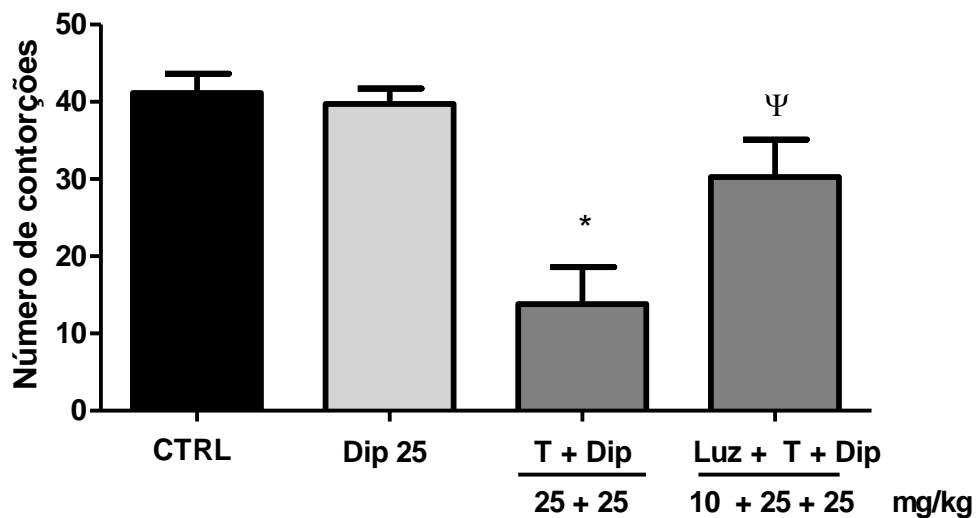
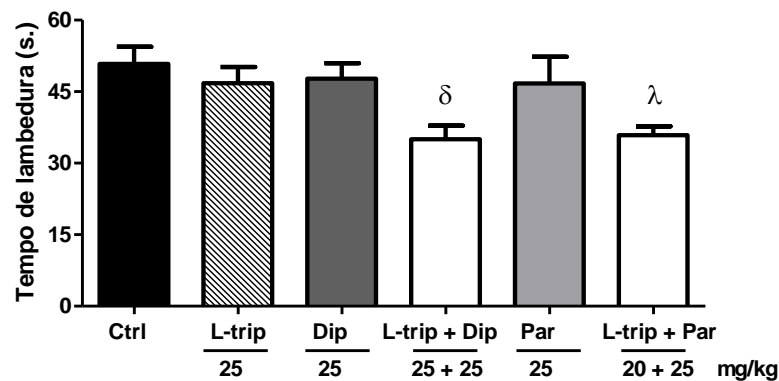


Fig. 35. Efeito do tratamento prévio com Luzindol na dose de 10 mg/kg, i.p. (Luz) no efeito antinociceptivo sinérgico da associação de L-triptofano 25 mg/kg, i.p. (T) 30 minutos antes da administração de dipirona 25 mg/kg, i.p. (Dip). * $p < 0,05$ vs Controle(CTRL), $\Psi p < 0,05$ vs. T + Dip e CTRL. (ANOVA, seguido de Student-Neumann-Keuls).

5.26. Efeito do tratamento conjunto via intragástrica de L-triptofano com dipirona ou paracetamol no teste de nociceção induzida pela formalina

A administração intraplantar de formalina 2% induz um comportamento bifásico de lambertura sugestivo de dor no animais que ocorre de zero à 5 minutos (primeira fase) e entre 20 à 30 minutos (segunda fase) após a aplicação de formalina [(50,83 ± 3,59 s.) e (79,88 ± 9,18 s.) primeira e segunda fase, respectivamente]. A administração de Dipirona ou Paracetamol isoladamente não exibiram atividade antinociceptiva nas doses administradas 25 mg/kg, i.g., em nenhuma das fases. Inversamente, a co-administração de L-triptofano 25 mg/kg juntamente com dipirona ou L-triptofano 20 mg/kg juntamente com paracetamol, foi capaz de reduzir o tempo de lambertura em ambas as fases do teste [(35,00 ± 2,87 s.)^δ e (35,89 ± 1,84 s.)^λ, L-trip+Dip e L-trip+Par na primeira fase] e [(45,52 ± 6,18)^δ e (37,65 ± 5,39)^λ, L-trip+Dip ou L-trip+Par na segunda fase].

A



B

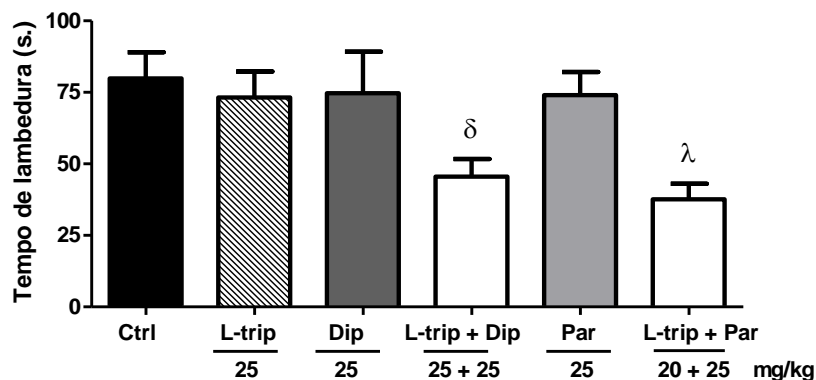


Fig. 36. Efeito da coadministração de L-triptofano e dipirona(Dip) ou paracetamol(Par) no teste de nociceção induzido por administração intraplantar de formalina 2%. A coadministração de L-triptofano e dipirona ou paracetamol (L-trip+Dip ou L-trip+Par, respectivamente) exibe efeito antinociceptivo quando comparado ao controle e aos tratamentos isolados tanto na primeira (A) quanto na segunda fase do teste (B). ^δp<0,05 vs Ctrl, i.g., ^λp< 0,05 vs Ctrl e (ANOVA, seguido de teste de múltiplas comparação de Dunnet).

5.27 Efeito do tratamento com L-triptofano ou dipirona sobre a resposta nociceptiva no teste de nocicepção térmica na placa quente

Diferentemente do teste de contorções abdominais o tratamento prévio com L-triptofano exibiu atividade antinociceptiva aumentando o tempo de latência para resposta ao calor ($55 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$), na dose 200 mg/kg ($16,80 \pm 1,32$) quando comparado ao controle ($10,42 \pm 1,06$). Nos tempos de 30, 60 e 120 min. após o tratamento. O tratamento com dipirona também possui capacidade de aumentar a latência de reação ao calor da placa quente nas doses de 200 mg/kg no tempo de 30 min. ($19,59 \pm 3,80$), respectivamente, e na dose de 200 mg/kg no tempo de 120 min. ($15,53 \pm 2,84$) após o tratamento.

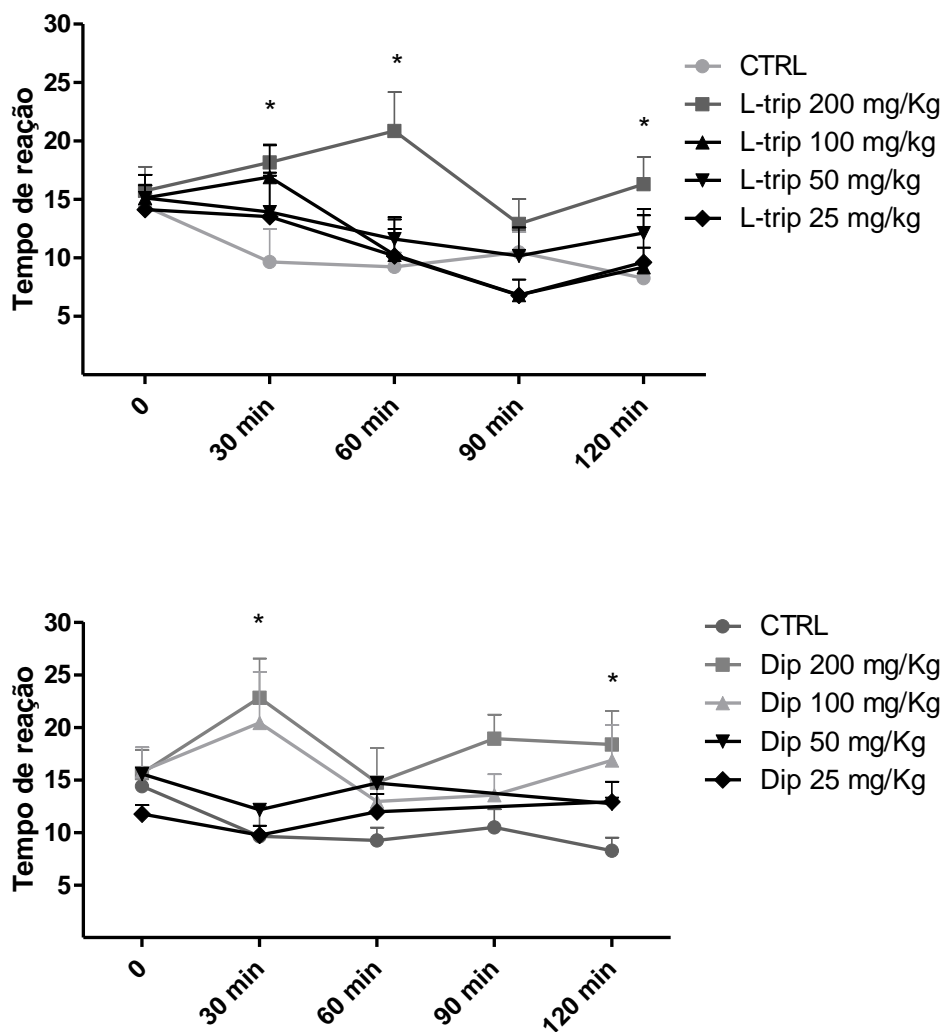


Fig . 37. Curso da resposta ao estímulo térmico na placa quente ($55 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$) dos animais tratados com L-triptofano ou Dipirona isoladamente. * $p < 0,05$ vs Controle(CTRL) para cada tempo marcado. (ANOVA seguido do teste de Bonferroni)

5.28 Efeito do tratamento combinado de L-triptofano e dipirona sobre a resposta antinociceptiva frente a nocicepção térmica na placa quente

O tratamento combinado realizado administrando-se previamente L-triptofano e, então, dipirona nos animais submetidos ao teste da placa quente mostrou-se efetivo em aumentar o tempo de resposta do animal ao calor na placa quente ($55 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$) na dose de 50 mg/kg de L-triptofano juntamente com 50 mg/kg de dipirona (doses não efetivas isoladamente) nos tempo de 30 ($18,50 \pm 3,16$) e 60 ($18,82 \pm 2,10$) min. após os tratamentos quando comparado ao grupo controle ($5,70 \pm 0,89$) e ($7,61 \pm 0,91$), respectivamente.

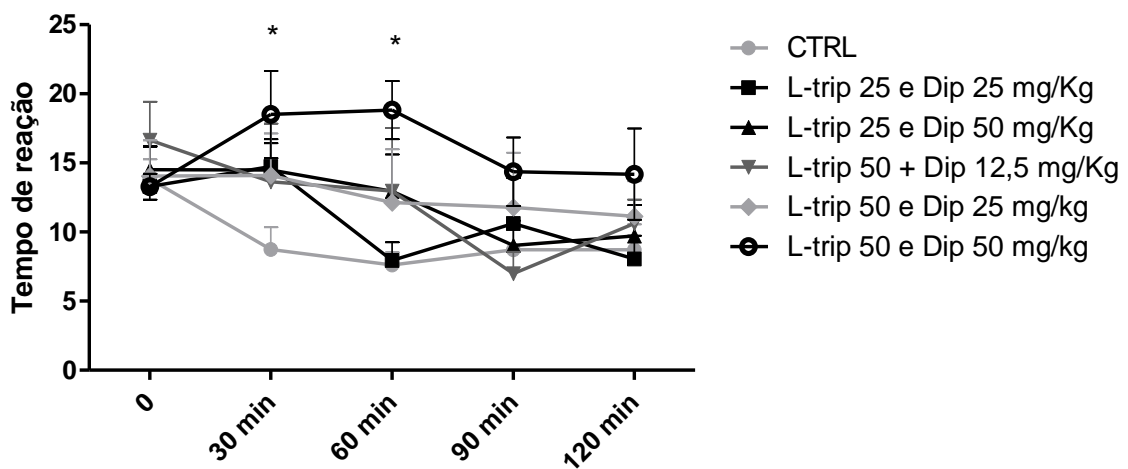


Fig. 38. Curso da resposta ao estímulo térmico na placa quente ($55 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$) dos animais tratados com L-triptofano previamente a Dipirona. * $p < 0,05$ vs Controle(CTRL) para cada tempo marcado. (ANOVA seguido do teste de Bonferroni)

5.29 Efeito do tratamento combinado de L-triptofano com dipirona ou paracetamol sobre a resposta antinociceptiva frente a nocicepção química induzida por capsaicina

O tratamento com dipirona 50 mg/kg não foi capaz de reduzir o tempo de lambedura (segundos, s) induzido pela capsaicina 1,6 (A): 39,89 s \pm 6,46, em relação aos controles: 39,50 s \pm 5,315, assim como L-triptofano, que obteve o seguinte tempo de lambedura: 34,75 s \pm 4,55, em resposta a capsaicina, também não se mostrou diferente em relação aos controles. A associação de L-triptofano com dipirona, na dose de 50 mg/kg cada, obteve resposta antinociceptiva diminuindo o tempo de lambedura em resposta a capsaicina (20,00 s \pm 3,44) em relação ao controle, similar a substância de referência, o vermelho de rutênio 3 mg/kg (V.R.), 8,80 \pm 1,20 s. O paracetamol não foi efetivo nem como agente isolado, tempo de lambedura de 42,00 \pm 3,64 s ou combinado com L-triptofano, 44,80 \pm 3,57 s.

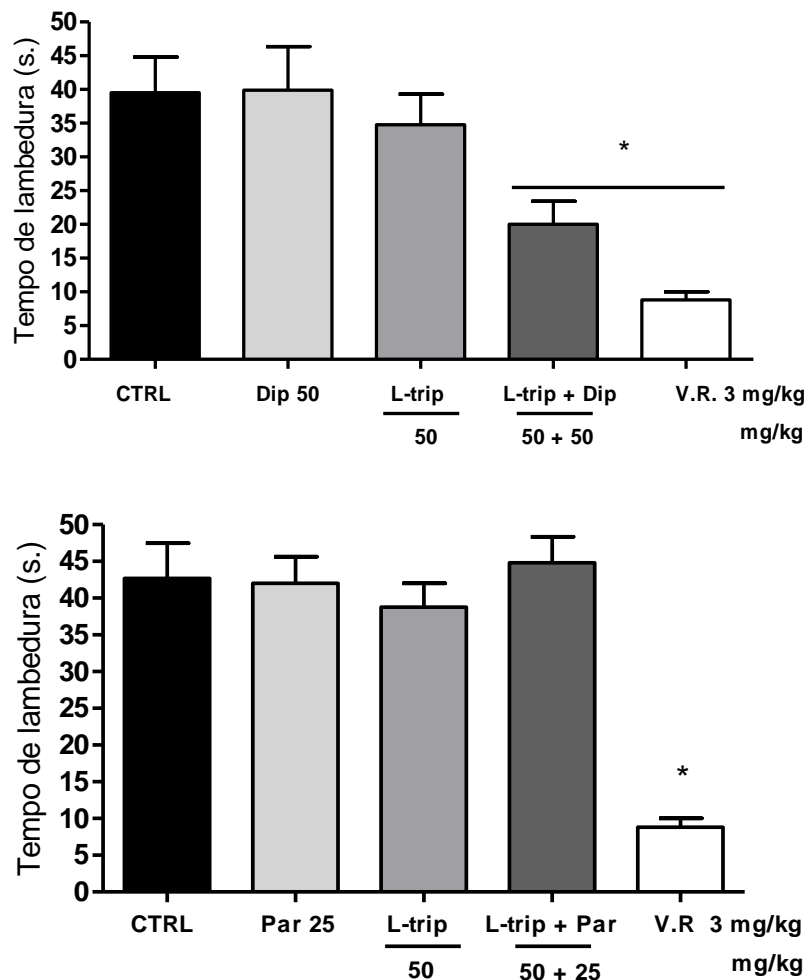


Fig. 39 . Efeito do tratamento com Dipirona (A), Paracetamol(B) e combinação de ambos com L-triptofano (A e B, respectivamente) no teste de nocicepção induzida pela capsaicina. Foi utilizado como estímulo capsaicina 1,6 μ mol/pata. V.R. se refere ao vermelho de rutênio, droga de referência. Dados são mostrados como média \pm E.P.M. do tempo de lambedura da pata dos animais (segundos). $p^* < 0,05$ vs controle(CTRL) (ANOVA, seguido de seguido de teste de múltiplas comparação de Dunnet).

5.30 Efeito do ácido quinurênico sobre o número de contorções induzidos pelo ácido acético

O tratamento com ácido quinurênico produz resposta antinociceptiva reduzindo o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em doses maiores que 18,5 mg/kg. Não sendo efetivo em doses menos que 12,5 mg/kg. As doses de 18,5; 25 e 50 mg/kg exibiram redução no número de contorções: $19,50 \pm 2,72$; $7,250 \pm 1,70$; $5,250 \pm 1,78$, respectivamente, quando comparado aos controles ($34,11 \pm 4,37$). O painel abaixo mostra a curva dose-resposta em função da antinocicepção produzida pelo ácido quinurênico no teste de contorções.

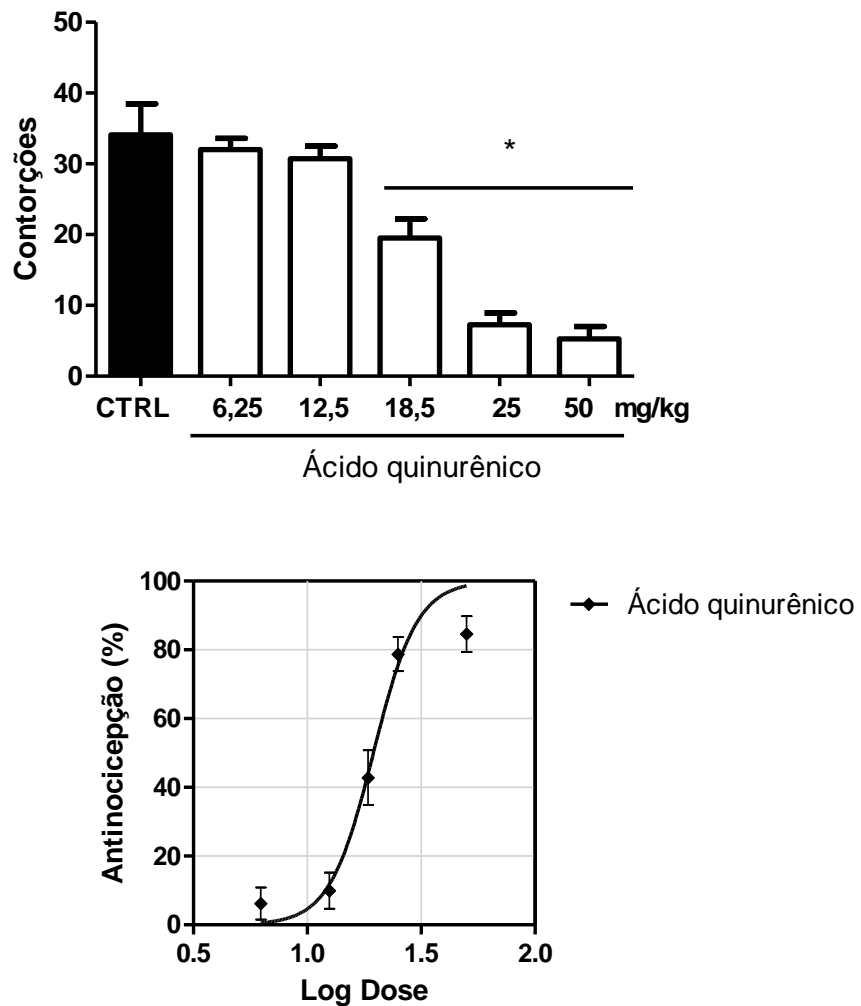


Fig. 40. Efeito da administração intraperitoneal de ácido quinurênico (6,25 – 50 mg/kg) sobre o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos. CTRL representa o controle com animais tratados com salina. O gráfico mostra a média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs CTRL (ANOVA, Student-Neumann-Keuls como *post hoc*).

5.31 Efeito sinérgico do pré-tratamento intraperitoneal com ácido quinurênico sobre a resposta antinociceptiva da dipirona no teste de contorções induzidos pelo ácido acético

Curva dose-resposta do efeito antinociceptivo produzido pelo tratamento com dipirona isoladamente e em associação com ácido quinurênico na proporções de 1:2. A análise da regressão mostra que as curvas são diferentes para o tratamento isolado e em associação caracterizando um efeito sinérgico, ou supra aditivo. A dose necessária para obtenção de 50% da resposta máxima (ED_{50}) foi calculada em 91,20 (77.39 - 95.78) mg/kg enquanto a ED_{50} para a dipirona associada ao tratamento prévio com ácido quinurênico foi 4,34 (3.74 - 5.03) mg/kg, demonstrando um redução drástica nesse parâmetro.

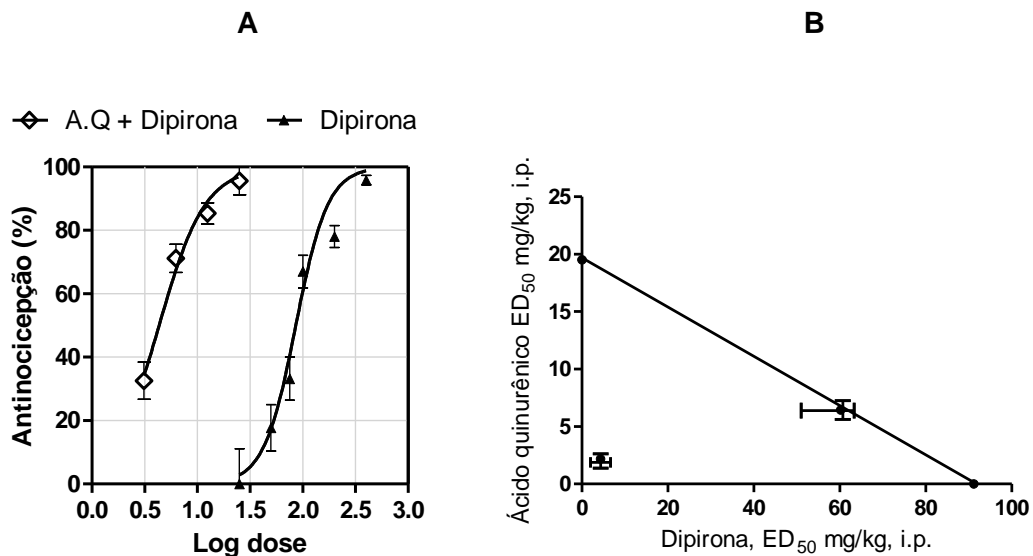


Fig. 41. A: A curva mostra a regressão não-linear para a relação dose resposta da dipirona isolada e em associação com o ácido quinurênico (A.Q.). Os dados mostrados são as médias da porcentagem de redução no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (antinocicepção %) \pm E.P.M em comparação com a média dos animais controles. B: isoblograma mostrando a distância entre o valor teórico calculado (sobre a linha reta) e o valor real obtido para ED_{50} da dipirona em tratamento combinado com A.Q.

Tabela 12. Valores de ED_{50} para tratamento isolado e combinado com dipirona e ácido quinurênico.

Tratamento	Razão	ED_{50} (mg/kg)
Dipirona	-	91,20 (77.39 - 95.78)
Ácido quinurênico + Dipirona	1:2	4,34 (3.74 - 5.03)*

Tabela 12. Dose necessária para reduzir em 50% o número de contorções induzidas pelo ácido acético em comparação com grupos controles (ED_{50}). O tratamento prévio com A.Q. reduz a ED_{50} quando comparados com o tratamento com dipirona isolada. Os dados são expressos como ED_{50} (IC 95%) em relação a dipirona. * $p < 0,05$ vs Dipirona (ANOVA).

5.32 Efeito sinérgico do pré-tratamento intraperitoneal com ácido quinurênico sobre a resposta antinociceptiva do paracetamol no teste de contorções induzidos pelo ácido acético

Curva dose-resposta do efeito antinociceptivo produzido pelo tratamento com paracetamol isoladamente e em associação com ácido quinurênico na proporções de 1:4,05. A análise da regressão mostra que as curvas são diferentes para o tratamento isolado e em associação caracterizando um efeito sinérgico, ou supra-aditivo. A dose necessária para obtenção de 50% da resposta máxima (ED_{50}) foi calculada em 96,18 (76,23-121,3) mg/kg enquanto a ED_{50} para a dipirona associada ao tratamento prévio com ácido quinurênico foi 25,47 (18,66-34,77 mg/kg, demonstrando importante redução nesse parâmetro.

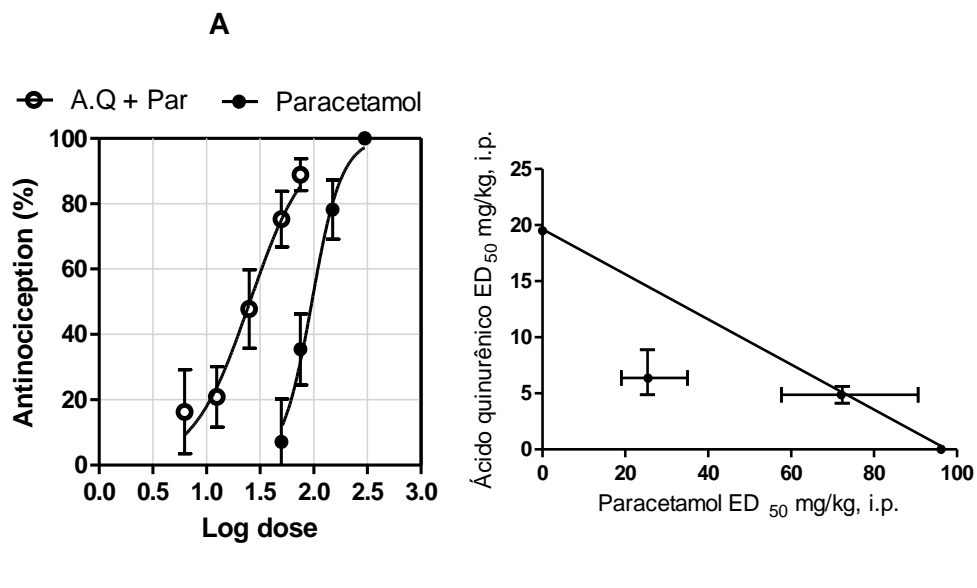


Fig. 42. A: A curva mostra a regressão não-linear para a relação dose resposta do paracetamol isolado e em associação com o ácido quinurênico (A.Q.). Os dados mostrados são as médias da porcentagem de redução no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (antinocicepção %) \pm E.P.M em comparação com a média dos animais controles. B: isobolograma mostrando a distância entre o valor teórico calculado (sobre a linha reta) e o valor real obtido para ED_{50} do paracetamol em tratamento combinado com A.Q.

Tabela 13. Valores de ED_{50} para tratamento isolado e combinado com paracetamol e ácido quinurênico.

Tratamento	Razão	ED_{50} (mg/kg)
Paracetamol	-	96,18 (76,23-121,3)
Ácido quinurênico + Paracetamol	1/4,05	25,47 (18,66-34,77)*

Tabela 13. Dose necessária para reduzir em 50% o número de contorções induzidas pelo ácido acético em comparação com grupos controles(ED_{50}). O tratamento prévio com ácido quinurênico reduz a ED_{50} quando comparados com o tratamento com paracetamol isolado. Os dados são expressos como ED_{50} (IC 95%) em relação ao paracetamol. * $p < 0,05$ vs Paracetamol (ANOVA)

6 Discussão

Até o presente momento, que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a descrever efeitos antinociceptivos da interação entre o aminoácido essencial L-triptofano e analgésicos não opióides nos modelos experimentais de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, nocicepção induzida pela formalina, nocicepção induzida por capsaicina, bem como na nocicepção térmica na placa quente.

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é um teste amplamente utilizado e aceito como modelo de nocicepção visceral e também muito empregado na prospecção de novas moléculas, marcadamente na pesquisa de moléculas de origem natural. O mecanismo da gênese das contorções induzidas pelo ácido acético envolve a liberação de diversos mediadores, como, por exemplo, as prostaglandinas E_2 e F_2 (BERKENKOPF & WEICHMAN, 1988; ELISABETSKY et al., 1995) histamina, bradicinina, 5-HT (DERAEDT et al., 1976; GUO et al., 2009) e interleucinas 1 e 8 (RIBEIRO et al., 2000). Algumas substâncias, como por exemplo, drogas anti-inflamatórias não esteroidais, narcóticos, agonistas simpaticomiméticos como a clonidina e produtos naturais são capazes, via diferentes mecanismos, de inibir as contorções induzidas pelo ácido acético (COLLIER et al., 1968; BENTLEY et al., 1983; KOLESNIKOV et al., 2000; STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2008; ZANBOORI et al., 2008; ROCHA et al., 2011).

A positividade da utilização de um modelo multi-mediado como o teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético para o estudo de interações sinérgicas é justamente o fato de envolver diferentes vias de mediação assim como condições dolorosas inflamatórias clinicamente importantes como osteoartrite e artrite reumatóide (CGRP, Substância P, IL-6, TNF- α , IL-1, Noradrenalina) (RAAP et al., 2000) mucosite induzida por quimioterápico (TNF- α , IL-1b, IL-6, PAF) (LOGAN et al., 2009; SOARES et al., 2011) e condições como a enxaqueca que parece estar ligada a ativação trigeminal e liberação de CGRP e ser sensível ao tratamento com drogas agonistas de receptores 5-HT_{1b/d} (HARGREAVES & SHEPHERD, 1999). Do exposto, o bloqueio de um desses mediadores envolvidos nas síndromes supracitadas por uma determinada substância, por exemplo, interfere também no teste de

contorções abdominais, diminuindo em alguma extensão o número de contorções, podendo, assim, ser detectada uma possível ação. Desse ponto de vista, o teste de contorções constitui-se em um teste sensível e, apesar da sua primeira descrição ter sido feita em 1969 (COLLIER, 1969), até os dias atuais é bastante utilizado em estudos de nocicepcão e faz-se referências desse método em jornais e revistas de alta qualidade na área (TALLARIDA & RAFFA, 1996; MANSOURI et al., 2013).

Em nossos experimentos, o L-triptofano não foi capaz de reduzir o número de contorções induzidas pelo ácido acético tanto nas administrações orais quanto intraperitoneais, portanto, não exibindo efeito antinociceptivo nesse teste. Além disso, nas doses utilizadas não foram verificadas alterações na atividade locomotora espontânea dos animais. Esses resultados estão de acordo com relatos prévios como os encontrados nos trabalhos de Heyliger et al. (1998) e Dennis e Melzack (1980), que descrevem atividade antinociceptiva, mas em doses intraperitoneais bem superiores às utilizadas nesse estudo, bem como nas descrições de Curzon & Marsden (1975), que não demonstraram alteração na atividade motora após injeção intraperitoneal de L-triptofano (150 mg/kg). Gibbons et al. (1981) verificaram que a capacidade de locomover sobre uma haste rotativa não foi afetada pela injeção intraperitoneal de L-triptofano (100 mg/kg). Assim, com base nestas informações prévias podemos afirmar que no presente estudo, o efeito observado do L-triptofano no teste nociceptivo provavelmente não está associado com a perda de habilidades motoras ou qualquer efeito colateral atribuído a doses mais elevadas de L-triptofano em humanos, especialmente tendo em vista, que nas combinações utilizadas nestes estudos, a dose mais elevada de L-triptofano foi de 50 mg/kg.

No mesmo teste, a dipirona foi avaliada e o efeito antinociceptivo significativo só foi descrito com a administração intragástrica na dose de 175 mg/kg ou na administração intraperitoneal de 100 mg/kg. Os resultados mostraram que as ED₅₀ do efeito analgésico da dipirona nesse teste foram de 128,7 mg/kg para via intragástrica e 91,20 mg/kg para via intraperitoneal. Quando houve tratamento conjunto (intragástrico) ou prévio (via intraperitoneal) com L-triptofano, as ED₅₀s sofreram reduções de 80,20 e 74,12 %, respectivamente, o que demonstra uma considerável interação entre as drogas quanto ao efeito antinociceptivo. Do mesmo modo, o tratamento com L-triptofano, conjunto i.g ou prévio i.p., reduz em 81,85 % e

50,82 %, respectivamente, a ED_{50} para o efeito analgésico do paracetamol. A administração prévia de L-triptofano e Cetoprofeno também mostrou-se efetiva por via intraperitoneal. Sem dúvidas, esses resultados apontam para uma interação sinérgica entre as drogas, mostrando o papel facilitador do L-triptofano para os efeitos antinociceptivos da dipirona, paracetamol e cetoprofeno.

A caracterização do tipo de interação existente entre o L-triptofano e esses analgésicos não-opioides: dipirona, cetoprofeno e paracetamol, no teste de contorções abdominais, foi realizada comparando as ED_{50} e a posição das curvas dos tratamentos isolados e em conjunto. Levando-se em consideração a observação de que o L-triptofano não exibiu atividade antinociceptiva nesse teste, não se espera incremento no efeito antinociceptivo da dipirona, paracetamol ou cetoprofeno na presença do L-triptofano, pela falta de atividade analgésica deste último. Dessa forma, a análise da interação é direta e nos orienta no sentido de admitir que a interação é sinérgica, sendo as curvas dose-resposta dos tratamentos na presença de L-triptofano deslocadas para a esquerda quando comparadas aos tratamentos isolados, indicando que a obtenção de um dado efeito analgésico (ED_{50}) é alcançado com doses significativamente menores de substância ativa.

A análise quantal do efeito do L-triptofano sobre a antinocicepção induzida pela dipirona nos mostra que a administração prévia de L-triptofano é capaz de aumentar a proporção de animais que exibem uma redução acima de 75% no número de contorções quando comparado aos controles. Dessa forma é sugerida a capacidade do L-triptofano de aumentar o efeito antinociceptivo máximo da dipirona, sendo essa uma característica desejável nas associações de fármacos onde são adicionadas drogas a um dado protocolo de tratamento quando verificado que o efeito máximo da monoterapia já foi alcançado e os efeitos clínicos observados não são satisfatórios (COOPER et al., 1980; COOPER et al., 1982 e DIONNE, 1999).

O L-triptofano administrado intraperitonealmente em dose elevada (200 mg/kg) exibiu atividade antinociceptiva no teste de nocicepção térmica na placa quente, diferentemente do que ocorreu no teste de contorções induzidas por ácido acético. No entanto, as doses não efetivas de L-triptofano no teste da placa quente quando combinadas com doses não efetivas de dipirona apresentaram efeitos antinociceptivos, demonstrando que a interação entre as substâncias ocorrem

também no modelo de nocicepção térmica, adicionando, assim, mais confiabilidade quanto ao efeito sinérgico verificado e estendendo o rol de possibilidades desta associação.

Historicamente, o teste da placa quente é descrito como ‘selecionador’ para drogas analgésicas, ou candidatas a analgésicas, de ação central, tanto a nível espinhal como supra-espinhal. Assim, morfina, codeína, dentre outras como a dexmedetomidina e citalopram são efetivas nesse teste (GUNELI et al., 2007; PRAVETONI et al., 2012). Considerando que o L-triptofano é o precursor do neurotransmissor serotonina e tendo sido mostrado que a associação de doses não analgésicas de L-triptofano com dipirona, cetoprofeno e paracetamol mostrou-se ser efetiva em modelos de dor visceral bem como no teste de nocicepção térmica/central, e ainda, que drogas inibidoras da recaptação de serotonina, como citalopram, exercem efeitos antinociceptivos tanto no teste de contorções abdominais quanto na placa quente (FASMER et al., 1989), podemos sugerir que o efeito sinérgico da associação de L-triptofano com as drogas não-opiíides utilizadas ocorre, em alguma extensão, em locais centrais de modulação do processo nociceptivo.

Vários resultados têm estabelecido a importância dos receptores TRPV1 sobre a hipernocicepção térmica (CATERINA et al., 2000; AMAYA et al., 2004), incluindo a capacidade de fortalecer a antinocicepção induzida por morfina na placa quente pela ação de antagonistas desses receptores (NGUYEN et al., 2010). Esses receptores são ativados pelo calor (>42°C) e por estímulos químicos, sendo a capsaicina, o ingrediente ativo da pimenta, o ativador mais conhecido desses receptores (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida). A ativação dos TRPV1 no neurônio sensitivo primário leva ao influxo de cálcio e sódio. Por sua vez, esses aferentes ativados liberam glutamato, substância P, neurocinina A e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina no corno dorsal da medula espinhal (SORKIN et al. 1992; SORKIN and McADOO 1993; SUN et al. 2004).

Nós avaliamos a efetividade da associação entre L-triptofano e dipirona e L-triptofano e paracetamol sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, e, assim, ativando os TRPV1. Esse procedimento induz um comportamento sugestivo de dor, caracterizado pela lambertura da pata onde foi

injetada a capsaicina. L-triptofano, dipirona ou paracetamol administrados isoladamente, em doses sub-efetivas extrapoladas do teste de contorções induzidas pelo ácido acético, não alteram o tempo de lambadura da pata. Contudo, a administração prévia de L-triptofano à dipirona foi capaz de diminuir o tempo de lambadura da pata, exercendo efeito antinociceptivo frente à ativação dos receptores TRPV1, semelhante ao que ocorreu com o antagonista desses receptores, o vermelho de rutênio. Diferentemente do observado com a dipirona, a associação de L-triptofano com paracetamol não é efetiva na redução do tempo de lambadura da pata em resposta a capsaicina. Estes resultados sugerem que a combinação de L-triptofano e dipirona é capaz de interferir na modulação da nocicepção termo-induzida por comprometer a transdução ou condução do estímulo detectado via TRPV1.

A despeito de nenhuma das substâncias, dipirona ou L-triptofano, terem sido descritas como antagonistas do receptor TRPV1, a ação descrita pode-se dever a interferência em outros sítios de ação capazes de comprometer a nocicepção induzida por agonista TRPV1. Como exemplo, Jin et al. (2009), demonstram que a ativação de receptores TRPV1 leva a um aumento na ativação de neurônios glutamatérgicos no neurônio nociceptivo primário, assim, em tese, o bloqueio com antagonistas de receptores de glutamato poderia comprometer a transmissão neuronal e o processo nociceptivo gerado pela ativação de TRPV1. De outra forma, Qin et al., 2010, descreveram que a depleção de serotonina amplia os efeitos de hipersensibilidade visceral e dor em animais tratados com capsaicina.

Do exposto, é razoável a sugestão que a biotransformação do L-triptofano à 5-HT e, outras moléculas sucessoras com atividades antagonista de glutamato como o ácido quinurênico, possam bloquear essa condução nociceptiva induzida pela capsaicina. Evidentemente, a biotransformação de L-triptofano em 5-HT e ácido quinurênico acontecem na ausência da dipirona, porém, como citado anteriormente não há antinocicepção associada aos tratamentos isolados. Uma possível explicação para esse fato seriam mecanismos colaterais da dipirona, que estão ausentes no paracetamol, por exemplo, Beirith et al. (1998) descreveram a capacidade da dipirona de comprometer a transmissão glutamatérgica o que, quando somado a influência de metabólitos do L-triptofano que bloqueiam

receptores de glutamato, causaria um bloqueio efetivo desta neurotransmissão e, assim, constituir-se-ia uma das possíveis vias por onde o sinergismo do L-triptofano com a dipirona poderia atuar, inclusive explicando a atividade no teste de nocicepção térmica na placa quente. Além disso, o fato da combinação de L-triptofano com paracetamol não apresentar efeito nesse teste pode estar ligado a capacidade de metabólitos derivados do paracetamol possuírem a capacidade de ativar, em alguma extensão, os receptores TRPV1 (MALLET et al., 2010) e não serem capaz de atuar sobre a transmissão glutamatérgica.

A 5-HT é um neurotransmissor envolvido em diversos processos fisiológicos de origem central. Nos processos nociceptivos, animais com danos nos núcleos da rafe ou com bloqueio da síntese deste neurotransmissor em outros locais do cérebro, podem apresentar desordens do sono e redução do limiar nociceptivo. Além disso, a administração de drogas analgésicas de ação central, como a morfina, podem ter reduzida ou até perder a sua capacidade analgésica diante do comprometimento das funções da 5-HT (YAKSH et al., 1977; DAFNY, 2013). De outra forma, a estimulação do núcleo da rafe por injeção intratecal de 5-HT, inibidores da MAO ou antidepressivos tricíclicos são capazes de fortalecer as ações analgésicas induzidas por acupuntura e morfina (HORIGUCHI et al., 2013).

A despeito do conhecido papel da 5-HT na percepção da dor (ROBERTS, 1989), a real ação de cada receptor permanece controversa. Por exemplo, agonistas e antagonistas de um mesmo receptor (5-HT₁) parece ter efeito antinociceptivo no teste de contorções abdominais (MILLAN, 1994). No entanto, nós demonstramos em nossos resultados que a dose analgésica de dipirona leva a um aumento de 5-HT central enquanto doses não antinociceptivas não demonstraram essa capacidade.

Baseando-se na posição de precursor metabólico da serotonina bem como nos relatos acerca da influência da neurotransmissão serotoninérgica na ação de analgésicos opióides e na descrição dessa via como modulatória nos processos nociceptivos, foi investigado o efeito do bloqueio de receptores do tipo 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃ sobre a antinocicepção induzida pelo tratamento conjunto com L-triptofano e doses sub-efetivas de dipirona, paracetamol e cetoprofeno.

Os receptores 5-HT_{1a} são receptores clássicos acoplados a proteína G_i e são expressos tanto pré-sinápticamente, como autoreceptores inibitórios nos neurônios serotoninérgicos, e pós-sinápticamente em diversos tecidos (BARNES & SHARP, 1999). Importante nesse contexto é a localização desses receptores em núcleos talâmicos e na medula espinhal. Na medula espinhal esse receptor está presente no nociceptor aferente primário e em neurônios intrínsecos do corno dorsal onde a sua ativação leva a uma inibição da atividade neuronal (DAVAL et al., 1987; POMPEIANO et al., 1992; GARRAWAY & HOCHMAN, 2001; ZHANG et al., 2002). Não obstante, a ativação cortical (KHARKEVICH & CHURUKANOV, 1999) e espinhal (BARDIN & COLPAERT, 2004) desses receptores estão associadas à supressão da dor. No entanto, Yaksh e Wilson (1979) mostram atividade antinociceptiva de antagonistas desse receptor.

Nessa abordagem, o bloqueio desses receptores 5HT_{1a} poderia comprometer a capacidade do L-triptofano de interagir sinergicamente com a dipirona, paracetamol ou cetoprofeno. Assim, no presente trabalho, o bloqueio com NAN-190 reduziu a atividade antinociceptiva das associações entre L-triptofano e paracetamol ou cetoprofeno, não exercendo efeito sobre a associação do L-triptofano com a dipirona. Embora os receptores 5-HT₂ e 5-HT₃ já tenham sido citados como partícipes da antinocicepção evocada pela neurotransmissão serotoninérgica, não houve diferenças entre o tratamento prévio com antagonistas dos receptores 5-HT₂ e 5-HT₃ sobre o efeito sinérgico do L-triptofano e as drogas testadas.

A interpretação desses dados torna-se complexa diante do fato que o aumento de serotonina decorrente da administração de L-triptofano não foi capaz de se associar positivamente a um efeito antinociceptivo e que o bloqueio da síntese de serotonina não altera de forma significativa a resposta nociceptiva ao ácido acético. Mesmo conhecido o fato descrito anteriormente que a ativação de receptores do tipo 5-HT_{1a} é capaz de produzir efeitos antinociceptivos. A explicação mais provável é que esta via possua um papel facilitador da atividade do paracetamol e cetoprofeno, ou seja, o aumento central de serotonina possibilitaria a ação desta em todos os receptores centrais de 5-HT. No entanto, a presença de receptores 5-HT_{1a} no tálamo e nos neurônios nociceptivos aferentes primários diminuiriam a condução do processo nociceptivo, o que por si só não geraria um efeito observável significativo,

mas na presença de paracetamol e cetoprofeno levaria a um efeito maior em virtude de uma supressão da síntese de prostaglandinas, via central e periférica, mesmo em concentrações onde o efeito analgésico não é observado quando do tratamento isolado.

Apesar dos estudos que mostram que a estimulação elétrica do núcleo magno da rafe (núcleo serotoninérgico) ou a aplicação intratecal de agonistas serotoninérgicos (MILLAN, 1994) ou serotonina (BARDIN, 2000) levam a uma resposta antinociceptiva, nossos estudos não mostram respostas antinociceptivas com a simples administração de L-triptofano em doses onde a produção de 5-HT é aumentada. Além disso, o bloqueio da síntese endógena de serotonina, e, por conseguinte, o comprometimento da via de supressão descendente, não altera a resposta nociceptiva nos resultados descritos nesse trabalho, assim como encontrado por Eide et al. (1988). Contudo, como citado anteriormente, o bloqueio dessa via compromete a função de analgésicos opióides o que nos faz conjecturar que essa via de modulação pode ser potencializada para produzir efeitos clinicamente relevantes, enquanto fisiologicamente essa via parece ter capacidade reduzida de bloquear a resposta nociceptiva.

Nós utilizamos um inibidor competitivo da enzima triptofano hidroxilase, a p-clorofenilalanina (PCPA), para verificar a importância da biotransformação da 5-HT no seu efeito sinérgico sobre a antinocicepção induzida pela dipirona. Os resultados de nossos experimentos indicam que o efeito do L-triptofano parece ser ligado a sua posição metabólica como precursor na síntese de 5-HT, desde que o pré-tratamento com PCPA reduziu o efeito do L-triptofano sobre a atividade antinociceptiva da dipirona. Com essa mesma abordagem foi verificado que a depleção de 5-HT também bloqueia parcialmente o efeito antinociceptivo da dipirona (o número de contorções foi significativamente menor no grupo com a síntese de serotonina bloqueada do que no grupo controle e maior do que no grupo tratado com a dipirona sem bloqueio da síntese de 5-HT, quando tratados com uma dose antinociceptiva de 100 mg/kg).

Estes dados sugerem que a atividade da dipirona pode ser dependente da síntese central de 5-HT, e nesse contexto, a suplementação com L-triptofano pode aumentar a síntese de 5-HT e, assim, reduzir a necessidade de dipirona, apoiando a

ideia que a via serotoninérgica pode ser vista como permissiva para o efeito analgésico. A análise da quantidade de 5-HT nos cérebros dos animais fortalece esta suposição. Nossos resultados indicaram que as doses antinociceptivas de dipirona aumentam a concentração de 5-HT, porém doses não antinociceptivas falham em aumentar a concentração desse neurotransmissor. Assim, a suplementação com L-triptofano é capaz de aumentar os níveis de 5-HT no cérebro total, em qualquer dose utilizada. Esses achados mostram que apesar do bloqueio de receptores serotoninérgicos 5-HT₁, 5HT₂ ou 5HT₃ não obstarem a ação sinérgica da dipirona, a formação de serotonina a partir do L-triptofano é necessária para que se possa produzir um efeito analgésico sinérgico com a dipirona.

A diminuição do aporte de L-triptofano em pacientes saudáveis guarda importante correlação com a função da 5-HT, a ativação cortical e a diminuição do limiar nociceptivo em voluntários. Nesse sentido Wang et al. (2010) descreveu que a modulação dietética da disponibilidade de L-triptofano através de uma mistura depletora de L-triptofano (TRP-) eleva o limiar de sensibilidade a dor nos pacientes pesquisados. Eles demonstraram que após a retirada da administração de TRP- e, então, consumo de uma mistura balanceada de aminoácidos, onde a disponibilidade de L-triptofano é normalizada, o limiar de nocicepção desses pacientes se eleva ao nível pré-teste, ou seja, normal. Além disso, esse estudo demonstrou através de imagens de ressonância magnética funcional que os indivíduos depletados de triptofano exibem maiores atividades em determinadas regiões dos córtices somatossensorial primário (S1) e secundário (S2). Ferreti et al., 2003 e Torquati et al., 2005 têm demonstrado a importância da ativação dessas áreas no processamento dos estímulos nociceptivos em humanos. Presume-se, ainda, do estudo de Wang et al. (2010) que a inervação do córtex, especialmente dos córtices S1 e S2, no que diz respeito ao processamento do L-triptofano administrado, provém, sobremaneira, da porção superior do núcleo da rafe, via ascendente. Portanto, pode-se estabelecer que uma menor disponibilidade de L-triptofano leva a redução da atividade na via serotoninérgica relacionada a nocicepção e, então, maior atividade cortical nas áreas somatossensoriais.

A biotransformação do L-triptofano pela triptofano hidroxilase e aminoácido aromático descarboxilase (mais descrita como DOPA descarboxilase) leva a geração

de 5-HT. A relação direta entre administração de L-triptofano e aumento central de 5-HT é facilmente estabelecida. Diferente de outros transmissores, por exemplo, a dopamina e noradrenalina, a síntese da serotonina parece ser determinada pelo menos em parte, por um sistema "open loop" (WURTMANN & SHEIN, 1975; MATSUDA et al., 2004) que depende mais da disponibilidade relativa do precursor L-triptofano para os neurônios. A maioria dos mamíferos não pode sintetizar triptofano "de novo"; assim moléculas de L-triptofano disponíveis para a biossíntese da serotonina no cérebro derivam, em última análise, da lise de proteína, ou a partir de moléculas de triptofano circulante obtidas diretamente da alimentação ou de pequenos reservatórios de armazenamento de tecido (FERNSTROM & FERNSTROM, 1995). Como a L-triptofano hidroxilase não parece ser facilmente saturada com as concentrações de L-triptofano presentes no cérebro e na medula espinal, nem mesmo por concentrações aumentadas por injeções de L-triptofano (WANG et al., 2010), ou por dietas com conteúdo elevado de L-triptofano, pode-se obter concentrações elevadas de 5-HT no SNC a partir do aporte desse aminoácido que dificilmente satura a L-triptofano hidroxilase (GREEN et al., 1962; WANG et al., 2010).

Em contraste, injeções de L-triptofano produzem apenas aumentos relativamente discretos na síntese de outros neurotransmissores, assim como a privação de L-triptofano não altera outros neurotransmissores, provavelmente devido à localização relativamente específica da enzima L-triptofano hidroxilase nos neurônios serotoninérgicos (GREEN et al., 1962; ARDIS et al., 2009). Em nosso estudo, as quantidades de noradrenalina e dopamina foram mantidas constantes nos animais que receberam L-triptofano nas doses utilizadas nas combinações, o que sugere, de uma forma geral, que a administração de L-triptofano não interfere na síntese de outros neurotransmissores. Essa produção de 5-HT restrita aos neurônios serotoninérgicos pode explicar o fato da administração intratecal de serotonina possuir marcante efeito antinociceptivo em comparação com o aumento de 5-HT induzido pela administração sistêmica de L-triptofano, pois, dessa forma a serotonina aplicada via central pode agir sobre receptores de 5-HT em neurônios fora do alcance sináptico dos neurônios 5-HT, mas que, no entanto, possuem receptores para serotonina.

As taxas cerebrais e de biossíntese de 5-HT na medula espinhal também podem ser alteradas em animais não apenas a partir de dietas que contêm diferentes concentrações de triptofano, mas também por manipulação do balanço da qualidade de aminoácidos consumidos na dieta, assim como o consumo aumentado de aminoácidos neutros como fenilalanina, valina, leucina, isoleucina, ou tirosina, que competem com o L-triptofano pelo transporte através da barreira hematoencefálica (WURTMANN & SHEIN, 1975). Na glândula pineal, ainda, ocorrem reações posteriores mediadas pela serotonina-N-acetil transferase e hidroxiindol-O-metil transferase (HIOMT) que levam a síntese de melatonina (RIOS et al., 2010).

Decerto, o efeito final da administração de L-triptofano é o aumento da síntese de 5-HT tanto no cérebro quanto na medula. A administração intratecal de 5-HT leva a um aumento no limiar nociceptivo no teste de nocicepção térmica - "tail flick" e limiar de corrente elétrica (GOODCHILD et al., 1997) e provoca também atividade antinociceptiva dose dependente no teste de nocicepção mecânica, fazendo o animal vocalizar com pressões mais elevadas (BARDIN et al., 1997). O aumento da concentração central de 5-HT via manipulação dietética, e a associação com a analgesia induzida por morfina, foram descritas em um estudo que concluiu que os animais alimentados com dieta deficiente em L-triptofano são menos responsivos aos efeitos analgésicos da morfina, além de possuírem concentrações reduzidas de serotonina no cérebro. As mesmas doses de morfina não efetivas nos animais privados de L-triptofano produzem analgesia eficaz nos animais com dieta normal, sem privação de L-triptofano (LYTLE et al., 1966).

Destes dados, pode-se concluir que a administração central de 5-HT possui capacidade de aumentar o limiar nociceptivo em animais e que dietas que diminuem as quantidades de 5-HT em humanos são pró-nociceptivas, pode-se ainda dizer, que o L-triptofano parece ser importante para o efeito da morfina, como também os neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe estão envolvidos na produção de analgesia por drogas como a morfina (MESSING & LYTLE, 1977; LIANG et al., 2011).

Mesmo reconhecendo a importância dos efeitos decorrentes da biotransformação do L-triptofano em 5-HT não se pode negligenciar o fato descrito

por Hammond & Yaksh (1984) e Jones & Light (1992) que descreveram que a analgesia induzida por estimulação do núcleo da rafe é bloqueada por antagonistas noradrenérgicos. Baseado nestas considerações, no presente estudo utilizamos a ioimbina para verificar se o sinergismo entre L-triptofano e paracetamol é influenciado por esta via noradrenérgica. Os resultados demonstraram que o antagonismo dos receptores alfa-adrenérgicos do tipo 2 bloquearam o efeito sinérgico do L-triptofano e paracetamol. Este resultado pode ser interpretado a luz do conhecimento que o núcleo magno da rafe possui neurônios não-serotonérgicos que se projetam para a medula espinhal e, além disso, que aproximadamente 10% dos neurônios do núcleo magno da rafe expressam receptores adrenérgicos α_2 . Dessa forma, a noradrenalina pode servir como monoamina modulatória neste sítio e o efeito sinérgico verificado pela administração de L-triptofano antes do paracetamol parece depender da ativação desses receptores (HAMMOND & YAKSH, 1984; JONES & LIGHT, 1992), o que pode ocorrer a nível espinhal ou supra espinhal.

Contudo, apenas 1% do L-triptofano é disponível para entrar nessa via metabólica visto que a maior parte do L-triptofano é catabolizado pela via das quinureninas, e um desses compostos formado, é o ácido quinurênico (AQ), formado a partir da quinurenina aminotransferase. O ácido quinurênico tem demonstrado várias atividades biológicas incluindo o antagonismo de receptores de glutamato do tipo NMDA e AMPA, antagonismo de receptores colinérgicos nicotínicos α_7 e ativação de receptores acoplados a proteína G GPR35 (HILMAS et al., 2001; STONE & ADDAE, 2002; WANG et al., 2006)

O efeito sinérgico do L-triptofano sobre a atividade antinociceptiva induzida pelas drogas analgésicas não opióides parece ser mediado por alguns mecanismos ligados a formação de 5-HT e melatonina ou à biotransformação pela via das quinureninas a ácido quinurênico. Este último tem sido descrito como sendo capaz de induzir analgesia nos testes da placa quente e tail-flick (HEYLIGER et al., 1998) bem como em modelos de hiperalgesia inflamatória, via administração intratecal (KEKESI et al., 2002). Devido a isso, nós não podemos descartar a hipótese de que o ácido quinurênico pode influenciar o efeito sinérgico do L-triptofano e assim decidimos examinar essa proposição, analisando o efeito analgésico do AQ.

Os resultados demonstraram que as doses mais elevadas de AQ ($\geq 18,75$ mg / kg) produziram um efeito analgésico durante o teste de contorções abdominais, efeito não observado com as doses mais baixas, as quais não foram capazes de diminuir o número de contorções induzidas pelo ácido acético. Vale ressaltar que as doses antinociceptivas encontradas no presente trabalho são várias vezes menores do que aquelas encontradas por Heylinger et al. (1998), durante os testes de nocicepção térmica em ratos. Além disso, a administração de AQ foi capaz de reduzir a dose requerida para o efeito antinociceptivo da dipirona, ou seja, apresentou um efeito sinérgico semelhante ao L-triptofano. A via das quinureninas representam uma rota importante do metabolismo do L-triptofano, logo, a verificação do sinergismo entre o AQ e dipirona nos permitem sugerir que o AQ está, pelo menos parcialmente, envolvido na mediação do efeito sinérgico do L-triptofano sobre a atividade da dipirona.

Como descrito anteriormente, o AQ é capaz de bloquear a neurotransmissão glutamatérgica, além de exibir interação sinérgica com a dipirona. Sendo o AQ produto metabólico do L-triptofano, parece razoável a hipótese de que os efeitos observados nos testes de nocicepção térmica na placa quente e nocicepção induzida pela capsaicina pela associação de L-triptofano e dipirona são reflexos do metabolismo do L-triptofano a AQ. A ativação de receptores TRPV1 parece resultar em aumento da transmissão glutamatérgica em vários neurônios como, por exemplo, nos aferentes nociceptivos primários (JIN et al., 2009), nos neurônios do corno dorsal na medula espinhal (ZHOU et al., 2009), no núcleo do trato solitário (NTS) (DOYLE et al., 2002), locus coeruleus (MARINELLI et al., 2002), neurônios dopaminérgicos da substância nigra (MARINELLI et al., 2005) e neurônios hipotalâmicos na área pré-óptica (KARLSSONA et al., 2005). Assim, o bloqueio do AQ nos receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA pode estar associado aos efeitos potencializadores do L-triptofano.

L-triptofano é um precursor da melatonina na glândula pineal, e tem sido extensivamente descrito o potencial antinociceptivo da melatonina em diversos modelos de nocicepção térmica e química em camundongos. Além disso, de acordo com Mantovani et al. (2006) a administração de melatonina produz um efeito analgésico sinérgico com morfina e diazepam, sugerindo o autor, uma possível

utilização como um medicamento para o tratamento adjuvante de dor. Assim, decidimos avaliar o envolvimento de receptores de melatonina no efeito do L-triptofano sobre a antinocicepção induzida pela dipirona, bloqueando ambos os receptores de melatonina, MT1 e MT2.

Os nossos resultados indicam que o sinergismo entre o L-triptofano e dipirona parece envolver os receptores de melatonina, levando em conta que o pré-tratamento com o luzindol, um antagonista dos receptores da melatonina, foi capaz de bloquear parcialmente o efeito do L-triptofano sobre a atividade antinociceptiva da dipirona. Este resultado indica que, provavelmente, o L-triptofano precisa ser metabolizado em melatonina e subseqüentemente ativar os receptores da melatonina para produzir o efeito sinérgico antinociceptivo.

7 Conclusão

Em conclusão, os nossos resultados mostraram que existe uma relação sinérgica entre o L-triptofano e a atividade antinociceptiva do cetoprofeno, paracetamol e dipirona. O mecanismo subjacente a esta interação parece ser diferente para a dipirona em relação a mecanística desse efeito para o paracetamol e cetoprofeno, embora para todos os casos seja necessária a metabolização do L-triptofano a serotonina. Os receptores 5-HT₁ e α 2 adrenérgicos parecem exercer papéis importantes no efeito sinérgico do L-triptofano com o paracetamol e cetoprofeno. No caso da dipirona, a interação sinérgica parece depender da formação de melatonina. Além disso, a existência de forte interação sinérgica entre o ácido quinurênico, a dipirona e o paracetamol sugere que esse metabólito pode ser importante para a ação descrita do L-triptofano.

8 Considerações Finais

Uma importante técnica utilizada para diminuir os efeitos colaterais de medicamentos é o uso de combinações de vários fármacos, em doses baixas, que produzem os mesmos efeitos terapêuticos de um único medicamento administrado em dose mais elevada. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi demonstrar o efeito sinérgico do L-triptofano sobre a atividade antinociceptiva da dipirona, cetoprofeno e paracetamol, bem como mostrar a dependência do metabolismo do L-triptofano em serotonina e ácido quinurênico no efeito sinérgico com analgésicos não-opioides durante os testes nociceptivos em camundongos.

Dessa forma, esse trabalho fornece subsídios pré-clínicos que podem servir de base para estudos clínicos posteriores com objetivo de incrementar as possibilidades da terapêutica farmacológica no manejo de estados dolorosos. Em adição, a larga experiência no uso das drogas abordadas neste estudo possibilita que os resultados obtidos na bancada do laboratório possam ser testados em relação ao seu potencial translacional de forma mais rápida para o contexto clínico, beneficiando aqueles pacientes refratários aos tratamentos atuais ou que experimentam efeitos adversos dose-dependente desses tratamentos.

Referências

- AHERN, G. P. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p.30429–34, 2003.
- ANDERSEN, S.; WORM-PEDERSEN, J. The prevalence of persistent pain in a Danish population. **Pain**, v. 106, n.3, p. S4:S332, 1997.
- ANDERSSON, G. B. Epidemiological features of chronic low back pain. **Lancet**, v; 354, p.581-585, 1999.
- ANDERSSON, D. A; GENTRY, C.; ALENMYR, L.; KILLANDER, D.; LEWIS, S. E; ANDERSSON, A.; BUCHER, B.; GALZI, J. L.; STERNER, O.; BEVAN, S.; HOGESTATT, E. D.; ZYGMUNT, P. M. TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. **Nat Commun.**, v. 22, n.2, p.551, 2011.
- ARDIS, T.C.; CAHIR, M.; ELLIOTT, J.J.;BELL, R.; REYNOLDS, GP.; COOPER, S.J;. Effect of acute tryptophan depletion on noradrenaline and dopamine in the rat brain. **J. Psychopharmacol.**, v.23, n.1,p.51-55, 2009.
- BANSAL, D.; BHANSALI, A.; HOTA, D.; CHAKRABARTI, A.; DUTTA, P. Amitriptyline vs. pregabalin in painful diabetic neuropathy: a randomized double blind clinical trial. **Diabet Med.**, v.26, n.10, p.1019-26, 2009.
- BARBANOJ, M. J.; ANTONIJOAN, R. M.; GICH, I. Clinical pharmacokinetics of dexketoprofen. **Clin Pharmacokinet**, v. 40, p. 245-62, 2001.
- BARDIN, L.; COLPAERT, F. C. Role of spinal 5-HT_{1A} receptors in morphine analgesia and tolerance in rats. **Eur J Pain**, v. 8, p.253–261, 2004.
- BARDIN, L.J.; LAVARENNE, A. E. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**, v. 86, p. 11–18, 2000.
- BARDIN; BARDIN, M.; LAVARENNE, J.; ESCHALIER, A. Effect of intrathecal serotonin on nociception in rats: influence of the pain test used. **Experimental Brain Research January**, v. 113, n.1, p 81-87, 1997.
- BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, p.1083–1152, 1999.
- BARNES, N. M.; ANDRADE, R.; BOCKAERT, J.; BUTLER, A.; HAMON, M.; HENSLER, J.; HERRICK-DAVIS, K.; HOYER, D.; MAROTEAUX, Luc.; MARTIN, G. R.; PETERS, J. A.; ROTH, B.; SHARP, T.; VILLALON, C.M.; NEUMAIER, J. 5-Hydroxytryptamine receptors, introductory chapter. Última modificação em 10/01/2012. Internacional Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR). Disponível em: < <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=1>>. Acesso em 03 jun. 2013.
- BASAK, G.W.; DROZD-SOKOŁOWSKA, J.; WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W. Update

on the incidence of metamizole sodium-induced blood dyscrasias in Poland. **J Int Med Res.**, v. 38, p.1374-1380, 2010.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CALIXTO, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **Eur J Pharmacol.**, v. 345, p.233-245, 1998.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p.219–228, 2002.

BEITZ, A. J. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 33-159, 1982.

BENSEÑOR, I.M. To use or not to use dipyrone? Or maybe, Central Station versus ER? That is the question... **Sao Paulo Med J.**, v.119, p. 190-191, 2001.

BENTLEY, G. A.; NEWTON, S.H.; STARR. J. Studies on the antinociceptive action of μ -agonist drugs and Their interactions with opioid mechanisms . **Br J Pharma.**, v. 79, p.125-134, 1983.

BENTLEY, E.; MACKIE, I. C. Trends in prescriptions of paracetamol for children. **Br Med J**, v. 311, p.362, 1995.

BERKENKOPF, J.W. & WEICHMAN, B.M. Production of prostacyclin in mice following intraperitoneal injection of acetic acid, phenylbenzoquinone and zymosan: its role in the writhing response. **Prostaglandins**, v.36, p. 693–709, 1998.

BERTOLINI, Alfio; FERRARI, Anna; OTTANI, Alessandra; GUERZONI, Simona; TACCHI, Raffaella; LEONE, Sheila. Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. **CNS Drug Reviews**, v. 12, n. 3–4, p. 250–275, 2006.

BERTOLINO, M.; VICINI, S.; COSTA, E. Kynurenic acid inhibits the activation of kainic and N-methyl-D-aspartic acid-sensitive ionotropic receptors by a different mechanism. **Neuropharmacology**, v.28, n.5, p.453-7, 1989.

BOMBARDIER, C. et al. Comparison of Upper Gastrointestinal Toxicity of Rofecoxib and Naproxen in Patients with Rheumatoid Arthritis. **N. Engl J. Med.**, v. 343, p.1520-8, 2000.

BOTTING, R.M. Inhibitors of cyclooxygenases: Mechanisms, selectivity and uses. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 57, p. 113-112, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília Guia para Registro de Novas Associações em Dose Fixa Brasil/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

BRENNAN, F.; CARR, D.B.; COUSINS, M. Pain Management: A Fundamental Human Right. **Anesth Analg.**, v. 105, p. 205-221, 2007.

BRODIE, B. B.; AXELROD, J. The fate of acetanilide in man. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 94, p.29–38, 1948.

BUCKLEY, N.; EDDLESTON, M. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. **Clinical Evidence**, v.12, p.2101, 2007.

CABRÉ, F.; FERNÁNDEZ, M. F.; CALVO, L.; FERRER, X.; GARCÍA, M. L.; MAULEÓN, D. Analgesic, antiinflammatory, and antipyretic effects of S(+)-ketoprofen in vivo. **J Clin Pharmacol**, v. 38, p. 3S-10S, 1998.

CARLTON, S. M.; HARGETT, G. L.; COGGESHALL, R. E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Neuroscience Letters**, v. 197, n.1, p. 25–28, 1995.

CARVALHO, L.P.; BOCHET, P.; ROSSIER, J. The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits. **Neurochem Int.**, v.28, n.4, p.445-452, 1996.

CATERINA, M.J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A.B.; MARTIN, W.J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K.R.; KOLTZENBURG, M.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v.288, p. 306–313, 2000.

CATERINA, M.J. & JULIUS D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annu Rev Neurosci.**, v.24, p. 487–517, 2001.

CERVERO, F. Visceral pain. In: Dubner, F.; Gebhart, G. F.; Bond, M. R. eds. *Vth World Congress on Pain*. Amsterdam: Elsevier, 1988, p.216-226.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, n.21, p. 13926-13931, 2002.

CHEN, S. & PAN, H. Distinct Roles of Group III Metabotropic Glutamate Receptors in Control of Nociception and Dorsal Horn Neurons in Normal and Nerve-Injured Rats. **Journal Pharm Exp Ther**, v. 312, n.1, p. 120-126, 2004.

CHO, I.; LEE, M.J.; JANG, M.; GWAK, N.G.; Lee, K.Y.; JUNG, HS. Minocycline markedly reduces acute visceral nociception via inhibiting neuronal ERK phosphorylation. **Molecular Pain**, v. 8, n. 13, 2012.

CHUANG, H.H.; PRESCOTT, E. D.; KONG, H.; SHIELDS, S.; JORDT, S. E. et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5) P2-mediated inhibition. **Nature**, v.411, p.957–62, 2001.

COLLETT, B. Visceral pain: the importance of pain management services. **British Journal of Pain.**, v. 7, n. 1, p. 6-7, 2013.

COLLIER, H. O.; DINNEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mice. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 32, p. 295-310, 1968.

COOPER, S. A.; ENGEL, J.; LADOV, M.; PRECHEUR, H.; ROSENHECK, A.; RAUCH, D. Analgesic efficacy of an ibuprofen-codeine combination. **Pharmacotherapy**, v. 2, p.162-167, 1982.

COOPER, S. A.; PRECHEUR, H.; RAUCH, D.; ROSENHECK, A.; LADOV, M.; ENGEL, J. Evaluation of oxycodone and acetaminophen in treatment of postoperative dental pain. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, n. 50, p. 496-501, 1980.

CURZON G & MARSDEN CA. The effect of L-tryptophan on changes in motor activity caused by parachlorophenylalanine. **Proceedings of the B.P.S.**, v.26, p. 232-233, 1973.

DAFNY, N. Em Byrne JH: The Neuroscience Online (NSO) Textbook, Capítulos 6-8, Houston/Texas. Disponível em: < <http://neuroscience.uth.tmc.edu/index.htm>>. Acesso em 26 abril 2013.

DAFNY, N.; DONG, W.Q.; PRIETO-GOMEZ, C.; REYES-VAZQUEZ, C.; STANFORD, J.; QIAO, J.T. Lateral hypothalamus: Site involved in pain modulation. **Neuroscience**, v. 70, n. 2, p.449-460, 1996.

DAVAL, G.; VERGE, D.; BASBAUM, AI; BOURGOIN S.; HAMON, M. Autoradiographic evidence of serotonin₁ binding sites on primary afferent fibres in the dorsal horn of the rat spinal cord. **Neurosci Lett**, v. 83, p.71-76, 1987.

DAVIS, A.J. & PERKINS M.N. The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v.113, p.63-68, 1994.

DENNIS, S.G. & MELZACK, R. Pain modulation by 5-hydroxytryptaminergic agents and morphine as measured by three pain tests. **Exp Neurol**, v. 69, p. 260-270, 1980.

DERAEDT, R.; *et al.* Inhibition of prostaglandins biosynthesis by non-narcotic analgesic drugs. **Arch Int Pharmacodyn Ther.**v.;224, n. 3, p. 30-42, 1976

DeSALLES, A. A; KATAYAMA, Y.; BECKER, D. P.; HAYES, R. L. Pain suppression induced by electrical stimulation of the pontine parabrachial region. Experimental study in cats. **J Neurosurg.**, v.62, n.3, p.397-407, 1985.

DÍAZ-REVAL, M. I.; GALVÁN-OROZCO, R.; LÓPEZ-MUÑOZ, F. J.; CARRILLO-MUNGUÍA, N. Synergism of caffeine on antinociceptive effects of metamizole. **Cir Cir**, v. 76, p.241-246, 2008.

DING, Y.Q.; MARKLUND, U.; YUAN, W.; YIN, J., WEGMAN, L.; ERICSON, J.; DENERIS, E.; JOHNSON, R. L.; CHEN, Z. F. Lmx1b is essential for the development of serotonergic neurons. **Nat. Neurosci.**, v. 6, p. 933-938, 2003.

DIONNE, R. A. Additive analgesic effects of oxycodone and ibuprofen in the oral surgery model American. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 57, p.673-678, 1999.

DIRIG, DAVID M.; YAKSH, TONY L. Intrathecal Baclofen and Muscimol, But Not Midazolam, are Antinociceptive Using the Rat-Formalin Model. **The American**

Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 275, p. 219-227, 1995.

DORR, V.J.; COOK, J. Agranulocytosis and near fatal sepsis due to 'Mexican aspirin' (dipyron). **South Med J.**, v.89, p. 612-614, 1996.

DOUGHERTY, P.M.; WILLIS, W.D. Enhanced responses of spinothalamic tract neurons to excitatory amino acids accompany capsaicin-induced sensitization in the monkey. **J Neurosci.**, v. 12, n. 3, p. 883-94, 1992.

DOYLE, M. W.; BAILEY, T. W.; JIN, Y. H. ANDRESEN, M. C. Vanilloid receptors presynaptically modulate visceral afferent synaptic transmission in nucleus tractus solitarius. **J Neurosci.**, v.22, p. 8222–8229, 2002.

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

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutinyl and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.107, p. 385-393, 1959.

EDWARDS, J.E.; MCQUAY, H. J. Dipyron and agranulocytosis: what is the risk. **The Lancet**. v. 360, p.1438, 2002.

EIDE P.K. & HOLE K., Interactions between serotonin and substance P in the spinal regulation of nociception. **Brain Res.**, v. 550, p. 225–230, 1991.

EIDE, P. K.; HOLE, K.; BERGE, O. G.; BROCH, O. J. 5-HT depletion with 5,7-DHT, PCA and PCPA in mice: differential effects on the sensitivity to 5-MeODMT, 8-OH-DPAT and 5-HTP as measured by two nociceptive tests. **Brain Res.**, v. 440, n.1, p.42-52, 1988.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T.A.; ALBUQUERQUE R. R.; NUNES, D.S.; CARVALHO, C. ANALGESIC activity of *Psychotria colorata* (wild ex Ret S) Muell. Arg Alkaloids. **J Ethnopharmacol.**, v. 48, p.77–83, 1995.

FASMER, O. B.; HUNSKAAR, S; HOLE, K. Antinociceptive effects of serotonergic reuptake inhibitors in mice. **Neuropharmacology**, v. 28, n. 12, p. 1363-6, 1989.

FEIN, A. **NOCICEPTORES**: As células que sentem dor. P, PETROV; FRANCISCHI, J. N; FERREIRA, S. H. *et al.* tradutores. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line; 2011. 106 p.

FERNSTROM, M. H.; FERNSTROM, J. D. Effect of chronic protein ingestion on rat central nervous system tyrosine levels and in vivo tyrosine hydroxylation rate. **Brain Res** v. 672, p. 97-103, 1995.

FERRETTI, A.; BABILONI, C.; DEL GRATTA, C.; CAULO, M.; TARTARO, A.; BONOMO, L.; ROSSINI, P.M.; ROMANI, G.L. Functional topography of the secondary somatosensory cortex for non-painful and painful stimuli: an fMRI study. **Neuroimage**, v. 20, n.3, p. 1625-1638, 2003.

FLEMING, N. R. P.; PEREIRA JUNIOR, F. J. Cefaléias Primárias. *In*: Alves Neto, O. **Dor**: princípios e prática. Porto Alegre: Editora Artmed; 2009.

- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) Disponível em:
<<http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/postmarketdrugsafetyinformationforpatientsandproviders/ucm103420.htm>>; Acesso em 28 fev. 2013.
- GARRAWAY, S. M.; HOCHMAN, S. Serotonin increases the incidence of primary afferent-evoked long-term depression in rat deep dorsal horn neurons. **J Neurophysiol**, v.85, p.1864–1872, 2001.
- GEBHART, G. F. Visceral Pain Mechanisms. In: CHAPMAN, C. R.; FOLEY, K. (Ed.). **Visceral Pain Mechanisms Current and Emerging Issues in Research on Cancer Pain**, C.R. Chapman and K., Lipincott-Raven, 1993.
- GENOVESE, M.C.; COHEN, S.; MORELAND, L.; LIUM, D.; ROBBINS, S.; NEWMARK, R.; BEKKER, P. Combination therapy with etanercept and anakinra in the treatment of patients with rheumatoid arthritis who have been treated unsuccessfully with methotrexate. **Arthritis Rheum.**, v. 50, n.5, p.1412-9, 2004.
- GEORGE, C.F.O.; MILLAR, T.W.; P.J. HANLY, P.J.; KRYGER, M.H. The Effect Of L-Tryptophan On Daytime Sleep Latency In Normals: Correlation With Blood Levels. **Sleep.**, v. 12, n.4, p. 432-440, 1989.
- GIBBONS, J. L.; BARRA, G. A.; BRIDGERA, W. H.; LIEBOWITZA, S. F.; Manipulations of dietary tryptophan: Effects on mouse killing and brain serotonin in the rat. **Brain Research**, v. 169, p. 139–153, 1979.
- GIBBONS, J. L.; BARR, G. A.; BRIDGER, W.H.; LEIBOWITZ, S.F. L-Tryptophan's effects on mouse killing, feeding, drinking, locomotion, and brain serotonin. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.15, n.2, p. 201-206, 1981.
- GOODCHILD, C.S.; GUO, Z.; FREEMAN, J.; GENT, J.P. 5-HT spinal antinociception involves mu opioid receptors: cross tolerance and antagonist studies. **British Journal of Anaesthesia**, v. 78, p.563-569, 1997.
- GREEN, H.; GREENBERG, S. M.; ERICKSON, R. W.; SAWYER, J. L.; ELLISON, T. Effect of dietary phenylalanine and tryptophan upon rat brain amine levels. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.136, p174-178, 1962.
- GSCHOSSMANN, J. M.; HOLTSMANN, G.; MAYER, E. A. Epidemiology and clinical phenomenology of visceral pain. **Schmerz.**, v. 16, n.6, p. 447-51, 2002.
- GUNELI, E.; YAVASOGLUB, N.U.K.; APAYDINC, S.; UYARD, M.; UYARE, M. Analysis of the antinociceptive effect of systemic administration of tramadol and dexmedetomidine combination on rat models of acute and neuropathic **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 88, n.1, p. 9–17, 2007.
- GUO, L.; LI, J.; YE, H.; ZHENG R.; HAO, X.J.; CHEN, W.Y.; JU, R.; YAO, R.; YANG, H.F.; YUY, X.L.; YE, C.Y. ZHANG DC. Anti-inflammatory and analgesic potency of carboxyamidotriazole, a tumoristatic agent. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**, v. 325, p.10–16, 2009.
- HALDER, S.; LOCKE, G. R. Epidemiology and social impact of visceral pain. In: GIAMBERARDINO, M. A. (ed). Visceral pain: clinical, pathophysiological and therapeutic aspects. **Oxford University Press**, 2009, p. 1–7.

HALLMAN, H. & JONSSON, G. **Med. Biol.**, v. 62, p. 198-209, 1984.

HAMERSCHLAK, N.; MALUF, E.; PASQUINI, R.; ELUF-NETO, J.; MOREIRA, F.R.; CAVALCANTI A.B.; OKANO, I.R.; FALCÃO, R.P.; PITA. M.T.; LOGGETTO, S.R.; ROSENFELD, L.G.; LORAND-METZE, I.G.; Incidence of aplastic anemia and agranulocytosis in Latin America – The LATIN study. **Sao Paulo Med J.**, v. 123, p. 101-104, 2005.

HAMMOND, D. L.; YAHSH, T. L. Antagonism of stimulation of methysergide or phentolamine. **Brain Research.**, v.298, p. 329-337, 1984.

HARDY, S. G. P. Analgesia elicited by prefrontal stimulation. **Brain Research.** v.339, n. 2, p. 281–284, 1985.

HARGREAVES RJ & SHEPHEARD SL. Pathophysiology of migraine--new insights. **Can J Neurol Sci.**,v. 26, p 12-9, 1999.

HEDENMALM, K. & SPIGSET, O. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyron (metamizole). **European Journal Pharmacology**, v. 58, p. 265-274, 2002.

HEILS, A.; TEUFEL, A.; STOBER, G.; RIEDERER, P.; BENDEL, D.; LESCH, K. P. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. **J. Neurochem.**, Germany, v. 66, p. 2621–2624, 1996.

HEYLIGER, S. O.; GOODMAN, C. B.; NGONG, J. M.; SOLIMAN, K. F. A. The analgesic effects of tryptophan and its metabolites in the rat. **Pharmacological Research**, Tallahassee. v. 38, p. 243-250, 1998.

HILMAS, C.; PEREIRA E.F.R.; ALKONDON, M.; RASSOULPOUR A.; SCHWARCZ, R.; ALBUQUERQUE, E.X. The Brain Metabolite Kynurenic Acid Inhibits 7 Nicotinic Receptor Activity and Increases Non-7 Nicotinic Receptor Expression: Physiopathological Implications. **The Journal of Neuroscience.**, v.21, n.19, p. 7463–7473, 2001.

HO, I. K.; BRASE, D. A.; LOH, H.H.; WAY, E.L. Influence of L-tryptophan on morphine analgesia, tolerance, and physical dependence. **J Pharmacol Exp Ther.** v.193, p.35-43, 1975.

HOLZER, P. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol.**, v. 43, p.143–201, 1993.

HORIGUCHI, N.; AGO, Y.;ASADA, K.; KITA, Y.; HIRAMATSU, N.; TAKUMA, K.; MATSUDA, T. Involvement of spinal 5-HT1A receptors in isolation rearing-induced hypoalgesia in mice. **Psychopharmacology**, v.227, n.2, p. 251-261, 2013.

HORNFELDT, C.S.; SUN, X.; LARSON, A. A. The NH₂-terminus of substance P modulates NMDA-induced activity in the mouse spinal cord. **J. Neurosci.**, Minnesota, v. 14, p. 3364–3369, 1994.

HRYCAJ, P.; STRATZ, T.; MULLER, W.; RUSSEL, I. J.; VIPRAIO, G. A., LOPEZ, Y. Platelet 3H-imipramine uptake receptor density and serum serotonin levels in

patients with fibromyalgia/fibrositis syndrome (letter; comment). **J. Rheumatol.**, v. 20, p. 1986–1988, 1993.

IMAMURA, M; IMAMURA, S. T.; FURLAN, A. D. Lombalgias. *In*: ALVES NETO, O.; COSTA, C. M. C.; SIQUEIRA, J. T. T.; TEIXEIRA, M. J. *et al.* **Dor**: princípios e prática, Porto Alegre: Artmed Editora, 2009. 1440 p.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP), 2009.

Disponível em: <

<http://www.iasppain.org/AM/AMTemplate.cfm?Section=Home,Home&SECTION=Home,Home&TEMPLATE=/CM/ContentDisplay.cfm&CONTENTID=10587>>. Acesso

em: 01 jun. 2013.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP), 2011.

Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>.> Acesso em: 12 mar. 2013.

JIN, Y.H.; YAMAKI, F.; TAKEMURA, M.; KOIKE, Y.; FURUYAMA, A.; YONEHARA, N. Capsaicin-induced glutamate release is implicated in nociceptive processing through activation of ionotropic glutamate receptors and group I metabotropic glutamate receptor in primary afferent fibers. **J Pharmacol Sci.**, v.109, n. 2, p. 233-41, 2009.

JONES S.L. & LIGHT A.R. Serotonergic medullary raphespinal projection to the lumbar spinal cord in the rat: a retrograde immunohistochemical study. **Journal of Comparative Neurology.**, v.322, p. 599-610, 1992.

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

JUNQUEIRA, L. C. U. & CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KARLSSONA, U., SUNDGREN-ANDERSSONA, A.K.; JOHANSSONB, S.; KRUPPA, J.J. Capsaicin augments synaptic transmission in the rat medial preoptic nucleus. **Brain Research.**, v. 1043, n.1–2, p. 1–11, 2005.

KEKESI, G.G.; JOO, G.G.; CSULLOG, E.E.; DOBOS, I.I.; KLIMSCHA, W.W.; TOTH, K.K.; BENEDEK, G.G.; HORVATH, G.G. The antinociceptive effect of intrathecal kynurenic acid and its interaction with endomorphin-1 in rats. **Eur J Pharmacol.**, v.445, n1-2, p. 93-96, 2002.

KENNEDY, Jeffrey D. Neuropathic Pain: Molecular Complexity Underlies Continuing Unmet Medical Need. **J. Med. Chem.**, v. 50, p.2547-2556, 2007.

KEW, J.N.; KEMP, J.A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, (Berl), v.179, p. 4-29, 2005.

KHARKEVICH D. A.; CHURUKANOV, V. V. Pharmacological regulation of descending cortical control of the nociceptive processing. **Eur. J. Pharmacol**, v.375, p.121–131, 1999.

KNABL, J.; WITSCHI, R.; HOSL, K.; REINOLD, H.; ZEILHOFER, U.B.; AHMADI, S.; BROCKHAUS, J.; SERGEJEVA, M.; HESS, A.; BRUNE, K.; FRITSCHY, J.M.; RUDOLPH, U.; MOHLER, H.; ZEILHOFER, H.U. Reversal of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes. **Nature**, v. 451, p. 330–334, 2008.

KOLESNIKOV, Y.A.; CHERESHNEV, I.; PASTERNAK, G.W. Analgesic synergy between topical lidocaine and topical opioids. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 295, p. 546–551, 2000.

LAPIN, I. P., Stimulant and convulsant effects of kynure- nines injected into brain ventricles in mice, **J. neural Trans.**, v.48, p.37-43, 1978.

LARSON, A. A.; IGWE, O. J.; SEYBOLD, V. S. Effects of lysergic acid diethylamide (LSD) and adjuvant-induced inflammation on desensitization to and metabolism of substance P in the mouse spinal cord. **Pain**, v. 37, p. 365–373, 1989.

LAWSON, S. N & DJOUHRI, L. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Res Rev.**, v. 46, n. 2, p.131-45, 2004.

LAWSON, S. N. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Delta- or Aalpha/beta-fibres. **Exp Physiol**, v. 87, n.2, p.239-44, 2002.

LEEM J.W.; CHOI, E.J.; PARK, E.S.; PAIK, K.S. N-methyl-d-aspartate (NMDA) and non-NMDA glutamate receptor antagonists differentially suppress dorsal horn neuron responses to mechanical stimuli in rats with peripheral nerve injury. **Neurosci Lett.**, v. 211, p. 37–40, 1996.

LIANG, D. Y.; LI, X.; CLARK, J.D. 5-hydroxytryptamine type 3 receptor modulates opioid-induced hyperalgesia and tolerance in mice. **Anesthesiology.**, v. 114, n.5, p. 1180-1189, 2011.

LIU, L.; SIMON, S. A. A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 738–741, 1994.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. PAIN: AN OVERVIEW. **LANCET**, v.353, n.8, p. 1607-1609, 1999.

LOGAN, R. M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T., KEEFE, D. M. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 63, p. 239–251, 2009.

LOYD, D. R.; MURPHY, Anne Z. The Role of the Periaqueductal Gray in the Modulation of Pain in Males and Females: Are the Anatomy and Physiology Really that Different? **Neural Plasticity**, Atlanta, 12 p., 2009.

LU, Y.; PERL, E.R. A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. **J Neurosci.**, v. 23, n.25, p. 8752-8758, 2003.

LUTFY, K.; CAI, S.X.; WOODWARD, R. M.; WEBER, E. Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. **Pain**, v.70, n. 1, p.31-40, 1997.

LYTLE, L.D., PHEBUS, L., FISHER, L. AND MESSING, R.B., Dietary effects on analgesic drugpotency. In: M. Adler, L. Manara and R. Samanin (Eds.), **Factors Affecting the Action of Narcotics**, Raven Press, New York, 1976.

MALCANGIO, M.; BOWERY, N.G. GABA and its receptors in the spinal cord Trends. **Pharmacol Sci**, v.17, p. 457–462, 1996.

MALIN, D.H.; LAKE, J.R.; HAMILTON, R.F.; SKOLNICK, M.H. Augmented analgesic effects of enkephalinase inhibitors combined with transcranial electrostimulation. **Life Sci**. v. 44, n.19, p. 1371-1376, 1989.

MALLET, C.; BARRIERE, D. A.; ERMUND, A.; JONSSON, B. A. G.; ESCHALIER, A. et al. TRPV₁ in Brain Is Involved in Acetaminophen-Induced Antinociception. **PLoS ONE**, v. 5, n.9, p.12748, 2010.

MALMBERG, A.B.; YAKSH T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science**, v. 257, p. 1276–1279, 1992.

MALUF, E. P. Epidemiologia da anemia aplástica no Brasil. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 1999.

MANSOURI, M. T.; NAGHIZADEHC, B.; GHORBANZADEHD, B.; FARBOODE, Y. Central and peripheral antinociceptive effects of ellagic acid in different animal models of pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 707, n. 1–3, p. 46-53, 2013.

MANTOVANI, M.; KASTER, M. P.; PERTILE, R.; CALIXTO, J. B.; RODRIGUES, A. L.; SANTOS, A. R. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. **J Pineal Res.**, v. 41, p. 382–389, 2006.

MARINELLI, S.; VAUGHAN, C. W.; CHRISTIE, M.J.; CONNOR, M. Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus In *vitro*. **The Journal of Physiology.**, v. 543, n.2, p. 531–540, 2002.

MARINELLI, S. et al. Activation of TRPV1 in the VTA Excites Dopaminergic Neurons and Increases Chemical- and Noxious-Induced Dopamine Release in the Nucleus Accumbens. **Neuropsychopharmacology**, v.30, p. 864–870, 2005.

MARQUES, J. O. Dor: diagnóstico e tratamento. Bases de Anatomia e Fisiopatologia. São Paulo: Âmbito Editora, v. 1, n. 1, 2004.

MARTÍNEZ-MARTÍN, P.; RAFFAELLI, E. J.; TITUS, F.; DESPUIG, J.; FRAGOSO, Y.D.; DÍEZ-TEJEDOR, E.; LIAÑO, H.; LEIRA, R.; CORNET, M.E.; VAN TOOR, B.S., CÁMARA, J., PEIL, H., VIX, J.M., ORTIZ, P. Co-operative Study Group: Efficacy and safety of metamizol vs. acetylsalicylic acid in patients with moderate episodic tension-type headache: a randomized, double-blind, placebo- and active-controlled, multicentre study. **Cephalalgia**, v. 21, p. 604-610, 2001.

MATSUDA, M.; IMAOKA, T.; VOMACHKA, A. J.; GUDELSKY, G.A.; HOU, Z.; BAILEY, J. P.; NIEPORT, K.M.; WALTHER, D.J.; BADER, M.; HORSEMAN, N.D. Serotonin Regulates Mammary Gland Development via an Autocrine-Paracrine Loop. **PLoS One**, v. 6, n.2, p. 193–203, 2004.

MEHLISCH, D.R. The efficacy of combination analgesic therapy in relieving dental pain. **The Journal of the American Dental Association**, v.133, n. 7, p. 861-871, 2002.

MESSING R. B.; LYTLE L. D., SEROTONIN-CONTAINING NEURONS: THEIR POSSIBLE ROLE IN PAIN AND ANALGESIA. **Pain**, v.4, p. 1-21, 1977.

MILLAN M.J. Serotonin and pain: evidence that activation of 5-HT_{1A} receptors does not elicit antinociception against noxious thermal, mechanical and chemical stimuli in mice. **Pain**. v.58, p. 45–61, 1994.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol**, v. 57, p. 161-164, 1999.

MIRANDA, H. F.; PUIG, M. M.; PRIETO, J. C.; PINARD, G. Synergism between paracetamol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in experimental acute pain. **Pain**., v.121, n.1-2, p. 22-8, 2006.

MOHAPATRA, D. P.; NAU, C. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p.50080-90, 2003.

MOLDOFSKY, H. Rheumatic pain modulation syndrome: the interrelationships between sleep, central nervous system serotonin, and pain. **Adv. Neurol.**, v. 33, p. 51-57, 1982.

MOROZOVA, A.S.; VAL'DMAN, A.V. Influence of neurotransmitters on the antinociceptive effect of midbrain stimulation. **Biull Eksp Biol Med.**, v. 88, n.11, p.551-3, 1979.

MORSE, H. N. Ueber eine neue Darstellungsmethode der Acetylamidophenole. **Ber Deutscher Chem Ges.**, v.11, p.232–233, 1878.

MUIR III, W.W. Anaesthesia and pain management in horses. **Equine veterinary education**, v. 10, n. 6, p. 335-340, 1998.

MUNRO, G.; LOPEZ-GARCIA, J.A.; RIVERA-ARCONADA, I.; ERICHSEN, H.K.; NIELSEN, E.O.; LARSEN, J.S.; AHRING, P.K.; MIRZA, N.R. Comparison of the novel subtype-selective GABA_A receptor-positive allosteric modulator NS11394 [3'-[5-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-benzoimidazol-1-yl]-biphenyl-2-carbonitrile] with diazepam, zolpidem, bretazenil, and gaboxadol in rat models of inflammatory and neuropathic pain. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 327, p. 969-981, 2008.

MURPHY, R.M.; ZEMLAN, F.P. Differential effects of substance P on serotonin-modulated spinal nociceptive reflexes. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 93, p.118-121, 1987.

NESS, T. J.; GEBHART, G. F. Characterization of neurons responsive to noxious colorectal distension in the T13-L2 spinal cord of the rat. **J Neurophysiol**, v. 60, p. 1419-1438, 1988.

NEUGEBAUER, V.; WEIRETTER, F.; SCHAIBLE, H. G. Involvement of substance P and neurokinin-1 receptors in the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. **J Neurophysiol.**, v.73, n.4, p.1574-83, 1995.

NGUYEN, T. L.; NAM, Y.S.; LEE, S.Y.; KIM, H. C.; JANG, C. G. Effects of capsazepine, a transient receptor potential vanilloid type 1 antagonist, on morphine-induced antinociception, tolerance, and dependence in mice. **Br. J. Anaesth.**, v.105, n.5, p. 668-674, 2010.

ONG, Cliff K. S.; SEYMOUR, Robin A.; LIRK, Phillip; MERRY, Alan F. Combining Paracetamol (Acetaminophen) with Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs A Qualitative Systematic Review of Analgesic Efficacy for Acute Postoperative. **Anesthesia & Analgesia**. v. 110, n.4, p.1170-9, 2010.

PAKULSKA, W.; WEJMAN, I.; CZARNECKA, E. Influence of felbamate on the antinociceptive action of morphine, metamizol and indomethacin in mice. **Acta Pol Pharm.**, v.60, p. 201-206, 2003.

PANDOLFINI, C.; BONATI, M. A literature review on off-label drug use in children. **Eur J Pediatr**, v.164, p.552–558, 2005.

PERKINS, M.N. & KELLY, D. Induction of bradykinin B1 receptors in vivo in a model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v.,110, p. 1441–1444, 1993.

PERKINS, M.N.; CAMPBELL E.; DRAY, A. Antinociceptive activity of the bradykinin B1 and B2 receptor antagonists, des-Arg9,[Leu8]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. **Pain**, v. 53, p. 191–197, 1993.

PETERS, J. C. Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 294, p.345–358, 1991.

POMPEIANO, M.; PALACIOS, J. M.; MENGOD, G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. **J Neurosci**, v.12, p. 440–453, 1992.

POTTER, W. Z.; HOLLISTER, L.E. Agentes antidepressivos. *In*: BERTRAM, G. **Katzung: Basic and Clinical Pharmacology**.10. Ed. São Paulo : McGraw-Hill, 2008.

PRAVETONI, M.; NAOUR, M.L.; HARMON, T.M.; TUCKER, A.M.; PORTOGHESE, P.S.; PENDEL, P.R. An Oxycodone Conjugate Vaccine Elicits Drug-Specific Antibodies that Reduce Oxycodone Distribution to Brain and Hot-Plate Analgesia. **J. Pharm. Exp. Ther.**, v. 18, 2012.

PREMKUMAR, L. S., AHERN G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature**, v. 408, p.985–90, 2000.

QIN, H.Y.; LUO, J. L.; QI, S.D.; XU, H. X.; SUNG, J. J.; BIAN, Z. X. Visceral hypersensitivity induced by activation of transient receptor potential vanilloid type 1 is mediated through the serotonin pathway in rat colon. **Eur J Pharmacol.**, v. 647, n.1-3, p. 75-83, 2010.

QUINTERO, J. E.; ONIFER, S. M.; POMERLEAU, F.; HUETTL, P.; GERHARDT, G. A. Electrical and noxious stimuli in the somatosensory pathway evoke rapid glutamate release in the primary somatosensory cortex of the rat. In: *Monitoring Molecules in Neurosciences*, Londres, 2012. Disponível em: <<http://mmn.fontismedia.com/online/meeting/infiles/pdf/abs090326.pdf>>. Acesso em: 06 jan. 2013.

RAAP, T.; JÜSTEN, H. P.; MILLER, L. E.; CUTOLO, M.; SCHÖLMEIRICH, J.; STRAUB, R. H. J. Neurotransmitter modulation of interleukin 6 (IL-6) and IL-8 secretion of synovial fibroblasts in patients with rheumatoid arthritis compared to osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, v. 27, p 2558-2565, 2000.

RAFFA, R.B. Pharmacology of oral combination analgesics: rational therapy for pain. **J Clin Pharm Ther**, v. 26, p. 257–264, 2001.

RAJA, S.; MEYER, R. A.; RINCKAMP, M.; CAMPBELL, J. N. Peripheral neural mechanism of nociception. In: WALL, P.D. & MELZACK, R. (Eds.). **Textbook of pain**. Ediburgh: Churchill Livingstone, p. 11-57, 1999.

RAMSEY, S.; DELLING, M.; CLAPHAM, D. E. AN INTRODUCTION TO TRP CHANNELS. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 68, p.619–47, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

REDDY, S. V. R.; YAKSH, T. L. Spinal noradrenergic terminal system mediates antinociception. **Brain Research.**, v. 189, p. 391-402, 1980.

REICHL, S.; AUGUSTIN, M.; ZAHN, P. K.; POGATZKI, E. M. Peripheral and spinal GABAergic regulation of incisional pain in rats. **Pain**, v. 153, n.1, p. 129–141, 2012.

RIANO-GALAN, I.; GONZALEZ, M.; SANCHEZ, S. G., et al. Opinion de los pediatras sobre el dolor infantil. **An Esp Pediatr**, v. 49, p.587–593, 1998.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol.**, v.387, p. 111–118, 2000.

RIOS, E. R. V.; VENÂNCIO, E. T; ROCHA, N. F. M.; WOODS, D. J.; VASCONCELOS, S.; MACEDO, D.; SOUSA, F. C. F.; FONTELES, M. M. F. Melatonin: Pharmacological Aspects and Clinical Trends. **International Journal of Neuroscience**, v.120, n.9, p.583-590, 2010.

RIZZATTI-BARBOSA, C. M.; NOGUEIRA, M. T.; de ANDRADE, E. D.; AMBROSANO, G. M.; de BARBOSA, J. R. Clinical evaluation of amitriptyline for the control of chronic pain caused by temporomandibular joint disorders. **Cranio.**, v.21, n.3, p.221-5, 2003.

ROBERT B. RAFFA, JOSEPH V. PERGOLIZZI, AND RONALD J. TALLARIDA, JR. Analgesic combinations. **J Pain**. v. 11, p. 701–709, 2010.

ROBERT, M. H. T.; REES, H. The antinociceptive effects of stimulating the pretectal nucleus of the rat. **Pain**., v. 25, n. 1, p.83–93, 1986.

ROBERTS, M. H. Involvement of serotonin in nociceptive pathways. **Drug Des Deliv.**, v.4, p.77-83, 1989.

ROCHA, N. F.; RIOS, E. R.; CARVALHO, A. M.; CERQUEIRA, G. S.; LOPES, A. A.; LEAL, L. K.; DIAS, M. L.; SOUSA, D.P.; SOUSA, F. C. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v.384, p.525-533, 2011.

ROCHA, N. F. M.; RIOS, E. R. V.; CARVALHO, A. M. R.; FREIRE, L.V.; DIAS, M. L.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F. Synergistic effect of the L-tryptophan and kynurenic acid with dipyron or paracetamol in mice. **Chemico-Biological Interactions**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi>, 2013.

RODRÍGUEZ-SILVERIO, J.; ARRIETA, J.; FLORES-MURRIETA. F. J. Synergistic interaction between tramadol and dipyron in thermal paw stimulation model in the rat. **Drug Development Research**, v. 70, n. 6, p. 450–454, 2009.

ROIZENBLATT, S.; HILÁRIO, M. O. E.; GOLDENBERG, J.; TUFIK, S. Fibromialgia juvenil. **Rev Bras Reumatol.**, v. 37, n. 5, p. 271-3, 1997.

RUSSELL, I. J.; MICHALEK, J. E.; VIPRAIO, G. A.; FLETCHER, E. M.; JAVORS, M. A.; BOWDEN, C. A. Platelet 3H-imipramine uptake receptor density and serum serotonin levels in patients with fibromyalgia/fibrositis syndrome. **J. Rheumatol.**, n. 19, p. 104–109, 1992.

SAGEN J.; WINKER M. A.; PROUNDFIT, H. K. Hypoalgesia induced by the local injection of phentolamine in the nucleus raphe magnus: blockade by depletion of spinal cord monoamines. **Pain** v.16, p. 253-263, 1983.

SANDKÜHLE, J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. **Physiol. Rev.**, v. 89, p. 707-758, 2009.

SARZI-PUTTINI, P.; ATZENI, F.; LANATA, L.; BAGNASCO, M.; COLOMBO, M.; FISCHER, F.; D'IMPORZANO, M. Pain and ketoprofen: what is its role in clinical practice? **Reumatismo**, v. 62, n. 3, p.172-188, 2010.

SCHMAUSS, C. D.; HAMMOND, L. J.; OCHI, W.; YAKSH. T.L. Pharmacological antagonism of the antinociceptive effects of serotonin in the rat sninal cord. **Eur. J. Pharmacol.** v. 90, p 349-357, 1983.

SCHOENFELD P., KIMMEY M.B., SCHEIMAN J., BJORKMAN D., LAINE L. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal complications-guidelines for prevention and treatment. **Aliment. Pharmacol. Ther.** v.13, p. 1273–1285, 1999.

SEGAL, M; SANDBERG, D. Analgesia produced by electrical stimulation of catecholamine nuclei in the rat brain. **Brain Res.**, v. 123, n.2, p.369-72, 1977.

SEWARDS, T. V., SEWARDS, M. A. Fear and power-dominance drive motivation: neural representations and pathways mediating sensory and mnemonic inputs, and outputs to premotor structures. **Neurosci Biobehav Rev**, v.26, p.553-79, 2002.

SHARMA, H. S.; NYBERG, F.; OLSSON, Y.; DEY, P. K. Alteration of substance P after trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat. **Neuroscience**, v.38, p. 205-212, 1990.

SHIM, E.; SEO, Y.; KWON, M.; HAM, Y.; CHOI, O.; LEE, J.; CHOI, S.; SUH, H. The intracerebroventricular kainic acid-induced damage affects animal nociceptive behavior. **Brain Research Bulletin.**, v. 73, n. 4-6, p. 203–209, 2007.

SHUKURI, M.; TAKASHIMA-HIRANO, M.; TOKUDA, K.; TAKASHIMA, T.; MATSUMURA, K.; INOUE, O.; DOI, H.; SUZUKI, M.; WATANABE, Y.; ONOE, H. In vivo expression of cyclooxygenase-1 in activated microglia and macrophages during neuroinflammation visualized by PET with ¹¹C-ketoprofen methyl ester. **J Nucl Med.**, v.52, p. 1094-101, 2011.

SILBERSTEIN, S. D. and US Headache Consortium. Practice parameter: evidence-based guidelines for migraine headache (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology.**, v.55, p.754-763, 2000.

SILVERSTEIN, F. E.; FAICH, G.; GOLDSTEIN, J. L.; SIMON, L. S.; PINCUS, T.; WHELTON, A.; MAKUCH, R.; EISEN, G.; AGRAWAL, N. M.; STENSON, W. F.; BURR, A. M.; ZHAO, W. W.; KENT, J. D.; LEFKOWITH, J. B.; VERBURG, K. M.; GEIS, G. S. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. **JAMA**, v. 284, n.10, p.1247-55, 2000.

SIMAT, T.; MEYER, K.; STEINHART, H.: Synthesis and analysis of oxidation, carbonyl condensation compounds of tryptophan. **J. Chromatogr.**, v.661, p. 93-99, 1994.

Sluka, K. A. Mechanisms and Management of Pain for the Physical Therapist. IASP Press, 2009, 394 p.

SLUKA, K. A.; REES, H. The neuronal response to pain **Physiotherapy Theory and Practice**, v. 13, n. 1, p.3-22, 1997.

SOARES P. M.G; LIMA-JUNIOR, R. C. P.; MOTA, J. M. S. C.; JUSTINO, P. F. C.; BRITO, G. C.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; SOUZA, M. H. L. P. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 68, n.3, p. 713-720, 2011.

Sociedade Brasileira para o Estudo da dor (SBED), 2005. Disponível em: <<http://www.dor.org.br/dorimpactos.asp>>. Acesso em: 15 jun. 2007.

SORKIN, L. S.; WESTLUND, K. N.; SLUKA, K. A; DOUGHERTY, P. M.; WILLIS, W.

D. Neural changes in acute arthritis in monkeys. IV. Time course of amino acid release into the lumbar dorsal horn. **Brain Res Rev.**, v.17, p. 39–50, 1992.

SORKIN, L. S.; MCADOO, D. J. Amino acids and serotonin are released into the lumbar spinal cord of the anesthetized cat following intradermal capsaicin injection. **Brain Res.**, v. 607, p.89–98, 1993.

SOUZA, C. D.; BAREA, L. M.; KOWACS, P. A.; FRAGOSO, Y. D. Efficacy and tolerability of combined dipyrone, isometheptene and caffeine in the treatment of mild-to-moderate primary headache episodes. **Expert Rev Neurother.**, v. 12, p. 159-167, 2012.

STEPANOVIC-PETROVIC, R.M.; et al. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. **Anesth Analg.**, v. 106, n. 6, p. 1897-1903, 2008.

STERANKA, L.R.; BURCH, R.M. Bradykinin antagonists in pains and inflammation. *In*: STEPHEN, G. **Farmer, The Kinin System**. São Diego, Califórnia : Academic Press, 1997.

STONE, T. W; ADDAE, J. I. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. **Eur J Pharmacol.**, v. 447, 285-96, 2002.

STONE, T.W.; DARLINGTON, L.G. Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* v. 1, p. 609-20, 2002.

STOVNER, L.J.; HAGEN, K.; JENSEN, R.; KATSARAVA, Z.; LIPTON, R.B.; SCHER, A.I.; STEINER, T.J. & ZWART J-A,. The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. **Cephalalgia**, v.27, p.193–210, 2007.

STRATZ, T.; SAMBORSKI, W.; HRYCAJ, P. Serotonin concentration in serum of patients with generalized tendomyopathy (fibromyalgia) and chronic polyarthritis. **Med. Klin.**, v. 88, p. 458–462, 1993.

SUN, R.Q.; LAWAND, N.B.; LIN, Q.; WILLIS, W.D. Role of calcitonin gene-related peptide in the sensitization of dorsal horn neurons to mechanical stimulation after Intradermal Injection of Capsaicin. **J Neurophysiol.**, v. 92, p. 320–326, 2004.

SUPORNILPCHAI, W.; SANGUANRANGSIRIKUL, S.; MANEESRI, S. Serotonin depletion, cortical spreading depression, and trigeminal nociception. **Headache**, Thailand, v. 46, n. 1, p.34-9, 2006.

SZABO, S. et al. A quantification method for assessing the extent of experimental erosions and ulcers. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 13, p. 59-66, 1985.

TABER, R. I.; GREENHOUSE, D. D.; RENDELL, J. K., IRWIN, S. Agonist and antagonist interactions of opioids on acetic acid-induced abdominal stretching in mice. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 169, p 29-38, 1969.

TAKEMORI, A. E.; PORTOGHESE, P. S. Enkephalin antinociception in mice is mediated by 1- and 2-opioid receptors in the brain and spinal cord, respectively. **Eur J Pharmacol.**, v.242, p.145–150, 1993.

TALLARIDA, R. J. & RAFFA, R. B. Testing for synergism over a range of fixed ratio drug combinations: replacing the isobologram. **Life Sci.**, v.58, p. 23-28, 1996.

TALLARIDA, R. J.; COWAN, A.; RAFFA, R. B. Antinociceptive Synergy, Additivity, and Subadditivity with Combinations of Oral Glucosamine Plus Nonopioid Analgesics in Mice. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 307, n. 2, p.699–704, 2003.

TANIS, J. E.; MORESCO, J. J.; LINDQUIST R. A.; KOELLE, M. R. Regulation of Serotonin Biosynthesis by the G Proteins Gao and Gaq Controls Serotonin Signaling in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v.178, p. 157–169, 2008.

THAM, S. M.; ANGUS, J. A.; TUDOR, E.; WRIGHT, C. E. Synergistic and additive interactions of the cannabinoid agonist CP55,940 with μ opioid receptor and α 2-adrenoceptor agonists in acute pain models in mice. **Br J Pharmacol.**, v.144, n.6, p. 875–884, 2005.

TORQUATI, K.; PIZZELLA, V.; BABILONI, C.; DEL GRATTA, C.; DELLA PENNA, S.; FERRETTI, A.; FRANCIOTTI, R.; ROSSINI, P.M.; ROMANI, G.L. Nociceptive and non-nociceptive sub-regions in the human secondary somatosensory cortex: an MEG study using fMRI constraints. **Neuroimage.**, v.15, n.1, p. 48-56, 2005.

TULUNAY, F. C.; ERGÜN, H.; GÜLMEZ, S. E.; OZBENLI, T.; OZMENOĞLU, M.; BOZ, C.; ERDEMOĞLU, A.K.; VARLIKBAS, A.; GÖKSAN, B.; INAN, L. The efficacy and safety of dipyron (Novalgin) tablets in the treatment of acute migraine attacks: a double-blind, cross-over, randomized, placebo-controlled, multi-center study. **Funct Neurol**, v.19, p.197-202, 2004.

URCH, C.E. & SUZUKI, R. Pathophysiology of somatic, visceral, and neuropathic cancer pain. In: Sykes N, Bennett MI & Yuan C-S. Clinical pain management: Cancer pain. 2. ed. London : Hodder Arnold, 2008.

VLACHOVA, V.; TEISINGER, J.; SUSANKOVA, K.; LYFENKO, A.; ETTRICH, R.; VYKLICHY, L. Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor. **J. Neurosci.**, v. 2, p.1340–50, 2003.

VON MERING, J. Beitrage zur Kenntniss der Antipyretica. **Ther Monatsch.**, v.7, p.577–587, 1893.

WALKER, J. L. Interrelationships of SRS-A production and arachidonic acid metabolism in human lung tissue. **Adv Prostaglandin Thromboxane Res.**, v. 6, p.115-9, 1980.

WALKER, P. D; RILEY, L. A; HART, R. P.; JONAKAIT, G. M. Serotonin regulation of tachykinin biosynthesis in the rat neostriatum. **Brain Res.**, v. 546, p. 33–39, 1991.

WANG, J.; SIMONAVICIUS, N; W.U. X; SWAMINATH, G.; REAGAN, J.; TIAN, H.; LEI, LING. Kynurenic Acid as a Ligand for Orphan G Protein-coupled Receptor GPR35. **Journal of Biological Chem.**, v. 281, p. 22021–22028, 2006.

WANG, W.; ZHANG, M.; WANG, Y.; JIN C.; BIN, Y.; MA, S.; 5-HT modulation of pain in SI and SII revealed by fMRI. **J. Cent. South. Univ.**, v.35, n.3, p.185-193, 2010.

WEINSTENIN S. L.; BULKWALTER, J. A. **Ortopedia de Turek: Princípios e suas aplicações**. 5. ed. São Paulo: Manole; 2000.

WESTLUND, K. N.; LU, Y.; COGGESHALL, R. E.; WILLIS, W. D. Serotonin is found in myelinated axons of the dorsolateral funiculus in monkeys. **Neuroscience Letters**, v. 141, n. 1, p. 35–38, 1992.

WHITE, K. P.; THOMPSON, J. Fibromyalgia syndrome in an Amish community: a controlled study to determine disease and symptom prevalence. **The Journal of rheumatology**, v. 30, n. 8, p. 1835-1840, 2003.

WILLIAMNS, F. G.; MULLET, M. A.; BEITZ, A. J. Basal release of Met-enkephalin and neurotensin in the ventrolateral periaqueductal gray matter of the rat: a microdialysis study of antinociceptive circuits. **Brain Research**, v. 690, n. 2, p. 207–216, 1995.

WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J Clin Neurophysiol.**, v.14, n.1, p.2-31, 1997.

WOLFE, F.; RUSSEL, I. J.; VIPRAIO, G. *et al.* Serotonin levels, pain threshold, and fibromyalgia symptoms in the general population. **J. Rheumatol.**, v. 24, p. 555–559, 1997.

WURTMAN, R. J. & SHEIN, H. M. Journal of Neural Transmission. Lack of effect of increased pineal serotonin content on H3-tryptophan uptake. **Journal of Neurotransmission**. v. 36, n. 3-4, p 177-181, 1975.

YAKSH, T. L.; WILSON, P. R. Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.208, p. 446-453, 1979.

YAKSH, T.L.; PLANT, R.L.; RUDY, T. A. Studies on the antagonism by raphe lesions of the antinociceptive action of systemic morphine. **European Journal of Pharmacology**, v.41 n.4, p. 399–408, 1977.

YEATS, J. C., DOCHERTY, R. J.; BEVAN, S. Calcium-dependent and -independent desensitization of capsaicin-evoked responses in voltage-clamped adult rat dorsal root ganglion (DRG) neurones in culture. **J. Physiol.**, Lond., v. 446, p.390, 1992.

YEOMANS, D. C.; PROUDFIT, H. K. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence. **Pain**, v. 69, n 1, p. 141-150, 1996.

YOSHIMURA, M. & NISHI, S. Primary afferent-evoked glycine- and GABA- mediated IPSPs in substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord in vitro. **J Physiol.**, v. 482, p. 29–38, 1995.

ZAHN, P. K.; BRENNAN, T. J. Lack of Effect of Intrathecally Administered N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonists in a Rat Model for Postoperative Pain. **Anesthesiology**, v. 88, n. 1, p. 143–156, 1998.

ZAHN, P. K.; UMALI, E.; BRENNAN, T. J. Intrathecal non-NMDA excitatory amino acid receptor antagonists inhibit pain behaviors in a rat model of postoperative pain. **Pain**, v. 74, n. 2-3, p.213–223, 1998.

ZANBOORI, A.; TAMADDONFARD, E.; MOJTAHEDEIN, A.; Effect of chlorpheniramine and ranitidine on the visceral nociception induced by acetic acid in rats: role of opioid system. **Pak J Biol Sci.**, v. 11, n. 20, p. 2428-2432, 2008.

ZHANG, Y. Q.; GAO, X.; JI, G. C.; HUANG, Y. L.; WU, G. C.; ZHAO, Z. Q. Expression of 5-HT1A receptor mRNA in rat lumbar spinal dorsal horn neurons after peripheral inflammation. **Pain**, v. 98, p. 287-295, 2002.

ZHOU HY, CHEN SR, CHEN H, PAN HL. The glutamatergic nature of TRPV1-expressing neurons in the spinal dorsal horn. **Journal of Neurochemistry.**, v. 108, p. 305-318, 2009.