

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Indiara Brusco

**ENVOLVIMENTO DAS CININAS NA DOR DO TIPO
FIBROMIALGIA INDUZIDA POR RESERPINA E O EFEITO DOS
INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I EM
CAMUNDONGOS**

**Santa Maria, RS
2019**

Indiara Brusco

**ENVOLVIMENTO DAS CININAS NA DOR DO TIPO FIBROMIALGIA
INDUZIDA POR RESERPINA E O EFEITO DOS INIBIDORES DA ENZIMA
CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Orientadora: Prof^ª Dra. Sara Marchesan de Oliveira

Santa Maria, RS
2019

Indiara Brusco

**ENVOLVIMENTO DAS CININAS NA DOR DO TIPO FIBROMIALGIA
INDUZIDA POR RESERPINA E O EFEITO DOS INIBIDORES DA ENZIMA
CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica da Universidade Federal de
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito
parcial para obtenção do título de **Doutora
em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica**

Aprovada em 29 de março de 2019

Sara Marchesan de Oliveira, Dra. (UFSM)

Angelo Piato, Dr. (UFRGS) - Videoconferência

Denis Broock Rosemberg, Dr. (UFSM)

Eunice André, Dra. (UFPR) - Parecer

Mauro Schneider Oliveira, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que sempre iluminou e guiou meus caminhos para que o melhor acontecesse.

À minha orientadora Sara Marchesan de Oliveira pela oportunidade e por ter acreditado em mim. Por se mostrar sempre disponível em ajudar, pela compreensão e paciência, por todos os ensinamentos e por apoiar e torcer pelo meu futuro, além da excelente orientação e exemplo. Minha eterna gratidão por guiar meu caminho científico contribuindo para meu amadurecimento profissional e pessoal.

À minha família pelo apoio incondicional, em especial a minha mãe por torcer e rezar por mim, pelo conforto em momentos difíceis e por vibrar de alegria comigo quando coisas boas aconteciam. À minha irmã Raquel e ao meu afilhadinho Liam pelo carinho e por tornar a caminhada mais leve e feliz.

A todos meus colegas e amigos do Lab Neuro com os quais dividi bons momentos. Ao nosso grupo de pesquisa que é maravilhoso, obrigado pela ótima convivência diária.

Agradeço, à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela oportunidade, bem como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para meu crescimento e amadurecimento profissional e para que esta tese se tornasse realidade, minha gratidão e respeito. Muito obrigada!!

RESUMO

ENVOLVIMENTO DAS CININAS NA DOR DO TIPO FIBROMIALGIA INDUZIDA POR RESERPINA E O EFEITO DOS INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I EM CAMUNDONGOS

AUTORA: INDIARA BRUSCO

ORIENTADORA: SARA MARCHESAN DE OLIVEIRA

A fibromialgia é uma doença crônica potencialmente incapacitante caracterizada por dor generalizada e uma série de comorbidades como a hipertensão, além de não possuir patofisiologia específica ou tratamento apropriado. Evidências têm demonstrado a contribuição das cininas e seus receptores B₁ e B₂ em condições dolorosas crônicas. Adicionalmente, o uso de drogas inibidoras da enzima conversora de angiotensina I (ECA) por pacientes hipertensos tem sido associado com uma potencialização de sintomas dolorosos. Desta forma, nós investigamos o envolvimento dos receptores B₁ e B₂ de cininas na dor tipo fibromialgia induzida por reserpina e o efeito dos inibidores da ECA sobre essa dor. Para a indução do modelo de fibromialgia camundongos *Swiss* machos receberam uma injeção subcutânea de reserpina (1 mg/kg, s.c.) uma vez por dia por 3 dias consecutivos. Parâmetros nociceptivos como alodínia mecânica e ao frio e nocicepção espontânea, além do teste de burrowing, tigmotaxia, nado forçado e força muscular, foram avaliados em um dia após a última administração de reserpina. O papel dos receptores B₁ e B₂ de cininas foi investigado usando camundongos nocaute ou antagonismo farmacológico. Adicionalmente, a expressão dos receptores de cininas e os níveis de bradicinina e monoaminas foram analisados no nervo ciático, medula espinhal e córtex cerebral dos animais. O efeito dos inibidores da ECA foi avaliado sobre os parâmetros nociceptivos (alodínia mecânica e ao frio e nocicepção espontânea) em animais previamente tratados com reserpina e também tratados com antagonistas dos receptores de cininas. Os níveis de bradicinina, assim como a atividade da ECA e da cininase I também foram mensurados. Camundongos nocaute para o receptor B₁ e B₂ de cininas preveniram o desenvolvimento de alodínia mecânica induzida por reserpina. O antagonismo desses receptores também reduziu a alodínia mecânica e ao frio e a nocicepção espontânea induzida por reserpina. A reserpina alterou os comportamentos de tigmotaxia, burrowing, nado forçado e força muscular dos camundongos. Além disso, a reserpina aumentou a expressão dos receptores B₁ and B₂ de cininas e os níveis de bradicinina, assim como reduziu os níveis de monoaminas em estruturas periféricas e centrais. Os inibidores da ECA enalapril e captopril aumentaram a alodínia mecânica induzida por reserpina e esse aumento foi prevenido pelos antagonistas dos receptores B₁ e B₂ de cininas. Doses submáximas de substância P e bradicinina causaram nocicepção espontânea e aumentaram a alodínia mecânica em animais tratados com reserpina. A administração de reserpina associada com inibidores da ECA aumentou os níveis de bradicinina e inibiu a atividade da ECA em estruturas envolvidas na modulação da dor. Evidenciamos que as cininas e seus receptores B₁ e B₂ estão envolvidos na dor do tipo fibromialgia. Além disso, podemos sugerir que a terapia com inibidores da ECA em pacientes hipertensos e com fibromialgia requer uma análise cuidadosa, uma vez isso poderia potencializar seus sintomas dolorosos. Logo, o tratamento da hipertensão em pacientes com fibromialgia poderia incluir classes de medicamentos anti-hipertensivos diferentes de inibidores da ECA. Nossos resultados também apontam que antagonistas dos receptores de cininas podem ser promissores para aliviar a dor de pacientes com fibromialgia.

Palavras-chave: Alodínia Mecânica, Alodínia ao Frio, Nocicepção Espontânea, Monoaminas, Enalapril.

ABSTRACT

KININS INVOLVEMENT IN THE RESERPINE-INDUCED FIBROMYALGIA-LIKE PAIN AND THE EFFECT OF ANGIOTENSIN I CONVERTING ENZYME INHIBITORS IN MICE

AUTHOR: INDIARA BRUSCO

ADVISOR: SARA MARCHESAN DE OLIVEIRA

Fibromyalgia is a chronic disease potentially disabling, characterized by widespread pain and a range of comorbidities as hypertension, besides not having specific pathophysiology or appropriate treatment. Evidence has demonstrated the contribution of kinins and their B₁ and B₂ receptors in chronic painful conditions. Additionally, the use of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor drugs by hypertensive patients has been associated with a potentiation of painful symptoms. Thus, we investigated the involvement of kinin B₁ and B₂ receptors in the reserpine-induced fibromyalgia-like pain and the effect of ACE inhibitors on this pain. For the induction of fibromyalgia model, male *Swiss* mice received one subcutaneous injection of reserpine (1 mg/kg, s.c.) once daily for 3 consecutive days. Nociceptive parameters such as mechanical and cold allodynia and spontaneous nociception, besides burrowing, thigmotaxis, forced swimming, and muscle strength test were evaluated at one day after the last reserpine administration. The role of kinin B₁ and B₂ receptors was investigated using knockout mice or pharmacological antagonism. Additionally, kinin B₁ and B₂ receptors expression and the bradykinin and monoamines levels were analyzed in the sciatic nerve, spinal cord and cerebral cortex of the animals. The effect of ACE inhibitors was evaluated on nociceptive parameters (mechanical and cold allodynia and spontaneous nociception) in animals previously treated with reserpine and also treated with kinin receptor antagonists. The bradykinin levels, as well as the activity of ACE and kininase I also were measured. Knockout mice for the B₁ and B₂ kinin receptor prevented the reserpine-induced mechanical allodynia. The antagonism of kinin B₁ and B₂ receptors also reduced the mechanical allodynia, the cold allodynia, and the spontaneous nociception reserpine-induced. The reserpine altered thigmotaxis, burrowing, forced swimming, and grip strength behavior of the mice. Moreover, reserpine increased the kinin B₁ and B₂ receptors expression and the kinin levels, as well as, reduced the monoamines levels in peripheral and central structures. The ACE inhibitors enalapril and captopril increased the reserpine-induced mechanical allodynia and this increase was prevented by kinin B₁ and B₂ receptor antagonists. Submaximal doses of substance P and bradykinin caused spontaneous nociception and increased mechanical allodynia in animals treated with reserpine. The reserpine administration associated with ACE inhibitors increased and bradykinin levels and inhibited the ACE activity in structures involved in the pain modulation. We evidence that kinins and their B₁ and B₂ receptors are involved in the fibromyalgia-like pain. In addition, we can suggest that therapy with ACE inhibitors in hypertensive patients and with fibromyalgia requires a careful analysis since this could potentiate their painful symptoms. Thus, hypertension treatment in patients with fibromyalgia could include classes of antihypertensive drugs diferents from ACE inhibitors. Our results indicate that kinin receptor antagonists may be promising drugs for relieving the pain of patients with fibromyalgia including those in treatment with ACE inhibitors.

Key words: Mechanical Allodynia, Cold Allodynia, Spontaneous Nociception, Monoamines, Enalapril.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - Serotonina
12 -HETE - Ácido 12-hidroxeicosatetraenóico
12 - LOX - 12 lipoxigenase
A - Amígdala
AA - Ácido araquidônico
Ala - Alanina
ANOVA - Análise de Variância
Arg - Arginina
ARRIVE - Animal Research: Reporting *in vivo* Experiments
ASIC - Canal iônico sensível a ácido (do inglês “Acid-sensing ion channels”)
B - basal
B₁^{-/-} - Nocaute para o receptor B₁ de cininas
B₂^{-/-} - Nocaute para o receptor B₂ de cininas
Bk - Bradicinina
BR1 - Receptor B₁
Ca²⁺ - Cálcio
CB - Canabinoide
CCK - Colecistoquinina
CEUA - Comitê de Ética e Uso Animal
cm - centímetros
CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês “*Calcitonin Gene-Related Peptide*”)
Cl⁻ - Cloreto
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COM - Carboxipeptidase M
DA - Dopamina
DABk - Des-Arg⁹-Brdicininina
DAG - Diacilglicerol
DALBk - Des-Arg⁹ [Leu⁸]-Brdicininina
DNIC - Controle inibitório nocivo difuso da dor (do inglês “*Diffuse Noxious Inhibitory Control of pain*”)
ECA - Enzima Conversora De Angiotensina I
ERK - proteína quinase regulada por sinal extracelular (do inglês “*Extracellular signal-regulated kinases*”)
EULAR- Liga Europeia Contra o Reumatismo (do inglês “*European League Against Rheumatism*”)
FAPGG - (N- [3- (2-Furyh) -Acrilolil] -L-Phenyl alanyl glycyl glycine)
FDA - Food and Drug Administration - U.S.
Fen - Fenilalanina
GABA - Ácido gama-aminobutírico
g - Gramas
Gli - Glicina
Glu - Glutamato
H - Hipotálamo
h - Horas
His - Histidina

IASP- Associação Internacional para Estudo da Dor (do inglês “*International Association for the Study of Pain*”)
ICD – Classificação Internacional de Doenças (do inglês “*International Classification of Diseases*”)
I.p. - Intraperitoneal
I.pl. - Intraplantar
I₃P - Inositol-3-fosfato
KDa - Quilodalton
Kg – Quilograma
K⁺ - Potássio
Kv - Canal de potássio dependente de voltagem
LC – Locus ceruleo
Lis - Lisina
LRP- Limiar De Retirada De Pata
M - Molar
mg - Miligrama
ml- Mililitro
min - Minutos
mg – Miligrama
μL - Micro Litro
NA - Noradrenalina
NaCl - Cloreto de sódio
NFκB - Fator nuclear kappa B
ng - Nanograma
NK1 - Neuroquinina 1
nmol/Kg - Nanomol/quilograma
NMR – Núcleo Magnus da Rafe
NO - Óxido nítrico
NOS - Óxido nítrico sintase
PAG - Substância cinzenta periaquedutal (do inglês “*Periaqueductal Gray Substance*”)
PB - Núcleo parabraquial
PBS - Salina Tamponada Fostatada (do inglês “*Phosphate Buffered Saline*”)
PG - Prostaglandina
PKC - Proteína quinase C
PLA₂ - Fosfolipase A₂
PLC - Fosfolipase C
Pro - Prolina
PVC - Policloreto de vinila
RVM – Medula rostroventromedial (do inglês “*Rostral Ventromedial Medulla*”)
s - segundos
s.c. - Subcutâneo
SEM - Erro Padrão da média (do inglês “*Standard Error Mean*”)
Ser – Serina
SP – Substância P
- Tálamo
α₁KA - Receptor de Tirosina Quinase de Alta Afinidade
TRPA - Receptor Potencial Transitório Anquirina (do inglês “*Transient Receptor Potential Ankyrin*”)
TRPM - Receptor de Potencial Transitório Melastatina (do inglês “*Transient Receptor Potential Melastatin*”)

TRPV- Receptor de Potencial Transitório Vanilóide (do inglês “Transient Receptor Potential Vanilloid”)

v.o. - Via Oral

WT - Tipo Selvagem (do inglês “*Wild Type*”)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 DOR E NOCICEPÇÃO.....	10
2.2 FIBROMIALGIA.....	31
2.3 SISTEMA CALICREÍNA-CININAS	37
3 OBJETIVOS	52
3.1 OBJETIVO GERAL.....	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
4 MANUSCRITO CIENTÍFICO	53
4.1 MANUSCRITO 1.....	53
4.2 MANUSCRITO 2.....	86
5 DISCUSSÃO	115
6 CONCLUSÃO	124
7 PERSPECTIVAS	125
REFERÊNCIAS	126
ANEXO I	141
ARTIGO PUBLICADO.....	142
ANEXO II	158
CERTIFICADOS DO CEUA.....	159

1 INTRODUÇÃO

A fibromialgia é uma doença crônica que prevalece em 2 a 8% da população mundial (CLAUW, 2014). Ela é classificada como dor primária crônica cujo principal sintoma é a dor generalizada caracterizada por hiperalgesia, alodínia e dor espontânea (REHM et al., 2010; CHOY, 2015; TREEDE et al., 2015; 2019). Os sintomas também incluem hipertensão, fadiga, depressão, problemas de memória e distúrbios do sono (CLAUW, 2015; ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016). A fibromialgia é, portanto, uma doença potencialmente incapacitante que resulta em altos custos médicos e grave redução da qualidade de vida dos pacientes, uma vez que seu diagnóstico e tratamento são um grande desafio para médicos e pacientes (DOPPLER et al., 2015; ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; MACFARLANE et al., 2017).

A fisiopatologia da fibromialgia permanece incompletamente compreendida (DOPPLER et al., 2015). No entanto, alguns estudos indicam anormalidades no sistema nervoso central, como disfunção da via descendente inibitória da dor mediada pela depleção de monoaminas (CLAUW, 2015) e sensibilização central (CHOY, 2015), além de alterações periféricas como disfunção de fibras nervosas pequenas (DOPPLER et al., 2015; TAGUCHI et al., 2015) e inflamação neurogênica (LITTLEJOHN, 2015). A inflamação neurogênica resulta da liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios como bradicinina, a partir de células inflamatórias periféricas, e substância P liberada de fibras C como parte de um reflexo axonal periférico (BLANCO et al., 2010; LITTLEJOHN, 2015).

Ambos os peptídeos bradicinina e substância P são mediadores neuro-inflamatórios envolvidos na sensibilização periférica e central como as que ocorrem na fibromialgia (de MOS et al., 2009; LITTLEJOHN, 2015; LITTLEJOHN; GUYMER 2018). A substância P contribui para o aumento da excitabilidade dos neurônios no corno dorsal, e consequentemente com o aumento da transmissão da dor a partir da medula espinhal para regiões cerebrais (BORSOOK; SAVA, 2009; CHOY, 2015; CLAUW, 2015). Ainda, a substância P contribui para a sensibilização periférica, uma vez que ela pode ser liberada após a ativação antidrômica de fibras C peptidérgicas, iniciada por reflexos axonais ou da raiz dorsal (LITTLEJOHN, 2015). É importante notar que níveis aumentados de substância P têm sido encontrados no fluido espinhal de pacientes com fibromialgia (CHOY, 2015).

Já a bradicinina parece contribuir para a patogênese da dor musculoesquelética crônica (PINHEIRO et al., 2013), uma característica da fibromialgia (CLAUW, 2014). A bradicinina é um peptídeo endógeno envolvido em processos inflamatórios e dolorosos via ativação do receptor B₂ de cininas, enquanto seus metabólitos ativos também induzem tais processos por agir sobre o receptor B₁ de cininas (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; DUTRA, 2017). A

ativação desses receptores causa comportamento nociceptivo espontâneo, alodínia mecânica e ao frio (BRUSCO et al., 2017a) e hiperalgesia térmica (FERREIRA et al., 2002) em humanos e animais experimentais (CALIXTO et al., 2004), tanto em modelos de dor aguda como crônica (BRUSCO et al., 2017a; QUINTÃO et al., 2008; SILVA et al., 2016).

Além disso, como a enzima conversora de angiotensina I (ECA) degrada a substância P e a bradicinina, o uso de drogas inibidoras da ECA tem sido associado a um aumento do risco de desenvolvimento de condições dolorosas crônicas e dor generalizada, por impedir a degradação desses peptídeos (BORSOOK; SAVA 2009; de MOS et al., 2009). Dados pré-clínicos e clínicos também demonstram que os inibidores da ECA aumentam o risco para o desenvolvimento de dor da gota (CHOI, 2012; SILVA et al., 2016) e síndrome de dor regional complexa (de MOS et al., 2009; BORSOOK; SAVA, 2009), além de aumentar a sensibilidade para a dor de dente (GUASTI et al., 2002) e dor muscular (BOIX et al., 2005) e induzir uma potencialização da hipersensibilidade dolorosa induzida por quimioterapia (BRUSCO et al., 2017a).

Evidências indicam que os inibidores da ECA facilitam e potencializam a progressão de mecanismos neuro-inflamatórios, uma vez que eles reduzem o limiar de ativação de neurônios periféricos e centrais (de MOS et al., 2009; BORSOOK; SAVA, 2009). Além de prevenir a degradação dos neuropeptídios, tais efeitos dos inibidores da ECA também podem estar relacionados à interação com os receptores B₁ e B₂ de cininas (BOIX et al., 2005; NEGRAS et al., 2015; DUTRA et al., 2017). Isto porque, inibidores da ECA podem atuar como agonistas alostéricos diretos do receptor B₁ de cininas (ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010; NEGRAES et al., 2015) e como potencializadores alostéricos indiretos da atividade das cininas no receptor B₂ por interações com a ECA na superfície celular onde ambos estão colocalizados (CHEN et al., 2006; ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010).

Os inibidores da ECA são uma das classes de drogas mais comumente usadas para tratar a hipertensão (MANCIA et al., 2013), a qual é uma comorbidade frequente da fibromialgia presente em 12-40% destes pacientes, além de ser um dos diagnósticos mais comuns (34,8%) pelos quais esses pacientes são admitidos em hospitais (HAVILAND; BANTA; PRZEKOP, 2011). Desta forma, este estudo teve como primeiro objetivo avaliar o envolvimento dos receptores B₁ e B₂ de cininas na patogênese da dor do tipo fibromialgia induzida por reserpina. Em seguida investigamos o efeito dos inibidores da ECA sobre o sintoma de dor do tipo fibromialgia induzido por reserpina e o envolvimento das cininas sobre esse efeito.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOR E NOCICEPÇÃO

A dor é uma experiência individual subjetiva que envolve a percepção de um estímulo aversivo onde cada indivíduo aprende a descrevê-la baseado em suas próprias experiências (SILVA; RIBEIRO-FILHO, 2011; NAVRATILOVA; PORRECA, 2014). Além disso, a dor envolve componentes sensoriais, afetivos, cognitivos e sociais (WILLIAMS; CRAIG, 2016). O termo dor é classicamente definido pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (“IASP”-International Association for the Study of Pain) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão” (IASP, 2012). Já a nocicepção é um termo fisiológico que se refere ao componente sensorial da dor e compreende os processos neurais de codificação e processamento dos estímulos nocivos (LOESER; TREEDE, 2008; NAVRATILOVA et al., 2013). Enquanto a dor é uma sensação subjetiva, a nocicepção pode ser medida em parâmetros objetivos (SANDKÜHLER, 2013).

A origem da dor e seu duplo papel como uma função fisiológica fundamental e por outro lado, como uma doença debilitante tem fascinado os cientistas durante séculos (KUNER, 2010). A sensação dolorosa, por sua natureza aversiva inerente, contribui para uma função vital do sistema nervoso que é fornecer informações sobre a ocorrência ou ameaça de alguma lesão (RINGKAMP et al., 2013). Desta forma, a capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem-estar de um organismo (WOOLF, 2010; YEKKIRALA et al., 2017). A dor, portanto, é um recurso fundamentalmente desagradável, mas de proteção, uma vez que sua aversão, ou seja, sua dimensão afetiva faz com que o indivíduo retire seu membro afetado de estímulos prejudiciais evitando um dano ainda mais grave às áreas lesadas (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014).

O papel fisiológico da dor é dramaticamente ilustrado por indivíduos que sofrem de anomalias congênitas, como mutações do gene *SCN9A*, o qual codifica o canal de sódio $Na_v1.7$. Tais mutações podem retardar a inativação do canal levando a hiperexcitabilidade que origina duas condições extremas de dor (eritromelalgia familiar ou doença de dor extrema paroxística). Ainda, outras mutações nesse gene podem causar hipoexcitabilidade tornando os indivíduos insensíveis a dor, isto é, incapazes de detectar estímulos dolorosos (DEVO, 2013). Essas pessoas não sentem dor frente a objetos pontiagudos, calor de chamas ou mesmo desconforto associado a lesões internas, como um osso quebrado por exemplo. Como

resultado, eles não adotam comportamentos de proteção adequados contra essas condições, muitas das quais podem ser fatais (BASBAUM et al., 2009).

Porém, mesmo que a dor normalmente funcione como uma resposta de alerta e de caráter adaptativo, ela pode se tornar um sintoma debilitante (WOOLF, 2010). Essa condição surge quando a dor que ocorre após uma lesão aguda persiste além do processo natural de cura e se estende além de sua utilidade de proteção (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014). Neste caso, a dor é maladaptativa e acredita-se resultar do funcionamento anormal do sistema nervoso e por isso apresenta um caráter patológico (GRACE et al., 2014; YEKKIRALA et al., 2017). Desta forma, ela pode levar a implicações em diversos níveis como psicológico e emocional, social, fisiológico e também econômico (KING; FRASER, 2013; NAVRATILOVA; PORRECA, 2014).

Em relação ao tempo de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda tem início recente, duração limitada e geralmente possui uma causa identificável, sendo restrita ao local da lesão e abolida após sua resolução (READY; EDWARDS, 1992; RUSSO; BROSE, 1998; KUNER, 2010). Essa dor apresenta função biológica de preservação da integridade e da defesa, sendo consequência de uma lesão ou iminência de lesão tecidual (JULIUS; BASBAUM, 2001). Já a dor crônica geralmente persiste além do tempo de cura de uma lesão, geralmente em decorrência da plasticidade neuronal que ocorre durante alguma doença e mantém a dor mesmo após a resolução da lesão. Frequentemente, a dor crônica pode não ter causa claramente identificável podendo surgir até mesmo na ausência de qualquer gatilho prévio (ASHBURN; STAATS, 1999; KUNER, 2010; MACINTYRE, 2010; READY; REDWARDS, 1992; RUSSO; BROSE, 1998). Além disso, essa dor é a causa principal que leva à incapacidade e intensa redução da qualidade de vida dos pacientes sendo um grande desafio na prática clínica (JULIUS; BASBAUM 2001; KUNER, 2010). Ainda, a dor crônica pode estar associada com prejuízos afetivos e cognitivos, tais como ansiedade, depressão, anedonia e déficits de aprendizagem (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014).

Quanto aos mecanismos moleculares e celulares operados isoladamente ou em combinação, tanto no sistema nervoso periférico quanto central, a dor pode ainda ser classificada como nociceptiva, inflamatória ou neuropática (SCHOLZ; WOOLF, 2002). A dor nociceptiva é aquela que está associada à proteção fisiológica do organismo em circunstâncias que podem causar dano potencial aos tecidos (WOOLF, 2010). Este tipo de dor ocorre somente em resposta a estímulos nocivos que ativam neurônios de alto limiar e continua apenas na presença mantida deles. É a dor que nos alerta a estímulos como uma picada de agulha ou quando tocamos algo muito quente ou muito frio (TORRES et al., 2006). Ela

funciona como um sinal de alerta precoce essencial que, geralmente, provoca o reflexo de retirada do membro lesionado frente ao agente nocivo (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014; STEIN, 2016). As doenças hereditárias associadas à insensibilidade congênita à dor estão associadas à perda da capacidade de detecção da dor nociceptiva (COX et al., 2006; INDO, 2001), o que pode levar a lesões repetidas e auto-mutilação, demonstrando a função altamente adaptativa e importante deste tipo de dor (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, al., 2009).

A segunda forma de dor, denominada dor inflamatória, é também adaptativa e tem função de proteção. No entanto, o imperativo muda de proteger o organismo contra um estímulo nocivo para agir sobre as consequências do dano, uma vez que ela ocorre em resposta à lesão tecidual e a inflamação subsequente (JUHL et al., 2008; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009). Neste tipo de dor a sensibilidade sensorial é aumentada após o dano tecidual de maneira a auxiliar na recuperação da lesão. Para exercer essa função o sistema nervoso sensorial sofre uma profunda mudança na sua capacidade de resposta passando a ser ativado também por entradas inócuas de baixo limiar. Agora, além de ocorrer dor espontânea (dor em repouso devido a descargas espontâneas de neurônios nociceptivos), estímulos que normalmente eram inócuos passam a produzir dor (alodínia) e respostas a estímulos que já eram nocivos passam a ser exageradas e prolongadas (hiperalgesia) (COLLOCA et al., 2017; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; HE et al., 2017; JUHL et al., 2008).

A dor inflamatória é causada pela ativação do sistema imune e por lesão ou infecção tecidual. Mediadores inflamatórios podem ativar diretamente os neurônios sensoriais que inervam o tecido lesionado evocando dor, ou podem agir em conjunto para produzir uma sensibilização do sistema nervoso somatossensorial. Esta forma de dor é uma das características principais da inflamação (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; WOOLF, 2010) e normalmente desaparece após a resolução da lesão tecidual inicial. No entanto, em doenças crônicas tais como na artrite reumatoide e gota a dor persiste durante tanto tempo quanto a inflamação é ativa. Logo, a dor inflamatória quando crônica apresenta características patológicas (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; TANEJA; DELLA PASQUA; DANHOF, 2017).

Finalmente, há a dor neuropática que é relativamente comum, não protetora, caracterizada por plasticidade maladaptativa do sistema nervoso e, portanto, patológica (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; WOOLF, 2010). Ela é uma dor que não se configura por um sintoma de alguma doença, mas sim um estado de doença do sistema nervoso periférico ou central. A dor neuropática surge como uma consequência direta de uma

lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial, incluindo as fibras periféricas e neurônios centrais, alterando sua estrutura e função (WOOLF, 2010; COLLOCA et al., 2017).

Além disso, a amplificação sensorial anormal faz com que a dor neuropática possa persistir de maneira independente da lesão ou doença inicial. Essa dor pode ser evocada por estímulos de baixa e alta intensidade resultando em sintomas como hipersensibilidade mecânica ou térmica caracterizada por alodínia ou hiperalgesia, dor espontânea e sensação de dormência, formigamento ou queimação principalmente nas extremidades distais (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; COLLOCA et al., 2017). A dor neuropática central pode resultar de lesão medular, acidente vascular cerebral ou esclerose múltipla. Já a dor neuropática periférica resulta de traumas mecânicos, doenças metabólicas como o diabetes, produtos químicos neurotóxicos e infecção, bem como, é o sintoma sensorial associado ao próprio câncer ou ao tratamento quimioterápico, entre outros (COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009).

Para que a dor nociceptiva, inflamatória e neuropática e também um toque suave seja detectado pelo indivíduo, é necessário a ativação de fibras aferentes primárias. Assim, baseando-se em critérios anatômicos e funcionais, diferentes tipos de fibras neuronais são capazes de conduzir os estímulos sensoriais a partir da periferia para as regiões centrais (BASBAUM et al., 2009; GOLD, 2013). Esses neurônios sensoriais são as fibras aferentes primárias A β , A δ e fibras C, que possuem diferentes propriedades permitindo-lhes responder e transmitir diferentes tipos de informações sensoriais (D'MELLO; DICKENSON, 2008). As fibras A β são fibras mielinizadas, de grande diâmetro, e por isso apresentam velocidade de condução muito rápida dos potenciais de ação (30-100 m/s). Essas fibras detectam estímulos de baixo limiar (não-nocivos) e normalmente respondem ao toque leve sendo responsáveis por transmitir a informação tátil e a propriocepção (postura do corpo no espaço). Apesar de estas fibras serem especializadas na detecção de estímulos inócuos como o tato, elas também são capazes de transmitir impulsos nervosos nociceptivos após uma lesão nervosa, por exemplo, como ocorre na dor neuropática (BASBAUM et al 2009; D'MELLO; DICKENSON, 2008; GRACE et al., 2014; JULIUS; BASBAUM, 2001; WEST et al., 2015).

Já as fibras A δ possuem médio diâmetro, são levemente mielinizadas e com velocidade de condução rápida (12-30 m/s), porém considerada mais lenta do que as fibras A β , e também apresenta um maior limiar de ativação. Existem duas classes principais de fibras A δ , ambas respondem a estímulos mecânicos, porém podem ser diferenciadas quanto à resposta ao calor ou como são afetadas por lesões teciduais. Por outro lado, as fibras C são fibras não mielinizadas, de pequeno diâmetro e por isso possuem velocidade de condução

lenta (0,5 - 2 m/s) do estímulo doloroso, e também os maiores limiares de ativação. A maioria das fibras C são polimodais (respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos), outras são mecanicamente insensíveis, mas respondem ao calor nocivo. Além disso, as fibras C são classificadas como peptidérgicas e não peptidérgicas. As peptidérgicas produzem e liberam substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), além de expressar o receptor de tirosina quinase de alta afinidade (TrkA) para o fator de crescimento do nervo. Já as fibras C não peptidérgicas apresentam locais de ligação para a isolectina B4 e expressam o receptor purinérgico P2X₃. Tanto as fibras A δ quanto as fibras C podem ser denominadas de nociceptores, os quais correspondem aos terminais periféricos dos axônios dos neurônios sensoriais e estão envolvidas na nocicepção mecânica, térmica ou química (BASBAUM et al., 2009; D'MELLO; DICKENSON, 2008; GRACE et al., 2014; JULIUS; BASBAUM, 2001; WEST et al., 2015).

As fibras aferentes primárias mencionadas acima se estendem da periferia ao corno dorsal da medula espinhal e seu corpo celular está localizado em diferentes gânglios, entre eles o gânglio da raiz dorsal que se dirige para o corpo em direção ao tronco e aos membros. A partir de cada gânglio da raiz dorsal origina-se um axônio que se divide em dois troncos, sendo que um deles se dirige para os tecidos periféricos originando as fibras aferentes primárias e o outro para a medula espinhal no caso dos nervos espinhais ou para o tronco encefálico no caso dos nervos cranianos (MANTYH et al., 2006; BASBAUM et al., 2009; TODD; KOERBER, 2013). Já gânglio do trigêmeo abriga os corpos celulares de neurônios que se dirigem para a face incluindo o território craniano e a cavidade oral e facial. Depois de entrar no trato trigeminal, a maioria dos aferentes atravessa via caudal enquanto transmite projeções colaterais que terminam nas subdivisões do núcleo espinhal do trigêmeo e sobre a medula cervical, para então, ativar os neurônios de segunda ordem (VILLANUEVA; NOSEDA, 2013). Ainda, há o gânglio nodoso que abriga os corpos celulares das fibras aferentes vagais que inervam os órgãos das cavidades torácica, abdominal e pélvica. Essas fibras possuem terminais centrais localizados principalmente no núcleo do trato solitário (GEBHAET; BIELEFELDT, 2016).

A experiência sensorial se inicia na periferia, onde os terminais dos neurônios sensoriais respondem aos estímulos nocivos, convertendo a energia do estímulo em um sinal elétrico. Em seguida, a informação é conduzida via potenciais de ação para o corno dorsal da medula espinhal, onde terminam as extremidades centrais destas fibras (D'MELLO; DICKENSON, 2008; GOLD, 2013). Logo, as fibras sensoriais atuam como neurônios de

primeira ordem conduzindo os estímulos nocivos a partir da periferia até o sistema nervoso central (MANTHY, 2006; GRACE et al., 2014).

As três modalidades de estímulos nocivos que são codificadas pelos neurônios sensoriais são químicas, térmicas e mecânicas, variando conforme a natureza específica do estímulo como o tipo de produto químico, a temperatura ou as propriedades características de cada estímulo mecânico (GOLD, 2013). A atividade nociceptiva desses neurônios também pode surgir espontaneamente, ou seja, independente de algum estímulo, sob condições patológicas como consequência de mudanças no equilíbrio de correntes iônicas na membrana, por vezes resultantes da atividade ectópica neuronal (LIU et al 2002; AMIR et al 2002; YEKKIRALA et al., 2017).

De qualquer forma, seja dependente ou independente de estímulo, a transdução dos sinais nociceptivos da periferia deve resultar na despolarização da membrana, uma vez que a geração do potencial de ação é necessária para a propagação das informações sensoriais para o sistema nervoso central (BASBAUM et al., 2009; GOLD, 2013). Um potencial gerador pode ser iniciado diretamente pela abertura de canais iônicos incluindo canais de receptores de potencial transitório (TRPA, TRPM, TRPV), canais de sódio (Na_v), canais iônicos sensíveis a ácido (ASIC), entre outros, os quais irão alterar o potencial de membrana e, assim, resultar em um potencial de ação que pode ser propagado em direção ao sistema nervoso central (CATERINA, 1997; CATERINA; GOLD; MEYER, 2005; BINGHAM et al., 2009; GRACE et al., 2014).

Um segundo mecanismo indireto envolve o fechamento de canais responsáveis por correntes hiperpolarizantes, como os canais de potássio. Isso resulta em um aumento na permeabilidade da membrana para a corrente despolarizante, que pode ser suficiente para acionar o potencial de membrana acima do limiar de potencial de ação. Para a eficiência desse mecanismo é necessário que uma corrente de despolarização, a abertura de canais de sódio, por exemplo, esteja simultaneamente ativa (ROCHA-GONZALEZ; MAO; ALVAREZ-LEEFMANS, 2008). O terceiro mecanismo é também indireto e depende de uma associação relativamente próxima entre um canal iônico capaz de conduzir a despolarização da membrana, e um canal iônico controlado por baixa tensão capaz de empurrar o potencial de membrana acima do limiar de potencial de ação (LIU et al., 2010).

A informação sensorial é então transmitida, via potenciais de ação, ao longo dos axônios das fibras nociceptivas até o corno dorsal da medula espinhal (D'MELLO; DICKENSON, 2008; GRACE et al., 2014). Assim que esses potenciais alcançam a medula espinhal ocorrem conexões com neurônios motores (fibras eferentes), os quais conduzem a

informação do sistema nervoso central para a periferia contribuindo para o reflexo de retirada do membro afetado pelo estímulo nocivo (WOLPAW, 2007). Além disso, conexões também ocorrem nas diferentes lâminas do corno dorsal, estendendo-se de forma superficial e/ou profunda (D'MELLO; DICKENSON, 2008; GRACE et al., 2014). A maioria das fibras nociceptivas A δ e C tem suas terminações em lâminas superficiais, as lâminas I e II, com um menor número atingindo as lâminas mais profundas, enquanto as fibras A β predominantemente inervam as lâminas III-V (D'MELLO; DICKENSON, 2008; WEST et al., 2015).

Além disso, células nociceptivas específicas encontradas principalmente superficialmente, fazem sinapses com fibras A δ e C e disparam potenciais de ação quando um estímulo doloroso é detectado na periferia. Já as células que recebem entrada exclusivamente de fibras A β são proprioceptivas e respondem apenas ao toque. Há ainda outro tipo de neurônio localizado mais profundamente (lâmina V) que é denominado de neurônio de faixa dinâmica ampla, uma vez que, recebe informações de todos os três tipos de fibras sensoriais e, portanto, responde a toda a gama de estímulos, desde o toque leve até a compressão, calor e produtos químicos nocivos. Tipos celulares não neuronais da medula espinhal como astrócitos e microglia, também são capazes de influenciar a transmissão da dor pelo corno dorsal, particularmente sob condições patológicas (KUNER, 2010; D'MELLO; DICKENSON, 2008) (Figura 1).

Na medula espinhal há também interneurônios glutamatérgicos excitatórios, e GABAérgicos inibitórios que podem aumentar ou diminuir a resposta nociceptiva, influenciando assim a saída do corno dorsal (D'MELLO; DICKENSON, 2008). Quando o potencial de ação alcança as terminações pré-sinápticas na medula espinhal, ocorre a abertura de canais de cálcio sensíveis a voltagem com conseqüente influxo de cálcio e liberação de neurotransmissores excitatórios, principalmente glutamato (BASBAUM et al., 2009; GRACE et al., 2014). O glutamato liga-se aos seus receptores expressos no corno dorsal produzindo potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos. A ativação mais intensa ou sustentada das fibras C também resulta na liberação de neuropeptídeos, como substância P e CGRP, que produzem potenciais sinápticos lentos através da ativação de seus receptores, contribuindo para a plasticidade na transmissão da dor no corno dorsal (BINGHAM et al., 2009; VERNE et al., 2004).

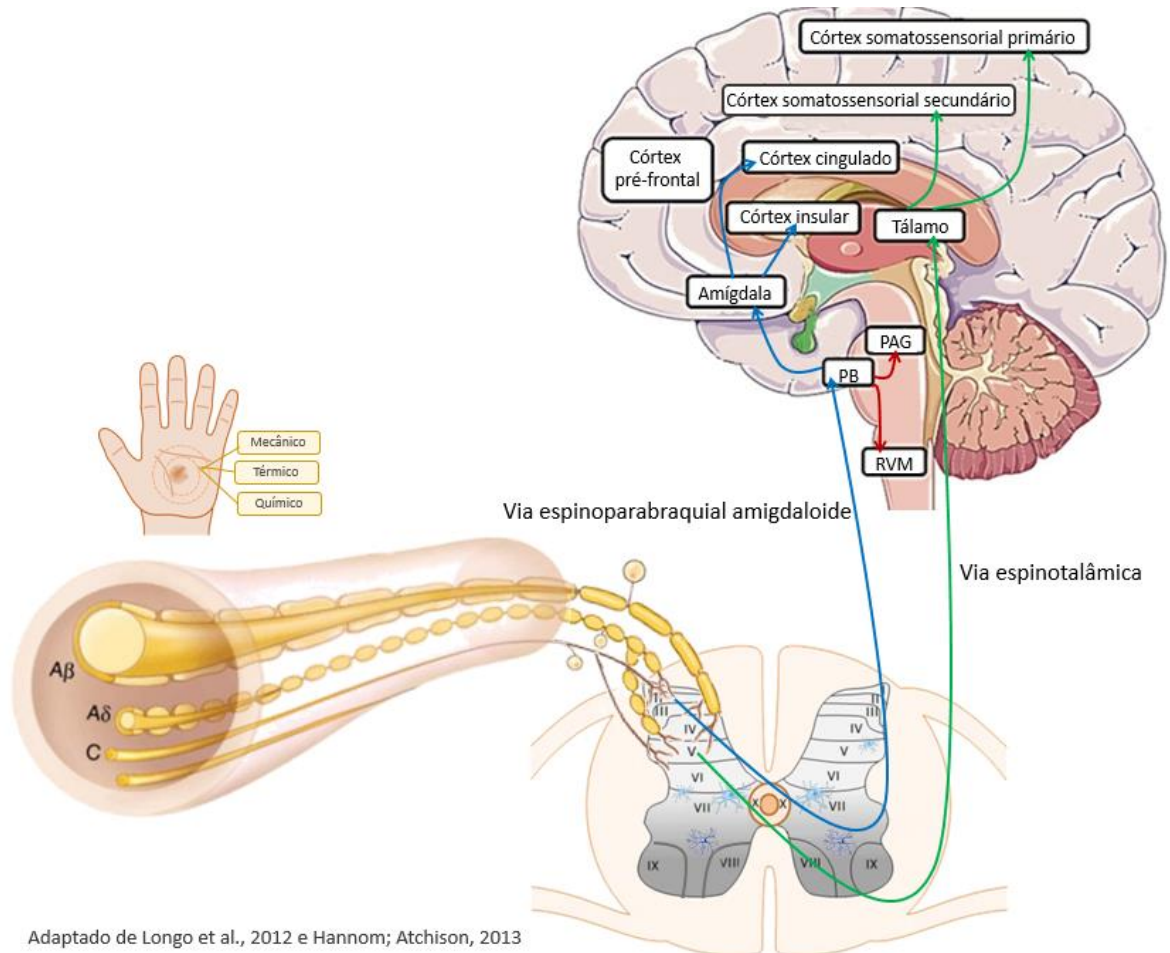
A liberação desses neurotransmissores na medula espinhal é regulada pela inibição pré-sináptica produzida pelos receptores GABA (ácido gama aminobutírico), além de outros receptores inibitórios como o canabinoide 1 e os três receptores opioides μ , δ e κ . O GABA,

assim como o neurotransmissor glicina, também induz inibição pós-sináptica em neurônios do corno dorsal controlando a transmissão da dor (WOOLF; SALTER, 2006). Quando o GABA e a glicina se ligam aos seus receptores eles desencadeiam o influxo de íons cloreto e então causam a hiperpolarização da membrana e desta forma a inibição da excitabilidade neuronal (COULL et al., 2005; SANDKÜHLER, 2013). Receptores GABA também potencializam correntes de potássio e suprimem correntes de cálcio para reduzir a atividade neuronal (MILLAN, 2002).

Após o processamento da dor na medula espinhal, os neurotransmissores e neuropeptídeos excitatórios ativam os neurônios nociceptivos de segunda ordem que transmitem as informações nociceptivas da medula espinhal até os centros superiores, por meio de duas vias ascendentes (BASBAUM et al., 2009; GRACE et al., 2014). Os axônios dos neurônios de segunda ordem do corno dorsal cruzam para o quadrante anterolateral e contralateral à entrada nociceptiva para iniciar as projeções ascendentes (FIELDS, 2004). A primeira via consiste na via espinotalâmica a qual ascende mais profundamente da lâmina III-VI do corno dorsal da medula espinhal até o tálamo, de onde neurônios de terceira ordem partem até o córtex somatossensorial (D'MELLO; DICKENSON, 2008; KUNER, 2010). Essa via é responsável por detectar o componente discriminativo-sensorial da dor, uma vez que o córtex somatossensorial primário determina a localização e a intensidade do estímulo nocivo e o córtex somatossensorial secundário determina o tipo de estímulo (térmico ou mecânico, por exemplo) (BINGHAM et al., 2009; GRACE et al., 2014) (Figura 1).

A segunda via pela qual a percepção do estímulo doloroso pode ascender é através de projeções (neurônios de segunda ordem) que partem principalmente da lâmina I da medula espinhal para o núcleo parabraquial localizado na ponte (tronco encefálico). Estima-se que 80% dos neurônios de projeção que partem dessa lâmina expressam o receptor de neuroquinina 1 (NK1) para a substância P (TODD, 2002). A partir do núcleo parabraquial as informações ascendem para a amígdala, via neurônios de terceira ordem que são em sua maioria CGRP positivos, as quais convergem para o córtex insular e córtex cingulado. Essa via é chamada de espinoparabraquial amigdalóide e é capaz de determinar o componente afetivo-motivacional frente à experiência dolorosa, uma vez que, o córtex cingulado anterior está associado com o desprazer e o sofrimento associados à dor, enquanto a ínsula está envolvida na aversão emocional a dor (BASBAUM et al., 2009; BINGHAM et al., 2009; ROEDER et al., 2016). O córtex pré-frontal faz a integração dos estímulos dolorosos abrangendo os componentes sensorial-discriminativos e afetivos-motivacionais da dor, contribuindo para experiências como o medo e a depressão associados à dor (BINGHAM et

al., 2009) (Figura 1). Há ainda projeções da coluna vertebral para outros locais como cerebelo e núcleo reticular lateral os quais estão principalmente envolvidos na integração sensorial-motora (DOSTROVSKY; CRAIG, 2013).



Adaptado de Longo et al., 2012 e Hannom; Atchison, 2013

Figura 1. Via ascendente de transmissão da dor. Os estímulos sensoriais são transmitidos a partir da periferia por meio de neurônios sensoriais aferentes primários (fibras A β , A δ e C) até o corno dorsal da medula espinhal. As fibras A β detectam estímulos inócuos e alvejam as lâminas III-V. Já as fibras A δ e C detectam estímulos nocivos (mecânicos, térmicos e químicos) e seus terminais centrais terminam principalmente nas lâminas superficiais (I-II) e também em lâminas profundas. Essas fibras fazem sinapse com neurônios de segunda ordem na medula espinhal que enviam as informações sensoriais para regiões supra-espinhais por meio de duas vias ascendentes. Os neurônios da via espinotalâmica (em verde) se projetam das lâminas III-VI até o tálamo de onde neurônios de terceira ordem alcançam o córtex somatossensorial primário e secundário que determina o componente discriminativo sensorial da dor. Os neurônios da via espinoparabraquial amigdalóide (em azul) partem principalmente das lâminas mais superficiais até o núcleo parabraquial (PB) de onde enviam projeções para a amígdala, e desta para o córtex insular e cingulado sendo responsável pelo componente afetivo-motivacional da dor. Ainda o PB pode enviar projeções para a medula rostralventromedial (RVM) e para a substância cinzenta periaquedutal (PAG) (em vermelho).

Após a recepção no corno dorsal da medula espinhal, a informação nociceptiva está sujeita ao processamento extensivo por uma diversidade de mecanismos, alguns dos quais aumentam, e alguns dos quais inibem sua transferência para centros superiores. Uma rede de caminhos descendentes que se projetam de estruturas cerebrais para o corno dorsal desempenha um papel importante nesse processamento (MILLAN, 2002). Desta forma, além

do controle da dor exercido na medula espinhal pelos interneurônios inibitórios que usam GABA e/ou glicina como transmissores, projeções descendentes oriundas do tronco encefálico também podem exercer controle modulatório sobre a nocicepção espinhal (BINGHAM et al., 2009; SANDKÜHLER, 2013). A modulação da dor é realizada, portanto, por vias descendentes (Figura 2) as quais estão envolvidas principalmente com o mecanismo endógeno de inibição da dor (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

A evidência inicial de mecanismos modulatórios da dor veio de observações feitas por Beecher, um médico que serviu ao Exército dos EUA durante a Segunda Guerra Mundial, o qual relatou uma notável atenuação da dor experimentada por soldados em situações de combate após sofrerem fraturas de ossos longos ou feridas penetrantes (BEECHER, 1946). Observações semelhantes foram feitas em atletas que continuavam competindo apesar de apresentarem lesões significativas (BINGEL; TRACEY, 2008). Alguns anos depois, Beecher descreveu que as vias descendentes também estavam subjacentes a analgesia com placebo (BEECHER, 1955) associada principalmente com o efeito de opioides endógenos (ZUBIETA et al., 2005). De fato, essas vias são sensíveis a opioides e importantes para o efeito de drogas analgésicas, incluindo, canabinoides, anti-inflamatórios não esteroidais, bloqueadores da recaptação de noradrenalina e serotonina, além do efeito dos próprios opioides exógenos (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

As vias descendentes possuem entradas que surgem em múltiplas áreas, incluindo o hipotálamo, a amígdala, a ínsula, o córtex cingulado rostral anterior, e o córtex pré-frontal, dirigindo-se para a região cinzenta periaquedutal no mesencéfalo (PAG), e com saídas indiretas da PAG para a modulação da dor na medula espinhal (BINGHAM et al., 2009; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010). A PAG influencia a modulação da dor descendente principalmente através de suas conexões com a medula rostroventromedial (RVM) e com núcleos noradrenérgicos pontomesencefálicos (BINGHAM et al., 2009; FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2005). Os neurônios de projeção PAG-RVM expressam neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios e serotonina, assim como, a PAG é rica em opioides endógenos e expressa os três receptores opioides (MOR, DOR, KOR) (HEINRICHER; INGRAM, 2008).

Além de projeções indiretas das vias de transmissão nociceptiva que incluem ligações com o hipotálamo, amígdala, córtex cingulado e ínsula anterior, projeções ascendentes colaterais também se projetam diretamente para núcleos mesencefálicos, incluindo a PAG e a RVM (HEINRICHER; FIELDS, 2013; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010). Essas duas estruturas podem receber entradas nociceptivas ascendentes diretas da medula espinhal

através de neurônios da via espinotalâmica. Além disso, projeções da via espinobulbar oriundas da lâmina I espinhal e também do núcleo parabraquial possuem projeções diretas para a PAG e a RVM (BENARROCH, 2008; GAURIAU; BERNARD, 2002; HEINRICHER; FIELDS, 2013). Tais projeções diretas do corno dorsal para a PAG transmitem informações inócuas e nocivas de estruturas cutâneas, musculoesqueléticas e viscerais (HEINRICHER; INGRAM, 2008). Logo, a PAG é anatomicamente bem localizada para modular as entradas nociceptivas e a percepção da dor através de suas interações com projeções ascendentes e descendentes de vários locais (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014) (Figura 2).

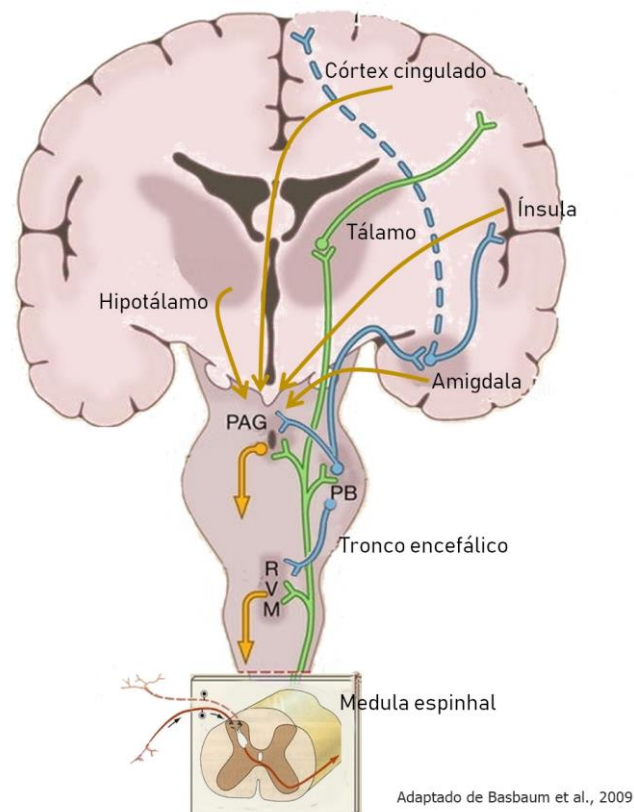


Figura 2. Interação entre as vias ascendentes e descendentes da dor. A substância cinzenta periaquedutal (PAG) recebe projeções descendentes a partir de interações indiretas com as vias ascendentes (hipotálamo, amígdala, córtex cingulado e ínsula; em amarelo). Projeções ascendentes colaterais também se projetam diretamente da medula espinhal para a PAG e a medula rostral ventromedial (RVM). Essas projeções podem ser oriundas da via espinobulbar incluindo projeções do núcleo parabraquial (PB; em azul), além de entradas espinotalâmicas (em verde).

A modulação da dor a partir da PAG é influenciada por diferentes fatores. Entre eles há os neurotransmissores GABA e glutamato que desempenham papéis opostos no processamento nociceptivo nesta estrutura. A ativação de neurônios glutamatérgicos e a inibição de neurônios GABAérgicos na PAG causa antinocicepção, ao passo que o oposto facilita a nocicepção através das vias descendentes (SAMINENI et al., 2017). Tem sido sugerido que agonistas μ -opioides inibem interneurônios GABAérgicos na PAG, mas não os

neurônios de saída da PAG que se projetam para RVM, os quais seriam presumidamente neurônios glutamatérgicos. Isto é, na PAG a maioria dos neurônios sensíveis a agonistas μ -opioides são interneurônios GABAérgicos. Adicionalmente, é hipotetizado que os interneurônios GABAérgicos estariam exercendo efeitos inibitórios nesses neurônios glutamatérgicos da PAG, os quais se projetam para a RVM para iniciar a inibição descendente (HEINRICHER; INGRAM, 2008; LAU; VAUGHAN, 2014; SAMINENI et al., 2017) (Figura 3).

Embora o efeito dos opioides sobre os neurônios glutamatérgicos na PAG seja pouco conhecido (HEINRICHER; INGRAM, 2008), como mencionado acima, opioides e também os canabinoides são capazes de ativar a analgesia descendente através de um processo indireto de "desinibição do GABA", a fim de suprimir os estímulos GABAérgicos inibitórios nos neurônios de saída da via analgésica descendente (possivelmente neurônios glutamatérgicos) (LAU; VAUGHAN, 2014; SAMINENI et al., 2017). Essa hipótese de desinibição foi fundamentada, uma vez que a antinocicepção resulta da excitação e ativação direta de neurônios da via descendente que se projetam da PAG para a RVM. No entanto, os opioides têm um efeito inibitório direto sobre os neurônios, mas também produzem analgesia quando injetados nessas estruturas (MOREAU; FIELDS, 1986; LAU; VAUGHAN, 2014). Para explicar este efeito dos opioides, Basbaum e Fields (1984) propuseram a hipótese da desinibição do GABA da analgesia. De acordo com ela, interneurônios GABAérgicos estão presentes na PAG e na RVM, onde liberam GABA, que atua via receptores GABA_A para inibir os neurônios de saída da via descendente. Foi proposto que os opioides ativam a via PAG-RVM ao suprimir indiretamente a influência inibitória dos interneurônios GABAérgicos locais, desinibindo desse modo o impulso antinociceptivo para a medula espinhal (LAU; VAUGHAN, 2014) (Figura 3).

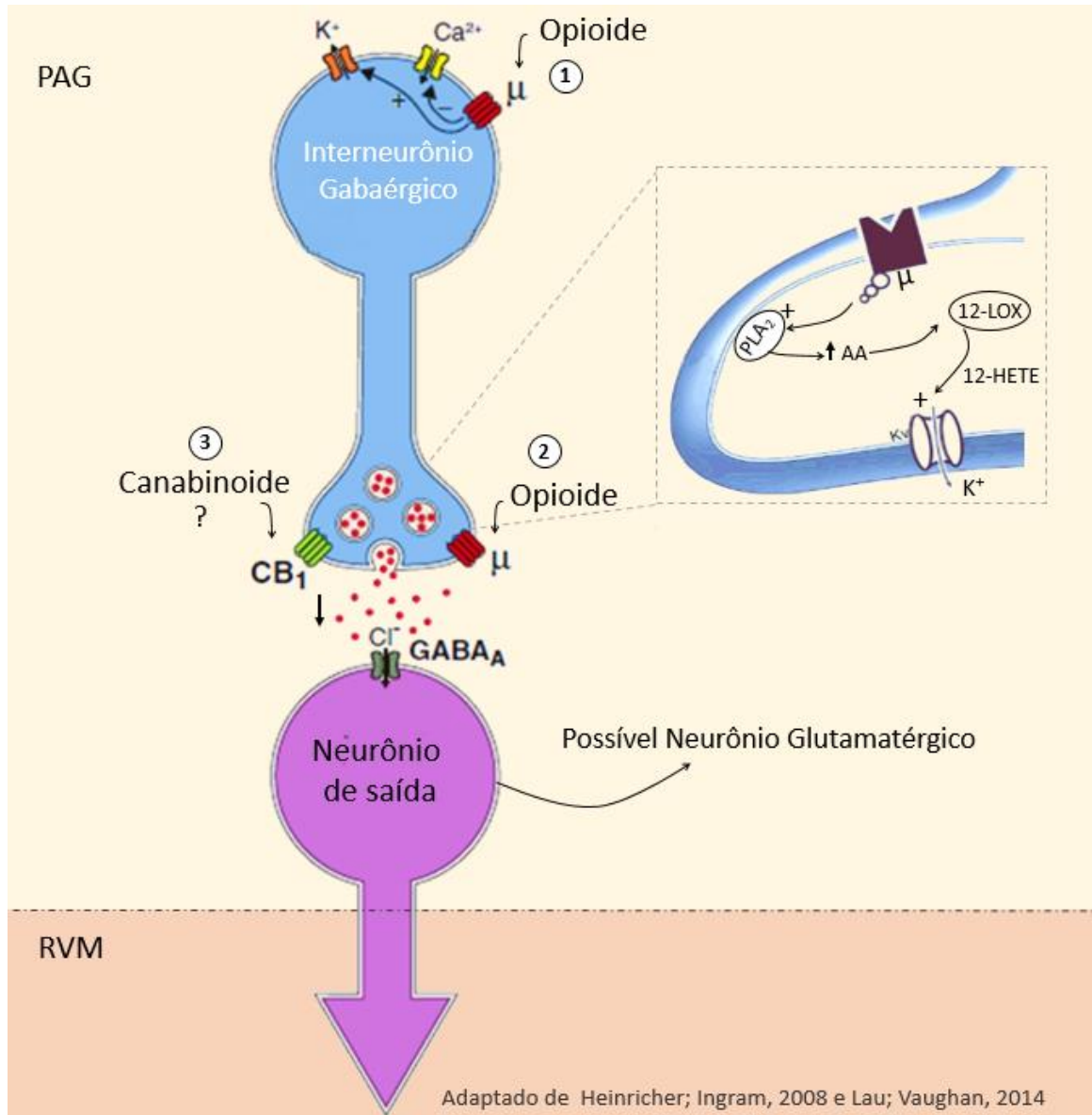


Figura 3. Modulação da dor na substância cinzenta periaquedutal (PAG), mecanismo de desinibição do GABA. A ativação de neurônios glutamatérgicos e a inibição de neurônios GABAérgicos na PAG causa antinocicepção. Agonistas μ -opioides não inibem neurônios de saída da PAG que se projetam para RVM (neurônios glutamatérgicos), porém, esses neurônios são inibidos por interneurônios Gabaérgicos locais. Os interneurônios Gabaérgicos liberam GABA, que atua via receptores GABA_A para inibir os neurônios de saída da via descendente através do influxo de íons cloreto (Cl^-) e hiperpolarização da membrana. Opióides e canabinóides ativam a analgesia descendente suprimindo os estímulos Gabaérgicos inibitórios nesses neurônios. A ativação pós-sináptica do receptor μ -opióide desencadeia um aumento na condutância de potássio e hiperpolarização dos interneurônios Gabaérgicos, além da inibição de canais de cálcio (1). Já a ativação de receptores μ -opioides pré-sinápticos causa diminuição da liberação do GABA e das entradas Gabaérgicas nos neurônios de saída PAG-RVM. Esse mecanismo inclui a ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂) e aumento de ácido araquidônico (AA), o qual é metabolizado pela 12-lipoxigenase (12-LOX) formando ácido 12-hidroxi-eicosatetraenóico (12-HETE) que, então, ativa canais de potássio para hiperpolarizar e diminuir a liberação do GABA (2). No entanto, os canabinóides exercem apenas ações pré-sinápticas nos neurônios de saída PAG-RVM, cujo mecanismo permanece desconhecido (3).

Para desencadear a desinibição do sistema PAG-RVM e a antinocicepção, os opioides e também os canabinoides usam mecanismos pós-sinápticos e pré-sinápticos distintos (LAU; VAUGHAN, 2014). Opioides inibem diretamente os neurônios da PAG-RVM, presumivelmente interneurônios GABAérgicos, via ativação pós-sináptica do receptor μ -opioide com consequente aumento na condutância de potássio e hiperpolarização desses neurônios, além da inibição de canais de cálcio. Agindo de forma pré-sináptica em receptores μ -opioides expressos em neurônios GABAérgicos, os opioides diminuem a liberação do GABA e as entradas GABAérgicas nos neurônios PAG-RVM (HEINRICHER; INGRAM, 2008; LAU; VAUGHAN, 2014). Esse mecanismo pré-sináptico dos opioides inclui canais de potássio dependentes de voltagem ligados a uma via de segundos mensageiros. Nessa via, os opioides ativam a fosfolipase A_2 que aumenta a produção de ácido araquidônico, o qual é posteriormente metabolizado pela 12-lipoxigenase formando metabólitos como o ácido 12-hidroieicosatetraenóico (12-HETE). Esse metabólito ativa canais de potássio dependentes de voltagem para hiperpolarizar e diminuir a liberação do GABA (HEINRICHER; INGRAM, 2008; LAU; VAUGHAN, 2014; VAUGHAN et al., 1997) (Figura 3).

Em contraste, os canabinoides não possuem efeitos pós-sinápticos diretos nos neurônios PAG-RVM exercendo apenas ações pré-sinápticas, cujo mecanismo permanece desconhecido (LAU; VAUGHAN, 2014). Desta forma, opioides e canabinoides ativam a analgesia descendente através de um processo indireto de desinibição do GABA suprimindo os estímulos gabaérgicos inibitórios nos neurônios de saída da via descendente (FIELDS, 2004; LAU; VAUGHAN, 2014) (Figura 3).

A partir da PAG projeções das vias descendentes alvejam a RVM, a qual é formada pelo núcleo magnus da rafe serotoninérgico, o núcleo reticular paragigantocelular-alfa e o núcleo paragiganto-celular lateral (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2005; OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014). A RVM recebe entradas neuronais da PAG e envia projeções descendentes através do funículo dorsolateral para o corno dorsal da medula espinhal. Ali, essas projeções formam conexões sinápticas com terminais aferentes primários e neurônios de segunda ordem, bem como com interneurônios, modulando desta forma a entrada nociceptiva na medula espinhal (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010) (Figura 4).

Existem duas populações de neurônios na RVM que são determinantes para a modulação da dor. Um grupo de neurônios chamados de células ON que aumenta o seu disparo em resposta a um estímulo nocivo, imediatamente antes do início do reflexo nociceptivo. Já a outra população de neurônios diminui o disparo imediatamente antes do reflexo nociceptivo sendo assim chamadas de células OFF. Alguns neurônios da RVM não

modificam sua atividade frente a um estímulo nocivo e então são chamados de células neutras, as quais parecem conter serotonina em sua constituição (FIELDS et al., 1983; FIELDS, 2004; HEINRICHER; INGRAM, 2008; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010) (Figura 4).

Enquanto o corpo celular dos neurônios ON e OFF está na RVM, os terminais dos axônios descendentes desses neurônios se projetam diretamente para as lâminas I, II e V do corno dorsal da medula espinhal as quais são alvo de aferentes nociceptivos primários (D'MELLO; DICKENSON, 2008; FIELDS, 2004; HEINRICHER; FIELDS, 2013). Uma vez que as células ON possuem características pronociceptivas (facilitatórias), enquanto as células OFF desempenham funções antinociceptivas (inibitórias), a ativação da modulação descendente pode inibir ou facilitar a entrada nociceptiva na medula espinhal e, portanto, fornece um sistema descendente endógeno de regulação bidirecional da dor (FIELDS et al., 1983; FIELDS, 2004; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010). Logo, o circuito PAG-RVM deve ser visto não especificamente como um sistema de analgesia, mas mais geralmente, como um sistema de modulação da dor (HEINRICHER; INGRAM, 2008).

Além de uma projeção direta ao corno dorsal, a RVM pode influenciar o processamento nociceptivo na medula através de projeções retransmitidas para um grupo de neurônios A7 no tegumento mesopontino. Esta conexão permite à RVM ativar neurônios noradrenérgicos que se projetam via espinhal de forma paralela às projeções diretas da RVM ao corno dorsal. As saídas da RVM são, portanto, projeções descendentes para o corno dorsal, tanto diretamente quanto via tegmento mesopontino (HEINRICHER; INGRAM, 2008). Além disso, estudos recentes têm reforçado que neurônios se projetam diretamente do núcleo parabraquial lateral para a RVM influenciando a resposta das células ON e OFF frente à estimulação nociva. Sabe-se que poucos desses neurônios expressam CGRP, sugerindo que a projeção do núcleo parabraquial para a RVM é distinta daquela da amígdala e, parece transmitir entradas glutamatérgicas (aproximadamente 70%) e GABAérgicas (aproximadamente 30%) diretas para os neurônios da RVM (CHEN et al., 2017; ROEDER et al., 2016). Ainda, neurônios da via espinoparabraquial positivos para o receptor de NK1 são importantes não apenas transmitindo a informação dolorosa para o núcleo parabraquial, mas também estabelecendo níveis inibitórios e excitatórios em redes nociceptivas descendentes (LAPIROT et al., 2009; SUZUKI et al., 2002). Essas conexões contribuem para que a via espinoparabraquial acesse o sistema de controle descendente da dor (CHEN et al., 2017; ROEDER et al., 2016).

Como mencionado anteriormente, os diferentes níveis do circuito PAG-RVM estão ligados em parte através da liberação de opioides endógenos (HEINRICHER; FIELDS, 2013). Assim como na PAG, agonistas μ -opioides também estão envolvidos na modulação descendente da dor por agir na RVM, uma vez que eles aumentam indiretamente a atividade das células OFF via inibição da entrada inibitória GABAérgica (FIELDS, 2004; HEINRICHER; FIELDS, 2013). Interneurônios GABAérgicos na RVM inibem preferencialmente a atividade das células OFF do que das células ON, portanto nessa estrutura eles favorecem os mecanismos de facilitação descendentes da dor (MILLAN, 2002). Agonistas μ -opioides atuam reduzindo a liberação do GABA na RVM através de uma ação pré-sináptica que inclui a ativação de canais de potássio. Desta forma, a inibição mediada pelo GABA é reduzida o que explica a ativação (desinibição) das células OFF pelos agonistas μ -opioides (FIELDS, 2004). Neurônios glutamatérgicos também podem agir sobre as células OFF amplificando o efeito da desinibição (HEINRICHER; INGRAM, 2008) (Figura 4).

Em contraste, as células ON são diretamente hiperpolarizadas através da ativação de uma condutância de potássio e, portanto, inibidas pelos agonistas μ -opioides sugerindo que elas provavelmente expressam os receptores μ -opioides (FIELDS, 2004). Embora a inibição pré-sináptica da transmissão glutamatérgica para as células ON em ambos RVM e PAG possa contribuir, o efeito analgésico de agonistas μ -opioides nessas estruturas se dá mais provavelmente devido à desinibição das células OFF (FIELDS, 2004). Desta forma, mesmo que os opioides sejam capazes de inibir as células ON, sabe-se que a ativação das células OFF é necessária e suficiente para a analgesia desencadeada por eles (FIELDS, 2004; HEINRICHER; FIELDS, 2013; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010) (Figura 4).

De acordo com a ideia de desinibição, argumentou-se que as células ON seriam interneurônios GABAérgicos locais que inibem as células OFF, sugerindo uma hipótese de inibição lateral. No entanto, a hipótese de inibição paralela onde neurônios inibitórios (OFF) e excitatórios (ON) formam duas vias distintas na modulação descendente da dor, parece prevalecer (CLEARY; NEUBERT; HEINRICHER, 2008; LAU; VAUGHAN, 2014). Ainda, à nível da medula espinhal, os opioides podem inibir a liberação de neurotransmissores excitatórios dos terminais aferentes primários, bem como a atividade dos neurônios de transmissão da dor (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

Além dos opioides, as monoaminas serotonina, noradrenalina e dopamina também podem exercer efeitos modulatórios da dor através das vias descendentes (Figura 4). Elas podem causar efeitos antinociceptivos ou pronociceptivos através da ativação de diferentes subtipos de receptores localizados nos aferentes nociceptivos primários, nos neurônios de

projeção do corno dorsal, em interneurônios excitatórios ou em inibitórios locais, e nas células gliais. A recaptação pré-sináptica e o controle da liberação por autoreceptores inibitórios pré-sinápticos determinam os níveis locais de monoaminas e assim os seus efeitos nos seus diferentes alvos no corno dorsal (BENARROCH, 2008).

Projeções serotoninérgicas partem do núcleo magno da rafe na RVM para o corno dorsal da medula espinhal, originando a via serotoninérgica descendente da dor (KWIAT; BASBAUM, 1992). No entanto apenas 20% dos neurônios da RVM são serotoninérgicos, uma vez que a maioria das projeções da RVM para a medula espinhal são glicinérgicas ou GABAérgicas (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010). A ativação de projeções descendentes da RVM promove a liberação de serotonina no corno dorsal, seja diretamente de terminais de projeção ou de interneurônios espinhais. Na medula, as projeções serotoninérgicas descendentes podem ser inibitórias ou facilitatórias da dor dependendo do subtipo de receptor que é ativado. A ativação de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} tende a ser antinociceptiva, enquanto os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT₃ tendem a promover nocicepção (DOGRUL; OSSIPOV; PORRECA, 2009; OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014).

Para produzir antinocicepção os receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos alteram a condutância de potássio e causam hiperpolarização a fim de inibir a excitabilidade dos neurônios espinotalâmicos e dos interneurônios excitatórios. Já os receptores pré-sinápticos 5-HT_{1B/D} contribuem para a antinocicepção por inibir a liberação de neurotransmissores dos aferentes primários através do bloqueio de canais de cálcio (BENARROCH, 2008; BOADAS-VAELLO et al., 2016). No entanto, a facilitação é principalmente mediada pela ação da serotonina sobre o receptor 5-HT₃ pré-sináptico onde ela aumenta a liberação de neurotransmissores dos aferentes nociceptivos primários, enquanto os receptores 5-HT₃ pós-sinápticos aumentam a excitabilidade dos neurônios espinotalâmicos (BENARROCH, 2008; HEINRICHER; FIELDS, 2013).

Embora nem a PAG nem a RVM contenham neurônios noradrenérgicos, ambas as regiões se comunicam com núcleos noradrenérgicos importantes para a modulação da dor, incluindo os núcleos A5 (locus coeruleus), A6 e A7 (Kölliker-Füse). A partir dessas projeções, a noradrenalina contribui principalmente para a inibição descendente da dor na medula espinhal por inibir a resposta de neurônios de transmissão pré e pós-sinápticos e por agir em interneurônios (BAJIC; PROUDFIT, 1999; FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2005; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010). Tais efeitos da noradrenalina são causados pela ativação de receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos na medula espinhal, desencadeando uma cascata intracelular que resulta na inibição de canais de cálcio e consequente inibição da

liberação de neurotransmissores excitatórios dos terminais aferentes primários. Além disso, esses receptores podem mediar a inibição pós-sináptica de neurônios de projeção espinotalâmicos via hiperpolarização causada pela alteração da condutância de potássio (BENARROCH, 2008; BOADAS-VAELLO et al., 2016; HEINRIVHER; INGRAM, 2008; PERTOVAARA, 2006; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

Um mecanismo adicional descendente inibitório da noradrenalina consiste na ativação de receptores α_1 -adrenérgicos os quais causam despolarização de interneurônios inibitórios GABAérgicos na medula espinhal (BENARROCH, 2008; GASSNER; RUSCHEWEYH; SANDKUHLER, 2009). Isto porque, nessa estrutura interneurônios GABAérgicos exercem ações inibitórias da dor (BASBAUM et al., 2009), ao contrário de regiões supra espinhais como a PAG e a RVM onde o GABA pode facilitar a dor por inibir as projeções descendentes inibitórias (FIELDS, 2004; LAU; VAUGHAN, 2015). Além disso, a noradrenalina liberada na medula espinhal também contribui para a antinocicepção mediada por opioides (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010). As vias descendentes, principalmente noradrenérgicas, também contribuem para o controle inibitório nocivo difuso da dor (DNIC), também chamado de modulação condicionada da dor, onde uma estimulação nociva em uma parte do corpo inibe neurônios nociceptivos que inervam outras partes do corpo (HENRICHER; FIELDS, 2013; COLLOCA et al., 2017).

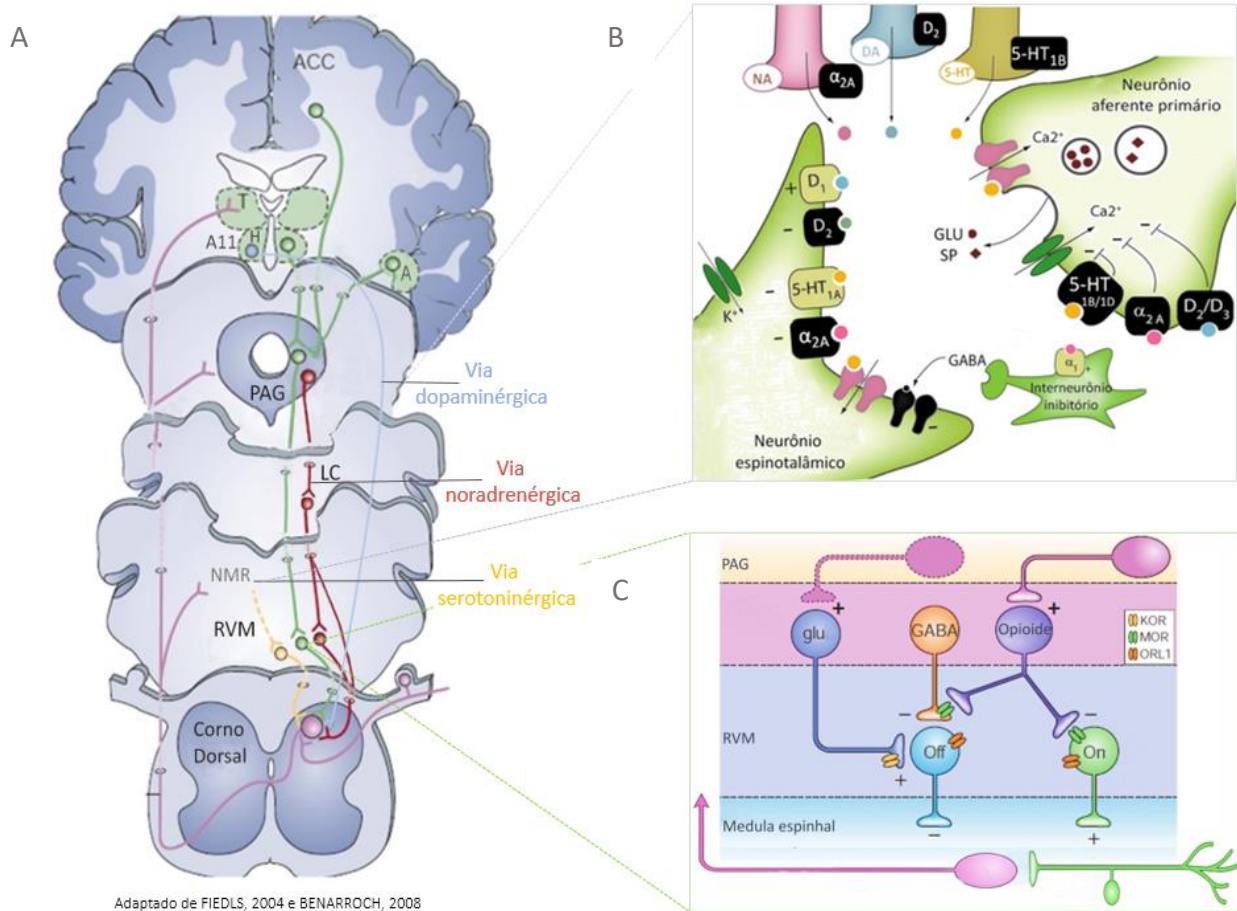


Figura 4. Vias descendentes modulatórias da dor (A). As projeções descendentes partem a partir do hipotálamo (H), amígdala (A), córtex cingulado e insular (ACC) até a PAG. Projeções ascendentes colaterais também se projetam diretamente para a PAG e RVM a partir da medula espinhal. A PAG envia projeções para o locus cerúleo (LC) que então projeta neurônios noradrenérgicos (em vermelho) para a medula espinhal. A via serotoninérgica (em amarelo) se projeta do núcleo magno da rafe (NMR) a partir da RVM para a medula espinhal. Já os neurônios dopaminérgicos (em azul) descendentes partem do núcleo A11 do hipotálamo e alcançam a medula espinhal. Na medula, as monoaminas podem causar antinocicepção por agir bloqueando canais de cálcio em neurônios aferentes primários para diminuir a liberação de neurotransmissores excitatórios como glutamato (Glu) e substância P (SP). Elas ainda hiperpolarizam e inibem neurônios espinotalâmicos por alterar a condutância de potássio. Ainda, a noradrenalina pode despolarizar e ativar interneurônios inibitórios no corno dorsal inibindo a ativação ascendente da dor (B). Projeções da PAG também alvejam a RVM a fim de modular os neurônios ON e OFF. Os opioides atuam inibindo diretamente as células ON enquanto ativam as células OFF indiretamente, uma vez que bloqueiam neurônios GABAérgicos e assim desinibem as vias descendentes analgésicas. Neurônios glutamatérgicos podem ativar as células OFF amplificando o efeito de desinibição. Axônios das células OFF se projetam para o corno dorsal aonde inibem a entrada nociceptiva enquanto as células ON facilitam a entrada nociceptiva (C). (KOR, MOR, ORL1; receptores opioides)

Já os neurônios dopaminérgicos descendentes se projetam principalmente a partir do núcleo A11 do hipotálamo periventricular posterior para o corno dorsal e em menor proporção da substância nigra e do núcleo paraventricular do hipotálamo (BENARROCH, 2008; MILLAN, 2002). Os aferentes primários e os neurônios da lâmina I do corno dorsal expressam os receptores dopaminérgicos do tipo D₁ (D₁ e D₅) e D₂ (D₂ e D₃). Agindo sobre os receptores D₂ e D₃ a dopamina exerce ação antinociceptiva por reduzir a liberação de neurotransmissores dos aferentes primários e pela inibição pós-sináptica dos neurônios do

trato espinotalâmico. Em contraste, a estimulação do receptor D₁ provoca efeitos pronociceptivos tanto diretamente quanto antagonizando ações dos opioides, por exemplo. Embora os receptores D₁ espinhais sejam expressos em maiores concentrações, os receptores D₂/D₃ têm maior afinidade pela dopamina (BENARROCH, 2008; LEVANT; MACCARSON, 2001; PAULUS; TRENKWALDER, 2006).

Em relação à facilitação descendente, ela também está associada, entre outros fatores, com ações da colecistoquinina em receptores CCK2, assim como com ações pronociceptivas da dinorfina na medula espinhal através da sua ligação aos receptores de cininas (LAI et al., 2008; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010). Tanto a substância P quanto seu receptor NK1 são encontrados na RVM e também contribuem para aumentar a excitabilidade dos neurônios facilitatórios da dor (HEINRICHER; FIELDS, 2013). Ainda, estudos recentes têm demonstrado que neurônios GABAérgicos da RVM se projetam para o corno dorsal da medula espinhal e inibem interneurônios encefalinérgicos e GABAérgicos locais para facilitar a dor mecânica (FRANÇOIS et al., 2017). Evidências sugerem que a facilitação descendente da nocicepção espinhal é um dos principais contribuintes para a sensibilização central e para o desenvolvimento de hiperalgesia secundária, indicando que o equilíbrio muda em favor da facilitação na transição da dor aguda para a crônica (HEINRICHER et al., 2009). Além disso, a facilitação descendente tem sido demonstrada estar mais envolvida na manutenção do que na iniciação de estados dolorosos (BINGHAM et al., 2009).

A facilitação descendente pode ainda ser engajada como parte de um ciclo de feedback positivo estimulado pela entrada nociva ascendente (HEINRICHER; FIELDS, 2013). A entrada nociva causa ativação da célula ON e inibição da célula OFF, que pode durar de menos de um segundo a minutos, para aumentar o reflexo de retirada frente ao estímulo nocivo. Desta forma, a estimulação nociva por si só recruta a RVM para facilitar a nocicepção como parte de um feedback positivo de curto prazo e, assim consiste na principal influência ascendente sobre as vias de modulação da dor (HEINRICHER; INGRAM, 2008; ROEDER et al., 2016). Tal processo de feedback positivo normalmente prepara o organismo para responder de forma mais rápida frente a entradas potencialmente prejudiciais (HEINRICHER; INGRAM, 2008). O problema surge quando essas modulações se tornam disfuncionais. Evidências clínicas apontam que disfunções das vias descendentes modulatórias da dor podem resultar de inibição reduzida e/ou facilitação aumentada das respostas nociceptivas. Em consequência tais disfunções podem levar ao aumento da dor observado em muitas condições dolorosas crônicas (OSSIPOV; MORIMURA; PORRECA, 2014) tais como na fibromialgia (CLAUW, 2015).

2.2 FIBROMIALGIA

A fibromialgia é uma doença crônica que afeta de 2 a 8% da população mundial. Sua prevalência é maior em mulheres do que em homens (razão 1:2) e pode se desenvolver em qualquer idade inclusive na infância (CLAUW, 2014). Ela é classificada segundo a Classificação Internacional de Doenças (ICD, do inglês ‘International Classification of Diseases’) como dor primária crônica e generalizada uma vez que a dor crônica, neste caso, não é considerada um sintoma, mas sim um estado de doença por si só (TREEDE et al., 2015; 2019).

A principal característica da fibromialgia é, portanto, a dor crônica generalizada presente em uma ou mais regiões anatômicas e que persiste ou reaparece por mais de 3 meses. Essa dor também é associada com sofrimento emocional significativo ou incapacidade funcional e não pode ser melhor explicada por outra condição dolorosa crônica (TREEDE et al., 2019). Os sintomas dolorosos são caracterizados por um aumento da sensibilidade à dor devido a redução do limiar de ativação dos nociceptores. Esses sintomas são manifestados nos pacientes como alodínia e hiperalgesia quando em contato com temperaturas frias e quentes e frente a estímulos mecânicos, assim como os pacientes também apresentam dor espontânea nos músculos e articulações (CHOY, 2015; HE et al., 2017; POTVIN; MARCHAND, 2016; REHM et al., 2010).

Além da dor, os sintomas apresentados pelos pacientes com fibromialgia também incluem uma variedade de comorbidades, como hipertensão, fadiga, problemas de memória, depressão e distúrbios do sono (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; CHOY, 2015; CLAUW, 2015). Fatores psicológicos, comportamentais e sociais associados a estados emocionais negativos contribuem para aumentar a incidência dessas comorbidades além de agravar a sensibilidade à dor (CLAUW, 2014, 2015). Desta forma, a fibromialgia resulta em significativa incapacidade funcional interferindo nas atividades diárias e sociais o que causa grande redução da qualidade de vida do paciente, além de alto uso de recursos médicos, uma vez que o diagnóstico e o tratamento são um grande desafio (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; DOPPLER et al., 2015; MACFARLANE et al., 2016).

A patofisiologia da fibromialgia ainda é pouco compreendida, mas sabe-se que alterações funcionais especialmente no sistema nervoso central causam um processamento anormal da dor e sensibilização central (CHOY, 2015; CLAUW, 2014; CLAUW, 2015; DOPPLER et al., 2015). A sensibilização central resulta em um aumento da resposta frente a um estímulo doloroso, a qual é mediada pela amplificação da sinalização da dor no sistema

nervoso central (CHOY, 2015; HÄUSER et al., 2015). A fibromialgia também tem sido descrita como um estado de dor centralizada. Esse termo não implica que a entrada nociceptiva periférica não esteja contribuindo para a dor, e sim que os pacientes sentem mais dor do que seria normalmente esperado de acordo com o grau de entrada nociceptiva (CLAUW, 2014; 2015). De qualquer forma, ambos os termos se referem que na fibromialgia há uma amplificação do processamento doloroso no sistema nervoso central (CLAUW, 2015).

Ainda, a nível central, tem sido demonstrado que em pacientes com fibromialgia há uma maior ativação neural no córtex cerebral para um dado estímulo além de excitabilidade aumentada dos neurônios da medula espinhal (CHOY et al., 2015). Dados pré-clínicos também demonstram uma maior ativação da microglia no corno dorsal, especialmente nas lâminas superficiais I-II onde a entrada nociceptiva é principalmente processada, um fator que contribui para a sensibilização central (TAGUCHI et al., 2015).

Além disso, o sistema nervoso central modula a transmissão da dor através de mecanismos facilitatórios ou inibitórios por meio da liberação de neurotransmissores (CLAUW, 2015). Neurotransmissores facilitatórios como substância P e glutamato, os quais aumentam a excitabilidade dos neurônios da medula espinhal e estimulam as vias de transmissão da dor, estão aumentados em pacientes com fibromialgia (CHOY, 2015; CLAUW, 2015). Por outro lado, neurotransmissores como noradrenalina, serotonina e dopamina, os quais modulam a percepção da dor em regiões cerebrais e podem inibir a transmissão da dor na medula espinhal, estão diminuídos. A depleção dessas monoaminas é a característica patofisiológica dominante na fibromialgia, uma vez que resulta em disfunção da modulação descendente principalmente inibitória da dor (CHOY, 2015; CLAUW, 2015; MILLAN, 2002). Isto porque, como mencionado acima, as monoaminas podem exercer ações analgésicas em neurônios aferentes primários e de projeção, além de interneurônios inibitórios dependendo do tipo de receptor em que se ligam (OSSIPOV, M.H.; DUSSOR, G.O.; PORRECA, 2010; MILLAN, 2002).

Além de mecanismos centrais, fatores periféricos contribuem para as características pré-clínicas e clínicas da fibromialgia (LITTLEJOHN, 2015; LITTLEJOHN; GUYMER 2018; TAGUCHI et al., 2015). Esses mecanismos incluem a inflamação neurogênica, resultante da liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios de fibras C e células inflamatórias periféricas, os quais contribuem para a sensibilização central. A principal célula inflamatória envolvida nesse processo inclui os mastócitos que, uma vez ativados, liberam várias substâncias neuroativas e vasoativas como a bradicinina (BLANCO et al., 2010; LITTLEJOHN, 2015). Já o corpo celular das fibras C peptidérgicas produz neuropeptídeos no

gânglio da raiz dorsal, particularmente substância P e CGRP, que são então transportados tanto proximalmente ao corno dorsal da medula espinhal quanto distalmente aos terminais dos axônios dessas fibras na periferia (LITTLEJOHN, 2015; LITTLEJOHN; GUYMER 2018). A inflamação neurogênica, portanto, resulta do efeito desses neuropeptídios sobre vasos sanguíneos periféricos, estruturas neurais sensoriais e células imunes. Tais efeitos contribuem para as características clínicas da fibromialgia como edema nos tecidos periféricos e alodínia (LITTLEJOHN, 2015).

Periféricamente também tem sido encontrado anormalidades funcionais e estruturais nas fibras C de pacientes com fibromialgia incluindo a redução do diâmetro de seus axônios. Embora ocorra uma redução das terminações nociceptivas há um aumento da sensibilidade dolorosa devido a neuroplasticidade central que surge, ou em virtude de alterações patológicas nessas terminações que aumentam a atividade das fibras antes delas morfologicamente desaparecerem (DOPPLER et al., 2015). Pré-clinicamente, mudanças na sensibilidade mecânica de nociceptores também têm sido caracterizadas na fibromialgia por uma diminuição na proporção das fibras C com consequente aumento da resposta das fibras C remanescentes, o que resulta na intensificação da dor (TAGUCHI et al., 2015).

Como a patofisiologia da fibromialgia é inespecífica o seu manejo clínico é frequentemente longo e complexo, envolvendo visitas clínicas repetidas e com diferentes médicos, o diagnóstico pode demorar anos para ser confirmado (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016). Os primeiros critérios para o diagnóstico da fibromialgia datam de 1990 segundo o Colégio Americano de Reumatologia. Baseado nestes critérios, para que um indivíduo fosse diagnosticado com fibromialgia, o mesmo deveria apresentar a ocorrência de dor generalizada (acima e abaixo da cabeça, e em ambos os lados do corpo), bem como sensibilidade em mais de 11 ou 18 pontos dolorosos (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; CLAUW, 2014; WOLFE et al., 1990). No entanto, ao longo do tempo pode-se observar que muitos pacientes diagnosticados com fibromialgia apresentavam um menor número de pontos dolorosos do que os estabelecidos acima. Com isso, no ano de 2010 surgiram então critérios alternativos para o diagnóstico da fibromialgia que incluíram o auto relato do paciente sobre os locais de dor e a presença de sintomas comórbidos, reduzindo a importância da contagem do número de pontos dolorosos (CLAUW, 2014; HÄUSER et al., 2015; WOLFE et a., 2011).

Na prática clínica, a fibromialgia deve ser suspeitada em pacientes com dor multifocal não totalmente explicada por lesão ou inflamação. Na maioria dos casos a característica mais proeminente é a dor musculoesquelética, uma vez que as vias de dor ao longo do corpo estão amplificadas podendo surgir dor em qualquer lugar (CLAUW, 2014; 2015). Isto é, o paciente

apresenta um processamento anormal da dor e não uma anormalidade patológica confinada à região do corpo em que atualmente está sentindo dor (CLAUW, 2015).

Apesar de algumas evidências, a fibromialgia permanece como uma doença incapacitante, uma vez que ainda não apresenta uma patofisiologia específica além de não possuir diagnóstico apropriado (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016). As terapias disponíveis são baseadas no gerenciamento dos sintomas, e desta forma apresentam eficácia limitada além de reações adversas que comprometem a qualidade de vida dos pacientes (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; CLAUW, 2014). Os tratamentos recomendados pela Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR do inglês ‘European League Against Rheumatism’) e pelo FDA (do inglês ‘Food and Drug Administration-US’) incluem terapias não farmacológicas como acupuntura, exercícios físicos, terapia cognitivo comportamental, entre outras (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; MACFARLANE et al., 2016).

Já os principais tratamentos farmacológicos visam aumentar a atividade dos neurotransmissores inibitórios ou reduzir a atividade dos excitatórios (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016). Entre eles, são aprovados em alguns países a pregabalina, a duloxetina e o milnacipram, sendo a pregabalina mais relevante clinicamente (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; MACFARLANE et al., 2016; ÜÇEYLER et al., 2013). Sabe-se que o alívio médio da dor relatado pelos pacientes após o uso de pregabalina é de apenas 50% (ÜÇEYLER et al., 2013) e que seu uso crônico provoca efeitos adversos como alterações psicológicas, ganho de peso, edema e visão turva, os quais limitam sua utilização (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; CLAUW, 2015). Curiosamente, os opioides são pouco eficazes no tratamento da fibromialgia. Isso é explicado porque a atividade opioide endógena está aumentada nessa doença, mas a disponibilidade dos receptores μ -opioides está reduzida. Ainda, há evidências de que essas drogas podem piorar o sintoma de dor relacionado à fibromialgia devido à hiperalgesia induzida por opioides (HARRIS et al., 2007; CLAUW et al., 2015).

Nesse sentido, modelos animais de administração de reserpina subcutânea vêm sendo utilizados para tentar elucidar os mecanismos subjacentes à fibromialgia a fim de encontrar terapias mais eficazes para o seu tratamento. Existem vários protocolos experimentais para induzir o modelo de fibromialgia nos animais e um deles é usando a administração de reserpina. O mecanismo pelo qual a reserpina induz o modelo é se ligando irreversivelmente ao transportador vesicular de monoaminas e assim esgotando esses neurotransmissores no sistema nervoso central. Sabe-se que em humanos e em animais experimentais a reserpina

causa uma série de alterações bioquímicas e comportamentais as quais estão associadas à fibromialgia (NAGAKURA et al., 2009; TAGUCHI et al., 2015; VESELINOVI et al., 2011).

Existem ainda outros modelos animais para induzir fibromialgia como o modelo de injeção intramuscular de salina ácida, o modelo de estresse sonoro e o modelo de estresse pelo frio (FRANGUE et al., 2014). No entanto, o modelo experimental de fibromialgia induzido por reserpina tem sido considerado relevante uma vez que apresenta validade de face (indicada pelos sintomas dolorosos e depressivos), validade construtiva (devido às alterações nos níveis de monoaminas), além de validade preditiva (devido a eficácia dos medicamentos clinicamente utilizados para tratar a fibromialgia) (NAGAKURA et al., 2009).

Além disso, a disfunção do sistema descendente inibitório da dor está envolvida na facilitação de comportamentos relacionados à dor neste modelo, devido à depleção de monoaminas (NAGAKURA et al., 2009; TAGUCHI et al., 2015) o que mimetiza a principal disfunção observada nos pacientes com fibromialgia (CHOY, 2015; CLAUW, 2015). Ainda, com este modelo, os animais exibem comportamentos relacionados à dor de longa duração frente à estímulos nocivos em múltiplos locais, e também comportamentos semelhantes à depressão, os quais são frequentemente encontrados em pacientes com fibromialgia, embora a dominância feminina não é observada com a administração de reserpina (TAGUCHI et al., 2015).

Estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nessa doença a fim de buscar tratamentos mais eficazes e que garantam a qualidade de vida dos pacientes (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; CLAUW, 2014; DOPPLER et al., 2015). Sabe-se que os receptores B₁ e B₂ de cininas estão envolvidos em condições dolorosas crônicas contribuindo para a alodínia, hiperalgesia e nocicepção espontânea que são sintomas dolorosos apresentados pelos pacientes com fibromialgia (BRUSCO et al., 2017a; CHOY, 2015; QUINTÃO et al., 2008; REHM et al., 2010). Esses sintomas podem surgir por disfunção das vias descendentes inibitórias que modulam a transmissão da dor na medula espinhal, além de sensibilização periférica e central causada por neuropeptídeos como substância P e bradicinina, a qual é agonista dos receptores de cininas (CHOY, 2015; CLAUW, 2015; LITTLEJOHN, 2015; LITTLEJOHN; GUYMER 2018). A bradicinina também contribui para a patogênese da dor musculoesquelética crônica, a qual é a mais proeminente característica clínica da fibromialgia (CLAUW, 2014; PINHEIRO et al., 2013).

Além disso, os receptores de cininas estão expressos, entre outros locais, principalmente nas fibras C cuja estrutura e função está alterada em pacientes com fibromialgia (BRUSCO et al., 2017a; SILVA et al., 2016; TAGUCHI et al., 2015). Eles

podem ainda contribuir para modulação facilitatória descendente da dor, que também está alterada na fibromialgia, por mediar as ações pronociceptivas do opioide endógeno dinorfina na medula espinhal, uma vez que, ao se ligar aos receptores para cininas a dinorfina causa excitabilidade neuronal e processamento anormal da dor (LAI et al., 2008; OSSIPOV, M.H.; DUSSOR, G.O.; PORRECA, 2010). Portanto, os receptores de cininas poderiam estar envolvidos na patofisiologia da dor associada a fibromialgia e, desta forma, antagonistas desses receptores poderiam ser promissores no tratamento dessa doença.

Ainda, pacientes com fibromialgia apresentam uma série de comorbidades como a hipertensão que acomete entre 12-40% deles (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; HAVILAND; BANTA; PRZEKOP, 2011). Adicionalmente, a hipertensão é um dos mais comuns diagnósticos (34,8%) pelos quais os pacientes com fibromialgia são admitidos em hospitais (HAVILAND; BANTA; PRZEKOP, 2011). Dados pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que inibidores da ECA, uma das principais classes de fármacos usados para tratar a hipertensão (MANCIA et al., 2013), contribuem para a potencialização de condições dolorosas agudas e crônicas (BOIX et al., 2005; BORSOOK; SAVA, 2009; BRUSCO et al., 2017a; CHOI, 2012; de MOS et al., 2009; GUASTI et al., 2002; SILVA et al., 2016). Tais efeitos ocorrem porque os inibidores da ECA impedem a degradação de neuropeptídeos como substância P e bradicinina, além de apresentarem efeitos alostéricos sobre os receptores de cininas (BORSOOK; SAVA, 2009; CHEN et al., 2006; de MOS et al., 2009; ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010; IGNJATOVIC et al., 2002). Logo, o uso de inibidores da ECA poderia potencializar os sintomas dolorosos em pacientes com fibromialgia.

2.3 SISTEMA CALICREÍNA-CININAS

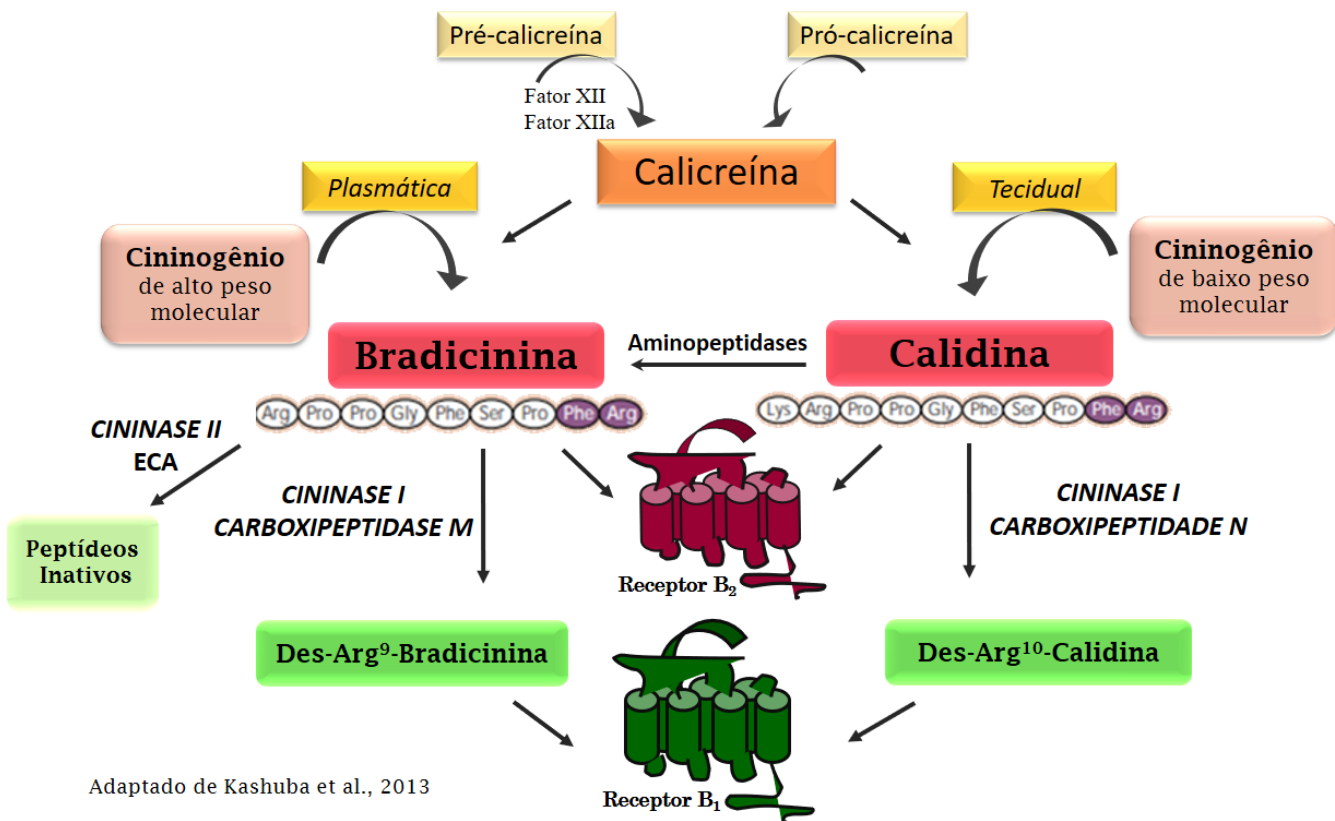
O sistema calicreína-cininas inclui uma cascata multiproteica endógena, cuja ativação leva ao desencadeamento da via de coagulação intrínseca e à hidrólise enzimática dos cininogênios com a consequente formação de peptídeos relacionados à bradicinina. Este sistema desempenha um papel fundamental em muitos processos biológicos (fisiológicos e patológicos) como na inflamação, vasodilatação, contração da musculatura lisa, cardioproteção, permeabilidade vascular, controle da pressão arterial, coagulação e dor (KASHUBA et al., 2013).

A primeira evidência do sistema calicreína-cininas foi relatada em 1909, quando os cirurgiões franceses Abelous e Bardier descobriram sinais de hipotensão em cães após a

injeção intravenosa de urina humana (ABELOUS; BARDIER, 1909; NEGRAES et al., 2015). Em 1928, os pesquisadores alemães Frey e Kraut atribuíram este efeito à presença de uma substância, que chamaram de calicreína (do grego kallikreas, termo para o pâncreas), uma vez que ela era encontrada no pâncreas (FREY; KRAUT, 1928; KASHUBA et al., 2013; IGIC, 2018). O grupo de Eugen Werle relatou em 1937 que a incubação da calicreína com soro liberava uma substância hipotensiva que chamaram de calidina (NEGRAES et al., 2015). Em 1949, o médico e farmacologista brasileiro Maurício Rocha e Silva e colegas descreveram outro peptídeo resultante da atividade da calicreína, o qual foi isolado da peçonha da jararaca *Bothrops* e também apresentava propriedades hipotensoras. Esse peptídeo foi denominado de bradicinina por produzir contrações tardias e lentas, uma vez que em grego bradi indica lento e cinin indica movimento (ROCHA e SILVA et al., 1949; KASHUBA et al., 2013; DUTRA, 2017). Em 1965, foi descoberto que na peçonha da jararaca *Bothrops* também contém um fator que potencializa algumas das ações farmacológicas da bradicinina (FERREIRA, 1965).

Entre a década de 40 e 60 também houve a identificação das enzimas cininase I (ERDÖS, 1961) e cininase II (YANG; ERDÖS, 1967) e de seus substratos os cininogênios (HABERMANN, 1963). Na década de 1970, Regoli e colaboradores definiram as primeiras caracterizações moleculares dos dois receptores de cininas B₁ e B₂, os quais diferiam em seus perfis farmacológicos e padrões de expressão (REGOLI; BARABE; PARK, 1977, LEEB-LUNDBERG et al., 2005). Nos anos 80, um grande avanço veio do desenvolvimento dos primeiros análogos de bradicinina com atividade antagonista no receptor B₂ (VAVREK e STEWART, 1985; LEEB-LUNDBERG et al., 2005).

O sistema calicreínas-cininas é formado, portanto, por interações complexas entre seus vários componentes, as enzimas teciduais e plasmáticas envolvidas na síntese das cininas chamadas de calicreínas, os precursores das cininas que são os cininogênios, as enzimas que metabolizam as cininas (cininases), as próprias cininas e os seus receptores B₁ e B₂ (MARCEAU; REGOLI, 2004; BARRETT et al., 2014) (Figura 5).



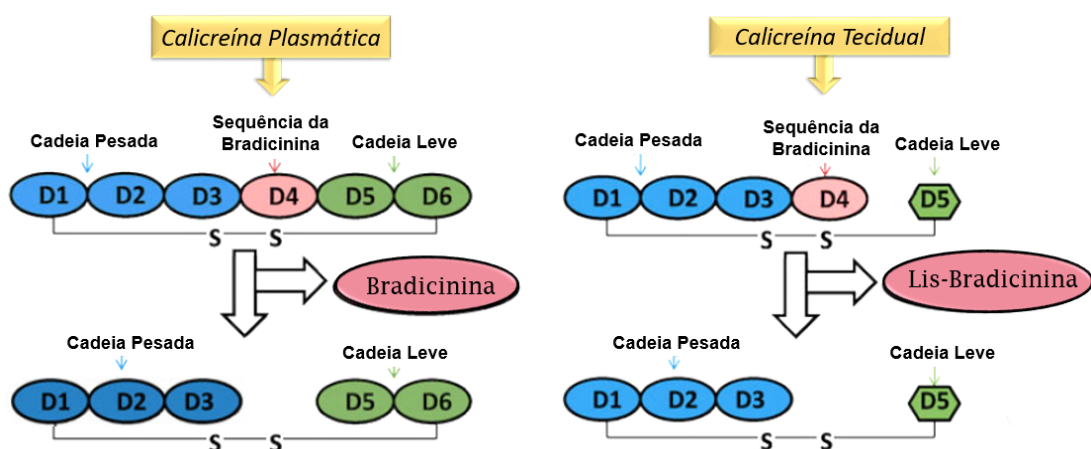
Adaptado de Kashuba et al., 2013

Figura 5 – A conversão do fator XII em fator XIIa medeia a ativação da pré-caliceína em caliceína o que inicia a produção de cininas. Os cininogênios constituem o substrato para formação das cininas pela ação de enzimas cininogênicas como a caliceína tecidual e a plasmática. A caliceína plasmática age sobre o cininogênio de alto peso molecular formando a bradicinina. Já a caliceína tecidual age sobre o cininogênio de baixo peso molecular formando a calidina. As cininas podem ser metabolizadas por peptidases chamadas de cininases. As cininases II (enzima conversora de angiotensina I-ECA) transformam a bradicinina em um peptídeo inativo. No entanto, as cininases I (carboxipeptidases M e N) removem aminoácidos terminais da bradicinina e da calidina formando os metabólitos ativos des-Arg⁹-bradicinina e des-Arg¹⁰-calidina. A calidina pode ainda ser convertida em bradicinina pela ação de aminopeptidases. A bradicinina e a calidina exercem seus efeitos pela ativação dos receptores B₂ para cininas, ao passo que seus metabólitos ativos des-arg, ativam os receptores B₁ para cininas.

As cininas são potentes peptídeos algogênicos endógenos formados a partir de glicoproteínas chamadas de cininogênios. Essas glicoproteínas são sintetizadas em tecidos hepáticos e em vários órgãos e tecidos extra-hepáticos, tanto em animais quanto em humanos, incluindo o tecido pulmonar, renal, neural, cardíaco e em células endoteliais (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; KASHUBA et al., 2013). Eles existem em duas isoformas proteicas humanas que são reconhecidas como cininogênio de alto e de baixo peso molecular (KASHUBA et al., 2013). O cininogênio de alto peso molecular possui um peso molecular de 120 kDa e uma concentração no plasma humano de aproximadamente 80 mg/mL. Já o cininogênio de baixo peso molecular é um polipeptídeo com peso molecular de aproximadamente 68-75 kDa e uma concentração plasmática próxima de 60 mg/mL (SAINZ, I.M.; PIXLEY, R.A.; COLMAN, 2007; KASHUBA et al., 2013).

Ambas as isoformas de cininogênios compartilham um peptídeo comum (18 aminoácidos), a cadeia pesada (362 aminoácidos) na porção N-terminal e os peptídeos da bradicinina (9 aminoácidos). A diferença entre eles está na cadeia leve que consiste de 255 aminoácidos presentes na porção C-terminal no cininogênio de alto peso molecular e de 38 aminoácidos no cininogênio de baixo peso molecular. As cadeias são ligadas entre si por pontes dissulfeto (COLMAN, 1996; CASSIN et al., 2002; KAPLAN et al., 2002).

Além disso, os cininogênios são formados por domínios que lhes conferem propriedades distintas e específicas como inibição de cisteíno proteases ou sítios de ligação para macromoléculas (CASSIM et al., 2002; COLMAN, 2006; MOREAU et al., 2005). O cininogênio de alto peso molecular é formado por seis domínios onde o D1-D3 incluem a cadeia pesada e o D5-D6 a cadeia leve, essas cadeias são ligadas por D4 que contém a sequência da bradicinina. Após a ativação da caliceína plasmática há a liberação do peptídeo bradicinina a partir desse cininogênio. Já o cininogênio de baixo peso molecular consiste em cinco domínios onde o D1-D3 incluem a cadeia pesada e o D5 a única cadeia leve presente. As duas cadeias também são ligadas por D4, que inclui a sequência da lis-bradicinina conhecida por calidina. Após a clivagem proteolítica desse cininogênio pela caliceína tecidual a calidina é então liberada. A forma clivada remanescente de ambos os cininogênios consiste de uma cadeia pesada e leve ligadas por uma ponte dissulfeto (para revisão ler KASHUBA et al., 2013) (Figura 6). Os cininogênios constituem, portanto, o substrato para formação das cininas pela ação de um grupo de serino proteases chamadas de cininogenases, dentre as quais a caliceína tecidual e a plasmática são as mais potentes (BARRETT et al., 2014; CALIXTO et al., 2000).



Adaptado de Kashuba et al., 2013

Figura 6. Os cininogênios são os precursores das cininas e constituem-se de duas isoformas. O cininogênio de alto peso molecular é formado por 6 domínios enquanto o cininogênio de baixo molecular é formado por 5

domínios. Os domínios são formados por cadeias pesadas e leves ligadas por um domínio que inclui a sequência da bradicinina (D4). Após a clivagem do cininogênio de alto e baixo peso molecular pela calicreína plasmática e tecidual há a liberação da bradicinina e da lis-bradicinina (calidina) respectivamente. A forma clivada remanescente consiste da cadeia pesada e leve ligadas por uma ponte dissulfeto.

Classicamente, existem duas vias principais pelas quais as cininas são geradas. A primeira inclui o sistema calicreína-cininas plasmático que é o mais complexo e também inicia a ativação da via intrínseca da cascata coagulação, além do sistema de geração de cininas tecidual que é o mais simples (MOREAU et al., 2005). A calicreína plasmática e a tecidual diferem em relação ao seu peso molecular, gene codificador, ponto isoelétrico, características imunológicas, sequência de aminoácidos, especificidade para substrato e tipo de cinina liberada, desta forma podendo desempenhar diferentes funções fisiopatológicas (CASSIN et al., 2002; MARCEAU; REGOLI 2004; DUTRA et al., 2017). Inibidores endógenos das calicreínas podem regular a produção de cininas. A α_2 -macroglobulina e o inibidor de esterase C1, por exemplo, são os principais inibidores da calicreína plasmática, enquanto calicreína tecidual é principalmente inibida pela α_1 -antitripsina (CASSIN et al., 2002; MOREAU et al., 2005).

A calicreína tecidual (glandular) é uma serina protease e glicoproteína ácida secretada por diversos órgãos e células como pâncreas, rim, baço, coração, neutrófilos, pituitária, placenta, glândulas sudoríparas e sebáceas, sistema nervoso central, e nervos periféricos (YAROVAYA; NESHKOVA, 2015; YOUSEF et al., 2003; KASHUBA et al., 2013; DUTRA, 2017). A calicreína tecidual é sintetizada como uma enzima inativa (denominada pró-calicreína) (KASHUBA et al., 2013) que é convertida na forma ativa pela clivagem de um peptídeo amino terminal (MOREAU et al., 2005), sendo a plasmina e a calicreína plasmática as responsáveis por essa conversão (KASHUBA et al., 2013). A calicreína tecidual age preferencialmente sobre o cininogênio de baixo peso molecular formando o decapeptídeo (-Lis¹-Arg²-Pro³-Pro⁴-Gli⁵-Fen⁶-Ser⁷-Pro⁸-Fen⁹-Arg¹⁰-) chamado de lis-bradicinina ou calidina (MARCEAU; REGOLI, 2004; DUTRA, 2017) por hidrolisar os resíduos amino-terminais metil³⁷⁹-lisina³⁸⁰ e carboxi-terminais arginina³⁸⁹-serina³⁹⁰ (MOREAU et al., 2005).

Embora o cininogênio de baixo peso molecular seja o substrato preferencial da calicreína tecidual, essa enzima também pode liberar cininas a partir do cininogênio de alto peso molecular (CASSIN et al., 2002; MOREAU et al., 2005). Quando se trata de roedores, por exemplo, tanto a calicreína plasmática como a tecidual formam preferencialmente bradicinina (CAMPBELL, 2003). Além disso, a calidina pode ser convertida em bradicinina

através da clivagem do resíduo de lisina N-terminal por aminopeptidases plasmáticas (GUIMARÃES et al., 1973).

A caliceína plasmática também é formada a partir de um precursor inativo, a pré-caliceína plasmática, uma serina protease semelhante à tripsina. Essa pré-caliceína é sintetizada predominantemente no fígado e níveis baixos também são sintetizados nas células epiteliais das glândulas renais, placentárias e adrenais (KAPLAN, 2014, IGIC, 2018), além de outros tecidos como cérebro, células endoteliais, leucócitos, fibroblastos, entre outros (CASSIM et al., 2002). A pré-caliceína pode ser ativada em situações patológicas (principalmente pela ativação do fator XII ou via de contato) ou em situações fisiológicas (independente do fator XII) (KAPLAN et al., 2002; KASHUBA et al., 2013).

O primeiro mecanismo é dependente da auto-ativação do fator XII (Fator de Hageman) em fator XIIa por meio de uma alteração conformacional após o contato com superfícies carregadas negativamente (MOREAU et al., 2005). O fator XIIa inicia então uma reação de modificação plasmática da pré-caliceína em caliceína na presença de cininogênio (SCHMAIER, 2008; KASHUBA et al., 2013; DUTRA, 2017), um processo chamado de ativação por sistema de contato (IGIC, 2018). A reação de formação da caliceína plasmática também ativa a formação estrutural do fator XII α o qual subsequentemente, ativa a transformação do Fator XI em Fator XIa, que por sua vez inicia a via intrínseca da cascata de coagulação (SCHMAIER, 2008). O segundo mecanismo pode ocorrer independentemente do fator XII onde proteínas prolicarboxipeptidases (IGIC, 2018) e de choque térmico 90 (HSP90) podem ser ativadoras da pré-caliceína em caliceína no plasma (JOSEPH; THOLANIKUNNEL; KAPLAN, 2002).

Em ambas as circunstâncias a ativação da caliceína plasmática leva à hidrólise do cininogênio de alto peso molecular em um processo que consiste de duas etapas. Primeiramente o cininogênio é clivado na ligação dos resíduos arginina³⁸⁹-serina³⁹⁰ da porção C-terminal da sequência da bradicinina, deixando esta ligada à extremidade C-terminal da cadeia pesada. Em seguida, a sequência Leu³⁷⁸-Met³⁷⁹-Lis³⁸⁰-Arg³⁸¹ é clivada na ligação lisina³⁸⁰-arginina³⁸¹ resultando na liberação da bradicinina, um peptídeo formado de nove aminoácidos (-Arg¹-Pro²-Pro³-Gli⁴-Fen⁵-Ser⁶-Pro⁷-Fen⁸-Arg⁹-) (MOREAU et al., 2005; MORI, K.; SAKAMOTO, W.; NAGASAWA, 1981; KASHUBA et al., 2013).

Depois de formadas, as cininas se difundem através dos capilares ou vasos linfáticos dos tecidos e são rapidamente inativadas por um conjunto de peptidases chamadas cininases, entre elas as principais são as cininases do grupo I e do grupo II (MOREAU et al., 2005). As cininases I são representadas pela enzima carboxipeptidase M (membrana) que age

preferencialmente em peptídeos contendo resíduos de arginina na porção C-terminal e carboxipeptidase N (plasma) que age preferencialmente em peptídeos contendo lisina na porção C-terminal. Desta forma, elas são capazes de remover os aminoácidos terminais das moléculas da bradicinina e da calidina, formando os metabólitos ativos des-Arg⁹-bradicinina (Arg¹-Pro²-Pro³-Gli⁴-Fen⁵-Ser⁶-Pro⁷-Fen⁸) e des-Arg¹⁰-calidina (Lis¹-Arg²-Pro³-Pro⁴-Gly⁵-Fen⁶-Ser⁷-Pro⁸-Fen⁹), respectivamente (CASSIM et al., 2002; KASHUBA et al., 2013). Em humanos, o termo coletivo "cininas" refere-se aos polipeptídeos bradicinina, calidina (lis-bradicinina) e aos dois metabólitos, des-Arg⁹-bradicinina e a des-Arg¹⁰-calidina, os quais constituem as quatro cininas biologicamente ativas (MARCEAU; REGOLI, 2004; KASHUBA et al., 2013).

Enquanto a carboxipeptidase N é sintetizada pelo fígado e secretada na circulação, onde é responsável por 90% da metabolização das cininas (CASSIN et al., 2002), a enzima carboxipeptidase M é encontrada ancorada na membrana plasmática sendo amplamente distribuída pelo fígado, rins, vasos sanguíneos, intestino, cérebro e nervos periféricos, além de se apresentar solúvel em vários fluidos corporais (ZHANG; TAN; SKIDGEL, 2013b). Independentemente de sua atividade enzimática de gerar as des-Arg-cininas, agonistas do receptor B₁, a carboxipeptidase M potencializa alostericamente a afinidade do receptor B₁ para seus agonistas, além de formar um complexo com esse receptor na membrana após a ligação da bradicinina ou calidina. Tais processos resultam na ativação da sinalização de segundos mensageiros (cálcio intracelular, ERK, óxido nítrico) através do receptor B₁ (ZHANG et al., 2008, 2011; ZHANG, X.; TAN, F.; SKIDGEL, 2013a, b) (Figura 7).

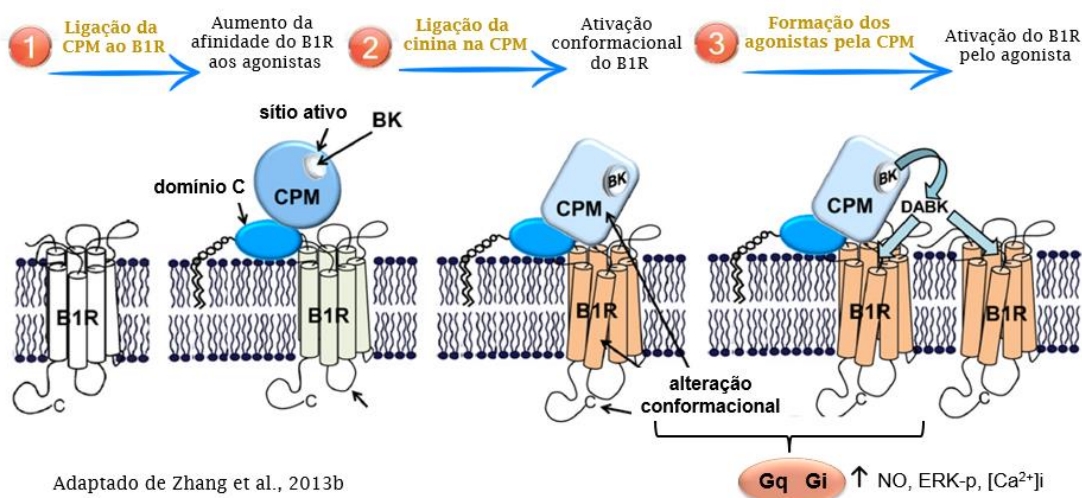


Figura 7. Três formas pelas quais a carboxipeptidase M (CPM) interage com o receptor B₁ de cininas (B1R). 1) a carboxipeptidase M potencializa alostericamente a afinidade do receptor B₁ para seus agonistas, as des-Arg-cininas. 2) a ligação do substrato da carboxipeptidase M (bradicinina-BK ou calidina) ao sítio ativo da enzima

causa uma alteração conformacional nesta, que é transmitida via interação proteína-proteína para o receptor B₁ de cininas, resultando no acoplamento da proteína G (Gq/Gi) e ativação da sinalização do cálcio (Ca²⁺), óxido nítrico (NO) ou ERK-p. 3) a clivagem de resíduos C-terminais da bradicinina (BK) ou calidina pela carboxipeptidase M gera agonistas do receptor B₁ (por exemplo, des-Arg⁹-bradicinina- DABK) que pode ativar ainda mais o receptor B₁ associado ou receptores B₁ adicionais.

As cininases II são representadas principalmente pela enzima conversora de angiotensina I (ECA) e pela endopeptidase neutra as quais clivam as cininas em metabólitos inativos (KASHUBA et al., 2013; MOREAU et al., 2005). A endopeptidase neutra (neprilisina) é uma metaloprotease envolvida no metabolismo de vários peptídeos secretados biologicamente tais como angiotensina I e II, substância P, encefalinas entre outros, e ainda é capaz de clivar o dipeptídeo C-terminal da bradicinina (Pro⁷-Fen⁸) tornando ela inativa (CAMPBELL, 2003; KASHUBA et al., 2013).

A ECA é uma dipeptidil carboxipeptidase dependente de zinco que é primeiramente sintetizada como uma proteína ligada à membrana e, posteriormente liberada na circulação após a clivagem proteolítica pós-translacional da âncora de membrana (COSTEROUSSE et al., 1992; MOREAU et al., 2005). A enzima possui duas metaloproteinases homólogas (domínios N e C-terminais) contendo uma sequência de ligação a zinco: HEXXH (His-Glu-X-X-His), as quais constituem o sítio ativo da enzima e exibem atividade enzimática semelhante (ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010; MOREAU et al., 2005). A ECA é amplamente distribuída em diversos tecidos humanos como células dendríticas, cérebro, nervos, líquido cefalorraquidiano, neurônios, córtex cerebral, medula espinhal, entre outros (COSTEROUSSE et al., 1992; KRAMER et al., 2005; VISNIAUSKAS et al. 2011; KAUR; MUTHURAMAN; KAUR, 2015).

Essa enzima é responsável por clivar o dipeptídeo Fen⁸-Arg⁹ da porção C-terminal da bradicinina, transformando-a em um metabólito inativo, sendo que, a des-Fen⁸-Arg⁹ bradicinina formada pode ser novamente degradada pela ECA, liberando o dipeptídeo Ser⁶-Pro⁷(CASSIM, et al., 2002; ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010). A ECA também é capaz de clivar um tripeptídeo (Ser⁶-Pro⁷-Fen⁸) da des-Arg⁹-bradicinina levando a fragmentos inativos (MARCEAU; REGOLI et al., 2004; MARCEAU et al., 2005), além de metabolizar a substância P, uma proteína da família das taquicininas (KASHUBA et al., 2013).

A ECA também faz a ligação entre o sistema caliceína-cininas e o sistema renina angiotensina, uma vez que é capaz converter o hormônio angiotensina I no potente vasoconstritor angiotensina II, além de inativar o peptídeo vasodilatador bradicinina, regulando desta forma a pressão arterial (MARIN-CASTAÑO, et al., 2002; NEGRAES et al., 2015). Por isso, inibidores da ECA são comumente utilizados para o tratamento da

hipertensão (MANCIA et al., 2013) sendo uma das classes de fármacos mais bem sucedidas para o tratamento de alterações cardiovasculares e renais (MARCEU; REGOLI, 2004).

Já a ECA2 é um homólogo da ECA que gera angiotensina 1-7, um peptídeo vasodilatador que ao contrário da angiotensina II, causa vasodilatação e tem efeitos antioxidantes, antitrombóticos e antifibróticos (FERRARIO et al., 1991; IGIC, 2018). A ECA2 é também uma glicoproteína integral de membrana encontrada na superfície das células endoteliais e epiteliais e tem distribuição tecidual mais limitada do que a ECA. A ECA2 consiste em um único domínio de sítio ativo e difere da ECA por atuar como uma carboxipeptidase removendo resíduos de aminoácidos individuais a partir seus substratos, que incluem a angiotensina II. A ECA2 hidrolisa eficientemente o metabólito ativo des-Arg⁹-bradicinina, mas não é capaz hidrolisar a bradicinina (VICKERS et al., 2002; MOREAU et al., 2005). Além disso, a ECA2 não é inibida por alguns fármacos inibidores da ECA (MOREAU et al., 2005).

A descoberta dos inibidores da ECA foi um grande avanço na medicina cardiovascular e a primeira descoberta de drogas usando o design baseando em ligantes. Os primeiros achados datam de 1965 quando Ferreira e Rocha e Silva encontram na peçonha de uma serpente brasileira, a jararaca *Bothrops*, um fator potencializador da bradicinina, que mais tarde junto com John Vane descobriram agir por inibir a ECA. Em 1977 foi descoberto o primeiro inibidor da ECA ativo por via oral, o captopril. Em seguida vários novos inibidores da ECA foram desenvolvidos, trazidos para ensaios clínicos e usados na prática clínica (CUSHMAN; ONDETTI, 1991; IGIC, 2018).

Uma vez que os inibidores da ECA impedem a degradação da bradicinina, eles são capazes de promover um aumento dos níveis desse peptídeo, que serve como modular enzimático e substrato para a enzima cininase I formar os agonistas do receptor B₁, as des-Arg-cininas (ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010; ZHANG, X.; TAN, F.; SKIDGEL, 2013b). Inibidores da ECA também aumentam a sinalização dos receptores B₁ e B₂, porém de maneiras diferentes (ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010).

O receptor B₁ de cininas é diretamente ativado pelos inibidores da ECA mesmo na ausência da expressão da ECA. Inibidores da ECA como enalapril, quinalapril, ramipril e captopril, mas não lisinopril, são agonistas alostéricos diretos do receptor B₁ em uma sequência de ligação ao zinco na segunda alça extracelular que difere do sítio de ligação dos ligantes peptídicos, as des-Arg-cininas (ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010; IGNJATOVIC et al., 2002). Na ECA, a sequência canônica (HEXXH) contendo resíduos de ligação ao zinco nos sítios ativos do domínio N e C, é importante para a ligação do inibidor (CORVOL;

EYRIES; SOUBRIER, 2004). A segunda volta extracelular do receptor B₁ de cininas humano tem a mesma sequência consenso (HEAWH) requerida para os inibidores da ECA (mas não ligantes peptídicos) para ativar o receptor B₁ (IGNJATOVIC et al., 2002).

Os inibidores da ECA, podem ainda, atuar como potencializadores alostéricos indiretos da atividade das cininas no receptor B₂ através de interações com o domínio C da ECA. Os inibidores da ECA se ligam a enzima, causam uma alteração conformacional nesta que é então transmitida para o receptor B₂ de cininas via heterodimerização da ECA com o receptor na superfície celular, onde ambos estão co-localizados (CHEN et al., 2006; ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010). A formação do heterodímero ECA/receptor B₂ na membrana é dependente de concentração. Quanto mais enzima, os inibidores da ECA aumentam mais efetivamente a ativação do receptor B₂ pelas cininas, ao passo que se as células expressam muito mais receptor B₂ o mesmo não ocorre (CHEN et al., 2006). Os inibidores da ECA também ressensibilizam receptores de cininas dessensibilizados e reduzem a sua internalização. Quando os inibidores da ECA potencializam a sinalização dos receptores B₁ e B₂ de cininas eles aumentam principalmente a produção de óxido nítrico, além de prostaglandinas e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010) (Figura 8).

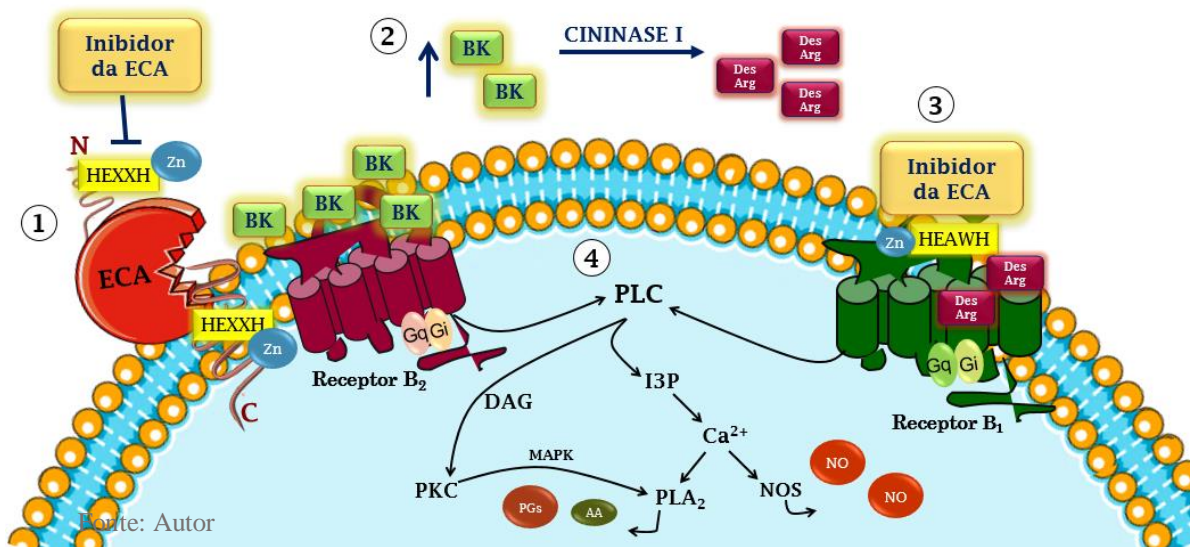


Figura 8: Potencialização da sinalização do receptor B₁ e B₂ de cininas pelos inibidores da ECA. 1) Inibidores da ECA são potencializadores alostéricos indiretos da atividade das cininas no receptor B₂ através de interações com a ECA (domínio C), uma vez que ambos estão co-localizados na membrana. 2) Inibidores da ECA impedem a degradação da bradicinina (BK) que é agonista do receptor B₂ e serve de substrato para a cininase I formar os agonistas do receptor B₁, as des-Arg-cininas (Des-arg). 3) Inibidores da ECA são agonistas alostéricos diretos do receptor B₁ em um local que difere do sítio de ligação dos agonistas, as des-Arg-cininas. Na ECA, a sequência HEXXH contendo resíduos de ligação ao zinco nos sítios ativos do domínio N e C é importante para a ligação do inibidor. A segunda volta extracelular do receptor B₁ de cininas tem a mesma sequência consenso (HEAWH) requerida para os inibidores da ECA ativar o receptor B₁. 4) A ativação dos receptores B₁ e B₂ de cininas, acoplados a proteína Gq e Gi, envolve a via da fosfolipase C (PLC), com consequente formação de inositol 3-

fosfato (I_3P) e diacilglicerol (DAG) que, são responsáveis respectivamente pela mobilização de cálcio (Ca^{2+}) intracelular e pela translocação da proteína quinase C (PKC). O Ca^{2+} medeia a ativação da óxido nítrico sintase (NOS), a produção de NO e a estimulação da fosfolipase A_2 (PLA_2) com consequente liberação de ácido araquidônico (AA) e produção de prostaglandinas (PG).

O uso de drogas inibidoras da ECA tem sido associado a um aumento do risco para o desenvolvimento de condições dolorosas crônicas e dor generalizada por impedir a degradação da bradicinina e da substância P (BORSSOK; SAVA 2009; de MOS et al., 2009). A bradicinina está envolvida em processos inflamatórios e dolorosos por meio da ativação do receptor B_2 de cininas, enquanto seus metabólitos ativos também induzem tais processos por agir no receptor B_1 de cininas (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; DUTRA, 2017). A substância P é um neuropeptídeo que, além de efeitos periféricos, também aumenta a excitabilidade dos neurônios no corno dorsal, contribuindo para o aumento da transmissão da dor da medula espinhal para as regiões cerebrais (BORSSOK; SAVA, 2009; CHOY, 2015; CLAUW, 2015).

Curiosamente, além da tosse, a dor envolvendo qualquer parte do corpo, incluindo o tórax, abdômen, membros, articulações, costas, ombro e cabeça, é considerada um efeito adverso dos medicamentos inibidores da ECA (WANG et al., 2005). Os inibidores da ECA podem induzir dor generalizada via mecanismos periféricos e centrais por facilitar a percepção dolorosa, uma vez que tornam os neurônios mais sensíveis à dor (BORSSOK; SAVA, 2009). Consistente com esses dados, o tratamento com inibidores da ECA em pacientes hipertensos normaliza a pressão arterial, mas aumenta a sensibilidade à dor (GUASTI et al., 2002; TURAN et al., 2013). Embora essas drogas não afetem o início da resposta neuro-inflamatória, eles facilitam sua progressão em direção a um ponto que se torna patológico, uma vez que podem potencializar uma resposta que tenha sido iniciada por um gatilho prévio (de MOS et al., 2009).

Dados pré-clínicos e clínicos demonstram que o uso de inibidores da ECA tem sido associado com um aumento do risco para desenvolvimento de dor da gota (CHOI, 2012; SILVA et al., 2016), aumento da sensibilidade para a dor de dente (GUASTI et al., 2002) e dor muscular (BOIX et al., 2005), além de aumento de risco para a síndrome de dor regional complexa (de MOS et al., 2009; BORSSOK; SAVA, 2009) e potencialização da hipersensibilidade dolorosa induzida por quimioterapia (BRUSCO et al., 2017a). Além disso, o potencial dos antagonistas dos receptores de cininas em prevenir o aumento da dor crônica induzido por inibidores da ECA tem sido previamente demonstrado (BRUSCO et al., 2017a).

As cininas exercem a maior parte dos seus efeitos biológicos através da ativação de dois tipos de receptores acoplados a proteína G, denominados de receptores B_1 e B_2 (LEEB-

LUNDBERG et al., 2005). Esses receptores apresentam sete domínios transmembrana, com uma porção N-terminal extracelular e outra porção C-terminal intracelular. A ativação destes receptores desencadeia a estimulação de diferentes sistemas de segundos mensageiros, conforme o tipo celular e a proteína G envolvida (MOREAU et al., 2005). Os sinais mediados pelo receptor B₂ são geralmente mais transitórios, enquanto que a estimulação de receptores B₁ causa respostas prolongadas (BLAUKAT et al., 2003).

Os receptores de cininas se acoplam a proteína Gq e Gi, para estimular aumentos de cálcio intracelular e a produção de fatores de relaxamento derivados do endotélio, incluindo o óxido nítrico, que por sua vez aumenta a permeabilidade vascular e a vasodilatação (LEEB-LUNDBERG et al., 2005). Na maioria das vezes a ativação desses receptores envolve a via da fosfolipase C, com consequente formação de inositol 3-fosfato e diacilglicerol, mobilização de cálcio intracelular e a ativação da proteína quinase C (LEEB-LUNDBERG et al., 2005; SHARMA; AL-SHERIF, 2006). Ao serem estimulados podem ainda ativar canais de potássio sensíveis ao cálcio, a adenilato ciclase, a fosfolipase A₂, a óxido nítrico sintase, o NFκB e várias proteínas quinases, além de promover a liberação de prostaglandinas, ácido araquidônico e interleucinas (BHOOLA; WORTHY; BLAUKAT, 2003; FERREIRA et al., 2008; LEEB-LUNDBERG et al., 2005; MARCEAU; REGOLI, 2004) (Figura 8).

O receptor B₂ é expresso de um modo constitutivo em vários tecidos mediando ações fisiológicas das cininas na nocicepção e na resposta inflamatória. Ele já foi identificado no sistema gastrointestinal, cardiovascular, respiratório, genitourinário, bem como no sistema nervoso periférico e central (MOREAU et al., 2005). Este receptor exibe uma elevada afinidade para a bradicinina e calidina (FERREIRA et al., 2002). Por outro lado, o receptor B₁ possui maior afinidade para os metabólitos ativos das cininas a des-Arg⁹-bradicinina e a lis-des-Arg⁹-bradicinina (des-Arg¹⁰-calidina) e é normalmente ausente ou sub-expresso em condições fisiológicas, porém pode ser regulado positivamente em condições inflamatórias e nociceptivas agudas ou persistentes (CALIXTO et al., 2004; EHRENFELD et al., 2011; LEEB-LUNDBERG et al., 2005, FERREIRA et al., 2008).

O receptor B₁ encontra-se no retículo endoplasmático, onde ocorre a formação de homo-oligômeros, que parece ser necessária para sua translocação e expressão funcional na membrana (SANDÉN; LEEB-LUNDBERG, 2013). Como mencionado anteriormente (Figura 7), sugere-se também outro mecanismo para sua regulação dependente da interação do receptor B₁ com a enzima carboxipeptidase M, regulando assim a sua sinalização via bradicinina e calidina, sem a necessidade de clivagem. Desta forma, a bradicinina ou calidina causariam alterações conformacionais na carboxipeptidase M levando à sinalização

intracelular via receptor B₁ (ZHANG et al. 2011). A expressão do gene do receptor B₁ pode ainda ser regulada por citocinas, via proteína MAP quinase e via fatores de transcrição, tais como o NFkB (MOREAU, et al., 2005). Há evidências que o receptor B₁ pode ser expresso de maneira constitutiva em neurônios de pequeno e médio diâmetro e em fibras C peptidérgicas e não peptidérgicas (MA et al., 2000, 2001), além de regiões não-neuronais como células do sistema imune (macrófagos, fibroblastos, neutrófilos) e em células endoteliais (EHRENFELD et al., 2006; SCHAEFFER et al., 2001).

Agindo sobre os receptores B₁ e B₂, as cininas medeiam processos fisiológicos e patológicos. Fisiologicamente, a ação sobre células endoteliais leva aos sintomas clássicos da inflamação, da resposta vascular e de dor à lesão tecidual (MARCEAU; REGOLI, 2004; LEEB-LUNDBERG et al., 2005). Patologicamente, a ativação dos receptores de cininas desencadeia nocicepção espontânea, alodínia e/ou hiperalgesia mecânica e térmica (BRUSCO et al., 2017a; COSTA et al., 2018; WERNER et al., 2007) em humanos e animais experimentais (CALIXTO et al., 2004). Evidências demonstram o envolvimento das cininas em condições dolorosas agudas (FERREIRA et al., 2008; SILVA, et al., 2016), e crônicas tais como na dor reumática (CASSIM et al., 2009) e em neuropatias (WERNER et al., 2007; BRUSCO et al., 2017a).

Os efeitos das cininas podem ser diretos ou associados com a estimulação de mediadores secundários incluindo prostanóides, taquicinas, citocinas, produtos derivados de mastócitos, além do óxido nítrico (CALIXTO et al., 2000; MARCEAU; BACHVAROV, 1998). Adicionalmente, os receptores B₁ e B₂ cininas são expressos em estruturas importantes para a modulação da dor no sistema nervoso periférico e central, como os nociceptores, nervo ciático, medula espinhal e córtex cerebral (BRUSCO et al., 2017a; CALIXTO et al., 2001; FERREIRA et al., 2005; GROGER et al., 2005; MA, 2001; MARCEAU; REGOLI, 2004; SILVA et al., 2016). Isso explica a capacidade das cininas em causar dor e ativar respostas reflexas pelo sistema nervoso autônomo (MARCEAU; REGOLI, 2004).

Portanto, antagonistas dos receptores das cininas, por interagir com os receptores B₁ e B₂, podem ser moléculas alvo para o tratamento de condições dolorosas agudas e persistentes. É importante notar que o antagonista do receptor B₂, Icatibant (Hoe 140), é clinicamente eficaz para o tratamento de angioedema hereditário sendo bem tolerado pelos pacientes sem provocar efeitos adversos graves (BAŞ, 2012; LUMRY et al., 2015). Assim, o potencial de antagonistas dos receptores de cininas como novos agentes analgésicos que não resultem em tolerância ou dependência, ou outros efeitos adversos tem atraído grande interesse para estudos clínicos (MARCEAU; REGOLI, 2004).

Já é conhecido que os receptores de cininas estão envolvidos em processos dolorosos crônicos e inibidores da ECA podem potencializar tais condições dolorosas. Portanto, os receptores de cininas poderiam estar envolvidos na dor associada à fibromialgia e desta forma, antagonistas desses receptores poderiam ser promissores no tratamento dessa doença. Além disso, o uso de inibidores da ECA poderia potencializar os sintomas dolorosos em pacientes com fibromialgia, e desta forma a terapia com esta classe de medicamentos deveria ser reavaliada em pacientes hipertensos e com fibromialgia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento dos receptores B₁ e B₂ para cininas e o efeito dos inibidores da ECA na dor associada à fibromialgia induzida por reserpina em camundongos.

3.2 OBJETIVO GERAL

> Avaliar o desenvolvimento de hipersensibilidade dolorosa associada à fibromialgia e realizar a dosagem dos níveis de monoaminas após a administração de reserpina.

> Investigar o envolvimento dos receptores B₁ e B₂ para cininas na hipersensibilidade dolorosa induzida por reserpina sobre parâmetros nociceptivos em camundongos nocautes para ambos os receptores e através de antagonismo farmacológico; além da avaliação da expressão das proteínas dos receptores e dosagem dos níveis de cininas.

> Investigar o efeito da inibição da ECA na hipersensibilidade dolorosa induzida por reserpina sobre parâmetros nociceptivos através da administração de inibidores da ECA, inibidor da cininase I e de antagonistas dos receptores B₁ e B₂ para cininas.

> Investigar o efeito da inibição da ECA na hipersensibilidade dolorosa induzida por reserpina através da avaliação da atividade da ECA e da cininase I, dosagem dos níveis de cininas após a administração de inibidores da ECA.

4 MANUSCRITO CIENTÍFICO

4.1 MANUSCRITO CIENTÍFICO I

Kinins and their B₁ and B₂ receptors are involved in the fibromyalgia-like pain symptoms in mice

Indiara Brusco¹, Allisson Benatti Justino², Cássia Regina Silva², Susana Fischer¹, Thiago Matar Cunha³, Rahisa Scussel⁴, Ricardo Andrez Machado-de-Ávila⁴, Juliano Ferreira⁵, Sara Marchesan Oliveira^{1*} ORCID: 03-2960-5284

¹Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

²Graduate Program in Genetics and Biochemistry, Biotechnology Institute, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

³Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

⁴Graduate Program in Health Sciences, University of Extrem South Catarinense, Criciúma, SC, Brazil

⁵Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

*Corresponding author: Sara Marchesan Oliveira

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Zip code: 97105-900

Santa Maria, RS, Brazil, Phone: +55 3220-8053, email: saramarchesan@hotmail.com; saramarchesan@ufsm.br.

Headings

- Reserpine induces fibromyalgia-like pain symptoms by the kinin B₁ and B₂ receptors
- Kinins and their receptors are involved in the fibromyalgia-like pain symptoms
- Kinin receptors might represent a target for relieving fibromyalgia-like pain symptoms

Abstract

Fibromyalgia is a disease characterized as generalized chronic primary pain that causes functional disability and reduction of patients' quality of life without specific pathophysiology or appropriate treatment. Evidence has demonstrated the contribution of kinins and their B₁ and B₂ receptors in chronic painful conditions. Thus, we investigate the involvement of the kinins and their B₁ and B₂ receptors in a fibromyalgia-like pain model reserpine-induced in mice. Nociceptive parameters (mechanical allodynia, cold sensitivity and spontaneous nociception) and behaviors of burrowing, thigmotaxis, and forced swimming were evaluated after reserpine administration in mice. The role of kinin B₁ and B₂ receptors was investigated using knockout mice or pharmacological antagonism. Kinin B₁ and B₂ receptors expression and the bradykinin and monoamines levels were measured in the sciatic nerve, spinal cord, and cerebral cortex of the animals. Knockout mice for the kinin B₁ and B₂ receptor reduced the reserpine-induced mechanical allodynia. The antagonism of B₁ and B₂ receptors also reduced the mechanical allodynia, the cold sensitivity, and the spontaneous nociception reserpine-induced. The reserpine altered thigmotaxis, forced swimming and burrowing behavior of the animals; with the last one being reversed by the kinin B₁ receptor antagonism. Moreover, reserpine increased the kinin B₁ and B₂ receptors expression and the kinin levels, as well as, reduced the monoamines levels in peripheral and central structures. Kinins and its B₁ and B₂ receptors are involved in the fibromyalgia-like pain symptoms. The B₁ or B₂ receptors might represent a potential target for the relief of fibromyalgia-like pain symptoms.

Keywords: Reserpine; Mechanical Allodynia; Cold Sensitivity; Spontaneous Nociception; Monoamines.

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; ARRIVE, Animal Research: Reporting *in vivo* Experiments; Bk, bradykinin; CONCEA, Brazilian Council of Animal Experimentation; DABk, des-Arg-bradykinin; DALBk, des-Arg-leu-bradykinin g, grams; h, hours; I_{max}, maximal inhibition; i.p., intraperitoneal; i.pl., intraplantar; KDa, kilodaltons; kg, kilograms; mg, milligrams, mL, milliliters; mmol, millimolar; min, minutes; µL, microliters; SEM, standard error of mean; UFSM, Federal University of Santa Maria; USP, University of São Paulo;

Introduction

Fibromyalgia is a chronic disease classified as chronic primary pain which affects 2-8% of the world population [1-4]. It is characterized mainly by widespread chronic pain accompanied by tenderness due to reduced pressure pain thresholds, which results in hyperalgesia and allodynia [5]. Comorbidities such as hypertension, fatigue, and depression also occur [5-7]. This painful condition results in the high use of medical resources, patient's increased disability, and severe reduction of patient's life quality since diagnosis and treatment are a challenge [3,6,7].

The pathophysiology of fibromyalgia remains incompletely understood [6], although studies indicate abnormalities as central sensitization [5], changes of number and function of small nerve fibers [6,8] and dysfunction of descending pain inhibitory pathways mediated by monoamines depletion [9]. Thus, animal models using reserpine have been employed to evaluate the underlying mechanisms to the fibromyalgia [8,10] since, in both animals and humans, the reserpine induces depression- and pain-related behaviors which are often found in patients with fibromyalgia [8,10,11]. In addition, the pain behaviors in this model are related to monoamine depletion [8,10], which mimics the main dysfunction of fibromyalgia patients [5,9], though female dominance is not observed in this model [8].

Kinins are endogenous algogenic peptides involved in painful and inflammatory processes via activation of B₁ and B₂ receptors. The B₂ receptor is activated by bradykinin or kallidin, while the B₁ receptor mediates the action of the kinin metabolites [12]. Activation of these receptors causes spontaneous nociceptive behavior, allodynia [13], and hyperalgesia [14] in both humans and experimental animals [15] in acute and chronic pain models [13,16,17].

Evidence shows the contribution of the bradykinin in the pathogenesis of chronic musculoskeletal pain [18], a characteristic of fibromyalgia [1]. Moreover, the bradykinin is involved in the peripheral sensitization, which can contribute to increased pain sensitivity in this disease [19]. The activation of kinin receptors may also contribute to descending facilitating modulation of pain, which is altered in fibromyalgia [20].

Despite advances, studies are needed to understand the mechanisms involved in fibromyalgia pain symptoms, the main clinical feature of the disease, to treat it adequately [1,6,7]. Thus, we assessed the involvement of the kinin B₁ and B₂ receptors on the pathophysiology of the fibromyalgia-like pain symptoms reserpine-induced in mice.

Methods

Materials

All reagents, when not mentioned, were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis MO, USA). Reserpine was dissolved in glacial acetic acid (0.1% in 0.9% NaCl). Pregabalin was acquired from Tocris Bioscience (São Paulo, Brazil) and dissolved in saline solution (0.9% NaCl). SSR240612 (a non-peptide antagonist of the B₁ receptor) and FR173657 (a non-peptide antagonist of the B₂ receptor) were obtained from Sanofi-Aventis (Germany). Stock solutions of the agonists and antagonists including bradykinin (Bk; B₂ receptor agonist), Icatibant (peptide B₂ receptor antagonist), des-Arg⁹-bradykinin (DABk; B₁ receptor agonist), and des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradykinin (DALBk; peptide B₁ receptor antagonist) were prepared in phosphate-saline buffer (PBS) and diluted to the desired concentration just before use. The enzyme immunoassay kit for bradykinin was obtained from Peninsula Laboratories International, Inc. (San Carlos, USA). Specific anti-B₁ or anti-B₂ antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (California, USA). The doses of the drugs used in this study were based on previous studies [10,13,21].

Animals

Experiments were conducted using adult male Swiss mice (25-30 g), wild-type C57BL/6 mice and kinin B₁ and B₂ receptor knockout mice (B₁^{-/-}, B₂^{-/-}, USP; 20-30 g). Animals were maintained in a temperature-controlled room (22±1°C) under a 12 h light/12 h dark cycle with free access to food and water. All protocols were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria and University of São Paulo (processes 2770030516/2016/UFSM and 208/2014/USP) and were performed following ethical guidelines established for investigations of experimental pain in conscious animals [22]. The experimental protocol also followed the national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy). Behavioral studies followed the Animal Research: Reporting *in vivo* Experiments (ARRIVE) guidelines [23,24]. The number of animals and the intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the treatments. Thus the group size used for each experiment was based on studies that used protocols similar to those proposed here [13,17]. The animals were allocated according to the baseline

thresholds before and after the reserpine administrations according to the experimental protocol.

Induction of fibromyalgia-like pain model

The fibromyalgia-like pain model that mimics fibromyalgia-like pain symptoms was induced according to Nagakura et al. (2009) [10] adapted for mice [25-27]. Animals received a subcutaneous (s.c.) administration of reserpine (1 mg/kg, s.c.) once daily for three consecutive days (day 1, 2 and 3). Control groups received only subcutaneous administrations of the vehicle (10 mL/kg, s.c.; 0.1% acetic acid in saline solution). Animals were subjected to the experimental protocols on the first day after the last injection of reserpine or vehicle.

Behavioral tests

Mechanical allodynia

Mechanical allodynia was evaluated with von Frey filaments of increasing stiffness (0.02-10 g) using the Up-and-Down method [13,28,29]. The mechanical paw withdrawal threshold (PWT) was calculated according to Dixon (1980) [30] and expressed in grams (g). The mechanical allodynia was considered as a decrease in the PWT when compared with the baseline values before reserpine administration.

Reserpine-induced mechanical allodynia

The animals received vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (0.1, 0.3, 1 mg/kg, s.c.) once daily for three consecutive days. The mechanical PWT was measured before (baseline values; B) and at 1, 3, 7, 11, 14 and 18 days after the last vehicle or reserpine administration [10]. The mechanical allodynia was also evaluated in wild-type (WT) C57BL/6 mice and knockout mice for the kinin B₁ or B₂ receptor (B₁^{-/-}, B₂^{-/-}). Experimental design is represented in the Fig.1.

Effect of kinin B₁ or B₂ receptor antagonists on reserpine-induced mechanical allodynia

The mechanical PWT was evaluated on the first day after the last reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. Animals presenting mechanical allodynia received intraperitoneally (i.p.)

vehicle (10 mL/kg) or peptide B₁ (DALBk; 150 nmol/kg) or B₂ (Icatibant; 100 nmol/kg) receptor antagonists, and the mechanical threshold was evaluated from 0.5 up to 4 h after treatments. The mechanical threshold was also evaluated after treatments (from 0.5-24 h) with non-peptide B₁ (SSR240612; 150 nmol/kg) or B₂ (FR173657; 100 nmol/kg) receptor antagonists. Pregabalin (30 mg/kg, i.p.) was used as a positive control [13]. Experimental design is represented in Fig. 2a.

Cold sensitivity

Cold sensitivity was assessed by the acetone drop method [31]. A drop (20 µL) of acetone was applied three times in each right hind paw and cumulative scores were then generated following a 4-point scale: 0=no response; 1=quick withdrawal, flick or stamp of the paw; 2=prolonged withdrawal or repeated flicking, and 3=repeated flicking of the paw with licking directed at the ventral side of the paw.

Effect of kinin B₁ or B₂ receptor antagonists on reserpine-induced cold sensitivity

Cold sensitivity was evaluated on the first day after the last vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. Animals presenting cold sensitivity were treated with vehicle (10 mL/kg, i.p.), peptide B₁ (DALBk; 150 nmol/kg, i.p.) or B₂ (Icatibant; 100 nmol/kg, i.p.) receptor antagonists or with non-peptide B₁ (SSR240612; 150 nmol/kg, i.p.) or B₂ (FR173657; 100 nmol/kg, i.p.) receptor antagonists. Pregabalin (30 mg/kg, i.p.) was used as a positive control. The cold sensitivity was evaluated at 1 h after treatments. Experimental design is represented in Fig. 2a.

Spontaneous nociception

Spontaneous nociceptive behavior was evaluated on the first day after the last vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. Animals were individually placed in chambers (transparent glass cylinders of 20 cm diameter) and adapted for 20 min. After, these animals received intraplantar (i.pl.) injections of the vehicle (20 µL/paw, i.pl.) or B₁ (DABk; 1 nmol/paw, i.pl.) or B₂ (Bk; 1 nmol/paw; i.pl.) receptor agonists (both at submaximal doses). The spontaneous nociceptive behavior was considered as the amount of time (in seconds) licking the injected paw for 10 min [13]. Experimental design is represented in Fig. 2b.

Effect of kinin B₁ or B₂ receptor antagonists on the spontaneous nociception induced by B₁ or B₂ receptor agonists in reserpine-treated animals

One day after the last reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration the animals received DALBk (150 nmol/kg, i.p.) or Icatibant (100 nmol/kg, i.p.) antagonist's administration; after thirty minutes the animals received intraplantar injections of B₁ (DABk; 1 nmol/paw, i.pl.) or B₂ (Bk; 1 nmol/paw, i.pl.) receptor agonists and the spontaneous nociceptive behavior was evaluated for 10 min [13]. Experimental design is represented in Fig. 2b.

Burrowing behavior

Burrowing is a natural rodent behavior for shelter and food storage, which has been used to assess the impact of pain in animal models since in painful and depressive conditions there is a reduction of this behavior [32,33]. Three hours before the dark cycle, animals were placed individually in the cages with a tube (burrow; 200 mm long x 68 mm diameter x 30 mm from the ground with one end open raised, and a closed lower) containing 200 g of feed pellet. Animals were trained in the apparatus before reserpine administrations. One day after the last reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration the animals were treated with vehicle (10 mL/kg, i.p.), peptide B₁ or B₂ receptors antagonists, DALBk (150 nmol/kg, i.p.) or Icatibant (100 nmol/kg, i.p.), respectively. Pregabalin (30 mg/kg, i.p.) was used as a positive control. A control group received only subcutaneous administration of vehicle (10 mL/kg, s.c.) and did not receive treatment. The amount of material displaced from the burrow after 2 h was measured and considered as a burrowing behavior [32]. Experimental design is represented in Fig. 2a.

Thigmotaxis behavior

Thigmotaxis is also a natural rodent behavior, as a protector effect to predator avoids, where the animal prefers the periphery of an open arena. It is also associated with a protective measure in painful conditions [34]. One day after the last vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration the animals were introduced into an apparatus consisting of a box (40x32x19cm) with a central quadrant (11x11). The number of entries and time spent in the central quadrant was then evaluated for 15 min and considered as thigmotaxis behavior [34]. The effect of the peptide B₁ or B₂ receptors antagonists, DALBk (150 nmol/kg, i.p.) or

Icatibant (100 nmol/kg, i.p.), respectively also was evaluated in the thigmotaxis behavior one day after the last reserpine administration. Pregabalin (30 mg/kg, i.p.) was used as a positive control. Spontaneous activity of the animals was recorded for 15 min with a camera (CTO66836, Chin) and the results were obtained by automated analysis (ANY-maze™ software) and further exported as raw data for the statistical analysis. The track plot for each traveled trace was directly exported from ANY-maze™ software after recording. Experimental design is represented in Fig. 2a.

Forced swimming test

The forced swimming test is commonly used to investigate the antidepressant-like activity of compounds. This test was carried out in a cylinder (10 cm diameter, 45 cm height) containing water maintained at $24\pm 1^\circ\text{C}$ to the height of 30 cm [35]. One day after the last vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration, animals were individually placed into the water and the time during which they remained immobile was quantified in seconds during a period of 6 min. Immobility was defined as the absence of all movements except motions required for keeping the head above the water. An increased immobility time suggest depressive-like behavior, thus the results were expressed as the immobility time in seconds (s). Experimental design is represented in Fig. 3.

Evaluation of possible adverse effects of reserpine

Possible adverse effects caused by reserpine (1 mg/kg, s.c.), including motor incoordination, catalepsy, change in body weight and temperature were measured at one day after its last administration (the same day that we performed all the experimental procedures). The locomotor activity of the animals was recorded for 15 min in the thigmotaxis apparatus where the results of mean speed and distance traveled were obtained by automated analysis (ANY-maze™ software) and further exported as raw data for the statistical analysis [34]. The catalepsy was evaluated in the bar test, the front paws of the mice were placed on a horizontal bar suspended 4.5 cm above the ground inside an enclosed box, and the time taken for the mice to remove both front paws from the bar was recorded [36]. The animals' rectal temperature was determined with a digital thermometer and the results expressed as the difference in the temperature ($^\circ\text{C}$) after treatments, from the baseline measurement [29]. Physical (body weight and hair appearance) and behavioral (irritability, salivation, and

tremors) changes were also measured after reserpine administration [37]. Experimental design is represented in Fig. 3.

Kinin B₁ and B₂ receptor expression

To evaluate a possible involvement of the kinin B₁ and B₂ receptors in the pathophysiology of fibromyalgia, the protein expression of the receptors was assessed by western blotting in samples of spinal cord and cerebral cortex at one day after the last vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration [13,17]. Samples were collected and homogenized in a lysis buffer containing a mixture of proteinase inhibitors and phosphatase inhibitors (Sigma). The protein concentrations of the lysate were determined using a BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL), and 30 µg of protein was loaded for each lane. Protein samples were separated on SDS-PAGE 12% gel and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). The membranes were blocked with 5% dry milk and incubated overnight at 4°C with anti-B₁ (1:1000) and anti-B₂ (1:1000) polyclonal primary antibodies, and for 1 h at room temperature with anti-rabbit secondary antibody (1:3000). B-actin (1:5000) was used as loading control. The blots were visualized in ECL solution (Amersham Biosciences) for 2 min and exposed onto hyperfilms (Amersham Biosciences) for 1-10 min and results were normalized to control group densitometry values and expressed as the relative amount of B₁ and B₂ receptors expression. Each animal represents a single band and each membrane was incubated with B₁, B₂ and actin antibodies in sequence, without stripping the membrane, so that actin will be the same for B₁ and B₂ receptors in the membrane of each structure (spinal cord or cerebral cortex). Experimental design is represented in Fig.3.

Kinin levels

Kinin levels were measured by a high-sensitivity enzyme immunoassay kit for bradykinin in samples of the sciatic nerve, spinal cord and cerebral cortex of animals at one day after the last vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration [13]. Results were expressed as bradykinin-related peptides levels (ng/mL). Experimental design is represented in Fig. 3.

Biogenic amine content

Dopamine and serotonin levels in the spinal cord and cerebral cortex were measured one day after the last vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. Animals were euthanized, samples collected and homogenized in perchloric acid 0.2 M. Homogenate was centrifuged (12.000 x g, 10 min, 4°C), the resulting supernatant left on ice for 5 min and then analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorimetric detection (320 nm with excitation at 279 nm. HPLC was evaluated with a LC-20AT pump coupled to a SIL-20AHT autosampler, and an RF-20A fluorescence detector, and LC Solution Shimadzu software (Kyoto, Japan). The amine content was quantified by comparing sample peak areas with those of respective standards. The results were expressed as monoamines levels (in ng) by μL of the sample [38]. Experimental design is represented in Fig. 3.

Data and statistical analyses

Results were expressed as the mean and standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software. The significance of differences between groups was evaluated with a Student's *t*-test, one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post hoc test. To meet parametric assumptions, data of mechanical threshold and cold sensitivity scores were log transformed before analyses. P values lower than 0.05 ($P < 0.05$) were considered significant.

Results

Reserpine induces mechanical allodynia

Reserpine decreased mechanical PWT in response to von Frey filaments, featuring mechanical allodynia, which was observed at 0.1 mg/kg (only on the first day), 0.3 mg/kg (from 1 to 7 days) and 1 mg/kg (from 1 to 14 days) after the last reserpine administration. Reserpine (1 mg/kg) promoted a maximum reduction of $81 \pm 2\%$ of the mechanical threshold at 1 day after its last administration (Fig. 4).

Reserpine does not cause adverse effects in mice

Considering that the maximum threshold reduction occurred at the dose of 1 mg/kg (s.c.), we evaluated in *Swiss* mice possible adverse effects caused by reserpine, which have been observed in other strains of mice. Here, reserpine did change neither the mean speed and

distance traveled in the thigmotaxis apparatus, nor caused cataleptic behavior in the mice, ruling out the occurrence of locomotor alterations in animals caused by repeated administration of reserpine. Moreover, reserpine did not change the body temperature and weight of the animals in our experiments (Fig.5), as well as, it did not change hair appearance nor caused irritability, salivation or tremors after its administration (data not showed). Based on these results (Fig. 4 and Fig. 5), the subsequent experiments were all performed with the reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration since on that dose was observed the maximum threshold reduction, without adverse effects that could compromise behavioral testing.

Kinin B₁ and B₂ receptors deletion reduces reserpine-induced mechanical allodynia

Wild-type C57BL/6 mice developed mechanical allodynia from 1 to 11 days after the last reserpine administration with a maximum threshold reduction of $63\pm 2\%$ on the first day (Fig. 6). Knockout mice for kinin B₁ (B₁^{-/-}) or B₂ (B₂^{-/-}) receptor presented reduced mechanical allodynia from 1 to 11 days or from 1 to 3 days after the last reserpine administration, respectively. Maximal inhibitions (I_{max}) of the mechanical allodynia were $94\pm 6\%$ and $88\pm 7\%$ at 1 day or 3 days after reserpine administration in B₁^{-/-} and B₂^{-/-} mice, respectively (Fig.6a,b). Based on these results (Fig. 4 and Fig. 6) the subsequent experiments were all performed on the first day after the last reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration since on that day was observed the maximum threshold reduction.

Reserpine increases the kinin B₁ and B₂ receptor expression and bradykinin levels

Reserpine increased the kinin B₁ and B₂ receptor expression in the spinal cord and cerebral cortex (Fig.7). Reserpine also increased bradykinin-related peptide levels in the sciatic nerve ($86\pm 0.34\%$) and cerebral cortex ($23\pm 0.07\%$) but not in the spinal cord (Fig.8).

Since deficiency of the kinin B₁ and B₂ receptors prevented reserpine-induced mechanical allodynia, as well as, reserpine increased the kinin B₁ and B₂ receptors expression and bradykinin-related peptide levels in wild-type animals, we evaluate the effect of the antagonists of these receptors on the mechanical and thermal and chemical stimulus in this model.

Kinin B₁ or B₂ receptors antagonists inhibit the reserpine-induced mechanical allodynia

B₁ (DALBk) and B₂ (Icatibant) receptor peptide antagonist decreased the mechanical allodynia induced by reserpine from 0.5 up to 2 h ($I_{\max}=46\pm7\%$ at 1 h) or from 0.5 up to 1 h ($I_{\max}=51\pm8\%$ at 1 h) after their administrations, respectively (Fig. 9a,b). Likewise, B₁ (SSR240612) and B₂ (FR173657) receptor non-peptide antagonists also decreased the mechanical allodynia from 0.5 up to 6 h (I_{\max} of $87\pm13\%$ at 1 h) and from 1 up to 2 h (I_{\max} of $56\pm16\%$ at 1 h) after their administrations, respectively (Fig. 9c,d). Pregabalin (positive control) presented effect from 0.5 up to 6 h ($I_{\max}=93\pm10\%$ at 2 h) after treatments (Fig. 9e).

Kinin B₁ or B₂ receptor antagonists inhibit the reserpine-induced cold sensitivity

Firstly, we showed that reserpine induced cold sensitivity in mice (Fig.10a,b). B₁ (DALBk.) or B₂ (Icatibant) receptor peptide antagonists decreased reserpine-induced cold sensitivity at 1 h after its administration with I_{\max} of $57\pm20\%$ and $50\pm18\%$, respectively (Fig. 10a). Likewise, B₁ (SSR240612) or B₂ (FR173657) receptor non-peptide antagonists also decreased the cold sensitivity with I_{\max} of $81\pm10\%$ and $86\pm18\%$ at 1 h after treatments, respectively (Fig. 10b). Pregabalin (positive control) caused an I_{\max} of $81\pm9\%$ at 1 h after administration (Fig. 10a,b).

Kinin B₁ or B₂ receptor antagonists decreased the spontaneous nociceptive behavior induced by agonists these receptors in reserpine-treated animals

The intraplantar injection of low doses of DABk (B₁ agonist) or Bk (B₂ agonist) caused spontaneous nociception in animals previously treated with reserpine, but not vehicle (Fig. 11a,b) which was prevented by the B₁ antagonist (DALBk; $I_{\max}=59\pm9\%$) or by the B₂ antagonist (Icatibant; $I_{\max}=64\pm8\%$), respectively (Fig. 11c,d).

Effect of B₁ or B₂ receptor antagonists on the decrease reserpine-induced burrowing behavior

Reserpine decreased the burrowing behavior of the mice. The B₁ antagonist (DALBk) reversed this reduction at 2 h after its administration with I_{\max} of $68\pm16\%$ (Fig.

12a). However, B₂ antagonist (Icatibant) and pregabalin did not reverse the decrease in the burrowing behavior reserpine-induced (Fig. 12).

Reserpine increases the thigmotaxis behavior

Reserpine increased the thigmotaxis behavior of the mice since it reduced the number of entries and the time spent in the central quadrant of the apparatus (Fig. 13). Pregabalin or B₁ and B₂ antagonists were not effective in reversing this behavior (data not shown).

Reserpine decreases the monoamines levels and increases the immobility time in the forced swimming test

Reserpine decreased the monoamines levels, such as dopamine and serotonin in the spinal cord and cerebral cortex of the mice (Fig. 14). Reserpine also increased the immobility time (218.7±24 seconds) of animals in the forced swimming test when compared to the vehicle group (167.9±14 seconds).

Discussion

Fibromyalgia is a potentially disabling disease since it causes chronic widespread pain associated with other debilitating symptoms, and did not have specific pathophysiology or appropriate diagnosis and treatment so far [1,5,7]. Here, reserpine caused behavioral and biochemical alterations related to fibromyalgia, as previously reported in human and experimental animals [10,11]. Moreover, kinin B₁ and B₂ receptor gene deletion and/or antagonism reduced the mechanical allodynia and cold sensitivity, and the spontaneous nociception reserpine-induced. Reserpine increased the expression of B₁ and B₂ receptors in the spinal cord and cerebral cortex and bradykinin levels in the sciatic nerve and cerebral cortex of animals. This indicates the involvement of the kinins and their B₁ and B₂ receptors in the fibromyalgia-like pain symptoms and suggests that B₁ and B₂ receptors antagonists have therapeutic potential for fibromyalgia-associated pain relief.

Although reserpine can cause some adverse effects, they weren't observed in Swiss mice. Here, it was showed that reserpine did not cause motor impairment evaluated by the mean speed and distance traveled in the thigmotaxis apparatus and catalepsy test, corroborating with Xu et al. (2013) [27]. Moreover, reserpine did not alter the body temperature and body weight of animals. The reserpine is used to induce fibromyalgia because this model presents face validity (painful and depressive alterations), construct

validity (monoamines depletion), and predictive validity (efficacy of clinically used drugs as pregabalin) [10]. Additionally, several studies use reserpine (1 mg/kg) to assess the pain/depression dyad in mice [25-27] which are among the main symptoms of patients with fibromyalgia [5,7].

Firstly, we showed that reserpine caused mechanical allodynia (pain in response to innocuous stimuli) in the animals, as previously reported [5,10]. Allodynia is one of the major characteristics of fibromyalgia, which is manifested clinically in the patients as pain in response to a light touch [5]. Here, kinin B₁ and B₂ receptor antagonists, as well as B₁ and B₂ receptor gene deletion reduced reserpine-induced mechanical allodynia. Indeed, the systemic administration of B₁ and B₂ receptor antagonists and the deficiency of both receptors have been found to reduce mechanical hypersensitivity in chronic pain animal models [13,16,39,40].

In addition to mechanical allodynia, patients with fibromyalgia report pain when in contact with cold temperature [41,42]. Reserpine induced cold sensitivity in the animals, as previously reported [43], which was reversed by kinin B₁ and B₂ receptor antagonists. Similarly, kinin receptors antagonists alleviated the cold sensitivity in another chronic pain model [44]. Mechanical or thermal painful stimuli are conducted to the central nervous system by nociceptive sensory neurons [45] where kinin B₁ and B₂ receptors are expressed, thus, it is possible to affirm the involvement of these receptors in pain modulation of mechanical and cold nociceptive stimuli [14,46,47].

The activation of both kinin receptors also triggers spontaneous nociception [13,44]. Spontaneous pain in the muscles or joints is also reported by patients with fibromyalgia [41]. Consistent with previous findings in chronic pain models [13,44] kinin B₁ or B₂ receptor agonists (bradykinin and DABk, at doses that normally do not cause nociception) induced nociceptive spontaneous behavior in animals treated with reserpine, which was prevented by antagonists of these receptors.

Spontaneous nociception can also be evaluated by the burrowing test, which reproduces the normal social behavior of animals and involves supraspinal mechanisms that contribute to sensory and affective pain phenotypes [48]. Its suppression reflects the pain impact on the reduction of well-being, which is compromised in patients with chronic pain [33,48,49]. Reserpine decreased the mice burrowing behavior similar to what occurs in chronic pain models [34,49], which was reversed by B₁ but not B₂ receptor antagonist. This result can be explained since the burrowing test also evaluates pain-associated depressive behaviors [32,33], which has been inhibited by B₁ but not B₂ receptor antagonist [50].

Moreover, pregabalin did not reverse this altered burrowing behavior. These results corroborate with clinical findings, which demonstrate that pregabalin has no effect on depressive symptoms in fibromyalgia [3,51].

Similar to burrowing behavior, thigmotaxis is a natural animal behavior that involves conflicting events as predator avoidance. The increase in this behavior is associated with a protective measure in chronic pain models [34]. In accordance, reserpine increased the thigmotaxis behavior which was not reversed by kinin receptor antagonists. These results are not unexpected since thigmotaxis also measures anxiety, a comorbidity of fibromyalgia [9,34], whose involvement of kinins is controversial [52,53].

The painful symptoms of fibromyalgia occur due to alterations in the central nervous system such as a dysfunction of descending pain modulation due to monoamines reduced levels [5,9]. Reserpine reduced the dopamine and serotonin levels in the spinal cord and cerebral cortex of animals, according to previous studies [10,35,54]. Importantly, reduced levels of these monoamines have also been demonstrated in the cerebrospinal fluid of patients with fibromyalgia [5,55].

In addition to central mechanisms, peripheral pathways contribute to the clinical and pre-clinical features of fibromyalgia [8,56]. These mechanisms include neurogenic inflammation, which also contributes to central sensitization, by the release of pro-inflammatory neuropeptides from sensorial neurons and inflammatory cells. Such cells can release several neuroactive and vasoactive substances, including bradykinin [56]. Reserpine increased the bradykinin levels in the sciatic nerve and also cerebral cortex, peripheral and central structures, respectively. However, we did not find increased kinin levels in the spinal cord. Since kinins are used as a substrate by the angiotensin I-converting enzyme and kininase I [57,58] the activity of these enzymes may influence the kinin levels in the spinal cord.

Bradykinin contributes to the pathogenesis of chronic musculoskeletal pain, which is the most prominent clinical feature of fibromyalgia [1,18]. Moreover, it is involved in peripheral sensitization, which can also increase pain sensitivity in fibromyalgia [19]. These results reinforce the involvement of kinins and its B₁ and B₂ receptors in fibromyalgia-like pain symptoms since bradykinin exerts its nociceptive effects by activating directly the kinin B₂ receptor, while its metabolites can activate the kinin B₁ receptor [12].

In fibromyalgia also occurs an increased excitability of spinal cord neurons and a greater neural activation in the cerebral cortex besides peripheral sensory neurons changes [5,6,8]. Importantly, the kinin B₁ and B₂ receptors are expressed in peripheral and central nervous systems and can be upregulated in inflammatory and painful conditions

[13,17,40,45,46]. In accord, we demonstrate that reserpine increased the kinin B₁ and B₂ receptor expression in the spinal cord and cerebral cortex of mice corroborating with other chronic pain models [14,16,40].

Besides pain, fibromyalgia patients also present depression, which may be associated with monoamines depletion in the central nervous system that occurs in both diseases [1,5,10]. Consistent with previous findings [10,35,54], reserpine increased the immobility time of mice in the forced swimming test, which measures a depressive-type behavior in animals similar to a depression condition in humans [35,54]. Thus, the reserpine-induced fibromyalgia animal model causes not only painful symptoms, but also a depression-associated behavior [10].

Although the pathophysiology of fibromyalgia has not yet been fully elucidated [1,7] the pregabalin is one of the main recommended therapies to treat it [3]. Similar to previous fibromyalgia models [10,35,54], pregabalin was effective in reducing reserpine-induced mechanical allodynia. Additionally, pregabalin also reduced the reserpine-induced cold sensitivity but did not alter the changes in the burrowing and thigmotaxis behavior. Our results corroborate with previous studies where pregabalin reduced cold sensitivity in chronic pain models [59]. However, patients with fibromyalgia report an average pain relief of only 50% after the pregabalin use [51]. Moreover, its chronic use causes adverse effects, including dizziness, somnolence, dry mouth, edema, blurred vision, weight gain and abnormal thinking [7,9].

In order to search therapies which do not focus at just treat the symptoms, but also the mechanisms involved in the development of fibromyalgia, it is important to elucidate the pathophysiological changes that occur in this painful condition. Thus, our results showed that kinins and its B₁ and B₂ receptors are involved in the fibromyalgia-like pain symptoms in a reserpine-induced animal model. These data extend the previous finding on the involvement of both kinin receptors in chronic painful conditions [13,16,44]. Importantly, clinical screening studies show that the Icatibant, a kinin B₂ receptor antagonist is effective in the treatment of hereditary angioedema, do not causes serious adverse effects and is well accepted by patients [60]. Therefore, kinin B₁ or B₂ receptor antagonists might represent a therapeutic potential for the fibromyalgia-like pain symptoms control, which is the most relevant clinical feature of the disease.

Acknowledgments

The authors acknowledge Professor Foued Salmen Espindola from the Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, for the assistance during this work.

Funding sources

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul-FAPERGS and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq [Grant #16/2551-0000281-9]; and by FAPERGS [Grant #17/2551-0001082-5] (Brazil); and by the CNPq [process #406098/2018-2]; and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES/PROEX [#23038.005848/2018-31]. SMO is recipient of fellowship from CNPq [process #307220/2017-6) and IB is recipient of fellowship from CAPES/PROEX [process #88882.182148/2018-01]. We thank CNPq and CAPES for their fellowship support.

Author contributions

Study concept and design: IB, SMO. Acquisition of data: IB, CRS, RS, SMO. Analysis and interpretation of data: IB, CRS, RS, SMO. Drafting of the manuscript: IB, CRS, RS, TMC, RAMA, JF, SMO. Study supervision: SMO.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical approval

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. Moreover, all procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted (Institutional Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria - processes 2770030516/2016 and by University of São Paulo - processes 208/2014).

References

- 1 Clauw DJ (2014) Fibromyalgia A Clinical Review. *JAMA* 311:1547-1555. doi: 10.1001/jama.2014.3266.
- 2 Treede RD (2015) A classification of chronic pain for ICD-11. *Pain* 156 :1003-1007. doi: 10.1097/j.pain.000000000000160.

- 3 Macfarlane GJ, Kronisch C, Dean LE, et al (2017) EULAR revised recommendations for the management of fibromyalgia. *Ann Rheum Dis* 76:318-328. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209724.
- 4 Treede RD, Rief W, Barke A, et al (2019) Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain* 160:19-27. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001384.
- 5 Choy EHS (2015) The role of sleep in pain and fibromyalgia. *Nat Rev Rheumatol* 11:513–520. doi: 10.1038/nrrheum.2015.56.
- 6 Doppler K, Rittner HL, Deckart M, et al (2015) Reduced dermal nerve fiber diameter in skin biopsies of patients with fibromyalgia. *Pain* 156: 2319-2325. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000285.
- 7 Arnold LM, Gebke KB, Choy EH (2016) Fibromyalgia: management strategies for primary care providers. *Int J Clin Pract* 70: 99-112. doi: 10.1111/ijcp.12757.
- 8 Taguchi T, Katanosaka K, Yasui M, et al (2015) Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. *Pain* 156: 415-427. doi: 10.1097/01.j.pain.0000460334.49525.5e.
- 9 Clauw DJ (2015) Fibromyalgia and Related Conditions. *Mayo Clin Proc* 90: 680-692. doi: 10.1016/j.mayocp.2015.03.014.
- 10 Nagakura Y, Oe T, Aoki T, et al (2009) Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia, *Pain* 146:26-33. doi: 10.1016/j.pain.2009.05.024.
- 11 Veselinović T, Schorn H, Vernaleken I, et al (2011) Effects of antipsychotic treatment on psychopathology and motor symptoms. A placebo-controlled study in healthy volunteers. *Psychopharmacology* 218:733–748. doi: 10.1007/s00213-011-2368-3.
- 12 Leeb-Lundberg LMF, Marceau F, Müller-Esterl W, et al (2005) International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57:27–77. doi: 10.1124/pr.57.1.2.
- 13 Brusco I, Silva CR, Trevisan G, et al (2017a) Potentiation of paclitaxel-induced pain syndrome in mice by angiotensin i converting enzyme inhibition and involvement of kinins. *Mol Neurobiol*. 54:7824-7837. doi: 10.1007/s12035-016-0275-7.
- 14 Ferreira J, Campos MM, Araujo R, et al (2002) The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. *Neuropharmacology* 43:1188-1197. doi:10.1016/S0028-3908(02)00311-8.

- 15 Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, et al (2004) Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* 143:803-818. doi:10.1038/sj.bjp.0706012.
- 16 Quintão NL, Passos GF, Medeiros R, et al (2008) Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. *J Neurosci* 28:2856-2863. doi:10.1523/JNEUROSCI.4389-07.2008.
- 17 Silva CR, Oliveira SM, Hoffmeister C, et al (2016) The role of kinin B1 receptor and the effect of angiotensin I-converting enzyme inhibition on acute gout attacks in rodents. *Ann Rheum Dis* 75:260-268. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205739.
- 18 Pinheiro AR, Paramos-de-Carvalho D, Certal M, et al (2013) Bradykinin-induced Ca²⁺ signaling in human subcutaneous fibroblasts involves ATP release via hemichannels leading to P2Y₁₂ receptors activation. *Cell Commun Signal* 11:70. doi:10.1186/1478-811X-11-70.
- 19 Staud R, Smitherman ML (2002) Peripheral and central sensitization in fibromyalgia: pathogenetic role. *Curr Pain Headache Rep* 6:259–266.
- 20 Ossipov MH, Dussor GO, Porreca, F (2010) Central modulation of pain. *J Clin Invest* 120:3779-3787, 2010. doi: 10.1172/JCI43766.
- 21 Sałat k, Cios A, Wyska E, et al (2014) Antiallodynic and antihyperalgesic activity of 3-[4-(3-trifluoromethyl-phenyl)-piperazin-1-yl]-dihydrofuran-2-one compared to pregabalin in chemotherapy-induced neuropathic pain in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 122:173–181. doi: 10.1016/j.pbb.2014.03.025.
- 22 Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110. doi:10.1016/0304-3959(83)90201-4.
- 23 Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, et al (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8: e1000412. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412.
- 24 McGrath JC, Lilley E (2015). Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. *Br J Pharmacol* 172: 3189–3193. doi: 10.1111/bph.12955.
- 25 Li S, Han J, Wang DS, et al (2016) Echinocystic acid reduces reserpine-induced pain/depression dyad in mice. *Metab Brain Dis* 31:455-463. doi: 10.1007/s11011-015-9786-6.
- 26 Liu SB, Zhao R, Li X, et al (2014) Attenuation of reserpine-induced pain/depression dyad by gentiopicroside through downregulation of GluN2B receptors in the amygdala of mice. *Neuromolecular Med* 16:350-359. doi: 10.1007/s12017-013-8280-8.

- 27 Xu Y, Zhang Lu, Shao T, et al (2013) Ferulic acid increases pain threshold and ameliorates depression-like behaviors in reserpine-treated mice: behavioral and neurobiological analyses. *Metab Brain Dis* 28:571-583. doi: 10.1007/s11011-013-9404-4.
- 28 Chaplan SR, Back FW, Pogrel JW, et al (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63.
- 29 Brusco I, Camponogara C, Carvalho FB, et al (2017b) α -Spinasterol: a COX inhibitor and a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist presents an antinociceptive effect in clinically relevant models of pain in mice. *Br J Pharmacol* 174: 4247-4262. doi: 10.1111/bph.13992.
- 30 Dixon WJ (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20:441-462. doi: 10.1146/annurev.pa.20.040180.002301.
- 31 Zheng H, Xiao WH, Bennett GJ (2012) Mitotoxicity and bortezomib-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Exp Neurol* 238:225-234. doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.08.023.
- 32 Deacon RMJ (2006) Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat Prot* 1:118-121. doi: 10.1038/nprot.2006.19.
- 33 Wodarski R, Delaney A, Ultenius C, et al (2016) Cross-centre replication of suppressed burrowing behaviour as an ethologically relevant pain outcome measure in the rat: a prospective multicentre study. *Pain* 157:2350-2365. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000657.
- 34 Huang W, Calvo M, Karu K, et al (2013) A clinically relevant rodent model of the HIV antiretroviral drug stavudine induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 154:560-575. doi: 10.1016/j.pain.2012.12.023.
- 35 De Souza AH, da Costa Lopes AM, Castro CJ Jr, et al (2014) The effects of Ph α 1 β , a spider toxin, calcium channel blocker, in a mouse fibromyalgia model. *Toxicon* 81:37-42. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.01.015.
- 36 Atwal N, Casey SL, Mitchell VA, et al (2019) THC and gabapentin interactions in a mouse neuropathic pain model. *Neuropharmacology* 144:115-121. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.10.006.
- 37 Camponogara C, Silva CR, Brusco I, et al (2019) *Nasturtium officinale* R. Br. effectively reduces the skin inflammation induced by croton oil via glucocorticoid receptor-dependent and NF- κ B pathways without causing toxicological effects in mice. *J Ethnopharmacol* 229:190- 204. doi: 10.1016/j.jep.2018.10.011.
- 38 De Benedetto GE, Fico D, Pennetta A, et al (2014) A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and

- serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *J Pharm Biomed Anal* 98: 266-270. doi: 10.1016/j.jpba.2014.05.039.
- 39 Yamaguchi-Sase S, Hayashi I, Okamoto H, et al (2003) Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve injury in rats. *Inflamm Res* 52:164-169. doi: 1023-3830/03/040164-06.
- 40 Ferreira J, Beirith A, Mori MAS, et al (2005) Reduced nerve injury induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. *Receptor* 25:2405-2412. doi:10.1523/JNEUROSCI.2466-04.2005.
- 41 Rehm SE, Koroschetz j, Gockel U, et al (2010) A cross-sectional survey of 3035 patients with fibromyalgia: subgroups of patients with typical comorbidities and sensory symptom profiles. *Rheumatology* 49:1146-1152. doi: 10.1093/rheumatology/keq066.
- 42 Potvin S, Marchand S (2016) Pain facilitation and pain inhibition during conditioned pain modulation in fibromyalgia and in healthy controls. *Pain* 157:1704-1710. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000573.
- 43 Nagakura Y, Takahashia M, Notob T, et al (2012) Different pathophysiology underlying animal models of fibromyalgia and neuropathic pain: Comparison of reserpine-induced myalgia and chronic constriction injury rats. *Behav Brain Res* 226:242-249. doi: 10.1016/j.bbr.2011.09.023.
- 44 Werner MFP, Kassuya CAL, Ferreira J et al (2007) Peripheral kinin B1 and B2 receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. *Neuropharmacology* 53:48-57. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.04.013.
- 45 Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, et al (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-284. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.
- 46 Ma QP (2001) The expression of bradykinin B (1) receptors on primary sensory neurones that give rise to small caliber sciatic nerve fibres in rats. *Neuroscience* 107:665-673.
- 47 Marceau F, Regoli D (2004) Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 3:845-852. doi: 10.1038/nrd1522.
- 48 Andrews N, Harper S, Issop Y, et al (2011) Novel, nonreflex tests detect analgesic action in rodents at clinically relevant concentrations. *Ann N Y Acad Sci* 1245:11e3. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06342.x.
- 49 Andrews N, Legg E, Lisak D, et al (2012) Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. *Eur J Pain* 16:485-495. doi: 10.1016/j.ejpain.2011.07.012.

- 50 Viana AF, Maciel IS, Dornelles FN, et al (2010) Kinin B1 receptors mediate depression like behavior response in stressed mice treated with systemic *E. coli* lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation* 7:98. doi: 10.1186/1742-2094-7-98.
- 51 Üçeyler N, Sommer C, Walitt B, et al (2013) Anticonvulsants for fibromyalgia. *Cochrane Database Syst Rev* 10:CD010782. doi: 10.1002/14651858.CD010782.
- 52 Bhattacharya SK, Mohan Rao PJR, Sen AP (1995) Anxiogenic activity of intraventricularly administered bradykinin in rats. *J Psychopharmacol* 9:348-354. doi: 10.1177/026988119500900410.
- 53 dos Anjos LC, Gomes FM, do Couto LL, et al (2016) Anxiolytic activity and evaluation of potentially adverse effects of a bradykinin-related peptide isolated from a social wasp venom. *Life Sci* 149:153-159. doi: 10.1016/j.lfs.2016.02.063.
- 54 Klein CP, Sperotto ND, Maciel IS, et al (2014) Effects of D-series resolvins on behavioral and neurochemical changes in a fibromyalgia-like model in mice. *Neuropharmacology* 86: 57e66. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.05.043.
- 55 Russell IJ, Vaeroy H, Javors M, et al (1992) Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35: 550-556.
- 56 Littlejohn G (2015) Neurogenic neuroinflammation in fibromyalgia and complex regional pain syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 11:639-648. doi: 10.1038/nrrheum.2015.100.
- 57 Erdös EG, Tan F, Skidgel RA (2010) Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension* 55:1-12. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.144600.Angiotensin.
- 58 Zhang X, Tan F, Brovkovich V et al (2013) Carboxypeptidase M augments kinin B1 receptor signaling by conformational crosstalk and enhances endothelial nitric oxide output. *Biol Chem* 394:335-345. doi:10.1515/hsz-2012-0290.
- 59 Gustafsson H, Sandin J (2009) Oral pregabalin reverses cold allodynia in two distinct models of peripheral neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 605: 103-108. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.01.014.
- 60 Baş M (2012) Clinical efficacy of icatibant in the treatment of acute hereditary angioedema during the FAST-3 trial. *Expert Rev Clin Immunol* 8:707-717. doi:10.1586/eci.12.67.

Figure and Captions

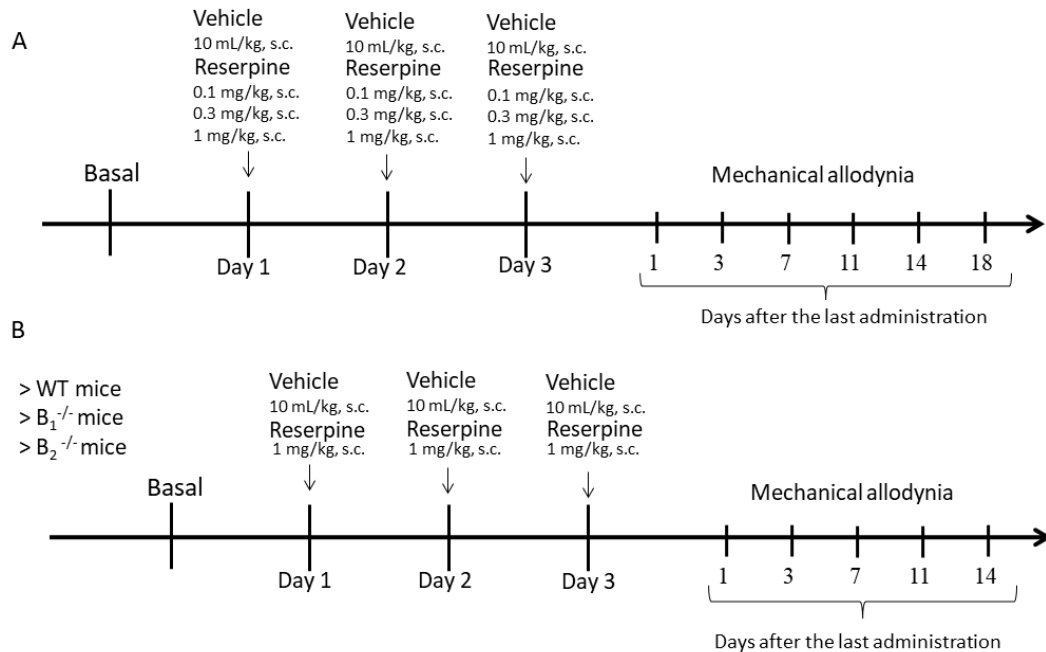


Fig 1 Experimental design for reserpine-induced mechanical allodynia. (A) Dose-response curve for reserpine (0.1, 0.3, 1 mg/kg, s.c.) administration. (B) Mechanical allodynia in wild-type (WT) mice and knockout mice for the kinin B₁ or B₂ receptor (B₁^{-/-}, B₂^{-/-}) after reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration

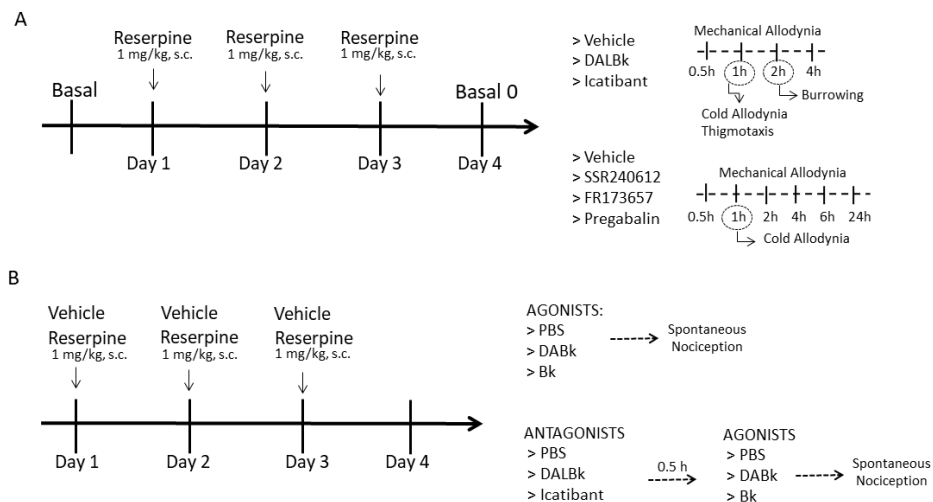


Fig 2 Experimental design for the agonists and antagonists treatment of kinin receptors after reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. (A) Mechanical allodynia was evaluated of 0.5-4 h after peptide antagonists (DALBk, Icatibant) treatment or of 0.5-24 h after non-peptide antagonists (SSR240612, FR173657) and pregabalin treatment. Cold allodynia was evaluated at 1 h after peptide and non-peptide antagonists' treatment. Thigmotaxis and burrowing behaviors were evaluated at 1 h and 2 h after peptide antagonist's treatment, respectively. (B) Spontaneous nociception after agonists (DABk, Bk) intraplantar administration, as well as, in

animals previously treated with antagonists (DALBk, Icatibant) and that 30 min after received agonists (DABk, Bk) intraplantar administration

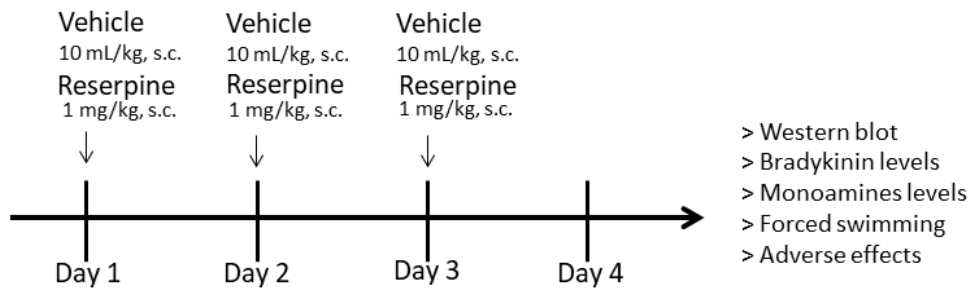


Fig 3 Experimental design for forced swimming, adverse effects, and western blot tests, as well as for bradykinin and monoamines levels evaluated 1 day after the last reserpine (1 mg/kg, s.c.) or vehicle (10 mL/kg, s.c.) administration

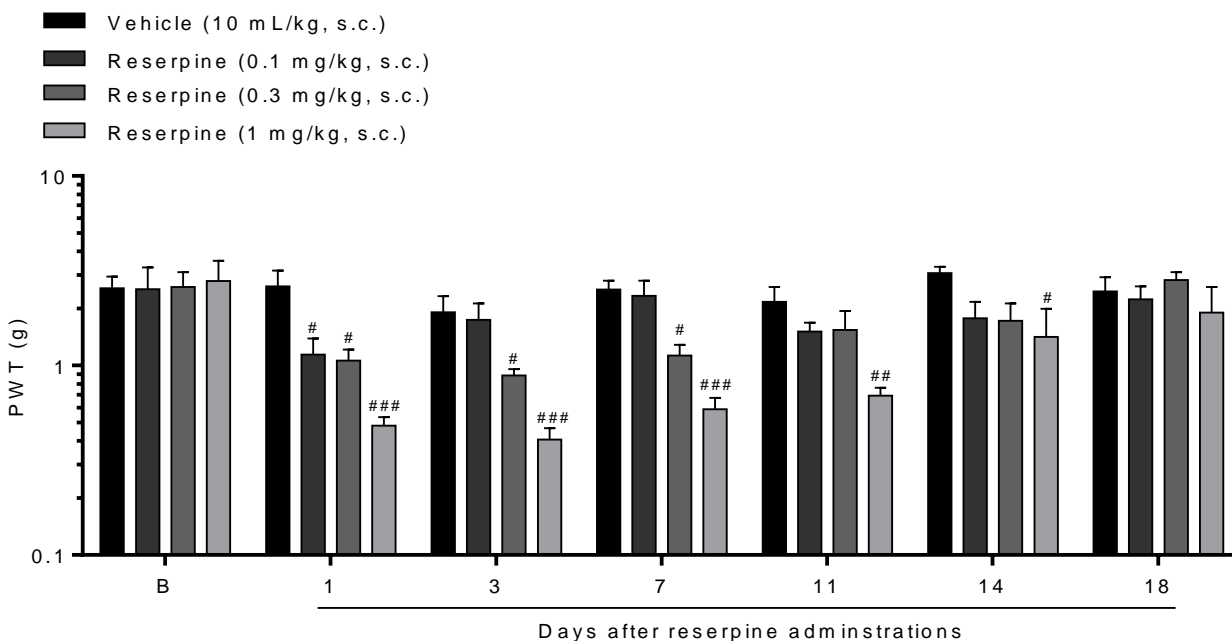


Fig 4 Time-response and dose-response curve to the vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg or 1 mg/kg, s.c.) on mechanical allodynia in mice. B denotes the baseline threshold before reserpine administrations. Data are expressed as the mean+SEM of 6 animals per group. #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 when compared to the vehicle group; two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test

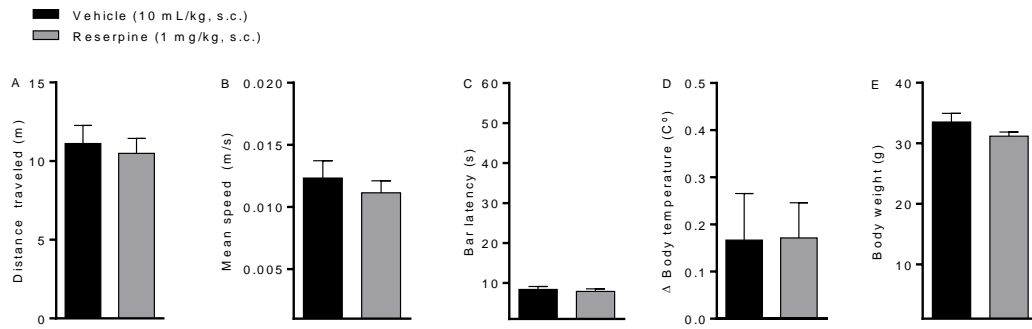


Fig 5 Possible adverse effects of the reserpine (1 mg/kg, s.c.) at one day after its last administration. (A) Distance traveled and (B) Mean speed in the thigmotaxis apparatus. (C) Latency to remove both front paws from the bar test. (D) Body temperature and (E) weight. Data are expressed as the mean+SEM of 6 animals per group. Significant differences were not found between groups (Student's t-test)

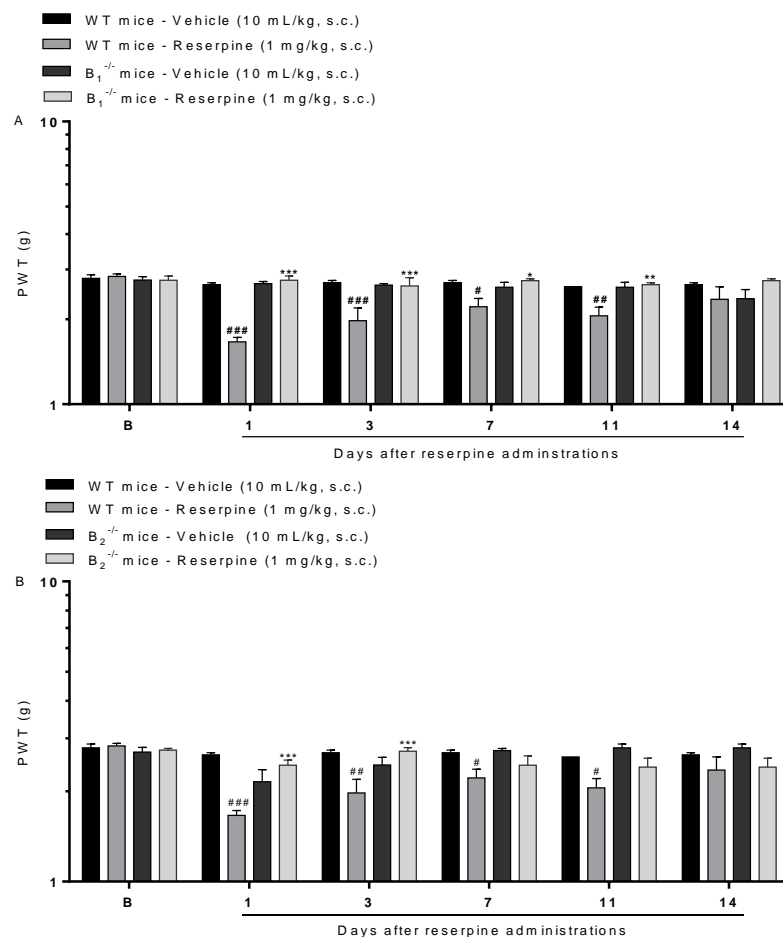


Fig 6 Time-response curves to the vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) on mechanical allodynia in wild-type (WT) and kinin receptors knockout mice. (A) B₁ receptor knockout mice (B₁^{-/-}) and (B) B₂ receptor knockout mice (B₂^{-/-}). B denotes the baseline threshold before reserpine administrations. Data are expressed as the mean+SEM of 5 animals per group. #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 when compared to the WT mice/vehicle group;

* $P < 0.05$, * $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared to the WT mice/reserpine group; two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test

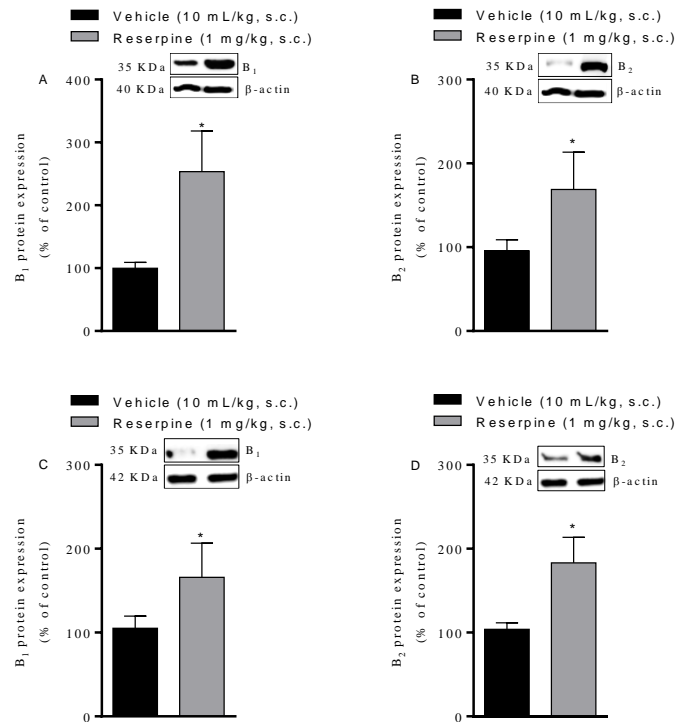


Fig 7 Effect of the vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) on the kinin B₁ and B₂ receptors expression in the spinal cord (A; B) and cerebral cortex (C; D) one day after its last administration. Data are expressed as the mean+SEM of animals 5-6 per group. * $P < 0.05$ when compared to the vehicle group second Student's t-test

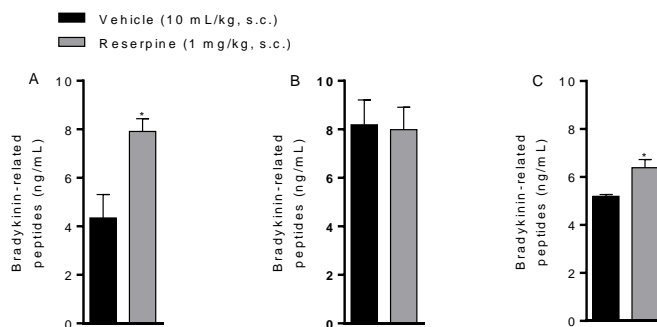


Fig 8 Effect of the vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) on the bradykinin-related peptide levels in the sciatic nerve (A), spinal cord (B) and cerebral cortex (C) one day after the last administration. Data are expressed as the mean+SEM of animals 5-6 per group. * $P < 0.05$ when compared to the vehicle group second Student's t-test

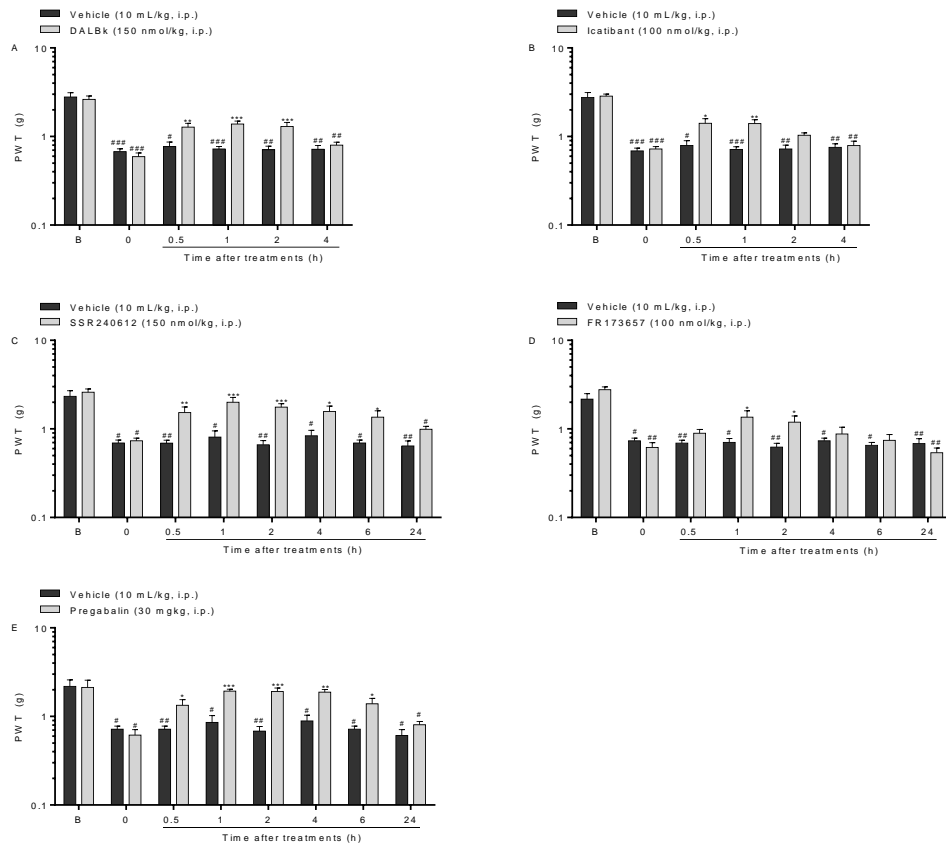


Fig 9 Effect of B₁ (DALBk) or B₂ (Icatibant) receptor peptide antagonists or B₁ (SSR240612) or B₂ (FR173657) receptor non-peptide antagonists or Pregabalin on reserpine-induced mechanical allodynia. Time-response curves caused by treatment with DALBk (150 nmol/kg, i.p.; A), Icatibant (100 nmol/kg, i.p.; B), SSR240612 (150 nmol/kg, i.p.; C), FR173657 (100 nmol/kg, i.p.; D) or Pregabalin (30 mg/kg, i.p.; E) in animals that received reserpine administrations (1 mg/kg, s.c.). B denotes the baseline threshold before reserpine administrations, while 0 day indicates basal mechanical threshold one day after the last reserpine administration and before treatment with antagonists or pregabalin. Data are expressed as the mean+SEM of 8 animals per group. #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 when compared to the basal mechanical threshold (B); one-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc Test. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 when compared to the vehicle group; two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test

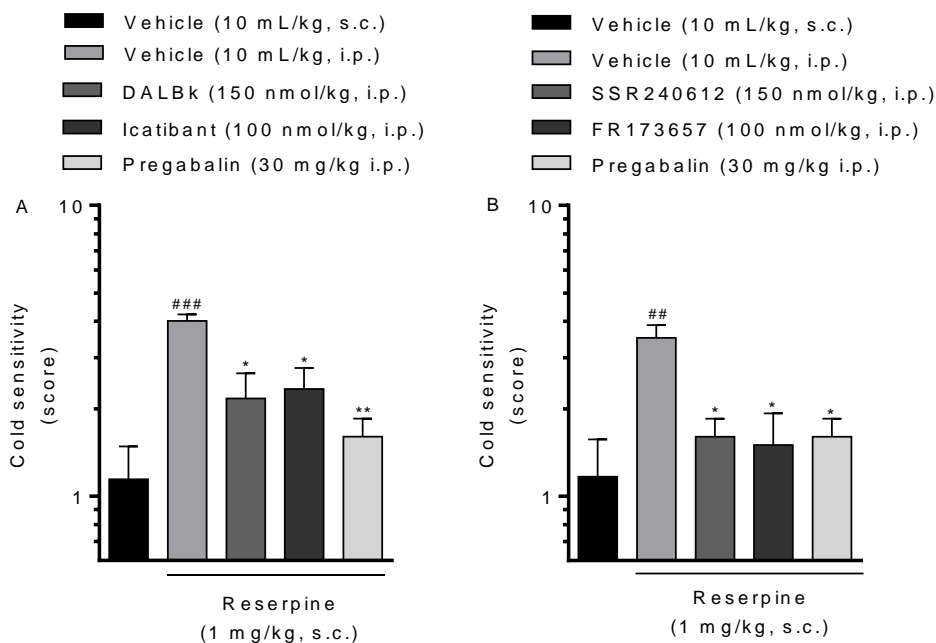


Fig 10 Effect of B₁ or B₂ receptor peptide or non-peptide antagonists and of the pregabalin on the reserpine-induced cold sensitivity. Treatment with vehicle (10 mL/kg, i.p.), B₁ (DALBk, 150 nmol/kg, i.p.) or B₂ (Icatibant, 100 nmol/kg, i.p.) receptor peptide antagonists (A) and treatment with B₁ (SSR240612, 150 nmol/kg, i.p.) or B₂ (FR173657, 100 nmol/kg, i.p.) receptor non-peptide antagonists (B) or pregabalin (30 mg/kg, i.p.) at one day after the last vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. Data are expressed as the mean+SEM of 6 animals per group. ##P<0.01, ###P<0.001 when compared to the vehicle (s.c.) group; *P<0.05, **P<0.01 when compared to the vehicle (i.p.) group; one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test

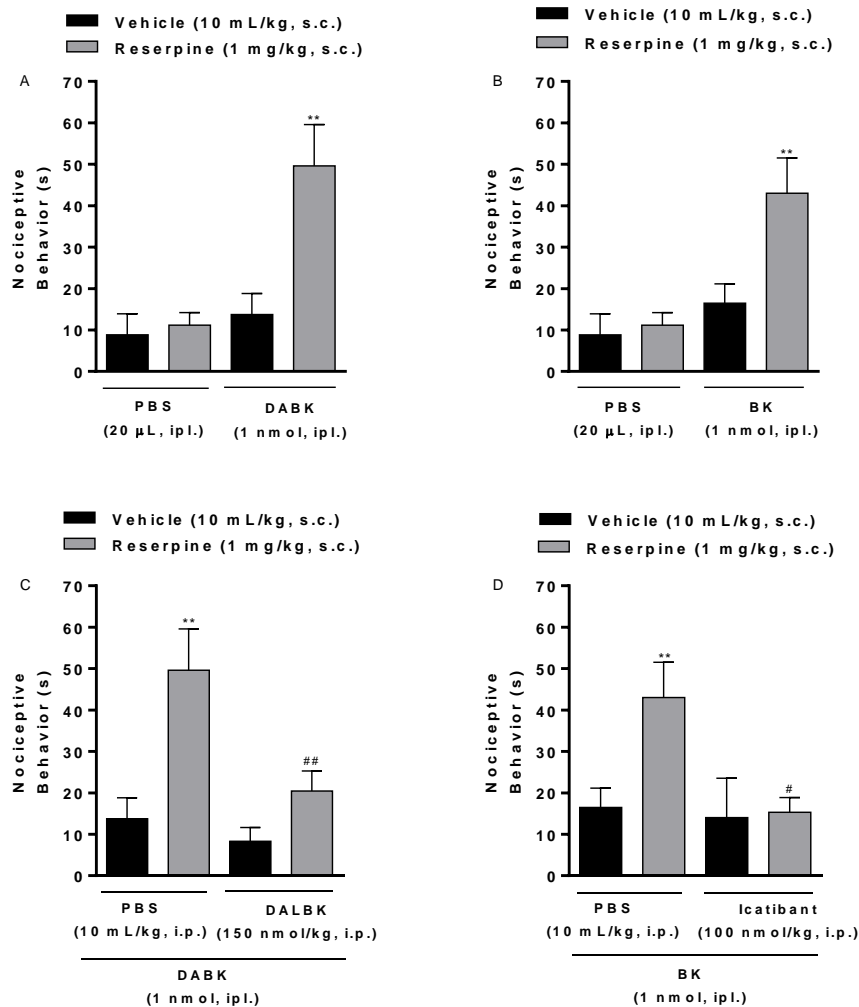


Fig 11 Effect of B₁ or B₂ receptor agonists and/or antagonists on spontaneous nociceptive behavior induced by reserpine. Nociceptive behavior induced by B₁ (DABk; 1 nmol/paw, i.pl.) (A) or B₂ (Bk; 1 nmol/paw, i.pl.) (B) receptor agonists in mice that received reserpine administrations (1 mg/kg, s.c.). Effect of B₁ (DALBk, 150 nmol/kg, i.p.; C) or B₂ (Icatibant, 100 nmol/kg, i.p.; D) receptor antagonists on nociceptive behavior induced by DABk (1 nmol/paw, i.pl.) or Bk (1 nmol/paw, i.pl.) in mice one day after the last reserpine administration. Data are expressed as the mean+SEM of 6 animals per group. **P<0.01 when compared with the vehicle group. #P<0.05, ##P,0.01 when compared to the DABk/PBS (C) or Bk/PBS (D) group; two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test

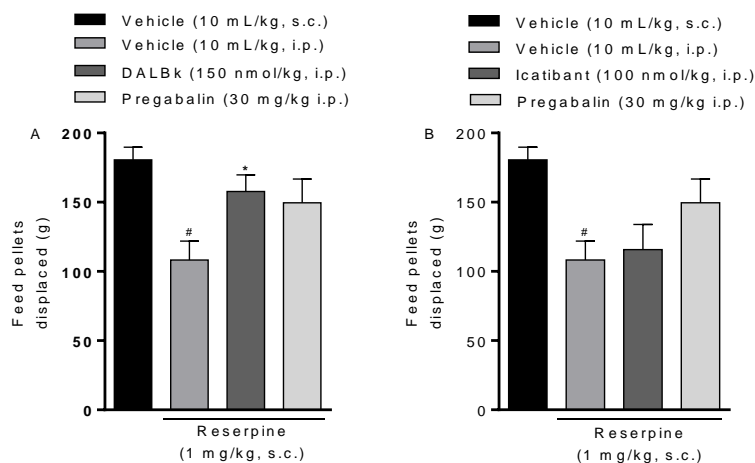


Fig 12 Effect of B₁ or B₂ receptor peptide antagonists and pregabalin on the decrease of the burrowing behavior induced by reserpine. Treatment with the vehicle (10 mL/kg, i.p.), B₁ (DALBk, 150 nmol/kg, i.p.) (A) or B₂ (Icatibant, 100 nmol/kg, i.p.) (B) receptor peptide antagonists or pregabalin (30 mg/kg, i.p.) one day after the last reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. Data are expressed as the mean+SEM of 8 animals per group. [#]P<0.05 when compared to the vehicle (s.c.) group; ^{*}P<0.05 when compared to the reserpine/vehicle group; one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test

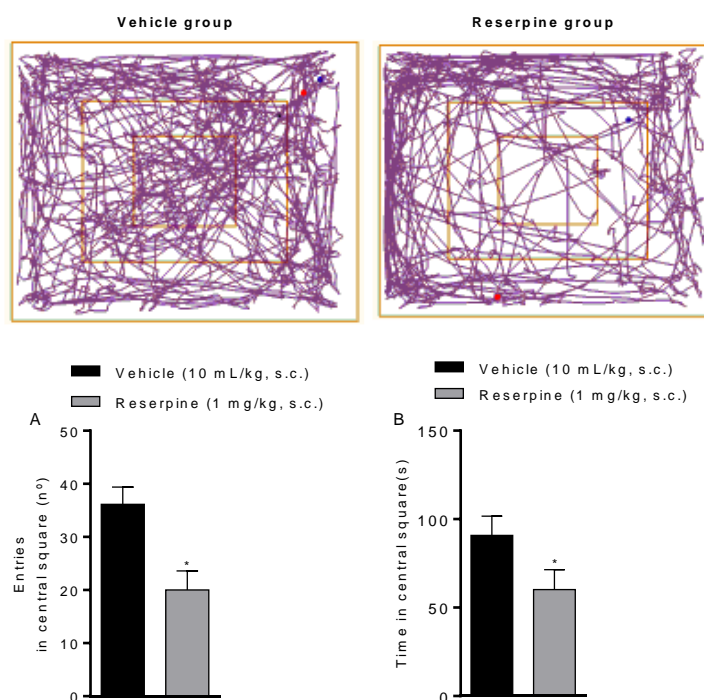


Fig 13 Effect of the vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) on the thigmotaxis behavior. The number of entries and (B) time spent in the central quadrant (C) on the thigmotaxis apparatus at one day after the last vehicle or reserpine administration. Data are expressed as the mean+SEM of 6 animals per group. ^{*}P<0.05 when compared to the vehicle group second Student's t-test

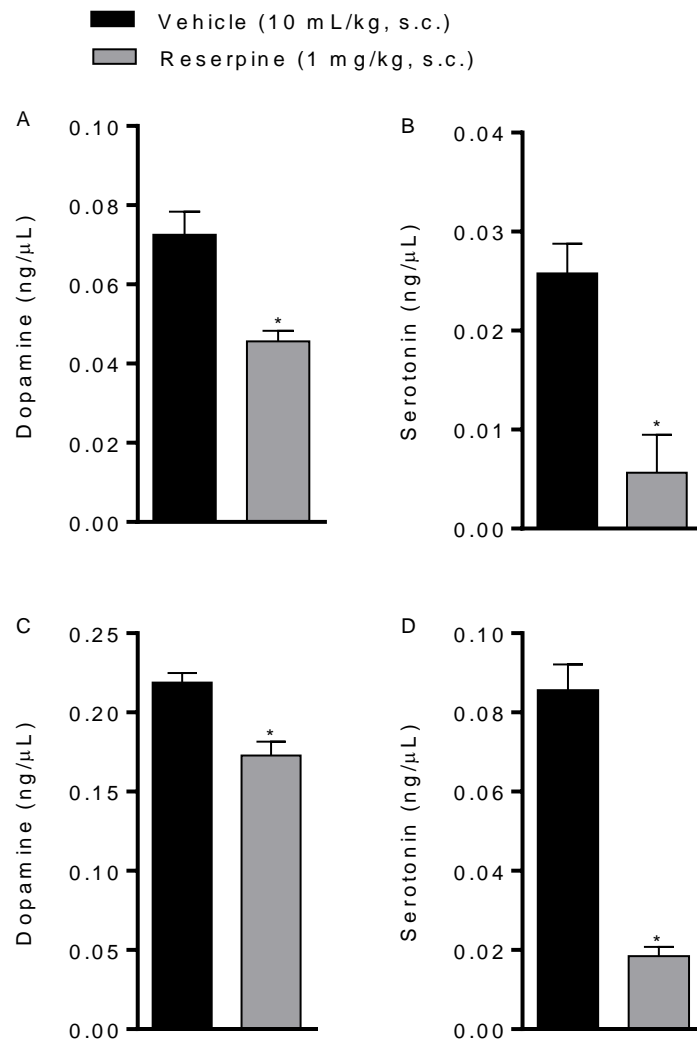


Fig 14 Effect of the vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) on the monoamines levels in the spinal cord (A, B) and cerebral cortex (C, D) one day after the last administration. Data are expressed as the mean+SEM of 6 animals per group. * $P < 0.05$ when compared to the vehicle group second Student's t-test

4.2 MANUSCRITO 2

Inhibitors of angiotensin I converting enzyme potentiate the fibromyalgia-like pain symptoms through the kinin receptors

Indiara Brusco¹, Allisson Benatti Justino², Cássia Regina Silva², Rahisa Scussel³, Ricardo Andrez Machado de Ávila⁴, Sara Marchesan Oliveira^{1*}

¹Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry Toxicology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

²Graduate Program in Genetics and Biochemistry, Biotechnology Institute, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, Brazil.

³Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Health Sciences Academic Unit, University of Extreme South Catarinense, Criciuma, SC, Brazil

⁴Health Sciences Academic Unit, University of Extreme South Catarinense, Criciuma, SC, Brazil

*Corresponding author: Sara Marchesan Oliveira

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Zip code: 97105-900; Santa Maria, RS, Brazil, Phone: +55 3220-8053, email: saramarchesan@hotmail.com; saramarchesan@ufsm.br.

Abstract

Fibromyalgia is a chronic disease potentially disabling, characterized by widespread pain and a range of comorbidities as hypertension. Among the mechanisms involved in fibromyalgia-like pain symptoms are kinins and their B₁ and B₂ receptors. Moreover, angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitors, antihypertensive drugs, can enhance the pain by blocking the neuropeptides degradation as substance P and bradykinin, besides enhancing kinin receptors signaling. We investigate the effect of ACE inhibitors on reserpine-induced fibromyalgia-like pain symptoms and the kinin involvement on this effect. Nociceptive parameters (mechanical and cold allodynia and spontaneous nociception) were evaluated after ACE inhibitors administration in mice previously treated with reserpine. The role of kinin B₁ and B₂ receptors was investigated using pharmacological antagonism. Additionally, bradykinin levels, as well as the activity of ACE and kininase I were measured in the sciatic nerve, spinal cord and cerebral cortex of the mice. ACE inhibitors enalapril and captopril enhanced the reserpine-induced mechanical allodynia, and this increase was prevented by kinin B₁ and B₂ receptor antagonists. Substance P and bradykinin caused spontaneous nociception and increased the mechanical allodynia in animals treated with reserpine. Reserpine plus ACE inhibitors increased bradykinin-related peptides levels and inhibited the

ACE activity in structures involved in the pain modulation. Since hypertension is frequent comorbidity affecting fibromyalgia patients, hypertension treatment with ACE inhibitors by these patients should be reviewed since this could enhance the fibromyalgia-like pain symptoms. Thus, hypertension treatment in patients with fibromyalgia could include other classes of antihypertensive drugs.

Key words: mechanical allodynia, enalapril, spontaneous nociception, bradykinin.

Introduction

Fibromyalgia is a chronic disease that prevails in 2 to 8 % of the world population (Clauw, 2014). It is classified as chronic primary pain whose main symptom is widespread pain, characterized by hyperalgesia, allodynia and spontaneous pain (Rehm et al., 2010; Choy, 2015; Treede et al., 2015). Symptoms also include hypertension, fatigue, depression, memory problems and sleep disturbances (Clauw, 2015; Arnold et al., 2016). Fibromyalgia is, therefore, a potentially disabling disease that results in high medical costs and severe reduction of patient's life quality since diagnostic and treatments are often inadequate (Doppler et al., 2015; Arnold et al., 2016; Macfarlane et al., 2017).

The pathophysiology of disease includes abnormalities in the central nervous system, such as dysfunction of descending pain inhibitory pathways mediated by monoamines decrease (Clauw, 2015) and central sensitization (Choy, 2015), besides peripheral alterations as dysfunction of small nerve fibers (Doppler et al., 2015; Taguchi et al., 2015) and neurogenic inflammation (Littlejohn, 2015). Neurogenic inflammation results from the release of proinflammatory neuropeptides such as bradykinin from peripheral inflammatory cells and substance P from C-fibers as part of a peripheral axonal reflex (Blanco et al., 2010; Littlejohn, 2015).

The substance P is a neuropeptide that besides peripheral effects increase the excitability of neurons in the dorsal horn contributing to the increased pain transmission from the spinal cord to brain regions (Borsook; Sava, 2009; Choy, 2015; Clauw, 2015). Bradykinin is also an endogenous peptide involved in inflammatory and painful processes through kinin B₂ receptor activation, while its active metabolites also induce such processes by acting on the kinin B₁ receptor (Leeb-Lundberg et al., 2005; Dutra, 2017). Increased levels of substance P have been found in the spinal fluid of patients with fibromyalgia (Choy, 2015), as well as, the involvement of bradykinin and of the kinin B₁ and B₂ receptors has been demonstrated in a fibromyalgia-like animal model (Brusco et al., unpublished data). Moreover, both peptides are

neuro-inflammatory mediators involved in central and peripheral sensitization such as those occurring in fibromyalgia (de Mos et al., 2009; Littlejohn, 2015; 2018).

Since the angiotensin I-converting enzyme (ACE) degrades substance P and bradykinin, the use of ACE inhibitors drugs has been associated with an increased risk of developing the chronic pain conditions and widespread pain by preventing the degradation of these peptides (Borsook; Sava 2009; de Mos et al., 2009). Preclinical and clinical data also showed that ACE inhibitors may contribute to the development of acute and chronic pain conditions (Choi, 2012; Silva et al., 2016; de Mos et al., 2009; Borsook; Sava, 2009; Guasti et al., 2002; Boix et al., 2005), besides causing a potentiation of chemotherapy-induced painful hypersensitivity (Brusco et al., 2017a).

ACE inhibitors facilitate and enhance the progression of neuroinflammatory mechanisms since they makes central and peripheral neurons more sensitive to pain (de Mos et al., 2009; Borsook; Sava, 2009). Besides preventing the neuropeptides degradation, (Boix et al., 2005; Negraes et al., 2015; Dutra et al., 2017) ACE inhibitors can act as direct allosteric agonists of the kinin B₁ receptor (Erdös et al., 2010; Negraes et al., 2015) and as indirect allosteric enhancers of the kinins activity on the B₂ receptor by interactions with the ACE on the cell surface where both are colocalized (Chen et al., 2006; Erdös et al., 2010).

ACE inhibitors are one of the most commonly used classes of drugs to treat hypertension (Mancia et al., 2013), which affect 12–40% of fibromyalgia' patients, and it is one of the most common diagnoses (34.8%) by which they are admitted to hospitals (Haviland et al., 2011). Thus, this study aimed to investigate the effect of ACE inhibitors on reserpine-induced fibromyalgia-like pain symptoms in mice and the kinin involvement on this effect.

Methods

Animals

Experiments were performed using adult male Swiss mice (25-30 g). Animals were maintained in a temperature-controlled room (22±1°C) with a 12 h light/12 h dark cycle and free access to food and water. The experimental protocol was approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA, processes number 2770030516/2016 and 3189251018/2018). The number of animals and the intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the treatments in accordance with ethical guidelines established for investigations of

experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983). The experimental protocol followed the Animal Research: Reporting *in vivo* Experiments (ARRIVE) guidelines (McGrath; Lilley, 2015) and national (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA) and international legislation (of U.S. Public Health Service’s Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals - PHS Policy). Experiments also are in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

Drugs

All reagents when not mentioned were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Reserpine was dissolved in glacial acetic acid (0.1%) in saline solution (0.9% NaCl). Mergepta was purchased from Calbiochem (California, USA). Enalapril, captopril and mergepta were dissolved in saline solution (0.9% NaCl). Bradykinin (Bk; B₂ receptor agonist), des-Arg⁹-bradykinin (DABk; B₁ receptor agonist), Icatibant (B₂ receptor antagonist) and des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradykinin (DALBk; B₁ receptor antagonist) were prepared in phosphate-saline buffer (PBS). The fluorescent substrates dansyl-ala-arg (kininase I substrate) and (N-[3-(2-furyh)-acryloyl]-L-phenyl alanyl glycyl glycine (FAPGG; ACE substrate) were purchased from Bachem (California, USA). Substance P was dissolved in glacial acetic acid (0.05%) in saline solution (0.9% NaCl). The enzyme immunoassay kit for bradykinin was obtained from Peninsula Laboratories International, Inc. (San Carlos, USA). The doses of the drugs used in this study were based in previous studies (Nagakura et al., 2009; Brusco et al., 2017a; Brusco et al., unpublished data).

Fibromyalgia-like pain model

The fibromyalgia model that mimics fibromyalgia-like pain symptoms was performed according to the method described by Nagakura et al., (2009) adapted for mice (Li et al., 2016). Animals received a subcutaneous (s.c.) administration of reserpine (1 mg/kg) once daily for three consecutive days (1, 2 and 3 days). Control groups received only subcutaneous administrations of vehicle (10 mL/kg; 0.1% acetic acid in saline solution (0.9% NaCl). Behavioral tests, evaluation of bradykinin levels and ACE and Kininase I activities were performed one day after the last administration of reserpine or vehicle.

Behaviour tests

Grip test

The muscle strength was measured with an automated meter (Model EFF305, Insight, São Paulo, Brazil). The apparatus consists of a raised metal grid from the floor and connected to a power transducer. To measure the muscle strength, mice were placed gently on the grid and allowed to grip it with its paws. Then, animals were gently pulled backward in a horizontal plane, from the tail base. The maximum strength exerted by the paws of each mouse was automatically recorded in grams (g) by the device. The test was repeated 3 times per mouse with at least 1 min resting period between each test (Katarzyna et al., 2010). Firstly, basal muscle strength values were recorded for each animal. After baseline, animals were treated with vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) and one day after the last administration, the muscle strength of the animals' forelimbs was again measured. Results were expressed as muscle strength in grams.

Mechanical allodynia

Mechanical allodynia was measured with a series of flexible nylon von Frey filaments of increasing stiffness (0.02-10 g) applied on the right hind paw of the mice using the up-and-down method (Chaplan et al., 1994; Oliveira et al., 2016). The mechanical paw withdrawal threshold (PWT) was calculated from the resulting scores according to Dixon (1980) and expressed in grams (g). Mechanical allodynia was considered as a significant decrease in the PWT in comparison to the baseline values.

To evaluate the development of mechanical allodynia on the reserpine-induced fibromyalgia-like pain model, animals received vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) once daily for three consecutive days (Nagakura et al., 2009) adapted for mice (Li et al., 2016). The mechanical PWT was measured before (basal; B) and at one day after the last reserpine administration (basal; 0) in the times of 0.5 h up to 24 h.

Effect of the ACE and kininase I inhibitors on reserpine-induced mechanical allodynia

Mechanical PWT was performed before (basal; B) and at one day after the last reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration (basal; 0). Then, animals that presented mechanical allodynia received oral (p.o.) treatment with vehicle (10 mL/kg, p.o.) or ACE inhibitors, enalapril (30 mg/kg, p.o.) or captopril (30 mg/kg, p.o.), as well as, the intraperitoneal (i.p.)

treatment with kininase I inhibitor, mergepta (3 mg/kg, i.p.). Mechanical allodynia was evaluated from 0.5 h up to 6 h after treatments (Brusco et al., 2017a). Experimental design is represented in the figure 1a.

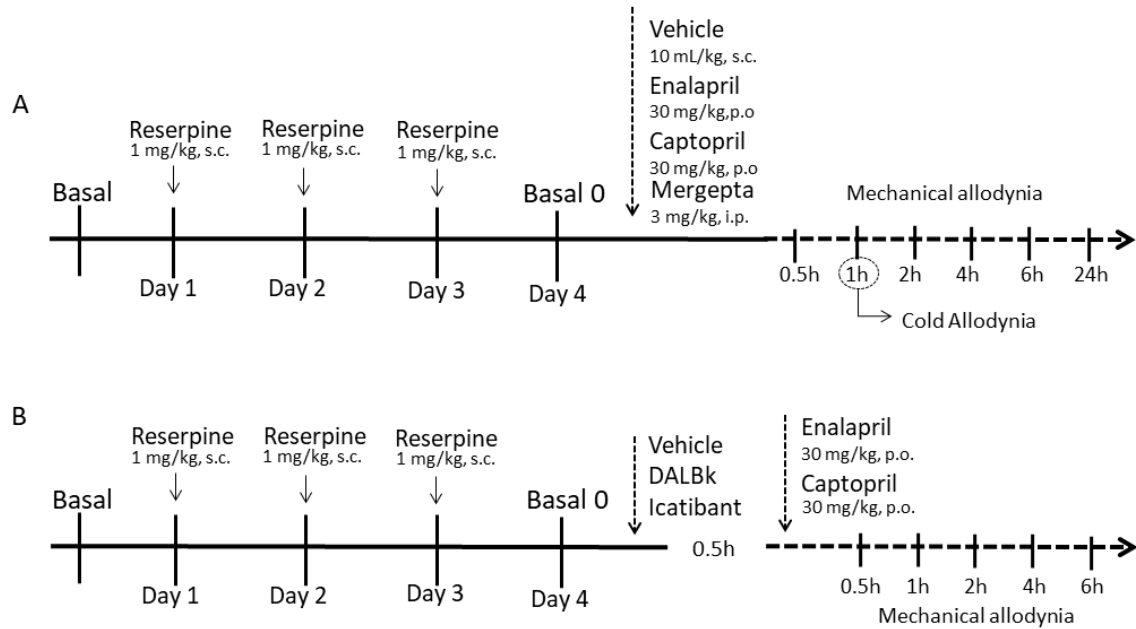


Figure 1. Experimental design for the effect of ACE inhibitors (enalapril and captopril) and kininase I inhibitor (mergepta) on the mechanical and cold allodynia reserpine-induced (A). Schematic representation of the effect of kinin receptor antagonists (DALBk, icatibant) on the mechanical allodynia it is induced by reserpine plus ACE inhibitors (enalapril and captopril) (B).

Effect of the kinin B₁ or B₂ receptor antagonists on reserpine-induced mechanical allodynia after ACE inhibitors administration

The effect of the kinin B₁ or B₂ receptors antagonists, DALBk or Icatibant, respectively, was evaluated on the mechanical allodynia in animals submitted to previous administration of reserpine and treated with ACE inhibitors, enalapril or captopril. Mechanical PWT was performed before (basal; B) and at one day after the last reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration (basal; 0). Then, animals that presented mechanical allodynia received the intraperitoneal pre-treatment with vehicle (10 mL/kg, i.p.), DALBk (150 nmol/kg, i.p.) or Icatibant (100 nmol/kg, i.p.) and at 0.5 h after received oral administrations of vehicle (10 mL/kg, p.o.), enalapril (30 mg/kg, p.o.) or captopril (30 mg/kg, p.o.). Mechanical allodynia was evaluated from 0.5 h up to 6 h after treatments with ACE inhibitors (Brusco et al., 2017a). Experimental design is represented in the figure 1b.

Effect of submaximal doses of the bradykinin and substance P on the reserpine-induced mechanical allodynia

Mechanical PWT was performed before (basal; B) of vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. Next, one day after the last of vehicle or reserpine administrations, animals received the intraplantar (i.pl.) injection of vehicle (20 μ L/paw, i.pl.) or submaximal doses de bradykinin (1 nmol/paw, i.pl.) and substance P (1 nmol/paw, i.pl.). Mechanical allodynia was evaluated at 2 h after the intraplantar injections. Experimental design is represented in the figure 2a.

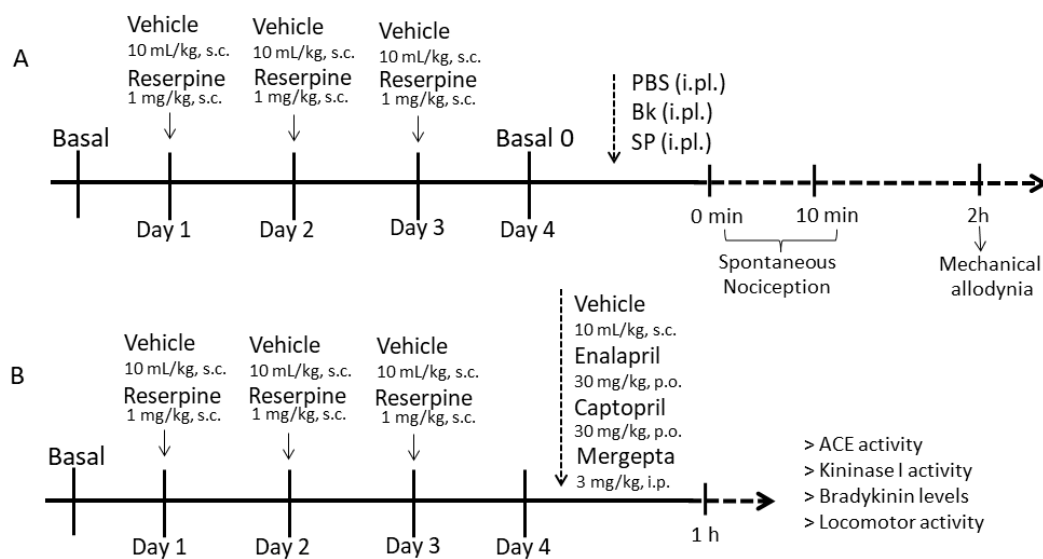


Figure 2. Experimental design for the effect of intraplantar submaximal doses of bradykinin (Bk) and substance P (SP) on the spontaneous nociception and mechanical allodynia after reserpine or vehicle administration (A). Schematic representation of the effect of ACE inhibitors (enalapril and captopril) and kininase I inhibitor (mergepta) on the ACE and kininase I activities, bradykinin levels, and locomotor activity, according to the methodological description (B).

Spontaneous nociception

Animals were individually placed in chambers (transparent glass cylinders of 20 cm diameter; adapted for 20 min) at one day after the last vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. Then these animals received the intraplantar (i.pl.) administration of vehicle (20 μ L/paw, i.pl.) or submaximal doses of bradykinin (1 nmol/paw, i.pl.) and substance P (1 nmol/paw, i.pl.). The spontaneous nociceptive behaviour was considered as the amount of time licking the injected paw during 10 min after injections and the results were

expressed in seconds (s) (Brusco et al., 2017a). Experimental design is represent in the figure 2a.

Cold allodynia

Cold allodynia was evaluated in the reserpine-induced fibromyalgia-like pain model with the acetone drop method (Brusco et al., 2017b). An acetone drop (20 μ L) was applied three times in each right hind paw and cumulative scores were generated following a 4-point scale: 0=no response; 1=quick withdrawal, flick or stamp of the paw; 2=prolonged withdrawal or repeated flicking, and 3=repeated flicking of the paw with licking directed at the ventral side of the paw.

Effect of the ACE and kininase I inhibitors on reserpine-induced cold allodynia

One day after the last vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration the animals were treated with vehicle (10 mL/kg, p.o.) or with ACE inhibitors, enalapril (30 mg/kg, p.o.) or captopril (30 mg/kg, p.o.), as well as with kininase I inhibitor, mergepta (3 mg/kg, i.p.). The score of cold allodynia was then evaluated at 1 h after the treatments (Brusco et al., 2017b). Experimental design is represented in the figure 1a.

Levels of bradykinin-related peptides

One day after the last vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration the animals were treated with ACE inhibitors enalapril (30 mg/kg, p.o.) or captopril (30 mg/kg, p.o.) or with kininase I inhibitor, mergepta (3 mg/kg, i.p.). At 1 h after the treatments, animals were promptly euthanized and sciatic nerve, cord spinal, and cerebral cortex were collected. The measurement of kinin levels was performed by enzyme immunoassays through a high-sensitivity kit for bradykinin. The results were expressed as bradykinin-related peptides levels in ng/mL of sample (Gewehr et al., 2013; Brusco et al., 2017a). Experimental design is represented in the figure 3.

Determination of ACE activity

One day after the last vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration animals were treated with vehicle (10 mL/kg, p.o.) or ACE inhibitors enalapril

(30 mg/kg, p.o.) or captopril (30 mg/kg, p.o.) or kininase I inhibitor mergepta (3 mg/kg, i.p.). At 1 h after treatments, the animals were euthanized and samples of the sciatic nerve, spinal cord, and cortex cerebral were collect. For measuring ACE activity, the samples were incubated in the presence of the ACE substrate (FAPGG). The formed product was measured at 340 nm, and results were expressed as μmol of cleaved substrate/ μl sample/min (Silva et al., 2016; Brusco et al., 2017a). Experimental design is represented in the figure 3.

Determination of kininase I activity

Animals were euthanized and samples of the sciatic nerve, spinal cord, and cortex cerebral were collect one day after the last vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. The kininase I activity assay involved the incubation of samples in the presence of its fluorescent substrate dansyl-ala-arg. The fluorescent product was extracted with chloroform and measured at 495 nm (340 nm excitation). Results were expressed as fluorescent units/mg of protein (Sangsree et al., 2003; Silva et al., 2016). Experimental design is represented in the figure 3.

Adverse effects assessment

Possible adverse effects caused by reserpine (1 mg/kg, s.c.) and by the combined administration of reserpine (1 mg/kg, s.c.) with enalapril (30 mg/kg, p.o.) were measured at one day after its last administration and at 1 h after enalapril administration. The locomotor activity was recorded for 15 min in the thigmotaxis apparatus where the results of mean speed and distance traveled were obtained by automated analysis (ANY-maze™ software) and further exported as raw data for the statistical analysis (Huang et al., 2013). The forced locomotor activity of each animal was evaluated using the rotarod test (3.7 cm in diameter, 8 rpm). Animals were first trained to remain on the apparatus for 60 s without falling. Results were expressed as the number of falls for 4 min in the rotarod test (Brusco et al., 2017b). Experimental design is represented in the figure 3.

Statistical analysis

Results were expressed as the mean and standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 software. To meet parametric assumptions, the data of mechanical threshold and cold allodynia scores were log transformed before

analysis. The significance of differences between groups was evaluated with Student's t-test, one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test or Bonferroni's post hoc test. P values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered significant.

Results

Reserpine induces mechanical allodynia and reduces muscle strength

Reserpine administrations, but not the vehicle, decreased the mechanical PWT of the animals in response to von Frey filaments, featuring mechanical allodynia in the fibromyalgia-like pain model. Mechanical allodynia was observed one day after the last reserpine administration in all times evaluated (Fig.3a). Moreover, reserpine administrations also reduced in $27 \pm 1.8\%$ the muscle strength of the mice one day after its last administration when compared to the vehicle group (Fig.3b).

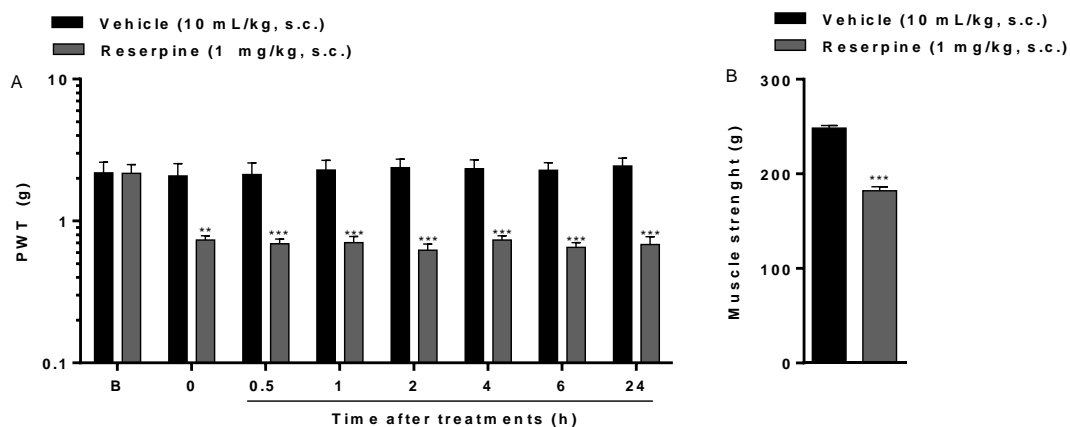


Figure 3. Time-response curve to the vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) on mechanical allodynia in mice (A). B denotes the baseline threshold before reserpine administrations while 0 indicates the basal threshold one day after the last reserpine administration. Muscle strength of the hind paws of the animals at one day after the last administration of vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) (B). Data are expressed as the mean+SEM (n= 6). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ when compared to the vehicle group; two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test (A) or *** $P < 0.001$ when compared to the vehicle group second Student's t-test (B).

ACE inhibitors enhance the reserpine-induced mechanical allodynia

Reserpine (1 mg/kg, s.c.) induced mechanical allodynia one day after its last administration when compared to basal values (B). The treatment with ACE inhibitors enalapril (30 mg/kg, p.o.) and captopril (30 mg/kg, p.o.) enhanced the mechanical allodynia

induced by reserpine from 1 up to 4 h after treatments when compared to vehicle group. The threshold maximum reduction was of $44\pm 8\%$ and $45\pm 10\%$ at 1 h and 2 h after treatments with enalapril and captopril, respectively (Fig. 4).

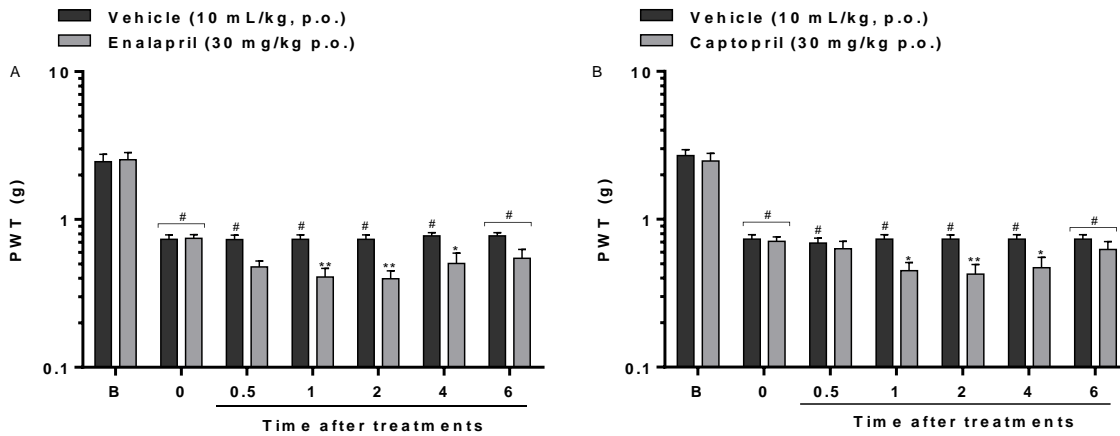


Figure 4. Effect of ACE inhibitors on the mechanical allodynia reserpine-induced. Time-response curves in animals that received vehicle (10 mL/kg, p.o.), (A) enalapril (30 mg/kg, p.o.) or (B) captopril (30 mg/kg, p.o.) one day after the last reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. B denotes the basal threshold before reserpine administrations, while 0 indicates the basal threshold one day after the last reserpine administration. Data are expressed as the mean+SEM (n=6-7). #P<0.001 when compared with the basal mechanical threshold (B); one-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test; *P<0.05, **P<0.01 when compared with the vehicle group; two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

Kinin B₁ and B₂ receptor antagonists reduce the mechanical allodynia induced by ACE inhibitors in animals previously treated with reserpine

ACE inhibitors enalapril (30 mg/kg, p.o.) and captopril (30 mg/kg, p.o.) enhanced the mechanical allodynia induced by reserpine (1 mg/kg, s.c.) when compared to baseline values (0) at one day after the last reserpine administration. The threshold maximum reduction was of $53\pm 6\%$ and $50\pm 10\%$ at 1 h, after enalapril and captopril administrations, respectively (Fig.5). The treatment with kinin B₁ (DALBk; 150 nmol/kg, i.p.) or B₂ (Icatibant; 100 nmol/kg, i.p.) receptor antagonists reduced the mechanical allodynia induced by reserpine plus enalapril administration from 0.5 up to 4 h after antagonists' administration. Maximal inhibitions (I_{max}) for DALBK and Icatibant were of $54\pm 4\%$ and $71\pm 9\%$ at 1 h after treatments, respectively (Fig.5a, b). Interestingly, DALBk (150 nmol/kg, i.p.) reduced reserpine-induced mechanical allodynia beyond the baseline values (time 0; after reserpine administrations) at 0.5 after treatment (Fig.5a). Likewise, DALBk and Icatibant reduced the mechanical allodynia

induced by reserpine plus captopril administration from 1 up to 2 h and from 1 up to 4 h after antagonist's administration with I_{\max} of $57\pm 5\%$ and $73\pm 8\%$ at 1 h after treatments, respectively (Fig. 5c, d).

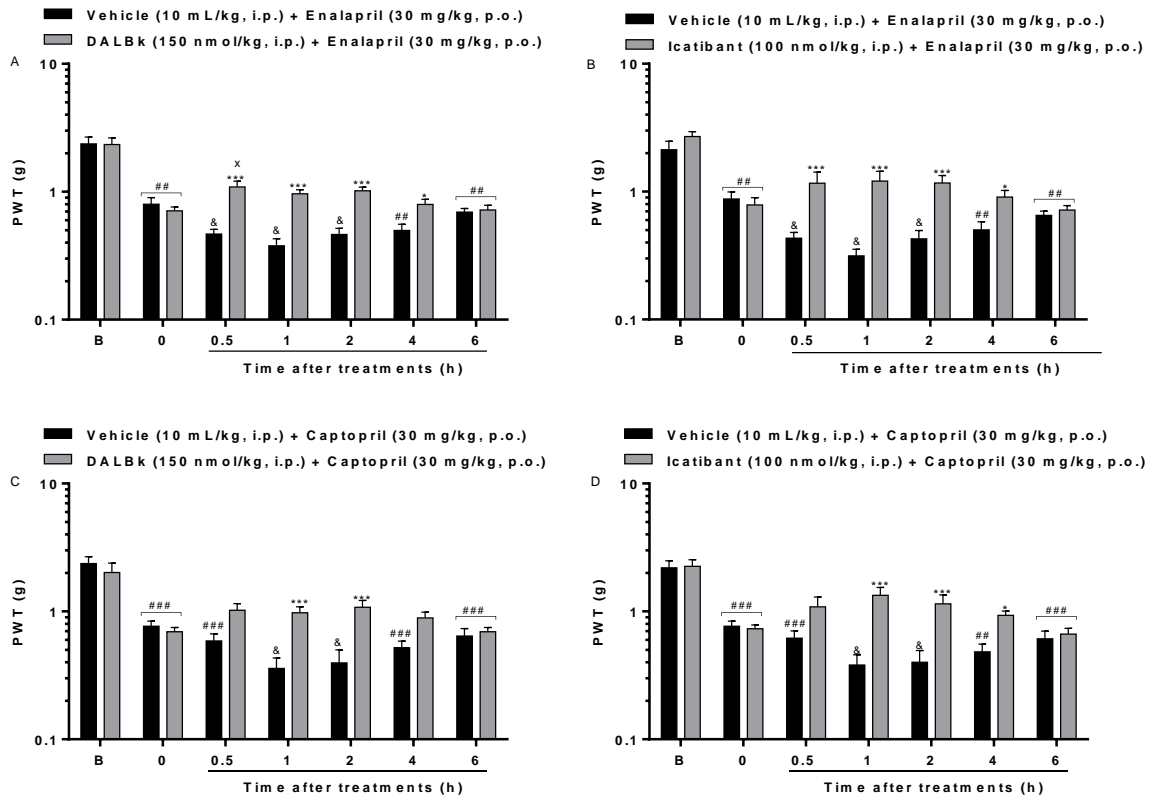


Figure 5. Effect of B₁ (DALBk) or B₂ (Icatibant) receptor antagonists on mechanical allodynia induced reserpine plus enalapril or captopril. Time-response curves from pre-treatment with vehicle (10 mL/kg, i.p.), (A) DALBk (150 nmol/kg, i.p.) or (B) Icatibant (100 nmol/kg, i.p.) in animals previously treated with reserpine (1 mg/kg, s.c.) and that received enalapril (30 mg/kg, p.o.) or captopril (30 mg/kg, p.o.). B denotes the basal threshold before reserpine administration, while 0 indicates the basal threshold one day after the last reserpine administration and before treatment with antagonists, enalapril or captopril. Data are expressed as the mean + SEM (n=5-8). ##P<0.01, and ###P<0.001 when compared to the basal threshold (B); &P<0.05 when compared to the basal values (0); *P<0.05 when compared to the baseline values (0)/DALBk; enalapril group; one-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test; *P<0.05, and ***P<0.001 when compared to the vehicle/enalapril or captopril group; two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

Kinase I inhibitor reduces the reserpine-induced mechanical allodynia

Reserpine (1 mg/kg, s.c.) induced mechanical allodynia one day after the last administration when compared to basal values (B). Treatment with kininase I inhibitor mergepta (3 mg/kg, i.p.) reduced reserpine-induced mechanical allodynia from 0.5 h up to 2 h after its treatment when compared to the vehicle group. The I_{\max} was of $43\pm 8\%$ at 1 h after treatment (Fig. 6a).

Effect of ACE and kininase I inhibitors on reserpine-induced cold allodynia

Reserpine (1 mg/kg, s.c.) induced cold allodynia one day after its last administration when compared to the animals that received vehicle (10 mL/kg s.c.) (Fig. 6b). Treatment with ACE inhibitors enalapril (30 mg/kg, p.o.) and captopril (30 mg/kg, p.o.) did not alter reserpine-induced cold allodynia (data not shown). However, the treatment with kininase I inhibitor mergepta (3 mg/kg, i.p.) reversed the cold allodynia induced by reserpine at 1 h after its administration when compared to the vehicle group (10 mL/kg, p.o.) with maximum inhibition of $52\pm 12\%$ (Fig. 6b).

Moreover, reserpine increased the kininase I activity one day after its last administration when compared to the vehicle in the cerebral cortex (Fig. 6c), but not in the sciatic nerve or spinal cord of the mice (data not shown).

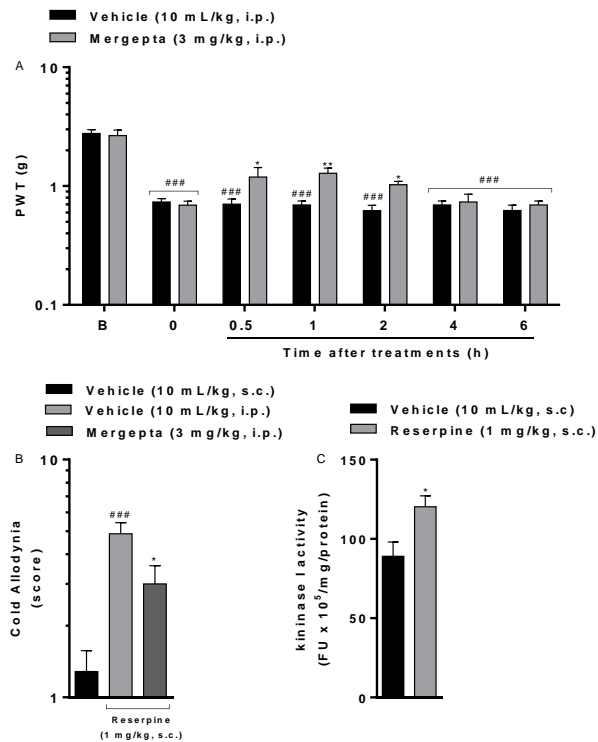


Figure 6. Effect of vehicle or kininase I inhibitor on mechanical (A) and cold (B) allodynia reserpine-induced and the effect of reserpine on the kininase I activity (C). (A) Time-response curve in animals that received vehicle (10 mL/kg, i.p.) or mergeпта (3 mg/kg, i.p.) one day after the last reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. B denotes the basal threshold before reserpine administration, while 0 indicates the basal mechanical threshold one day after the last reserpine administration. (B) Cold allodynia score one day after the last of the vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration in animals treated with vehicle (10 mL/kg, i.p.) or mergeпта (3 mg/kg, i.p.). (C) Effect of reserpine (1 mg/kg, s.c.) on the kininase I activity in cerebral cortex samples. Data are expressed as the mean + SEM (n=6-8). ###P<0.001 when compared with basal mechanical threshold (B) or vehicle (s.c.); one-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test; *P<0.05, **P<0.01 when compared with the vehicle (i.p.) group; two-way repeated measures (A), one-way (B) ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test or Student's t-test (C).

Bradykinin and substance P enhance reserpine-induced mechanical allodynia and cause spontaneous nociception in animals treated with reserpine

Reserpine (1 mg/kg, s.c.) induced mechanical allodynia in the animals one day after its last administration when compared to basal PWT values (B). The intraplantar administration of low doses of bradykinin (Bk; 1 nmol/paw, i.pl.) and substance P (SP; 1 nmol/paw, i.pl.) enhanced the mechanical allodynia induced by reserpine when compared to reserpine/PBS intraplantar group. The maximum threshold reduction was of 57±11% and 64±9% after treatments with Bk and SP, respectively. As expected, low doses of Bk or SP did not cause mechanical allodynia in animals treated subcutaneously with vehicle (Fig. 7a; b).

Moreover, the intraplantar administration of low doses of bradykinin (Bk; 1 nmol/paw, i.pl.) and substance P (SP; 1 nmol/paw, i.pl.) was able to produce spontaneous nociceptive behavior in animals treated with reserpine when compared to reserpine/PBS intraplantar group. On the other hand, low doses of Bk and SP did not cause spontaneous nociception in animals treated subcutaneously with vehicle (Fig. 7 c; d).

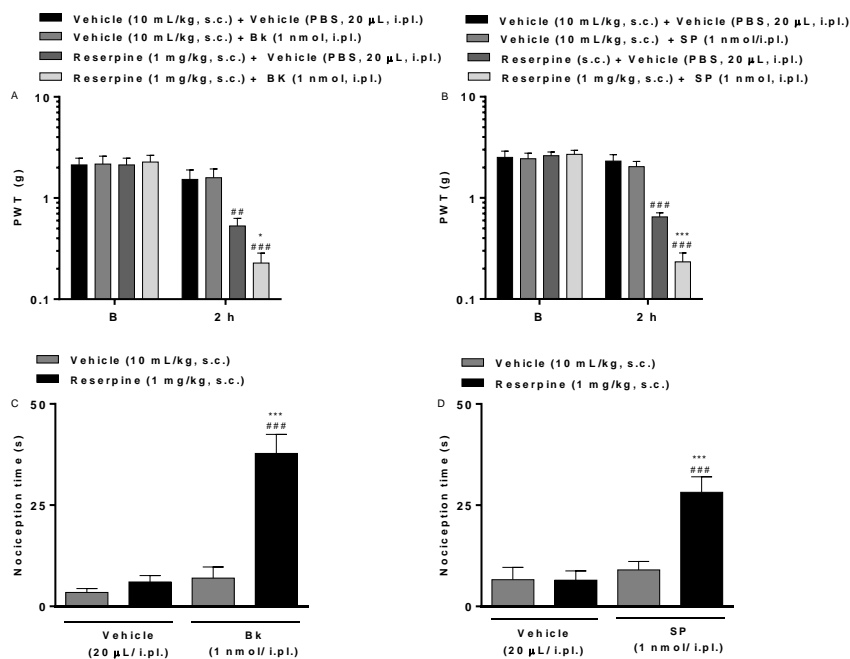


Figure 7. Effect of bradykinin (Bk) and substance P (SP) on mechanical allodynia (A; B) and spontaneous nociceptive behavior (C; D) induced by reserpine. Treatment with vehicle (PBS; 20 µL/paw, i.pl.) and low doses of Bk (1 nmol/paw, i.pl.) (A; C) or SP (1 nmol/paw, i.pl.) (B; D) one day after the last of vehicle (10 mL/kg, s.c.) or reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. B denotes the basal threshold before reserpine administrations. Data are expressed as the mean + SEM (n=6). (A; B) #P<0.05; ###P<0.001 when compared to the basal (B) group; *P<0.05; ***P<0.001 when compared to the reserpine/vehicle (PBS) group; Two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. (C; D) ##P<0.001, ###P<0.001 when compared to the vehicle/vehicle (PBS) group; ***P<0.001 when compared to the reserpine/vehicle (PBS) group; one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test.

Effect of ACE and kininase I inhibitors on bradykinin levels in animals previously treated with reserpine

Reserpine (1 mg/kg, s.c.) increased bradykinin-related peptide levels in the sciatic nerve and cerebral cortex, but not in the spinal cord of the mice one day after its last administration when compared to the vehicle group (Fig.8). Treatment with reserpine plus

kininase I inhibitor mergepta (3 mg/kg, i.p.) maintained the increase of bradykinin-related peptide levels in the sciatic nerve and cerebral cortex (Fig. 8g,h,i).

Reserpine plus ACE inhibitor enalapril (30 mg/kg, p.o.) or captopril (30 mg/kg, v.o.) maintained the increase of bradykinin-related peptide levels in the sciatic nerve (Fig.8a,d). In the cerebral cortex, both enalapril and captopril enhanced the increase in the bradykinin-related peptide levels induced by reserpine when compared to the reserpine group (Fig. 8c,f). Moreover, only reserpine plus captopril (30 mg/kg, p.o.) increased bradykinin-related peptide levels in the spinal cord (Fig.8b,e,h).

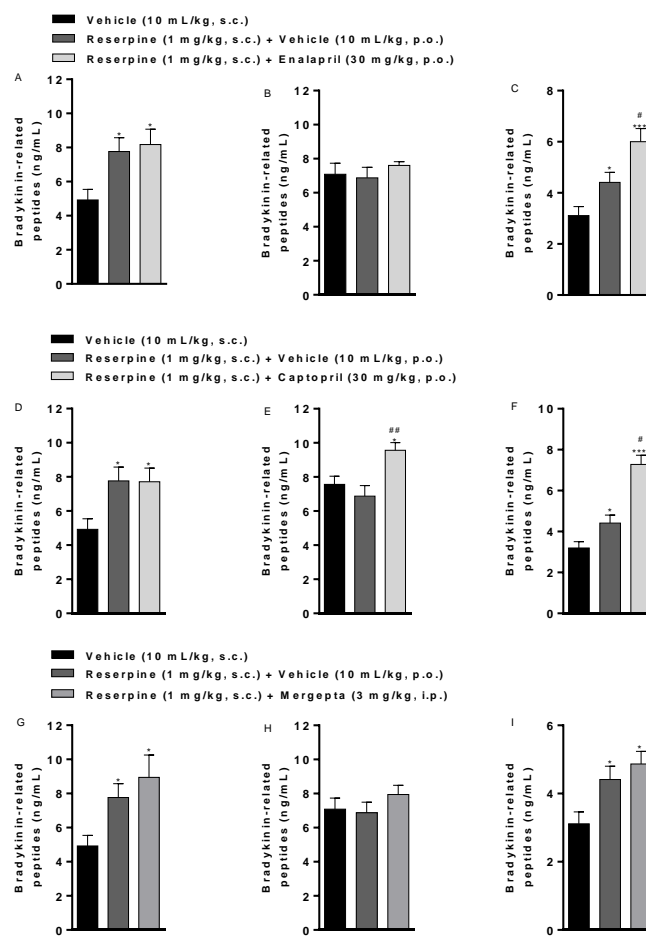


Figure 8. Effect of vehicle or ACE and kininase I inhibitors on the increase bradykinin levels in animals treated with reserpine in the sciatic nerve (A, D, G), spinal cord (B, E, H) and cerebral cortex (C, F, I). Treatment with vehicle (10 mL/kg, p.o.), enalapril (30 mg/kg, p.o.), captopril (30 mg/kg, p.o.) or mergepta (3 mg/kg, i.p.) one day after the last of reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. Data are expressed as means + SEM (6-7). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared to the vehicle group. # $P < 0.05$ when compared to the reserpine group; one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

Effect of ACE inhibitors on the ACE activity in animals previously treated with reserpine

Reserpine (1 mg/kg, s.c.) did not alter the ACE activity in the tissues evaluated one day after its last administration when compared to the vehicle group (10 mL/kg, s.c.). However, treatment with reserpine plus ACE inhibitors enalapril (30 mg/kg, p.o.) and captopril (30 mg/kg, p.o.) inhibited ACE activity in the sciatic nerve (9a;d) and cerebral cortex (9c;f) 1 h after its administration when compared to the vehicle group (10 mL/kg, s.c.). Only the treatment with reserpine plus ACE inhibitor captopril (30 mg/kg, p.o.) inhibited ACE activity in the spinal cord (Fig. 9e).

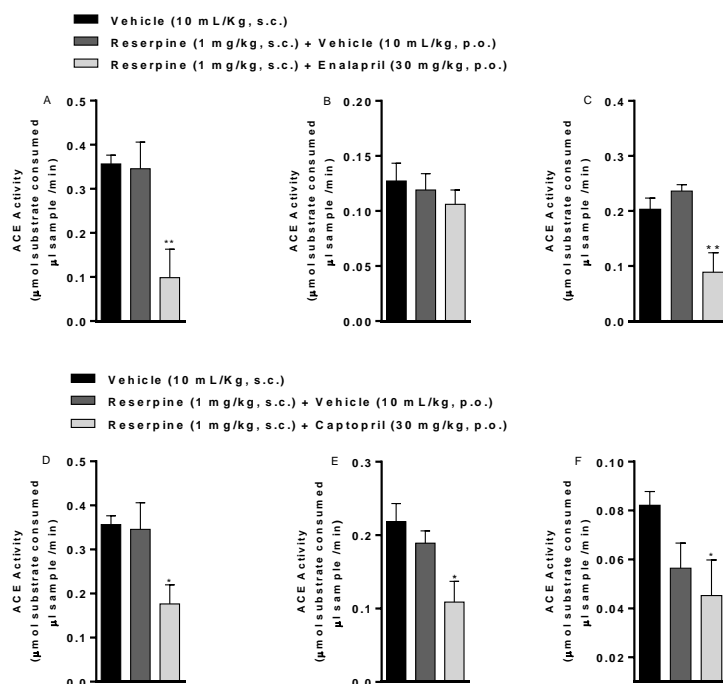


Figure 9. Effect of vehicle or ACE inhibitors on the ACE activity in the sciatic nerve (A; D), spinal cord (B; E) and cerebral cortex (C; F). Treatment with vehicle (10 mL/kg, p.o.), (A; B; C) enalapril (30 mg/kg, p.o.) or (D; E; F) captopril (30 mg/kg, p.o.) one day after the last of reserpine (1 mg/kg, s.c.) administration. Data are expressed as means + SEM (n=6-8). *P<0.05, **P<0.01 when compared to the vehicle group; one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

Reserpine and enalapril do not alter the locomotor activity of the mice

The reserpine and reserpine plus enalapril administration did neither change the speed and distance traveled of the animals in the thigmotaxis apparatus, nor fall number in the rota rod apparatus when compared to the vehicle (Table 1).

Table 1. Effects of reserpine or reserpine plus enalapril administration on the locomotor activity of the mice

Treatments	Distance traveled (m)	Mean speed (m/s)	Full number
Vehicle (10 mL/kg, s.c.)	11.12 ± 1.15	0.0123 ± 0.0014	0.50 ± 0.34
Reserpine (1 mg/kg, s.c.)	10.42 ± 1.11	0.0105 ± 0.0012	0.57 ± 0.42
Reserpine (1 mg/kg, s.c.) plus Enalapril (30 mg/kg, s.c.)	8.5 ± 1.06	0.0095 ± 0.0012	0.50 ± 0.34

Data are expressed as the mean+SEM (n=6). Significant differences were not found between groups (Student's t-test).

Discussion

The clinical features of the fibromyalgia include mainly chronic widespread pain, besides a range of comorbidities as fatigue, nonrestorative sleep, depression (Choy, 2015; Arnold et al., 2016) and hypertension, which is one of the most frequent, affecting 12-40% of patients with fibromyalgia (Haviland et al., 2011; Arnold et al., 2016). ACE inhibitors are widely used antihypertensive drugs that have been associated with an increase in painful conditions by blocking the neuropeptides degradation and acting on the kinin receptors (de Mos et al., 2009; Borsook; Sava, 2009; Silva et al., 2016; Brusco et al., 2017a) which are involved in the fibromyalgia pathophysiology (Littlejohn, 2015; Brusco et al., unpublished data).

We showed that ACE inhibitors enhanced the reserpine-induced mechanical allodynia in the fibromyalgia-like pain model and this increase was prevented by kinin

receptors antagonists. Intraplantar injections of submaximal doses of bradykinin and substance P caused spontaneous nociception and enhanced mechanical allodynia in animals treated with reserpine. The reserpine plus ACE inhibitors administration increased the bradykinin levels and inhibited the ACE activity in structures involved in the pain modulation. Moreover, the kininase I inhibitor mergepta reversed the reserpine-induced cold and mechanical allodynia. This indicates that the treatment of hypertension with ACE inhibitors by patients with fibromyalgia should be reviewed since this could enhance the patients' painful symptoms.

Initially, we showed that reserpine caused mechanical allodynia after its administration inducing a fibromyalgia-like painful symptom, which is in according to preclinical (Brusco et al., unpublished data) and clinical data (Veselinovi et al., 2011). This result was reinforced by the grip test, a sensitive test for painful parameters in animals (Montilla-García et al., 2017), where reserpine reduced the muscle strength indicating some degree of muscular weakness, other fibromyalgia' characteristic (Larsson, et al., 2015), but without altering the animals' locomotor activity.

Hypertension is a common comorbidity of the fibromyalgia (Haviland et al., 2011), which is usually treated with ACE inhibitors (Mancia et al., 2013). We evidenced that systemic administration of two ACE inhibitors, enalapril, and captopril, enhanced the mechanical allodynia, but not cold allodynia, induced by reserpine without altering the locomotor activity of the mice. Similar to our findings, ACE inhibitors have enhanced the mechanical allodynia in acute and chronic pain animal models (Silva et al., 2016; Brusco et al., 2017a). Clinical studies also indicate that the use of ACE inhibitors increase the pain in patients with gout (Choi et al., 2012) and complex regional pain syndrome (de Mos et al., 2009; Borsook; Sava, 2009).

Interestingly, besides coughing, pain involving any part of the body, including the chest, abdomen, limbs, joints, back, shoulder, and the head are considered adverse effects of ACE inhibitor drugs (Wang et al., 2005). Coincidentally, fibromyalgia patients present similar symptoms ACE inhibitors-caused, characterized chronic widespread pain (Choy et al., 2015). ACE inhibitors induce widespread pain through central and peripheral mechanisms since these drugs making the neurons more sensitive to pain (Borsook; Sava, 2009), suggesting that ACE inhibitors can enhance the pain perception in fibromyalgia' patients. Consistent with these data, the treatment with ACE inhibitors in hypertensive patients normalized the blood pressure but increased the sensitivity to pain (Guasti et al., 2002; Turan et al., 2013). Although ACE inhibitors do not affect the initiation of the neuroinflammatory response, they

facilitate its progression to a pathological state since it may enhance a response that has been initiated by a previous trigger (de Mos et al., 2009).

ACE inhibitors can also increase pain sensitivity by interaction with kinin B₁ and B₂ receptors (Boix et al., 2005; Silva et al., 2016; Brusco et al., 2017a). We observed that the potentiation of mechanical allodynia caused by the reserpine plus ACE inhibitors administration was reduced by the kinin B₁ or B₂ receptor antagonists. Since ACE inhibitors are known as kinin B₁ receptor direct allosteric agonists (Erdös et al., 2010; Negraes et al., 2015) and kinin B₂ receptor indirect allosteric enhancers (Chen et al., 2006; Erdös et al., 2010) our results reinforce the involvement of both kinin receptors in the reserpine-induced pain (Brusco et al., unpublished data) and are consistent with previous studies, which associate the increased pain caused by ACE inhibitors with their action on kinins and their receptors (Boix et al., 2005; Silva et al., 2016; Brusco et al., 2017a). Moreover, similar to our results, the potential of kinin receptors antagonists in preventing the increase of chronic pain induced by ACE inhibitors has been previously showed (Brusco et al., 2017a).

In addition to the allosteric effects on the kinin receptors, the increased pain sensitivity induced by ACE inhibitors has been associated with the increase of substance P and bradykinin levels (de Mos et al., 2009; Borsook; Sava, 2009). Both peptides, at doses that normally do not cause nociception, enhanced the reserpine-induced mechanical allodynia and caused spontaneous nociceptive behavior in the animals, which are clinical manifestations of patients with fibromyalgia (Rehm et al., 2010; Choy, 2015). Consistent with our findings, bradykinin, and substance P are involved with the mechanical hypersensitivity and spontaneous nociception in pain animal models (Ferreira et al., 2002; Hoffmeister et al., 2011; Wei et al., 2012; Brusco et al., 2017a).

Previous studies using pharmacological antagonism have also shown the contribution of these peptides in chronic painful conditions (Brusco et al., 2017a; Li et al., 2012). Moreover, these results reinforce the kinins involvement in the pain potentiation induced by ACE inhibitors (Silva et al., 2016; Brusco et al., 2017a) since bradykinin exerts its painful effects through activation of the kinin B₂ receptor and to be substrate to kininase I enzyme that forms B₁ receptor agonists (Erdos et al., 2010; Kashuba et al., 2013).

Besides generation of B₁ receptor agonists and allosteric effects on this receptor, when binding to bradykinin, the kininase I enzyme form a complex with B₁ receptor, resulting in its activation (Zhang et al., 2008; 2013 ab). We demonstrated that reserpine increased the activity of the kininase I enzyme in the cerebral cortex. Furthermore, reserpine or reserpine plus mergepta, a kininase I inhibitor, increased the bradykinin levels in the sciatic nerve and

cerebral cortex. Moreover, mergepta also reduced the reserpine-induced cold and mechanical allodynia. These data amplify the evidence that reserpine induces fibromyalgia like-pain symptoms by acting on both kinin receptors (Brusco et al., unpublished data) and that ACE inhibitors could potentiate this pain since ACE inhibition prevents bradykinin degradation which is substrate and modulator of kininase I (Erdos et al., 2010; Zhang et al., 2013b).

Consistent with the increase of the nociceptive parameters, we also observed increased bradykinin-related peptide levels in the sciatic nerve, spinal cord and cerebral cortex of the animals after the reserpine plus ACE inhibitors administration. High levels of bradykinin have been previously found in a fibromyalgia animal model (Brusco et al., unpublished data). Indeed, bradykinin contributes to peripheral and central sensitization involved with increased pain sensitivity in fibromyalgia (Clauw, 2014; Staud; Smitherman, 2002; Wang et al., 2005) and with the pathogenesis of chronic musculoskeletal pain, one of the most relevant symptoms of fibromyalgia (Clauw, 2014, Pinheiro et al., 2013). Here, ACE inhibitors enhanced the increase of bradykinin levels only in the cerebral cortex, but not in the sciatic nerve or spinal cord. These results can be explained since there is not always an increase in kinin levels after treatment with ACE inhibitors (Erdos et al., 2010; Brusco et al., 2017a), because these drugs can potentiate the kinin actions not necessarily by the inhibition of their degradation, that is, independently of blocking ACE activity (Sivieri et al., 2007).

Similar to bradykinin, substance P also facilitates pain transmission in fibromyalgia (Clauw, 2015). It increases the excitability of neurons in the dorsal horn contributing to pain transmission and increasing the response to painful stimuli (Borsook, Sava, 2009, Choy, 2015; Clauw, 2015). Moreover, substance P can be released after the antidromic activation of peptidergic C-fibers, initiated by axonal or dorsal root reflexes, contributing to peripheral sensitization (LITTLEJOHN, 2015). The substance P also enhances the neurogenic inflammation, characteristics of fibromyalgia, through peripheral and central mechanisms (de Mos, 2009; Littlejohn, 2015). These data corroborate with our findings, where the substance P caused spontaneous nociceptive behavior and increased mechanical allodynia in the reserpine-induced fibromyalgia-like pain model.

Since ACE is responsible for degrading the bradykinin (de Mos et al., 2009) and we observed increased levels the bradykinin after ACE inhibitors administration, the ACE activity was also evaluated in peripheral and central structures involved in the pain modulation. The reserpine plus ACE inhibitors administration inhibited the ACE activity in the sciatic nerve, spinal cord, and cortex cerebral of the animals. These results are consistent with previous data which showed a wide distribution ACE in various tissues including

structures of the peripheral and central nervous system such as, dendrite cells, brain, nerve, cerebrospinal fluid, neurons, cerebral cortex, spinal cord, among others (Kramer et al., 2005; Visniauskas et al. 2011; Kashuba et al., 2013; Kaur et al., 2015).

Ogata et al. (2016) also showed an increased spinal ACE expression which was associated with the allodynia development in a neuropathic pain model. Similar to our finding, ACE inhibitors administration in animals submitted to chronic pain models inhibited the ACE activity in the serum and peripheral tissues including the sciatic nerve (Silva et al., 2016; Brusco et al., 2017a). A great finding was the association between ACE gene polymorphism with susceptibility for the development of fibromyalgia (Inanir et al., 2015), strengthening our evidence that ACE inhibitors enhance the pain in fibromyalgia patients.

Symptoms of comorbidity to fibromyalgia, such as hypertension, are of great importance because they are the main responsible for the search by patients for medical care (Haviland et al., 2011). Among them, depression is the neuropsychiatric disorder more reported by fibromyalgia' patients (15.3%), and hypertension the most frequent cardiovascular comorbidity, occurring in up to 41.8% of them (Gore et al., 2010). Since ACE inhibitors are a class of drugs commonly used for treat hypertension (Marceau; Regoli, 2004; Mancia et al., 2013), our results suggest that the use of ACE inhibitors could potentiate painful symptoms in patients with fibromyalgia. These findings are relevant because pain is one of the main clinical features of this disease (Choy, 2015). In according to previous studies, drugs that induce peripheral and central sensitization, as the ACE inhibitor drugs, could potentiate the pathophysiological mechanisms involved in pain (Borsook: Sava, 2009) such as those occurring in fibromyalgia.

Overall, we evidence the involvement of kinin B₁ and B₂ receptors in the increased propensity for fibromyalgia-like pain in response to systemically administered ACE inhibitors. These data extend the previous finding on the involvement of both kinin receptors in the increased pain induced by these drugs (Boix et al., 2005; Brusco et al., 2017a). Moreover, our results suggest that the therapy with ACE inhibitors in fibromyalgia' patients requires careful analysis since they enhance fibromyalgia-like pain symptom induced by reserpine. Thus, the hypertension treatment in fibromyalgia' patients could include other classes of antihypertensive drugs, different from ACE inhibitors.

Financial Support

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul-FAPERGS and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico-CNPq (Grant #16/2551-0000281-9), by FAPERGS (Grant #17/2551-0001082-5) (Brazil), and by the CNPq (process #406098/2018-2); and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES/PROEX (#23038.005848/2018-31). SMO is recipient of fellowship from CNPq (process #307220/2017-6) and IB is recipient of fellowship from CAPES/PROEX (process #88882.182148/2018-01). We thank CNPq and CAPES for their fellowship support.

Author contributions

Study concept and design: IB, SMO. Acquisition of data: IB, ABJ, CRS, RS, SMO. Analysis and interpretation of data: IB, ABJ, CRS, RS, SMO. Drafting of the manuscript: IB, ABJ, CRS, RS, RAMA, SMO. Study supervision: SMO.

Acknowledgments

The authors acknowledge Professor Foued Salmen Espindola from the Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, for the assistance during this work.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Arnold L.M., Gebke K.B., Choy E.H. Fibromyalgia: management strategies for primary care providers. **Int J Clin Pract**, v.70, p. 99-112, 2016.
- Beaudry F., Vachon P. Determination of substance P in rat spinal cord by high-performance liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. **Biomed Chromatogr**, v.20, p.1344-50, 2006.
- Blanco I., et al. Abnormal overexpression of mastocytes in skin biopsies of fibromyalgia patients. **Clin Rheumatol**, v.29, p.1403–1412, 2010.
- Boix F., et al. Kinin peptides in human trapezius muscle during sustained isometric contraction and their relation to pain. **J Appl Physiol**. v.98, p. 534 –540, 2005.
- Borsook D., Sava S. Pain: Do ACE inhibitors exacerbate complex regional pain syndrome? **Nat Rev Neurol.**, v.5, p.306-308, 2009.
- Brusco I., et al. Potentiation of Paclitaxel-Induced Pain Syndrome in Mice by Angiotensin I Converting Enzyme Inhibition and Involvement of Kinins. **Mol Neurobiol.**, v.54, p.7824-7837, 2017a.

- Brusco I, et al. α -Spinasterol: a COX inhibitor and a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist presents an antinociceptive effect in clinically relevant models of pain in mice. **Br J Pharmacol.**, v.174, p.4247-4262, 2017b.
- Chaplan S.R., et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods** v.53, p.55–63, 1994.
- Chen Z., et al. Human ACE and bradykinin B₂ receptors form a complex at the plasma membrane. **FASEB J.** v. 20, p. 2261–2270, 2006.
- Choi H.K., et al. Antihypertensive drugs and risk of incident gout among patients with hypertension: population based case-control study. **BMJ**, v.344, p. d8190., 2012.
- Choy E.H.S. The role of sleep in pain and fibromyalgia. **Nat Rev Rheumatol**, v.11, p.513–520, 2015.
- Clauw D.J. Fibromyalgia A Clinical Review. **JAMA.** v. 311, p.1547-1555, 2014.
- Clauw D.J. Fibromyalgia and Related Conditions. **Mayo Clin Proc.**, v. 90, p. 680-692, 2015.
- de Mos M., et al. The association between ACE inhibitors and the complex regional pain syndrome: Suggestions for a neuro-inflammatory pathogenesis of CRPS. **Pain**, v.142, p. 218–224, 2009.
- Dixon W.J. Efficient analysis of experimental observations. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** v. 20, p. 441–62, 1980.
- Doppler K., et al. Reduced dermal nerve fiber diameter in skin biopsies of patients with fibromyalgia. **Pain**, v.156, p. 2319-2325, 2015.
- Dutra R.C. Kinin receptors: Key regulators of autoimmunity. **Autoimm Rev**, v.16, p. 192-207, 2017.
- Erdös E.G., Tan F., Skidgel R.A. Angiotensin I–converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. **Hypertension**, v. 55, p. 214-20. 2010.
- Ferreira J. et al. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology**, v.43, p.1188–1197, 2002.
- Gewehr C., et al. Mechanisms involved in the nociception triggered by the venom of the armed Spider Phoneutria nigriventer. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7, p. e2198, 2013.
- Gore M., et al. Initial use of pregabalin, patterns of pain-related pharmacotherapy, and healthcare resource use among older patients with fibromyalgia. **Am J Manag Care.** v.16, p.S144-53., 2010.

- Guasti L., et al. Changes in pain perception during treatment with angiotensin converting enzyme-inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockade. **J Hypertens.** v.20, p.485-491, 2002.
- Huang W., et al. A clinically relevant rodent model of the HIV antiretroviral drug stavudine induced painful peripheral neuropathy. **Pain,** v.154, p. 560-575, 2013.
- Haviland M.G., Banta J.E., Przekop P. Fibromyalgia: prevalence, course, and co-morbidities in hospitalised patients in the United States, 1999-2007. **Clin Exp Rheumatol.** v.29, p.S79-87, 2011.
- Hoffmeister C., et al. Participation of the TRPV1 receptor in the development of acute gout attacks. **Rheumatology (Oxford),** v.53, p.240-249, 2014.
- Inanir A., et al. Angiotensin converting enzyme and methylenetetrahydrofolate reductase gene variations in fibromyalgia syndrome. **Gene.** v. 564, p.188-192, 2015.
- Kashuba E. et al. The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. **Biomarkers,** v. 18, p. 279-296. 2013.
- Katarzyna A., et al. A mouse model offers novel insights into the myopathy and tendinopathy often associated with pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia **Hum Mol Genet,** v.19, p. 52–64, 2010.
- Kaur P., Muthuraman A., Kaur M. The Implications of Angiotensin-Converting Enzyme and Their Modulators in Neurodegenerative Disorders: Current and Future Perspectives **ACS Chem Neurosci,** v.6, p. 508-521, 2015.
- Kramer H.H., et al. Inhibition of neutral endopeptidase (NEP) facilitates neurogenic inflammation. **Exp Neurol,** v.195, p. 179–184, 2005.
- Larsson A., et al. Resistance exercise improves muscle strength, health status and pain intensity in fibromyalgia—a randomized controlled trial. **Arthritis Res Ther.** v.17, p.161, 2015.
- Leeb-Lundberg L.M.F, et al. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol Rev,** v. 57, p. 27–77, 2005.
- Li S., et al. Echinocystic acid reduces reserpine-induced pain/depression dyad in mice. **Metab Brain Dis.** v. 31, p.455-463, 2016.
- Littlejohn G. Neurogenic neuroinflammation in fibromyalgia and complex regional pain syndrome **Nat Rev Rheumatol,** v.11, p.639-648, 2015.
- Littlejohn G., Guymer E. Neurogenic inflammation in fibromyalgia. **Semin Immunopathol,** v.40, p.291-300, 2018.

Lumry W.R., et al. Icatibant for Multiple Hereditary Angioedema Attacks across the Controlled and Open-Label Extension Phases of FAST-3. **Int Arch Allergy Immunol**. v.168, p. 44-55, 2015.

Macfarlane G. J. et al. EULAR revised recommendations for the management of fibromyalgia. **Ann Rheum Dis**, v. 76, p.318-328, 2017.

Mancia G., et al. ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **Eur Heart J**, v.34, p.2159–2219, 2013.

McGrath J.C., Lilley E. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. **Br J Pharmacol**, v.172, p. 3189–3193, 2015.

Marceau F., Regoli D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, p. 845-852. 2004.

Montilla-García A. et al. Grip strength in mice with joint inflammation: A rheumatology function test sensitive to pain and analgesia. **Neuropharmacology**, v. 125, 231-242., 2017.

Nagakura Y. et al., Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia, **Pain** v.146, p.26-33, 2009.

Negraes P.D., et al. Review roles of kinins in the nervous system. **Cell Transplant**, v.24, p.613–623, 2015

Ogata Y., et al. Involvement of spinal angiotensin II System in streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain in mice. **Mol Pharmacol**, v.90, p. 205-213, 2016.

Oliveira S.M., et al. Antinociceptive effect of a novel armed spider peptide Tx3-5 in pathological pain models in mice. **Pflug Arch Eur J Phy.**, v. 468, p. 881-894, 2016.

Otis C., et al. Concurrent validity of different functional and neuroproteomic pain assessment methods in the rat osteoarthritis monosodium iodoacetate (MIA) model. **Arthritis Res Ther**, v.18, p.150, 2016.

Pinheiro A.R. et al. Bradykinin-induced Ca²⁺ signaling in human subcutaneous fibroblasts involves ATP release via hemichannels leading to P2Y₁₂ receptors activation **Cell Comm Signal**, v.11, p.70, 2013.

Rehm S. E., et al. A cross-sectional survey of 3035 patients with fibromyalgia: subgroups of patients with typical comorbidities and sensory symptom profiles. **Rheumatology**, v. 49, p.1146–1152, 2010.

Staud R., Smitherman M.L. Peripheral and Central Sensitization in Fibromyalgia: Pathogenetic Role. **Curr Pain and Head Reports.**, v.6, p.259–266, 2002.

Sangsree S., et al. Kininase I-type carboxipeptidase enhance nitric oxide production in endothelial cells by generating bradykinin B1 receptor agonists. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** v.284, p.1959–1968, 2003.

Silva C.R., et al. The role of kinin B1 receptor and the effect of angiotensin I-converting enzyme inhibition on acute gout attacks in rodents. **Ann Rheum Dis**, v.75, p.260–268, 2016.

Sivieri D.O., et al. Potentiation of bradykinin effect by angiotensin-converting enzyme inhibition does not correlate with angiotensin-converting enzyme activity in the rat mesenteric arteries. **Hypertension**, v.50, p.110–115, 2007.

Taguchi T., et al. Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. **Pain**, v. 156, 415-427, 2015.

Treede R.D., et al. A classification of chronic pain for ICD-11. **Pain**, v.156, p.1003-1007, 2015.

Turan A., et al. Preoperative angiotensin-converting enzyme inhibitor use is not associated with increased postoperative pain and opioid use. **Clin J Pain**, v.29, 1050-1056, 2013.

Veselinović T., et al. Effects of antipsychotic treatment on psychopathology and motor symptoms. A placebo-controlled study in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, v.218, p.733–748, 2011.

Visniauskas B., et al. Angiotensin I converting enzyme (ACE) activity and expression in rat central nervous system after sleep deprivation. **Biol Chem**, v.392, p. 547-553, 2011.

Wang H., et al. Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. **J Neurosci**, v.31 p.7986-7992, 2005.

Wei T., et al. Keratinocyte expression of inflammatory mediators plays a crucial role in substance P-induced acute and chronic pain. **J Neuroinflammation**, v.9, p.181, 2012.

Li W.W., et al. Signaling Controls Mast Cell Activation, Degranulation, and Nociceptive Sensitization in a Rat Fracture Model of Complex Regional Pain Syndrome **Anesthesiology**, v.116, p. 882–895, 2012.

Zhang X., et al. Carboxypeptidase M and kinin B1 receptors interact to facilitate efficient b1 signaling from B2 agonists. **J Biol Chem**, v. 283, p. 7994-8004, 2008.

Zhang X., Tan F., Skidgel R.A. Carboxypeptidase M is a positive allosteric modulator of the kinin B1 receptor. **J Biol Chem**, v. 288, p. 33226-33240, 2013a.

Zhang X., Tan F., Skidgel R.A. Carboxypeptidase M is a positive allosteric modulator of the kinin B1 receptor. **J Biol Chem**, v. 288, p. 33226-33240, 2013b.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p.109–110, 1983.

5 DISCUSSÃO

A fibromialgia é uma doença crônica potencialmente incapacitante, caracterizada principalmente por dor generalizada além de não possuir patofisiologia específica ou diagnóstico e tratamento adequados (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; CHOY, 2015; CLAUW, 2014). Nossos resultados demonstraram que a administração de reserpina causou uma série de alterações comportamentais (nociceção) e bioquímicas associadas à fibromialgia, como já foi relatado em humanos e em animais experimentais (NAGAKURA et al., 2009; VESELINOVI et al., 2011). Embora a administração de reserpina possa causar alguns efeitos adversos, em nossos experimentos observamos que a capacidade do animal em retirar a pata no teste de alodínia mecânica e ao frio já foi um indicativo de que a reserpina não causou prejuízo motor, o que foi confirmado pela velocidade e distância percorrida pelo animal no aparato de tigmotaxia e no teste de catalepsia, assim como a reserpina não alterou a temperatura e o peso corporal dos animais. Além disso, a deleção do gene do receptor B₁ e B₂ de cininas e/ou o antagonismo desses receptores reduziram a alodínia mecânica e ao frio e a nociceção espontânea induzida por reserpina. Ainda, a reserpina aumentou a expressão do receptor B₁ e B₂ de cininas na medula espinhal e no córtex cerebral, e os níveis de bradicinina no nervo ciático e córtex cerebral dos animais. Isso indica um envolvimento das cininas e seus receptores B₁ e B₂ na dor do tipo fibromialgia.

Além de dor crônica generalizada, a fibromialgia apresenta uma variedade de comorbidades como fadiga, sono não reparador, depressão (CHOY, 2015; ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016) e hipertensão, a qual é uma das mais frequentes, afetando 12-40% dos pacientes com fibromialgia (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; HAVILAND; BANTA; PRZEKOP, 2011). Os inibidores da ECA são fármacos anti-hipertensivos amplamente utilizados que têm sido associados a um aumento de condições dolorosas por bloquear a degradação de neuropeptídios e agir sobre os receptores de cininas (de MOS et al., 2009; BORSOOK; SAVA, 2009; SILVA et al., 2016; BRUSCO et al., 2017a). Nós observamos que os inibidores da ECA potencializaram a alodínia mecânica induzida pela reserpina no modelo de dor tipo fibromialgia e esse aumento foi prevenido pelos antagonistas dos receptores de cininas. Injeções intraplantar de bradicinina e substância P causaram nociceção espontânea e aumentaram a alodínia mecânica em animais tratados com reserpina. A administração de reserpina plus inibidores da ECA aumentou os níveis de bradicinina e inibiu a atividade da ECA em estruturas envolvidas na modulação da dor. Além disso, o inibidor da cininase I mergepta reverteu a alodínia mecânica e ao frio induzida pela reserpina. Isso indica que o

tratamento da hipertensão com inibidores da ECA por pacientes com fibromialgia deve ser revisado, uma vez que estes poderiam potencializar os sintomas dolorosos dos pacientes.

Primeiramente, foi demonstrado que a reserpina causou alodínia mecânica nos animais como previamente relatado (NAGAKURA et al., 2009; TAGUCHI et al., 2015). A alodínia é uma das principais características da fibromialgia que se manifesta clinicamente nos pacientes como dor em resposta a um toque leve (CHOY, 2015). Aqui, os antagonistas dos receptores B₁ e B₂ de cininas ou a deleção do gene do receptor B₁ e B₂ reduziram a alodínia mecânica induzida por reserpina. De fato, tem sido encontrado que a administração sistêmica de antagonistas dos receptores B₁ ou B₂ e a deficiência de ambos os receptores reduzem a hipersensibilidade mecânica em modelos animais de dor crônica (BRUSCO et al., 2017a; FERREIRA et al., 2005; QUINTÃO et al., 2008; YAMAGUCHI-SASE et al., 2003).

Como mencionado anteriormente, a hipertensão é uma comorbidade comum de pacientes com fibromialgia (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; HAVILAND; BANTA; PRZEKOP, 2011) a qual geralmente é tratada com fármacos inibidores da ECA (MANCIA et al., 2013). Nós evidenciamos que a administração sistêmica de dois inibidores da ECA, enalapril e captopril, aumentou a alodínia mecânica induzida pela reserpina sem alterar a atividade locomotora dos camundongos. Similar aos nossos achados, os inibidores da ECA têm potencializado a alodínia mecânica em modelos animais de dor aguda e crônica (BRUSCO et al., 2017a; SILVA et al., 2016). Estudos clínicos também indicam que o uso de inibidores da ECA aumenta a dor em pacientes com gota (CHOI et al., 2012) e síndrome da dor regional complexa (BORSOOK; SAVA, 2009; de MOS et al., 2009).

Curiosamente, além da tosse, a dor envolvendo qualquer parte do corpo, é considerada como efeito adverso de fármacos inibidores da ECA (WANG et al., 2005). Coincidentemente, os pacientes com fibromialgia apresentam sintomas semelhantes aos causados pelos inibidores da ECA, caracterizados por dor generalizada crônica (CHOY et al., 2015). Os inibidores da ECA podem induzir dor generalizada através de mecanismos periféricos e centrais, uma vez que esses fármacos reduzem o limiar de ativação de neurônios sensoriais (BORSOOK; SAVA, 2009), sugerindo que os inibidores da ECA podem potencializar a percepção da dor em pacientes com fibromialgia. Consistente com esses dados, o tratamento com inibidores da ECA em pacientes hipertensos normaliza a pressão arterial, mas aumenta a sensibilidade à dor (GUAISTI et al., 2002; TURAN et al., 2013). Embora os inibidores da ECA não afetem o início da resposta neuro-inflamatória, eles facilitam sua progressão para um estado patológico, uma vez que podem aumentar uma resposta que tenha sido iniciada por um gatilho prévio (de MOS et al., 2009).

Os inibidores da ECA também podem aumentar a sensibilidade à dor por interagirem com os receptores B₁ e B₂ de cininas (BOIX et al., 2005; BRUSCO et al., 2017a; SILVA et al., 2016). Nós observamos que a potencialização da alodínia mecânica causada pela administração de reserpina plus inibidores da ECA foi reduzida pelos antagonistas dos receptores B₁ e B₂ de cininas. Uma vez que, os inibidores da ECA são conhecidos como agonistas alostéricos diretos do receptor B₁ de cininas (ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010; NEGRAES et al., 2015) e como potencializadores alostéricos indiretos do receptor B₂ de cininas (CHEN et al., 2006; ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010) esses resultados reforçam o envolvimento de ambos os receptores de cininas na dor induzida por reserpina, e são consistentes com estudos anteriores, que associam o aumento da dor causada por inibidores da ECA com sua ação sobre as cininas e seus receptores (BOIX et al., 2005; BRUSCO et al., 2017a; SILVA et al., 2016). Além disso, similar aos nossos resultados, o potencial de antagonistas dos receptores de cininas em prevenir o aumento da dor crônica induzida por inibidores da ECA tem sido previamente demonstrado (BRUSCO et al., 2017a).

Além da alodínia mecânica, pacientes com fibromialgia frequentemente relatam dor quando em contato com temperaturas frias (REHM et al., 2010; POTVIN, MARCHAND, 2016). A reserpina induziu alodínia ao frio nos animais, como relatado por NAGAKURA et al. (2012), a qual foi revertida pelos antagonistas dos receptores B₁ e B₂ de cininas, porém não foi alterada pelos inibidores da ECA. Este efeito também tem sido previamente atribuído ao antagonismo dos receptores de cininas em um modelo de dor crônica (WERNER et al., 2007). Estímulos dolorosos, mecânicos ou térmicos, são conduzidos ao sistema nervoso central por neurônios sensoriais nociceptivos como fibras C e A δ (BASBAUM et al 2009; GRACE et al., 2014). Uma vez que os receptores B₁ e B₂ de cininas estão presentes nesses neurônios e em outros elementos neurais sensoriais é possível fundamentar seu envolvimento na modulação da dor a partir de estímulos nociceptivos mecânicos e frios (MA, 2001; FERREIRA et al., 2002; MARCEAU; REGOLI, 2004).

Além da dor evocada por estímulos mecânicos ou térmicos, a ativação de ambos os receptores de cininas em neurônios sensoriais também desencadeia dor espontânea (BRUSCO et al., 2017a; COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, 2009; WERNER et al., 2007). A dor espontânea nos músculos ou nas articulações é uma manifestação clínica que também tem sido relatada por pacientes com fibromialgia (REHM et al., 2010). Consistente com achados prévios em modelos de dor crônica (WERNER et al., 2007; BRUSCO et al., 2017a), agonistas do receptor B₁ ou B₂ de cininas, bradicinina e DABk (em doses que normalmente não causam

nocicepção) induziram comportamento nociceptivo em animais tratados com reserpina, o qual foi prevenido por antagonistas desses receptores.

Além de causar comportamento nociceptivo espontâneo, doses submáximas de bradicinina aumentaram a alodínia mecânica induzida por reserpina. Os mesmos resultados foram observados após a administração de substância P. Tanto a bradicinina como a substância P são degradadas pela ECA, logo, além dos efeitos alostéricos sobre os receptores de cininas, a potencialização da sensibilidade dolorosa induzida pelos inibidores da ECA tem sido associada ao aumento dos níveis desses peptídeos (BORSOOK; SAVA, 2009; de MOS et al., 2009). Esses resultados reforçam o envolvimento das cininas na potencialização da dor induzida pelos inibidores da ECA (BRUSCO et al., 2017a; SILVA et al., 2016), uma vez que a bradicinina exerce seus efeitos dolorosos através da ativação do receptor B₂ de cininas e é substrato para a enzima cininase I que forma agonistas do receptor B₁ (ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010; KASHUBA et al., 2013).

Além da geração dos agonistas do receptor B₁ e dos efeitos alostéricos sobre esse receptor, ao se ligar à bradicinina, a enzima cininase I forma um complexo com o receptor B₁ resultando em sua ativação (ZHANG et al., 2008; ZHANG, X.; TAN, F.; SKIDGEL, 2013 ab). Nós demonstramos que a reserpina aumentou a atividade da enzima cininase I no córtex cerebral dos animais. Além disso, a reserpina ou reserpina plus mergepta, um inibidor da cininase I, aumentaram os níveis de bradicinina no nervo ciático e no córtex cerebral. Adicionalmente, o mergepta também reduziu a alodínia mecânica e ao frio induzida pela reserpina. Esses dados ampliam as evidências de que a reserpina induz sintoma de dor tipo fibromialgia, por agir em ambos os receptores B₁ e B₂ de cininas e que os inibidores da ECA poderiam potencializar essa dor, uma vez que a inibição da ECA previne a degradação da bradicinina que é substrato e modulador da cininase I (ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010; ZHANG, X.; TAN, F.; SKIDGEL, 2013b).

A nocicepção espontânea também pode ser avaliada de forma indireta pelo teste de burrowing, o qual mimetiza o comportamento social normal dos animais e envolve mecanismos supraespinhais que contribuem para os fenótipos sensoriais e afetivos da dor (ANDREWS et al., 2011). Sua supressão reflete o impacto global da dor na redução do bem-estar do animal, o qual também está comprometido em pacientes com dor crônica (ANDREWS et al., 2011, 2012; WODARSKI et al., 2016). A reserpina diminuiu o comportamento de burrowing dos animais, similar ao que ocorre em modelos de dor crônica (ANDREWS et al., 2012; HUANG et al., 2013; LAU et al., 2013) o qual foi revertido apenas pelo antagonista do receptor B₁, mas não do receptor B₂. Esse resultado pode ser explicado,

uma vez que o teste de burrowing também avalia comportamentos depressivos associados à dor (DEACON, 2006; WODARSKI et al., 2016) os quais têm sido inibidos pelo antagonista do receptor B₁, mas não B₂ (VIANA et al., 2010). Além disso, a pregabalina não foi capaz de reverter essa alteração no comportamento de burrowing. Esses resultados corroboram com achados clínicos, que demonstram que a pregabalina não tem efeito sobre os sintomas depressivos na fibromialgia (ÜÇEYLER et al., 2013; MACFARLANE et al., 2017).

Similar ao comportamento burrowing, a tigmotaxia também é um comportamento natural do animal que envolve eventos conflitantes como a proteção à predadores. O aumento desse comportamento está associado a uma medida protetora em modelos de dor crônica (HUANG et al., 2013). Em acordo com isso, a reserpina aumentou o comportamento de tigmotaxia, o qual não foi revertido pelos antagonistas dos receptores de cininas. Esses resultados não são inesperados, uma vez que a tigmotaxia também mensura a ansiedade, uma comorbidade da fibromialgia (CLAUW, 2015; HUANG et al., 2013), cujo o envolvimento das cininas é controverso (ANJOS et al., 2016; BHATTACHARYA; MOHAN RAO; SEN, 1995). Adicionalmente, também observamos que a reserpina reduziu a força muscular dos animais no Grip teste, um teste sensível para parâmetros dolorosos em animais (MONTILLA-GARCÍA et al., 2017). Esse resultado pode ser associado a algum grau de fraqueza muscular que é característica de pacientes com fibromialgia (LARSSON, et al., 2015).

Os sintomas dolorosos da fibromialgia podem ocorrer devido a alterações no sistema nervoso central, tais como uma disfunção da modulação descendente da dor devido à depleção de monoaminas (CHOY, 2015; CLAUW, 2015). A reserpina reduziu os níveis de monoaminas dopamina e serotonina na medula espinhal e no córtex cerebral dos animais, de acordo com estudos anteriores (de SOUZA et al., 2014; KLEIN et al., 2014; NAGAKURA et al., 2009). É importante ressaltar que níveis reduzidos dessas monoaminas também foram demonstrados no líquido cefalorraquidiano de pacientes com fibromialgia (CHOY, 2015; RUSSELL, 1992).

Na fibromialgia também ocorre um aumento da excitabilidade dos neurônios da medula espinhal e uma maior ativação neural no córtex cerebral, além de alterações dos neurônios sensoriais periféricos (CHOY, 2015; DOPPLER, 2015; TAGUCHI et al., 2015). É importante notar que os receptores de cininas B₁ e B₂ são expressos no sistema nervoso periférico e central e podem ser regulados positivamente em condições inflamatórias e dolorosas (BRUSCO et al., 2017a; FERREIRA et al., 2005; MA et al., 2001; SILVA et al., 2016). Em acordo com esses dados, nós demonstramos que a reserpina aumentou a expressão

do receptor B₁ e B₂ de cininas na medula espinhal e no córtex cerebral dos camundongos, corroborando com outros modelos de dor crônica (FERREIRA et al., 2002; 2005; QUINTÃO et al., 2008).

Além de mecanismos centrais, fatores periféricos contribuem para as características pré-clínicas e clínicas da fibromialgia (LITTLEJOHN, 2015; TAGUCHI et al., 2015). Esses mecanismos incluem a inflamação neurogênica, a qual também contribui para a sensibilização central, pela liberação de neuropeptídios pró-inflamatórios como a substância P, a partir de neurônios sensoriais. Células inflamatórias periféricas também contribuem para esse processo liberando várias substâncias neuroativas e vasoativas, incluindo a bradicinina (LITTLEJOHN, 2015).

A substância P é um neuropeptídeo que facilita a transmissão da dor na fibromialgia (CLAUW, 2015). Ela ainda aumenta a excitabilidade dos neurônios no corno dorsal contribuindo para a transmissão da dor e o aumento da resposta aos estímulos dolorosos (BORSOOK, SAVA, 2009, CHOY, 2015; CLAUW, 2015). Além disso, a substância P pode ser liberada após a ativação antidrômica de fibras C peptidérgicas, iniciada por um reflexo axonal ou do corno dorsal, contribuindo para a sensibilização periférica (LITTLEJOHN, 2015). A substância P é também um potente mediador da inflamação neurogênica, característica da fibromialgia, através de mecanismos periféricos e centrais (de MOS, 2009; LITTLEJOHN, 2015). Esses dados corroboram com nossos achados, onde a substância P causou comportamento nociceptivo espontâneo e aumentou a alodínia mecânica no modelo de dor do tipo fibromialgia induzido por reserpina.

Consistente com os parâmetros nociceptivos, nós também observamos níveis aumentados de peptídeos relacionados à bradicinina no nervo ciático e córtex cerebral dos animais após a administração de reserpina. Já a administração de reserpina plus inibidores da ECA aumentou os níveis de bradicinina nessas estruturas e também na medula espinhal. De fato, a bradicinina contribui para a sensibilização periférica e central envolvida no aumento da sensibilidade à dor na fibromialgia (CLAUW, 2014; STAUD; SMITHERMAN, 2002; WANG et al., 2005) e com a patogênese da dor musculoesquelética crônica, um dos sintomas mais relevantes da fibromialgia (CLAUW, 2014, PINHEIRO et al., 2013). Aqui, os inibidores da ECA potencializaram o aumento dos níveis de bradicinina apenas no córtex cerebral, mas não no nervo ciático ou na medula espinhal. Esses resultados podem ser explicados, uma vez que nem sempre há um aumento nos níveis de cininas após o tratamento com inibidores da ECA (BRUSCO et al., 2017a; ERDÖS; TAN; SKIDGEL, 2010), isto porque, essas drogas

podem potencializar as ações das cininas não necessariamente por inibir a sua degradação, isto é, independente do bloqueio da atividade da ECA (SIVIERI et al., 2007).

Como a ECA é responsável pela degradação da bradicinina (de MOS et al., 2009) e nós observamos níveis aumentados desse peptídeo após a administração de inibidores da ECA, a atividade da ECA também foi avaliada em estruturas periféricas e centrais envolvidas na modulação da dor. A administração de reserpina associada com; inibidores da ECA inibiu a atividade da ECA no nervo ciático, na medula espinhal e no córtex cerebral dos animais. Esses resultados são consistentes com dados anteriores que mostraram uma ampla distribuição da ECA em vários tecidos, incluindo estruturas do sistema nervoso periférico e central, como células dendríticas, cérebro, nervos, líquido cefalorraquidiano, neurônios, córtex cerebral, medula espinhal, entre outros (KRAMER et al., 2005; VISNIAUSKAS et al., 2011; KASHUBA et al., 2013; KAUR; MUTHURAMAN; KAUR, 2015).

Ogata et al. (2016) também demonstrou um aumento da expressão da ECA espinhal o qual foi associado ao desenvolvimento de alodínia em um modelo de dor neuropática. Similar aos nossos achados, a administração de inibidores da ECA em animais submetidos a modelos de dor crônica tem inibido a atividade da ECA no soro e em tecidos periféricos, incluindo o nervo ciático (BRUSCO et al., 2017a; SILVA et al., 2016). Um grande achado foi a associação entre o polimorfismo do gene da ECA com a suscetibilidade para o desenvolvimento de fibromialgia (INANIR et al., 2015), reforçando nossa evidência de que os inibidores da ECA podem aumentar a dor em pacientes com dor associada a fibromialgia.

Além da hipertensão, pacientes com fibromialgia também apresentam outras comorbidades como a depressão, a qual pode estar associada à depleção de monoaminas no sistema nervoso central que ocorre em ambas as doenças (CLAUW, 2014; CHOY, 2015; NAGAKURA et al., 2009). Consistente com achados prévios (KLEIN et al., 2014; NAGAKURA et al., 2009; de SOUZA et al., 2014), a reserpina aumentou o tempo de imobilidade dos camundongos no teste de nado forçado, o qual mede comportamentos tipo depressivos em animais, semelhante a uma condição de depressão em humanos (KLEIN et al., 2014; de SOUZA et al., 2014). Assim, o modelo animal de fibromialgia induzido por reserpina causou não apenas sintomas dolorosos, mas também um comportamento associado à depressão (NAGAKURA et al., 2009).

Os sintomas comorbidos da fibromialgia, como a depressão e a hipertensão, são de grande importância, pois são os principais responsáveis pela busca por cuidados médicos (HAVILAND; BANTA; PRZEKOP, 2011). A hipertensão é a comorbidade cardiovascular mais frequente em pacientes com fibromialgia, ocorrendo em até 41,8% deles (GORE et al.,

2010). Como os inibidores da ECA são uma classe de medicamentos comumente usados para tratar a hipertensão (MARCEAU; REGOLI, 2004; MANCIA et al., 2013), nossos resultados sugerem que o uso de inibidores da ECA poderia potencializar os sintomas dolorosos em pacientes com fibromialgia. De acordo com estudos prévios, drogas que induzem sensibilização periférica e central, como os inibidores da ECA, poderiam potencializar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dor (BORSOOK; SAVA, 2009), como os que ocorrem na fibromialgia. Além disso, nós evidenciamos o envolvimento dos receptores B₁ e B₂ de cininas na potencialização da dor do tipo fibromialgia induzida pelos inibidores da ECA. Esses dados estendem achados prévios sobre o envolvimento de ambos os receptores de cininas no aumento da dor induzida por esses fármacos (BOIX et al., 2005; BRUSCO et al., 2017a).

Embora a patogênese da fibromialgia ainda não tenha sido completamente elucidada (CLAUW, 2014; ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016), a pregabalina é uma das principais terapias recomendadas para o seu tratamento (MACFARLANE et al., 2016). Similar à modelos prévios de fibromialgia (KLEIN et al., 2014; NAGAKURA et al., 2009; de SOUZA et al., 2014) a pregabalina foi eficaz na redução da alodínia mecânica induzida pela reserpina. Além disso, a pregabalina também reduziu a alodínia ao frio induzida por reserpina, corroborando com estudos anteriores em modelos de dor crônica (GUSTAFSSON; SANDIN, 2009; WANG et al., 2017). No entanto, a pregabalina, em uma dose que não compromete a atividade locomotora dos animais (SAŁAT et al., 2014), não interferiu nas alterações induzidas pela reserpina no comportamento de burrowing e tigmotaxia. Tal resultado estaria associado ao baixo efeito da pregabalina nos sintomas de depressão e ansiedade nos pacientes com fibromialgia (ÜÇEYLER et al., 2013). Além disso, a pregabalina apresenta um alívio médio da dor de apenas 50% (ÜÇEYLER et al., 2013) e seu uso crônico pode causar vários efeitos adversos, incluindo tontura, sonolência, boca seca, edema, visão turva, ganho de peso e pensamento anormal, o que limita o seu uso (ARNOLD; GEBKE; CHOY, 2016; CLAUW, 2015).

Desta forma, é importante elucidar as alterações patofisiológicas da fibromialgia para buscar terapias que não visem apenas os sintomas, mas também os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa condição dolorosa. Nesse sentido, nossos resultados mostraram que os receptores B₁ e B₂ de cininas estão envolvidos na dor associada à fibromialgia em um modelo induzido por reserpina. Esses resultados estendem descobertas anteriores sobre o envolvimento de ambos os receptores de cininas em condições dolorosas crônicas (BRUSCO et al., 2017a; QUINTÃO et al., 2008; WERNER et al., 2007). É importante notar que estudos

de triagem clínica tem demonstrado que o Icatibant, antagonista do receptor B₂ de cininas é eficaz no tratamento do angioedema hereditário, não apresenta efeitos adversos graves e é bem tolerado pelos pacientes (BAŞ, 2012; LUMRY et al., 2015). Portanto, antagonistas dos receptores B₁ e B₂ de cininas podem representar um potencial terapêutico para o controle da dor associada à fibromialgia, a qual é a característica clínica mais relevante da doença. Esses antagonistas podem ser eficazes também em pacientes com fibromialgia e que estão sob tratamento com inibidores da ECA.

6 CONCLUSÃO

As cininas e seus receptores B₁ e B₂ estão envolvidos no sintoma de dor do tipo fibromialgia, um dos principais sintomas dessa doença, em um modelo animal induzido por reserpina. Logo, antagonistas dos receptores B₁ ou B₂ de cininas podem representar um potencial terapêutico para o controle da dor em pacientes com fibromialgia. Além disso, nós evidenciamos o envolvimento dos receptores B₁ e B₂ de cininas na propensão aumentada para a dor do tipo fibromialgia em resposta a administração sistêmica de fármacos inibidores da ECA. Nossos resultados sugerem que a terapia com inibidores da ECA em pacientes hipertensos e com fibromialgia requer uma análise cuidadosa, uma vez que eles podem potencializar os sintomas dolorosos destes pacientes. Logo, o tratamento da hipertensão em pacientes com fibromialgia poderia incluir outras classes de medicamentos anti-hipertensivos.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar a dosagem de substância P e dos metabólitos das cininas (des-Arg-cininas) após a administração de reserpina e reserpina associada com inibidores da ECA.
- Avaliar a expressão dos receptores B₁ e B₂ de cininas após a administração de reserpina associada com inibidores da ECA.
- Realizar um estudo clínico em pacientes com fibromialgia e hipertensos que fazem uso de fármacos inibidores da ECA e compará-los com pacientes com fibromialgia, mas não hipertensos.

REFERÊNCIAS

- ABELOUS, J.E.; BARDIER, E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. **CR Seances Socie Biol**, v.66, p.511, 1909.
- AMIR, R., et al. Oscillatory mechanism in primary sensory neurons. **Brain** v.125, p. 421–435, 2002.
- ANDREWS, N., et al. Novel, nonreflex tests detect analgesic action in rodents at clinically relevant concentrations. **Ann N Y Acad Sci**, v.1245, p. 11e3, 2011.
- ANDREWS, N., et al. Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. **Eur J Pain**, v. 16, p. 485–495, 2012.
- ANJOS, L.C., et al. Anxiolytic activity and evaluation of potentially adverse effects of a bradykinin-related peptide isolated from a social wasp venom. **Life Sci.**, v.149, p.153-159, 2016.
- ARNOLD, L.M., GEBKE, K.B., CHOY, E.H. Fibromyalgia: management strategies for primary care providers. **Int J Clin Pract**, v.70, p. 99-112, 2016.
- ASHBURN, M.A.; STAATS, P.S. Management of chronic pain. **Lancet**, v.353, p.1865-1869, 1999.
- BAJIC, D.; PROUDFIT, H.K. Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. **J Comp Neurol**, v.405, p.359–379, 1999.
- BARRETT, K.E. et al. **Fisiologia Médica de Ganong**. 24^a ed. São Paulo: AMGH Ltda, 2014. cap.32, p.598.
- BASBAUM, A.I., FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu Rev Neurosci**, v.7, p.309-338, 1984.
- BASBAUM, A.I., et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139, p.267-284, 2009.
- BAŞ, M. Clinical efficacy of icatibant in the treatment of acute hereditary angioedema during the FAST-3 trial. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 8, p. 707–717, 2012.
- BEECHER, H.K. Pain in men wounded in battle. **Ann Surg**, v. 123, p.96–105, 1946.
- BENARROCH, E.E. Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. **Neurology** v.71, p.217-21, 2008.
- BHATTACHARYA, S.K.; MOHAN RAO, P.J.R.; SEN, A.P. Anxiogenic activity of intraventricularly administered bradykinin in rats. **J Psychopharmacol** v.9, p.348-354, 1995.
- BHOOLA, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol Rev**, v. 44, p. 1-44. 1992.

BINGEL, U.; TRACEY, I. Imaging CNS modulation of pain in humans. **Physiology (Bethesda)**, v. 23 p.371–380, 2008.

BINGHAM, B., et al. The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v.5, p. 28-37, 2009.

BLANCO, I., et al. Abnormal overexpression of mastocytes in skin biopsies of fibromyalgia patients. **Clin Rheumatol**, v.29, p.1403–1412, 2010.

BLAUKAT, A. Structure and signalling pathways of kinin receptors. **Andrologia**, v. 35, p. 17-23. 2003.

BOIX, F., et al. Kinin peptides in human trapezius muscle during sustained isometric contraction and their relation to pain. **J Appl Physiol**. v.98, p. 534 –540, 2005.

BOADAS-VAELLO, P., et al. Neuroplasticity of ascending and descending pathways after somatosensory system injury: reviewing knowledge to identify neuropathic pain therapeutic targets. **Spinal Cord**, v.54, p.330-40, 2016.

BORSOOK, D.; SAVA, S. Pain: Do ACE inhibitors exacerbate complex regional pain syndrome? **Nat Rev Neurol.**, v.5, p.306-308, 2009.

BRUSCO, I., et al. Potentiation of Paclitaxel-Induced Pain Syndrome in Mice by Angiotensin I Converting Enzyme Inhibition and Involvement of Kinins. **Mol Neurobiol.**, v.54, p.7824-7837, 2017a.

BRUSCO, I., et al. α -Spinasterol: a COX inhibitor and a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist presents an antinociceptive effect in clinically relevant models of pain in mice. **Br J Pharmacol.**, v.174, p.4247-4262, 2017b.

CALIXTO, J.B. et al. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, p.1-5, 2000.

CALIXTO, J.B. et al. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Curr Opin Anesthesiol**, v.14, p. 519-526, 2001.

CALIXTO, J.B. et al. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br J Pharmacol**, v.143, p. 803-818, 2004.

CAMPBELL, D.J. The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 35, p. 784-791. 2003.

CASSIM, B.; MODY, G.; BHOOLA, K. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. **Pharmacol Therapeut**, v.94, p.1-34, 2002.

CASSIM, B., et al. Kallikreins, kininogens and kinin receptors on circulating and synovial fluid neutrophils: role in kinin generation in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v.48, p.490-6, 2009.

CATERINA, M.J., GOLD, M.S., MEYER, R.A. **Molecular biology of nociceptors**. In Hunt S, Koltzenburg M, editors: *The neurobiology of pain*, Oxford: Oxford University Press, 2005, p.1–33.

CATERINA, M.J., et al: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature** v.389, p.816–824, 1997.

CHEN, Z. et al. Human ACE and bradykinin B2 receptors form a complex at the plasma membrane. **FASEB J.** v. 20, p. 2261–2270, 2006.

CHEN Q., et al. Optogenetic Evidence for a Direct Circuit Linking Nociceptive Transmission through the Parabrachial Complex with Pain-Modulating Neurons of the Rostral Ventromedial Medulla (RVM). **eNeuro**. v.4. pii: ENEURO.0202-17, 2017.

CHOI, H.K., et al. Antihypertensive drugs and risk of incident gout among patients with hypertension: population based case-control study. **BMJ**, v.344, p. d8190., 2012.

CHOY, E.H.S. The role of sleep in pain and fibromyalgia. **Nat Rev Rheumatol**, v.11, p.513–520, 2015.

CLAUW, D.J. Fibromyalgia a clinical review. **JAMA**, v. 311, p.1547-1555, 2014.

CLAUW, D.J. Fibromyalgia and related conditions. **Mayo Clin Proc.**, v. 90, p. 680-692, 2015.

CLEARY, D.R; NEUBERT, M.J.; HEINRICHER, M.M. Are opioid-sensitive neurons in the rostral ventromedial medulla inhibitory interneurons? **Neuroscience**, v.151, p. 564-571, 2008.

COLLOCA, L., et al. Neuropathic pain. **Nat Rev Dis Primers**, v.16; 3: 17002., 2017.

COLMAN, R.W. Inhibitory and antiadhesive properties of human kininogens. **Immunopharmacology**, v.32, p. 9–18, 1996.

COLMAN, R.W. Regulation of angiogenesis by the kallikrein-kinin system. **Curr Pharmaceutical Des**, v.12, p.2599–2607, 2006.

CORVOL, P.; EYRIES, M.; SOUBRIER, F. Peptidyl-dipeptidase A/angiotensin I-converting enzyme. **Barrett, AJ.; Rawlings, ND.; Woessner, JF. Handbook of Proteolytic Enzymes**. San Diego, CA: Academic Press; 2004, ed. 2, v.1, p. 332-346.

COSTA R., et al. Kinin receptors sensitize TRPV4 channel and induce mechanical hyperalgesia: relevance to paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice. **Mol Neurobiol**, v.55, p.2150-2161, 2018.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Neuropathic pain: a maladaptive response of nervous system to damage. **Ann Rev Neurosci**, v.32, p.1-32, 2009.

COULL, J.A.M., et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain, **Nature**, v.438, p.1017–1021, 2005.

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

COSTEROUSSÉ, O., et al. Angiotensin converting enzyme (kininase II). Molecular and physiological aspects. **C R Seances Soc Biol Fil**, v. 186, p. 586-598. 1992.

CUSHMAN, D.W.; ONDETTI, M.A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v.17, p.589-592, 1991.

DEACON, R.M.J. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. **Nat Protocol.**, v. 1, p. 118-121, 2006.

de SOUZA, A.H. et al. The effects of Ph α 1 β , a spider toxin, calcium channel blocker, in a mouse fibromyalgia model. **Toxicon**, v.81, p.37-42, 2014.

DEVO, M. Neuropathic Pain: Pathophysiological Response of Nerves to Injury. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone, 2013, ed. 6, cap, 61, p. 861-888.

D'MELLO, R., DICKENSON, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br J Anaesth**, v.101, p.8-16, 2008.

de MOS M., et al. The association between ACE inhibitors and the complex regional pain syndrome: Suggestions for a neuro-inflammatory pathogenesis of CRPS. **Pain**, v.142, p. 218–224, 2009.

DOGRUL, A.; OSSIPOV, M.H.; PORRECA, F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. **Brain Res**, v.1280, p.52–59, 2009.

DOPPLER, K., et al. Reduced dermal nerve fiber diameter in skin biopsies of patients with fibromyalgia. **Pain**, v.156, p. 2319-2325, 2015.

DOSTROVSKY, J.O., CRAIG, A.D. Sistemas de Projeção Ascendente. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone, 2013, ed.6 cap.12, p. 182-197.

DUTRA, R.C. Kinin receptors: Key regulators of autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v.16, p. 192-207, 2017.

EHRENFELD, P., et al. Activation of kinin B1 receptors induces chemotaxis of human neutrophils. **J Leukoc Biol**, v. 80, p. 117-124. 2006.

EHRENFELD, P.; FIGUEROA, C.D.; BHOOLA, K.D. Kinin: kallikreins and kinins in cancer. In: Bader M, editor. **Kinin. De Gruyter**, p. 217–245, 2011.

ERDÖS, E.G. Enzymes that inactivates active polypeptides. **Biochem Pharmacol**, v.8, p. 21, 1961.

ERDÖS, E.G.; TAN, F.; SKIDGEL, R.A. Angiotensin I–Converting Enzyme Inhibitors Are Allosteric Enhancers of Kinin B1 and B2 Receptor Function. **Hypertension**, v. 55, p. 214-20. 2010.

FERREIRA, S.H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Br J Pharmacol Chemother**. v.24, p.163-169, 1965.

FERREIRA, J. et al. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology**, v.43, p.1188–1197, 2002.

FERREIRA, J., et al. Reduced nerve injury induced neuropathic pain in kinin B 1 receptor knock-out mice. **Receptor**, v., 25, p. 2405–2412, 2005.

FERREIRA, J. et al. The role of kinin B1 receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. **Neuropharmacology**, v. 54, p. 597–604, 2008.

FERRARIO, C.M., et al. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. **Hypertension**, v.18, p.126e133, 1991.

FIELDS, H.L., et al. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. **J Neurosci**, v.3, p. 2545–2552, 1983.

FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Nat Rev Neurosci**, v.5, p. 565-575, 2004.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; HEINRICHER, M.M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. **McMahon S, Koltzenburg M, eds. Textbook of Pain**, Burlington, Massachusetts, USA: Elsevier Health Sciences; 2005, ed. 5, p.125–142.

FRANÇOIS, A., et al. A brainstem-spinal cord inhibitory circuit for mechanical pain modulation by GABA and enkephalins. **Neuron**, v.93, p.822-839, 2017.

FRANGUE, C., et al. Fibromyalgia and Sleep in Animal Models: A Current Overview and Future Directions. **Curr Pain Headache Rep**, v.18, p.434, 2014.

GASSNER, M.; RUSCHEWEYH, R.; SANDKUHLER, J. Direct excitation of spinal GABAergic interneurons by noradrenaline. **Pain**, v.145, p.204–210, 2009.

GAURIAU, C.; BERNARD, J.F. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. **Exp Physiol**, v.87, p.251–258, 2002.

GEBHART, G.F.; BIELEFELDT, K. Physiology of visceral pain. **Compr Physiol**, v.6, p.1609-1633, 2016.

GOLD, M.S. Molecular Biology of Sensory Transduction. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone, 2013, ed.6, cap.2, p. 31-32.

GRACE, P.M., et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nat Rev Immun**, v. 14, p. 217 -231, 2014.

GROGER, M. et al. Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 25, p. 978–989, 2005.

GUASTI, L. et al. Changes in pain perception during treatment with angiotensin converting enzyme-inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockade. **J Hypertens** v.20, p.485-491, 2002.

GUIMARÃES, J.A. et al. Kinin-converting aminopeptidase from human serum. **Biochem Pharmacol**, v. 22, p. 3157-3172, 1973.

GUSTAFSSON, H.; SANDIN, J. Oral pregabalin reverses cold allodynia in two distinct models of peripheral neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 605, 103–108, 2009.

HABERMANN, E. On pH-related modifications of kinin-producing alpha-globulin (kininogen) from bovine serum and the molecular weight of kininogen I. **Biochem Z**, v.337, p.440-448, 1963.

HAVILAND, M.G., BANTA, J.E., PRZEKOP P. Fibromyalgia: prevalence, course, and comorbidities in hospitalised patients in the United States, 1999-2007. **Clin Exp Rheumatol** v.29, p.S79-87, 2011.

HARRIS, R.E. et al. Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia. **J Neurosci**, v.27, p.10000-10006, 2007.

HÄUSER, W. et al. Fibromyalgia. **Nat Rev Dis Primers**, v.1, p.15022, 2015.

HE, D., et al. Methodology for self-report of rest pain (or spontaneous pain) vs evoked pain in chronic neuropathic conditions: a prospective observational pilot study **Pain reports**, v.2, p. e587, 2017.

HEINRICHER, M.M.; INGRAM, S.L. The brainstem and nociceptive modulation. **Bushnell MC, Basbaum AI, The senses, a comprehensive reference**: San Diego, CA, Pain. Academic Press, 2008, v. 5, p.593–626.

HEINRICHER, M.M., et al. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. **Brain Res Rev**, v. 60, p.214–225, 2009.

HEINRICHER, M.M.; FIELDS, H.F. Central nervous system mechanisms of pain modulation. all and Melzack's Textbook of Pain. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone, 2013, ed.6, cap. 8, p.129-142.

HUANG, W. et al. A clinically relevant rodent model of the HIV antiretroviral drug stavudine induced painful peripheral neuropathy. **Pain**, v. 154, p. 560-575., 2013.

IASP. IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor. **Pain terms**, 2012.

IGIĆ, R. Four decades of ocular renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems (1977-2017). **Exp Eye Res**, v.166, p.74-83., 2018.

IGNJATOVIC, T. et al. Novel mode of action of angiotensin converting enzyme inhibitors. **J Biol Chem**, v.277, p.16847–16852, 2002.

INANIR A., et al. Angiotensin converting enzyme and methylenetetrahydrofolate reductase gene variations in fibromyalgia syndrome. **Gene** v. 564, p.188-192, 2015.

INDO, Y. Molecular basis of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): mutations and polymorphisms in TRKA (NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. **Hum Mutat**, v.18, p.462–471, 2001.

JOSEPH, K.; THOLANIKUNNEL, B.G.; KAPLAN, A.P. Activation of the bradykinin-forming cascade on endothelial cells: a role for heat shock protein 90. **Int Immunopharmacol**, v.2, p.1851–59, 2002.

JUHL, G.I., et al. Central sensitization phenomena after third molar surgery: a quantitative sensory testing study. **Eur J Pain**, v.12, p.116–27, 2008.

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

KAPLAN, A.P.; JOSEPH, K.; SILVERBERG, M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. **J Allergy Clin Immunol**, v.109, p.195-209, 2002.

KASHUBA, E. et al. The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. **Biomarkers**, v. 18, p. 279-296. 2013.

KAUR, P.; MUTHURAMAN, A.; KAUR, M. The implications of angiotensin-converting enzyme and their modulators in neurodegenerative disorders: current and future perspectives, **ACS Chem Neurosci**, v.6, p. 508-521, 2015.

KRAMER, H.H., et al. Inhibition of neutral endopeptidase (NEP) facilitates neurogenic inflammation. **Exp Neurol**, v.195, p. 179–184, 2005.

KING, N. B.; FRASER, V. Untreated pain, narcotics regulation, and global health ideologies. **PLoS Medicine**, v. 10, p. e1001411. 2013.

KLEIN, C.P. et al. Effects of D-series resolvins on behavioral and neurochemical changes in a fibromyalgia-like model in mice. **Neuropharmacology**, v.86, p.57e66, 2014.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nat Med** v.16, p.1258-1266, 2010.

KWIAT, G.C.; BASBAUM, A.I. The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. **Somatosens Mot Res**, v.9 p.157–173, 1992.

LAPIROT, O., et al. NK1 receptor-expressing spinoparabrachial neurons trigger diffuse noxious inhibitory controls through lateral parabrachial activation in the male rat. **Pain**, v.142, p. 245–254, 2009.

LAI, J., et al. Pronociceptive Actions of Dynorphin via Bradykinin Receptors. **Neurosci Lett**, v. 437, p.175–179, 2008.

LARSSON, A., et al. Resistance exercise improves muscle strength, health status and pain intensity in fibromyalgia-a randomized controlled trial. **Arthritis Res Ther**, v.17, p.161, 2015.

LAU, W., et al. A back translation of pregabalin and carbamazepine against evoked and non-evoked endpoints in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain. **Neuropharmacology**, v.73, p. 204-215, 2013.

LAU, B.K., VAUGHAN, C.W. Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. **Curr Opin Neurobiol**, v.29, p.159-64, 2014.

LEEB-LUNDBERG, L.M.F, et al. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol Rev**, v. 57, p. 27–77, 2005.

LEVANT, B.; MCCARSON, K.E. D (3) dopamine receptors in rat spinal cord: implications for sensory and motor function. **Neurosci Lett**, v.303, p.9–12, 2001.

LITTLEJOHN, G. Neurogenic neuroinflammation in fibromyalgia and complex regional pain syndrome. **Nat Rev Rheumatol**, v. 11, p.639-648, 2015.

LITTLEJOHN, G, GUYMER, E. Neurogenic inflammation in fibromyalgia. **Semin Immunopathol**. v.40, p.291-300, 2018.

LIU, C.N., et al: Subthreshold oscillations induced by spinal nerve injury in dissociated muscle and cutaneous afferents of mouse DRG. **J Neurophysiol**, v.87, p. 2009–2017, 2002.

LIU, B., et al. The acute nociceptive signals induced by bradykinin in rat sensory neurons are mediated by inhibition of M-type K⁺ channels and activation of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. **J Clin Invest**, v.120, p.1240–1252, 2010.

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

LUMRY, W.R., et al. Icatibant for Multiple Hereditary Angioedema Attacks across the Controlled and Open-Label Extension Phases of FAST-3. **Int Arch Allergy Immunol**, v.168, p. 44-55, 2015.

MA, Q. P. The expression of bradykinin B(1) receptors on primary sensory neurones that give rise to small caliber sciatic nerve fibres in rats. **Neuroscience**, v.107, p.665–673, 2001.

MACFARLANE, G. J. et al. EULAR revised recommendations for the management of fibromyalgia. **Ann Rheum Dis**, v. 76, p.318-328, 2017.

MACINTYRE, P.E., et al. Acute pain management: scientific evidence. **Australian and New Zealand College of Anaesthetists and Faculty of Pain Medicine**. 3^a Ed., pp. 1- 533, 2010.

MANCIA, G., et al. ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC) **Eur Heart J**, v.34, p.2159–2219, 2013.

MANTYH, P.W. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. **Nat Rev Neurosci**, v.7, p.797–809, 2006.

MARCEAU, F.; BACHVAROV, D.R. Kinin receptors. **Clin Rev Allergy Immunol**, v.16, p.385, 1998.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, p. 845-852. 2004.

MARIN-CASTAÑO, M.E., et al. Induction of Functional Bradykinin B1-Receptors in Normotensive Rats and Mice Under Chronic Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Treatment. **Circulation**, v.105, 627-632, 2002.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progr Neurobiol**, v. 66 p.355–474, 2002.

MONTILLA-GARCÍA, A., et al. Grip strength in mice with joint inflammation: A rheumatology function test sensitive to pain and analgesia. **Neuropharmacology**, v. 125, 231-242., 2017.

MOREAU, J.L.; FIELDS, H.L. Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission. **Brain Res**, v.397, v.37-46, 1986.

MOREAU, M.E. et al. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **J Pharmacol Sci**, v. 99, p. 6-38. 2005.

MORI, K.; SAKAMOTO, W.; NAGASAWA, S. Studies on human high molecular weight (HMW) kininogen. III. Cleavage of HMW kininogen by the action of human salivary kallikrein. **J Biochem**, v. 90, p. 503-509, 1981.

NAGAKURA, Y., et al., Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia, **Pain**, v.146, p.26-33, 2009.

NAVRATILOVA, E. et al. Evaluation of reward from pain relief. **Ann NY Acad Sci**, v.1282, p. 1-11. 2013.

NAVRATILOVA, E.; PORRECA, F. Reward and motivation in pain and pain relief. **Nat Neurosci** v. 17, p. 1304-1312, 2014.

NEGRAES, P.D., et al. Review roles of kinins in the nervous system. **Cell Transplant** v.24, p.613–623, 2013.

OGATA Y., et al. Involvement of Spinal Angiotensin II System in Streptozotocin-Induced Diabetic Neuropathic Pain in Mice. **Mol Pharmacol**, v.90, p. 205-213, 2016.

OSSIPOV, M.H.; DUSSOR, G.O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**, v.120, p.3779-3787, 2010.

OSSIPOV, M.H.; MORIMURA, K.; PORRECA F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Curr Opin Support Palliat Care**, v. 8, p.143–151, 2014.

PAULUS, W.; TRENKWALDER, C. Less is more: pathophysiology of dopaminergic-therapy-related augmentation in restless legs syndrome. **Lancet Neurol**, v.5, p. 878–886, 2006.

PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Prog Neurobiol**, v. 80, p.53–83, 2006.

PINHEIRO, A.R. et al. Bradykinin-induced Ca²⁺ signaling in human subcutaneous fibroblasts involves ATP release via hemichannels leading to P2Y₁₂ receptors activation **Cell Commun Signal** v.11, p.70, 2013.

POTVIN, S.; MARCHAND, S. Pain facilitation and pain inhibition during conditioned pain modulation in fibromyalgia and in healthy controls. **Pain**, v.157, p.1704-1710, 2016.

QUINTÃO, N.L. et al. Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B₁ and B₂ receptors. **J Neuroscience**, v. 28, p.2856-2863, 2008.

READY, L.B.; EDWARDS, W.T. Management of Acute Pain: a Practical Guide. **Taskforce on Acute Pain**. Seattle, 1992.

REGOLI, D.; BARABE', J.; PARK, W.K. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. **Can J Physiol Pharmacol** v.55, p. 855–867, 1977.

REHM, S. E., et al. A cross-sectional survey of 3035 patients with fibromyalgia: subgroups of patients with typical comorbidities and sensory symptom profiles. **Rheumatology**, v. 49, p.1146–1152, 2010.

RINGKAMP, M., et al. Peripheral Mechanisms of Cutaneous Nociception. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone, 2013, ed.6, cap.1, p.1.

ROCHA E SILVA, M.; BERLDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am J Physiol**, v. 156, p. 261e273, 1949.

ROCHA-GONZALEZ, H.I., MAO, S., ALVAREZ-LEEFMANS, F.J. Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransport and intracellular chloride regulation in rat primary sensory neurons: thermodynamic and kinetic aspects. **J Neurophysiol**, v.100, p.169–184, 2008.

ROEDER, Z., et al. Parabrachial complex links pain transmission to descending pain modulation. **Pain**, v.157, p.2697-2708, 2016.

RUSSELL, I.J., et al. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v.35, p.550–556, 1992.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Ann Rev Med**, v.49, p.123-133, 1998.

SALAŁ, k., et al. Antiallodynic and antihyperalgesic activity of 3-[4-(3-trifluoromethyl-phenyl)-piperazin-1-yl]-dihydrofuran-2-one compared to pregabalin in chemotherapy-induced neuropathic pain in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 122, p.173–181, 2014.

SAMINENI V.K., et al. Divergent Modulation of Nociception by Glutamatergic and GABAergic Neuronal Subpopulations in the Periaqueductal Gray. **eNeuro**, v.4, pii: ENEURO.0129-16, 2017.

SANDÉN, C.; LEEB-LUNDBERG, L.M. Kinin B1 receptor homo-oligomerization is required for receptor trafficking to the cell surface. **Int Immunopharmacol**, v. 15, p. 121-128. 2013.

SANDKÜHLER, J. Spinal Cord Plasticity and Pain. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone, 2013, ed.6, cap. 6, p.94-110.

SAINZ, I.M.; PIXLEY, R.A.; COLMAN, R.W. Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. **Thromb Haemost**, v.98, p.77–83, 2007.

SCHAEFFER, P. et al. Detection of bradykinin B1 receptors in rat aortic smooth muscle cells. **Biochem Pharmacol**, v. 61, p. 291-298. 2001.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nat Neurosci**, v.5, p.1062-1067, 2002.

SCHMAIER, A.H. The elusive physiologic role of Factor XII. **J Clin Invest**, v.118, p. 3006–3009.

SILVA, J. A.; RIBEIRO-FILHO, N. P. A dor como um problema psicofísico. **Revista Dor**, v. 12, p. 138–151, 2011.

SILVA, C.R., et al. The role of kinin B1 receptor and the effect of angiotensin I-converting enzyme inhibition on acute gout attacks in rodents. **Ann Rheum Dis**, v.75, p.260–268, 2016.

SIVIERI, D.O., et al. Potentiation of bradykinin effect by angiotensin-converting enzyme inhibition does not correlate with angiotensin-converting enzyme activity in the rat mesenteric arteries. **Hypertension**, v.50, p.110–115, 2007.

STAUD, R.; SMITHERMAN, M.L. Peripheral and Central Sensitization in Fibromyalgia: Pathogenetic Role. **Curr Pain Headache Rep**, v.6, p.259–266, 2002.

STEIN, C. Opioid Receptors. **Ann Rev Med**, v. 67, n. 1, p. 433–451, 2016.

SUZUKI R., et al. Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. **Nat Neurosci**, v.5, p.1319-26, 2002.

TAGUCHI, T. et al. Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. **Pain** v. 156, 415-427, 2015.

TANEJA, A., DELLA PASQUA, O.; DANHOF, M. Challenges in translational drug research in neuropathic and inflammatory pain: the prerequisites for a new paradigm. **Eur J Clin**

Pharmacol, v.73, p.1219–1236, 2017.

TODD, A.J. Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. **Exp Physiol**, v.87, p. 245–9, 2002.

TODD, A.J., KOERBER R.H. Neuroanatomical Substrates of Spinal Nociception. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone, 2013, ed.6, cap. 5 p.77-93.

TORRES, L., et al. The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. **Osteoarthr Cartil**, v.14, p.1033–1040, 2006.

TREEDE, R.D., et al. A classification of chronic pain for ICD-11. **Pain** v.156, p.1003-1007, 2015.

TREEDE, R.D., et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). **Pain** v.160,19-27, 2019.

TURAN, A., et al. Preoperative angiotensin-converting enzyme inhibitor use is not associated with increased postoperative pain and opioid use. **Clin J Pain**. v.29, p.1050-1056, 2013.

ÜÇEYLER, N., et al. Anticonvulsants for fibromyalgia. **Cochrane Database Syst Rev** v.10, p.CD010782, 2013.

VAUGHAN, C.W., et al. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. **Nature**, v.390, p. 611-614, 1997.

VAVREK, R.J.; STEWART, J.M. Competitive antagonists of bradykinin. **Peptides** v.6, p.161–164, 1985.

VERNE, G.N. et al. Representations of pain in the brain. **Curr Rheumatol Rep**, v.6, p. 261–265, 2004.

VESELINOVIĆ, T. et al. Effects of antipsychotic treatment on psychopathology and motor symptoms. A placebo-controlled study in healthy volunteers. **Psychopharmacology**, v.218, p.733–748, 2011.

VIANA, A.F., et al. Kinin B1 receptors mediate depression like behavior response in stressed mice treated with systemic *E. coli lipopolysacch* ride. **J Neuroinflammation**, v.7, p. 98, 2010.

VILLANUEVA, L.; NOSEDA, R. Trigeminal mechanisms of nociception. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. Philadelphia: Elsevier/Churchill Livingstone, 2013, ed.6, cap.56, p.793-802.

VISNIAUSKAS, B., et al. Angiotensin I converting enzyme (ACE) activity and expression in rat central nervous system after sleep deprivation. **Biol Chem**, v.392, p. 547-553, 2011.

VICKERS, C., et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2). **J Biol Chem**, v.28, p.28, 2002.

WANG, H., et al. Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. **J Neurosci**, v. 25, p.7986-7992, 2005.

WANG, J., et al. A novel therapeutic with two SNAP-25 inactivating proteases shows long-lasting antihyperalgesic activity in a rat model of neuropathic pain. **Neuropharmacology**, v.118, p. 223-232, 2017.

WERNER, M.F.P. et al. Peripheral kinin B 1 and B 2 receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuropharmacology**, v.53, p.48-57, 2007.

WEST, S.J., et. Circuitry and plasticity of the dorsal horn-toward a better understanding of neuropathic pain. **Neuroscience**, v.300, p. 254-75, 2015.

WILLIAMS, A. C.; CRAIG, K. D. Updating the definition of pain. **Pain** v. 157, n. 11, p. 2420–2423, 2016.

WODARSKI, R. et al. Cross-centre replication of suppressed burrowing behaviour as an ethologically relevant pain outcome measure in the rat: a prospective multicentre study. **Pain**, v.157, p. 2350–2365, 2016.

WOLFE F., et al; Report of the Multicenter Criteria Committee. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of fibromyalgia. **Arthritis Rheum**, v.33, p.160-172, 1990.

WOLFE. F, et al. Fibromyalgia criteria and severity scales for clinical and epidemiological studies: a modification of the ACR preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia. **J Rheumatol**. v.38, p.1113-1122, 2011.

WOOLF CJ AND SALTER MW (2006) Plasticity and pain: role of the dorsal horn. In *Wall and Melzacks Textbook of Pain* edn 5, 91–106 (Eds McMahon SB and Koltzenburg M) New York: Churchill Livingstone

WOOLF, C.J. What is this thing called pain? **J Clin Invest** v. 120, p. 3742-3744. 2010.

WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Plasticity and pain: role of the dorsal horn. **Wall and Melzacks Textbook of Pain** (Eds McMahon SB and Koltzenburg M) New York: Churchill Livingstone, 2006, ed. 5, 91–106.

WOLPAW, J.R. Spinal cord plasticity in acquisition and maintenance of motor skills **Acta Physiol**, v.189, p.155–169, 2007

YAMAGUCHI-SASE, S., et al. Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve injury in rats. **Inflamm Res**, v.52, p.164 – 169, 2003.

YANG, H.Y.; ERDÖS, E.G. Second kininase in human blood plasma. **Nature**, v.215, p. 1402-1403, 1967.

YAROVAYA, G.A.; NESHKOVA, A.E. Past and Present Research on the Kallikrein Kinin System (On the 90th Anniversary of the Discovery of the System)
Russ J Bioorgan Chem, v.41, p. 245–259, 2015.

YEKKIRALA, A.S., et al. Breaking barriers to novel analgesic drug development. **Nat Rev Drug Discov**, v.16, p. 545–564, 2017.

YOUSEF, G.M.; KISHI, T.; DIAMANDIS, E.P. Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. **Clin Chim Acta**, v. 329, p. 1-8. 2003.

ZHANG, X., et al. Carboxypeptidase M and kinin B1 receptors interact to facilitate efficient b1 signaling from B2 agonists. **J Biol Chem** v. 283, p. 7994-8004, 2008.

ZHANG X. et al. Cross-talk between carboxypeptidase M and the kinin B1 receptor mediates a new mode of G protein-coupled receptor signaling. **J Biol Chem** v. 286, p. 18547-18561. 2011.

ZHANG, X.; TAN, F.; SKIDGEL, R.A. Carboxypeptidase M is a positive allosteric modulator of the kinin B1 receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 33226-33240, 2013a.

ZHANG, X.; TAN, F.; SKIDGEL, R.A. Carboxypeptidase M is a positive allosteric modulator of the kinin B1 receptor. **J Biol Chem.**, v. 288, p. 33226-33240, 2013b.

ZUBIETA, J.K., et al. Placebo effects mediated by endogenous opioid activity on mu-opioid receptors. **J Neurosci**, v.25, p.7754–7762, 2005.

ANEXO I

ARTIGO PUBLICADO

Requisito necessário para obtenção do título de doutor

Durante o período de doutorado também foi desenvolvido um trabalho não relacionado ao modelo de fibromialgia. Neste estudo foi avaliada a atividade analgésica de um composto isolado de um extrato de planta, o α -spinasterol, sobre modelos de dor patológica como a dor pós-operatória e a dor neuropática induzida por trauma ou quimioterapia em camundongos. Nesta pesquisa, foram também avaliados possíveis efeitos adversos e o mecanismo de ação do α -spinasterol sobre as enzimas ciclo-oxigenases (COX) 1 e 2.


Nosso estudo resultou em um artigo científico que está publicado na revista *British Journal of Pharmacology* cujo fator de impacto é de 6.81. O artigo “Brusco I, et al. α -Spinasterol: a COX inhibitor and a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist presents an antinociceptive effect in clinically relevant models of pain in mice. *Br J Pharmacol.* v.174, p.4247-4262. doi: 10.1111/bph.13992, 2017” consta como Anexo I desta tese.

RESEARCH PAPER

α -Spinasterol: a COX inhibitor and a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist presents an antinociceptive effect in clinically relevant models of pain in mice

Correspondence Sara Marchesan Oliveira, Department of Biochemistry and Molecular Biology; Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: saramarchesan@hotmail.com; saramarchesan@ufsm.br

Received 13 March 2017; Revised 14 August 2017; Accepted 16 August 2017

Indiara Brusco¹, Camila Camponogara¹, Fabiano Barbosa Carvalho¹, Maria Rosa Chitolina Schetinger¹, Mauro Schneider Oliveira², Gabriela Trevisan², Juliano Ferreira³ and Sara Marchesan Oliveira^{1,4} 

¹Graduate Program in Biological Sciences, Biochemistry Toxicology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, ²Graduate Program in Pharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, ³Graduate Program in Pharmacology, Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, SC, Brazil, and ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

BACKGROUND AND PURPOSE

Postoperative pain is one of the most common manifestations of acute pain and is an important problem faced by patients after surgery. Moreover, neuronal trauma or chemotherapeutic treatment often causes neuropathic pain, which induces disabling and distressing symptoms. At present, treatments of both painful conditions are inadequate. α -Spinasterol, which is well characterized as a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist, has anti-inflammatory, antioxidant and antinociceptive effects. Therefore, we investigated its antinociceptive potential on postoperative and neuropathic pain, as well as its effect on COX-1 and COX-2 activities.

EXPERIMENTAL APPROACH

Nociceptive responses in a postoperative pain model (surgical incision-induced) or different neuropathic pain models (trauma or chemotherapy-induced) were investigated in mice.

KEY RESULTS

Oral administration of α -spinasterol reduced postoperative pain, when given as a pre- (0.5 h before incision) or post-treatment (0.5 h after incision), and reduced cell infiltration in the injured tissue. α -Spinasterol also reduced the mechanical allodynia induced by partial sciatic nerve ligation and the mechanical and cold allodynia induced by paclitaxel. Moreover, α -spinasterol inhibited COX-1 and COX-2 enzyme activities without altering the body temperature of animals. Importantly, α -spinasterol did not alter spontaneous or forced locomotor activity. Furthermore, it did not cause gastric damage or liver and kidney changes, nor did it alter cell viability in the cerebral cortex and spinal cord slices of mice.

CONCLUSION AND IMPLICATIONS

α -Spinasterol is an effective and safe COX inhibitor with antinociceptive effects in postoperative and neuropathic pain models. Therefore, it is an interesting prototype for the development of novel analgesic drugs.

Abbreviations

aCSF, artificial CSF; ALT, alanine aminotransferase; AMG9810, 2E)-N-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-3-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-2-propenamide; AST, aspartate aminotransferase; B, baseline; ID₅₀, inhibitory dose 50%; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide; NaCl, sodium chloride; PWT, paw withdrawal threshold; TRP, transient receptor potential; TRPV1, transient receptor potential vanilloid 1.



Introduction

Pain is one of the most significant causes of suffering and disability worldwide, impairing the quality of life of affected individuals (King and Fraser, 2013; Taylor *et al.*, 2016). Acute postoperative pain, which is a type of inflammatory pain that is caused by surgical procedures, affects a majority of patients, with less than 50% of them reporting adequate relief. Moreover, the severity of this pain is characterized as moderate, severe or extreme (Kehlet *et al.*, 2006; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2007; Gan *et al.*, 2014; Chou *et al.*, 2016). Satisfactory treatment of postoperative pain reduces cognitive impairment and the risk of chronic or persistent postsurgical pain (Kehlet *et al.*, 2006; Vaurio *et al.*, 2006; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2007; Wu and Raja, 2011; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2017). However, the analgesic agents commonly used to treat postoperative pain [opioids and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)] can cause adverse effects, limiting their use (Wu *et al.*, 2011; Gan *et al.*, 2014; Chou *et al.*, 2016). Thus, regardless of many advances in this field, the treatments of postoperative pain remain inadequate (Wu *et al.*, 2011; Chou *et al.*, 2016; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2017).

Neuropathic pain is also a painful clinical condition, which results from a lesion (trauma) or disease (such as the neuropathies associated with a tumour or the use of chemotherapy). It affects the somatosensory system, altering its structure and function (Sisignano *et al.*, 2014; Finnerup *et al.*, 2015; Gilron *et al.*, 2015). The incidence of chemotherapy-induced peripheral neuropathy occurs in up to 80% of patients who receive chemotherapy (Sisignano *et al.*, 2014). However, the treatment of neuropathic pain remains a challenge. The therapies available are often inadequate, their efficacy is unpredictable and they often cause adverse effects (Dworkin *et al.*, 2007; Kamerman *et al.*, 2015).

Therefore, the development of therapeutic alternatives, which are more effective and can safely treat postoperative and neuropathic pain, is urgently needed. In this regard, natural products have been an important source of new therapeutic agents, including analgesic molecules (Calixto, 2005; Mishra and Tiwari, 2011). α -Spinasterol is a steroid compound that is found in a variety of plants (Trevisan *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2014). It exhibits antioxidant (Coballase-Urrutia *et al.*, 2010), anticonvulsant (Socala *et al.*, 2015), antidepressant (Socala and Wlaż, 2016) and anti-inflammatory (Boller *et al.*, 2010; Borges *et al.*, 2014) pharmacological effects. Moreover, α -spinasterol also elicits antinociceptive effects, through its action as a transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonist. TRPV1 is a receptor for noxious stimuli and a therapeutic target for new analgesics (Trevisan *et al.*, 2012).

Compounds with a multi-target action, for instance, on both TRPV1 receptor and COX enzymes, might improve the efficacy and minimize the adverse effects caused by TRPV1 antagonism or COX inhibition (Tributino *et al.*, 2010). Several COX inhibitors and TRPV1 antagonists have been shown attenuate postoperative pain (Whiteside *et al.*, 2004; Uchytlova *et al.*, 2014). Moreover, inflammatory mediators, such as PGE₂, the COX end-product, drive neuropathy and sensitize TRPV1 channels (Lau *et al.*, 2010). Either the direct modulation of TRPV1 or the inhibition of the COX pathway can relieve neuropathic pain (Marwaha *et al.*, 2016).

Therefore, COX inhibitors and TRPV1 antagonists can also reduce the neuropathy induced by trauma or chemotherapy (Guindon and Beaulieu, 2006; Ito *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). Likewise, a TRPV1 antagonist with additional anti-inflammatory properties would be a promising prototype for the treatment of neuropathies (Sisignano *et al.*, 2014).

We investigated the antinociceptive potential and any possible adverse effects of α -spinasterol in different clinically relevant pain models, including those of postoperative and neuropathic pain. We also evaluated the effect of α -spinasterol on the activities of the enzymes COX-1 and COX-2.

Methods

Animals

Adult male Swiss mice (25–30 g) were kept at a controlled temperature (22 ± 1°C) in individually ventilated cages, on a 12 h light/12 h dark cycle, with food and water available *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with the national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation and of the U.S. Public Health Service's Policy on Humane care and Use of Laboratory Animals-PHS Policy), under the ethical guidelines established for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983). The study was approved by the Committee on the Ethical Use of Animals of the Federal University of Santa Maria (process number 3652150416/2016).

Animal models for postoperative and neuropathic pain were used, since both cause incapacitating symptoms in patients and are often inadequately treated (Gan *et al.*, 2014; Gilron *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2016). Therefore, the use of an intact organism was important to obtain an adequate response to the experimental models used here. In this context, Swiss mice have been used previously in experiments involving postoperative pain (Oliveira *et al.*, 2011; 2013), partial sciatic nerve ligation-induced neuropathic pain (Villarinho *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2014) and paclitaxel-induced neuropathic pain (Brusco *et al.*, 2016).

Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath and Lilley, 2015). The group size used for each experiment was based on studies that used protocols similar to those proposed here. Therefore, we estimated a group size of six mice for each experimental group (Villarinho *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2014; Brusco *et al.*, 2016). The number of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum needed to demonstrate the consistent effects of the treatments. Allocation concealment was performed using a randomization procedure (<http://www.randomizer.org/>). Behavioural evaluations were performed blindly on drug administration. Each experiment was repeated two to three times (using two or three animals for each repetition) and experiments were carried out between 08:00 and 17:00 h.

Treatment

To evaluate the antinociceptive effect of α -spinasterol in the postoperative pain model, the animals were treated with

vehicle (10 mL·kg⁻¹, p.o.), α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.) or **indomethacin** (10 mg·kg⁻¹, p.o.; positive control), 0.5 h before the incision (pretreatment) or 0.5 h after the incision (post-treatment). The antinociceptive effect in the postoperative pain model (pretreatment) was also evaluated, using a dose-response curve for α -spinasterol (0.1–1 mg·kg⁻¹, p.o.) or indomethacin (1–10 mg·kg⁻¹, p.o.).

In the partial sciatic nerve ligation-induced neuropathy model, the animals received vehicle (10 mL·kg⁻¹, p.o.), α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.) or **celecoxib** (100 mg·kg⁻¹, p.o.; positive control), 7 days after sciatic nerve ligation. To assess the chemotherapy-induced neuropathy, the animals were treated orally with vehicle (10 mL·kg⁻¹, p.o.), α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.) or **acetaminophen** (100 mg·kg⁻¹, p.o.; positive control), 1 day after a single dose of paclitaxel administration (acute treatment) or 21 days after the first repeated paclitaxel dose (chronic treatment).

Behavioural tests

Postoperative pain model. The postoperative pain model was carried out as previously described (Oliveira *et al.*, 2011, 2013). Animals were anaesthetised with 2% isoflurane *via* a nose cone. After antiseptic preparation, a 5 mm longitudinal incision was made in the skin and the fascia of the right hind paw, which started 2 mm from the proximal edge of the heel and extended to the toes. The underlying muscle was elevated with forceps, leaving the muscle origin and insertion intact. The skin was sutured with 6.0 nylon wire. The animals were pretreated (0.5 h before incision) or post-treated (0.5 h after incision) with vehicle (10 mL·kg⁻¹, p.o.), α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.) or indomethacin (10 mg·kg⁻¹, p.o.; positive control). The mechanical paw withdrawal threshold (PWT) was measured using a time-response curve from 0.5 to 24 h after treatment. The combined effect of α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.) plus indomethacin (10 mg·kg⁻¹, p.o.) versus α -spinasterol or indomethacin alone was also evaluated in the pretreatment protocol. The mechanical PWT was also evaluated in the pretreatment protocol using a dose-response curve, with different doses of α -Spinasterol (0.1–1 mg·kg⁻¹, p.o.) or indomethacin (1–10 mg·kg⁻¹, p.o.), at 1 h after its administration. The reduction in the mechanical PWT after the surgical incision was characterized as mechanical allodynia.

Partial sciatic nerve ligation-induced neuropathy model. For the partial sciatic nerve ligation-induced neuropathy model, animals were first anaesthetised using an injection of ketamine (90 mg·kg⁻¹, i.p.) plus xylazine hydrochloride (3 mg·kg⁻¹, i.p.). The depth of anesthesia was considered when the animal presented severe muscle relaxation, pupils dilated and no reflexes palpebral or corneal. Posteriorly, a partial ligation of the right sciatic nerve was made by tying one-third to one-half of the dorsal portion of the sciatic nerve (Villarinho *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2014). In another group of animals, the nerve was exposed without ligation (sham-operated group). The mechanical PWT was measured before the nerve ligation and then 7 days after the

procedure. Mice that presented a reduction in the mechanical PWT after injury, characterized as mechanical allodynia, were treated with vehicle (10 mL·kg⁻¹, p.o.), α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.) or celecoxib (100 mg·kg⁻¹, p.o.);

positive control). Thereafter, the mechanical PWT was assessed again from 0.5 to 6 h after treatments.

Chemotherapy-induced neuropathic pain model. For the model chemotherapy-induced neuropathic pain, mice received one dose (acute treatment; 1 mg·kg⁻¹, i.p.) or four doses (chronic treatment; 4 × 1 mg·kg⁻¹, i.p.; on alternate days, i.e. on days 1, 3, 5 and 7, resulting in a cumulative dose of 4 mg·kg⁻¹) of paclitaxel (Brusco *et al.*, 2016). The animals were then administered with vehicle (10 mL·kg⁻¹, p.o.), α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.) or acetaminophen (100 mg·kg⁻¹, p.o.; positive control), 1 day after acute treatment or 21 days after the first administration of the chronic treatment of paclitaxel. Thereafter, the mechanical PWT was assessed from 0.5 up to 24 h. Cold allodynia was evaluated from 1 up to 6 h after the administration of treatments.

Assessment of mechanical allodynia

The mechanical PWT was determined before and after the induction of all pain models or before and after the treatments, using a series of flexible nylon von Frey calibrated filaments of increasing stiffness (i.e. 0.02, 0.07, 0.16, 0.4, 1.4, 4.0 and 10.0 g) using the up-and-down method (Oliveira *et al.*, 2011, 2013). Mice were acclimatized in individual Plexiglas boxes (9 × 7 × 11 cm) on an elevated, wire mesh platform to allow access to the plantar surface of the right hind paw. Calibrated filaments of von Frey were applied to the plantar surface, using pressure to bend the filament. Six measurements were performed. An absence of a paw-lifting response led to the use of the next filament with increasing weight, while a paw-lifting response led to the use of the next weaker filament. The mechanical PWT response was then calculated as previously described by Dixon (1980). A significant decrease in mechanical PWT compared to the baseline value was considered mechanical allodynia.

Assessment of spontaneous nociception

The spontaneous nociception score was observed in the postoperative pain model, immediately before starting the measurements of mechanical allodynia following the surgical procedure in the paw tissue (Oliveira *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016). The animals remained in the Plexiglas boxes on an elevated, wire mesh platform, to allow observation of the plantar surface of the right hind paw. The amount of weight that the animals were willing to put on their paw after being submitted to an incision was estimated by qualitative visual analysis, using the following scale: score 0, normal paw pressure, with equal weight distribution on both hind paws; score 1, slightly reduced paw pressure, with the hind paw completely on the floor, but the toes are not spread; score 2, moderately reduced hind paw pressure, with only some parts of the paw slightly touching the floor; score 3, severely reduced hind paw pressure, with the hind paw completely removed from the floor. The results are expressed as the sum of scores, from 0.5 to 4 h and 0.5 to 6 h after treatments, for the pre- and postoperative respectively.

Assessment of cold allodynia

Cold allodynia was assessed in the chemotherapy-induced neuropathy model using the acetone drop method (Zheng *et al.*, 2012), which was adapted to mice. The score for cold



allodynia was evaluated immediately after the measurements of mechanical allodynia (following the development of paclitaxel-induced neuropathic pain). The animals remained in the Plexiglas boxes on an elevated, wire mesh platform, to allow access to the plantar surface of the right hind paw where a drop (20 μL) of acetone was then applied three times. Cumulative scores were generated for each mouse using the following 4-point scale: 0, no response; 1, quick withdrawal, flick or stamp of the paw; 2, prolonged with withdrawal or repeated flicking; and 3, repeated flicking of the paw with licking directed at the ventral side of the paw. The results are expressed as the sum of three scores that were evaluated for each animal.

Leukocyte infiltration assessment

To assess cell infiltration in the paws of the animals subjected to the postoperative pain, mice were pretreated (0.5 h before incision) with vehicle (10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), α -spinasterol (0.3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or indomethacin (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.). The mice were then killed 2 h after the treatment. The plantar surface of the hind paw was removed and fixed for 12 h in an alcian solution (16:2:1 mixture of ethanol 80%, formaldehyde 40%, and acetic acid) in a volume that was 5–10 times greater than the volume of the sample. The sections were then fixed and transferred to containers containing 70% alcohol to preserve the tissue. Thereafter, the paws were embedded in paraffin wax to prepare the histological lamina, sectioned at 5 μm and stained with haematoxylin–eosin. The prepared histological lamina were analysed using a light microscope, with 20 \times and 40 \times objectives. Representative areas were selected for the quantitative count of the cellular infiltration (Oliveira *et al.*, 2011; 2014).

COX-1 and COX-2 enzyme activities in vitro

α -Spinasterol has been already characterized as a TRPV1 antagonist (Trevisan *et al.*, 2012), and we also evaluated whether this compound inhibits the activity of the enzymes COX-1 and COX-2. A COX screening assay kit (Kit No. 560101, Cayman), was used according to the manufacturer's instructions and as previously described (Oliveira *et al.*, 2014), for the evaluation of COX activity in two experiments. The α -Spinasterol concentration (i.e. 3–100 μM) was chosen from pilot experiments. The COX inhibitory activities were quantified from the absorption at 405 nm. The results are presented as prostaglandin levels (in $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Investigation of possible adverse effects α -Spinasterol-induced

Evaluation of cell viability on the cerebral cortex and spinal cord slices

Preparation and incubation of slices. Animals were killed and the cerebral cortex and spinal cord were immediately removed and used for the preparation of slices (400 μm thick, with a McIlwain tissue chopper) as previously described (Carvalho *et al.*, 2012). Then, the slices were placed in a pre-gassed artificial CSF (aCFS) containing the following (in mM): NaH_2PO_4 (1.25); NaH_2CO_3 (22); MgCl_2 (1.8); NaCl (129); CaCl_2 (1.8); KCl (3.5); and D-glucose, pH 7.4 (10). Before the experiment, the aCFS was pre-conditioned for 2 h in the incubator in a 95% air, 5% CO_2

atmosphere. The cerebral cortex and spinal cord slices were treated with α -spinasterol (1–1000 nM), for 6 h at 37°C, in a 95% air, 5% CO_2 atmosphere.

LDH release assay. LDH is an intracellular enzyme. Its extracellular release serves as a useful marker of cell membrane damage (Zeni *et al.*, 2014). The integrity of cells after 6 h of treatment with α -spinasterol (1–1000 nM) in the cerebral cortex and spinal cord slices was evaluated through an LDH release assay, using a colourimetric kit (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, MG, Brazil). The results are expressed as % LDH released $\cdot\text{g}^{-1}$ of tissue.

MTT reduction. Cell viability was determined by the ability of cells to reduce MTT (Mozes *et al.*, 2012); viable cells reduce the water-soluble yellow MTT to water-insoluble blue MTT formazan. Cerebral cortex and spinal cord cell slices pretreated for 6 h with α -spinasterol (1–1000 nM) were incubated with MTT (0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) dissolved in aCFS pre-conditioned for 30 min at 37°C (in 95% air, 5% CO_2 atmosphere). Then, the medium was discarded, and the formazan produced was solubilized with 300 μL of DMSO. Following a 30 min incubation, in the dark, at room temperature, the slices produced a coloured compound whose OD was measured at 550 and 620 nm. Data were standardized through the following formula: $(\text{OD}_{550} - \text{OD}_{620}) \cdot \text{g}^{-1}$ of tissue – 100% in relation to control group (only aCFS).

Gastric lesion assessment. Mice were fasted for 18 h before treatments to evaluate the gastric tolerability of animals after the oral administration of α -spinasterol. The animals were then treated with vehicle (10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), α -spinasterol (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or indomethacin (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) and were killed after 4 h. The stomachs were removed, opened and washed with saline (NaCl 0.9%) at 4°C. The lesion index was visually evaluated using a magnifying glass. Gastric mucosal lesions were quantified using a score of 0–6 according to the size and number of lesions (Oliveira *et al.*, 2009).

Biochemical markers. The occurrence of changes in the liver or kidney was also evaluated in the animals treated with vehicle (10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), α -spinasterol (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or indomethacin (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.). Blood was collected, 4 h later, *via* a cardiac puncture, and the mice were killed. The blood was then centrifuged to obtain the serum samples. The activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) and the level of urea and creatinine, which are sensitive indicators of liver and kidney injury, respectively, were assessed in the serum samples, using the appropriate Labtest® kit for each biochemical analysis, according to the manufacturer's specifications (Labtest Diagnostica, Brazil) (Oliveira *et al.*, 2014).

Evaluation of locomotor activity. Locomotor activity was evaluated 1 h after vehicle (10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), α -spinasterol (0.3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), indomethacin (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or **AMG9810** (30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) administration, as previously described by Trevisan *et al.* (2012). Briefly,

the spontaneous locomotor activity of the animals was evaluated using an open-field test, which consists of a glass box measuring 40 × 60 × 50 cm, wherein the floor of the box is divided into 12 equal squares. The forced locomotor activity of each animal was evaluated using the rotarod test (3.7 cm in diameter, 8 rpm). The animals were first trained to remain on the apparatus for 60 s without falling. The results are expressed as the number of crossings and rearings during 5 min in the open-field test and as the number of falls during 4 min in the rotarod test.

Body temperature. Since severe hyperthermia is a well-known adverse effect of TRPV1 receptor antagonists, such as AMG9810 (Trevisan *et al.*, 2012), we investigated the effect of α -spinasterol on body temperature. Animals were treated with vehicle (10 mL·kg⁻¹, p.o.), α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.), indomethacin (10 mg·kg⁻¹, p.o.) or AMG9810 (30 mg·kg⁻¹, p.o.; TRPV1 antagonist, used as a positive control). The animals' rectal temperature was then determined 1 h later. The results are expressed as the difference in the temperature (°C) after treatments, from the baseline measurement (Trevisan *et al.*, 2012).

Data and statistical analysis

The data and statistical analysis comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis *et al.*, 2015). Results are expressed as the mean and SEM, except for the inhibitory dose (ID₅₀) values (i.e. the α -spinasterol or indomethacin dose that reduces mechanical allodynia to the order of 50% relative to the control value), which are expressed as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits, and gastric lesion scores, spontaneous nociception scores and cold allodynia, which are reported as medians followed by their 25th and 75th percentiles. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 software (San Diego, CA, USA). The significance of the differences between groups was evaluated by one-way or two-way ANOVA, followed by Tukey's *post hoc* test or Bonferroni's *post hoc* test for parametric data. The data of mechanical threshold and cold allodynia scores were log transformed before analysis to meet the parametric assumptions. Non-parametric data were evaluated using the Kruskal–Wallis test, followed by Dunn's test. *Post hoc* tests were performed only when the *F*-value achieved the necessary level of statistical significance (*P* < 0.05) and when there was no significant variance in homogeneity (Curtis *et al.*, 2015).

Materials

Indomethacin and celecoxib were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Both were dissolved in DMSO (10%), Tween 80 (10%) and 0.9% NaCl (80%). Acetaminophen and α -spinasterol were purchased from local suppliers and Tocris (Bristol, UK) respectively. Both were dissolved in Tween 80 (5%), polyethylene glycol (20%) and 0.9% NaCl (75%). Paclitaxel (i.e. 6 mg·mL⁻¹ paclitaxel in Cremophor EL and dehydrated ethanol) was purchased from Glenmark (Buenos Aires, Argentina) and was dissolved in NaCl (0.9%). The AMG9810 was purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) and dissolved in DMSO (5%), Tween 80 (5%) and 0.9% NaCl (90%). All drugs

(10 mL·kg⁻¹), except paclitaxel (10 mL·kg⁻¹; which was administered i.p.), were administered by gavage (p.o.). Doses of the drugs used were based on those used in previous studies (Trevisan *et al.*, 2012; Brusco *et al.*, 2016). The von Frey filaments and 6.0 nylon wire were purchased from North Coast Medical (CA, USA) and Huaiyin Medical Instruments Co., Ltd. (Jiangsu, China) respectively.

Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Southan *et al.*, 2016), and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16 (Alexander *et al.*, 2015a,b).

Results

Effect of α -spinasterol on postoperative pain

α -Spinasterol reduces the surgical incision-induced nociception. The right hind paw surgical incision produced a decrease in the PWT in response to mechanical stimuli of von Frey filaments compared to the baseline (B), characterized as mechanical allodynia (Figure 1A–D). Post-treatment (0.5 h after incision) with α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.) or indomethacin (10 mg·kg⁻¹, p.o.) reversed this mechanical allodynia from 0.5 up to 6 h after treatments, with maximum inhibitions of 76 ± 5 and 82 ± 3%, respectively, at 2 h after its administration when compared to the vehicle group (Figure 1A). Pretreatment (0.5 h before incision) with α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.) or indomethacin (10 mg·kg⁻¹, p.o.) was also effective in preventing the mechanical allodynia induced by surgical incision from 0.5 up to 6 h after the treatments, with maximum inhibition of 60 ± 5 and 59 ± 5% at 1 h and of 64 ± 6 and 54 ± 8% at 2 h after its administration, respectively, when compared to the vehicle group (Figure 1B). The combined treatment with α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.) and indomethacin (10 mg·kg⁻¹, p.o.) was more effective in preventing mechanical allodynia induced by surgical incision at 0.5 and 1 h after the treatments, with a maximum inhibition of 79 ± 5% at 1 h, compared to the individual treatment with indomethacin (Figure 1B).

We also evaluated the effect of the pretreatment with α -spinasterol using a dose–response curve. The pretreatment (0.5 h before incision) with α -spinasterol at doses of 0.1, 0.3 and 1 mg·kg⁻¹ was effective in preventing mechanical allodynia induced by surgical incision compared to the vehicle group. The calculated ID₅₀ value was 1.85 (0.19–17.30) mg·kg⁻¹, with a maximum inhibition of 58 ± 5% (at 1 mg·kg⁻¹), at 1 h after the treatment (Figure 1C). Likewise, the anti-allodynic effect of indomethacin occurred at the three doses tested (1, 3 and 10 mg·kg⁻¹, p.o.), and the calculated inhibitory dose value was 6.53 (3.16–13.49) mg·kg⁻¹, with a maximum inhibition of 59 ± 3% (at 10 mg·kg⁻¹), at 1 h after its administration (Figure 1D).

Both the post-treatment and pretreatment with α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.) did not alter the spontaneous nociception score induced by surgical incision, when evaluated from 0.5

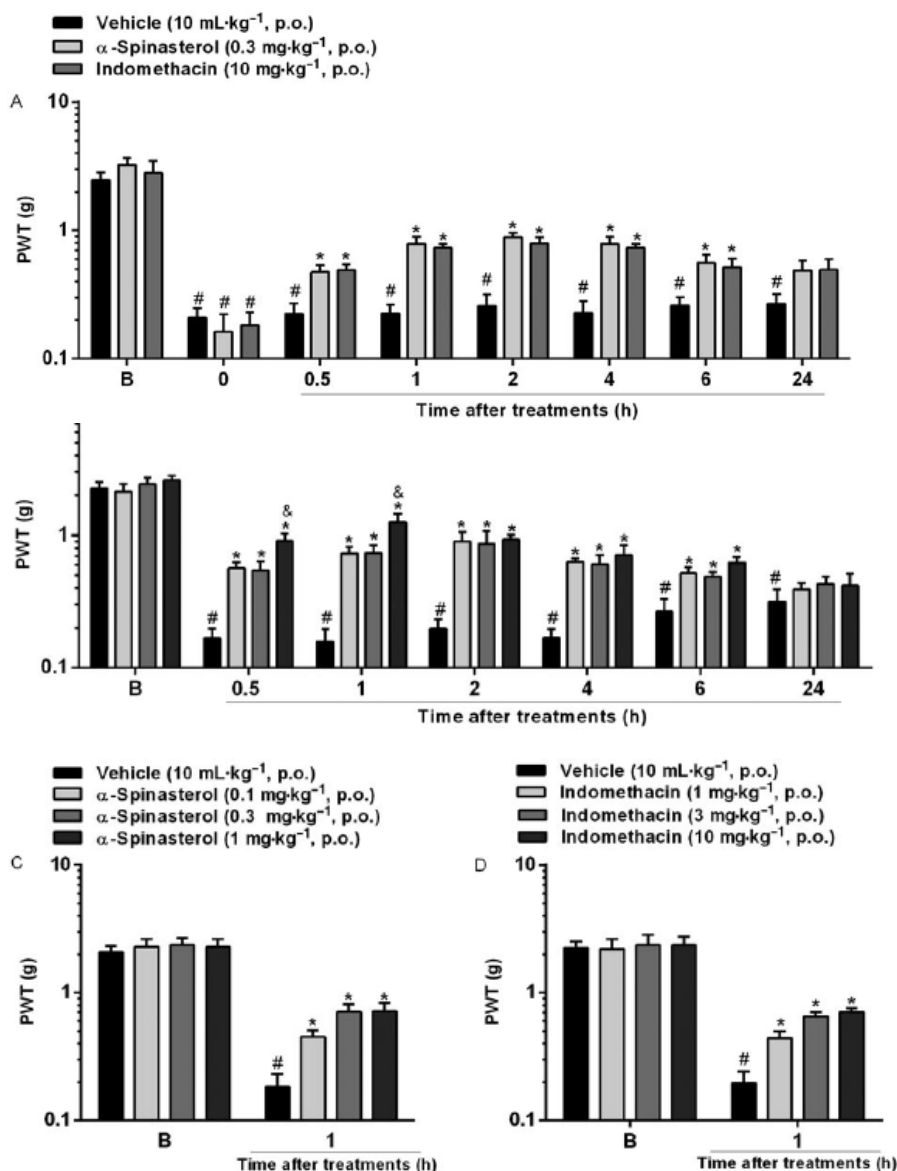


Figure 1

Effects of α -spinasterol and indomethacin on mechanical allodynia induced by surgical incision. Time-response curves in animals that received vehicle ($10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), α -spinasterol ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or indomethacin ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), 0.5 h after surgical incision (post-treatment) (A) or 0.5 h before surgical incision (pretreatment) (B). Dose-response curves in animals that received vehicle ($10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), α -spinasterol (0.1 – $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) (C) or indomethacin (1 – $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) (D) 0.5 h before incision (pretreatment). B denotes the basal mechanical threshold before surgical incision. 0 indicates the basal mechanical threshold after surgical incision and before of treatments. Data are expressed as the mean \pm SEM of six animals per group. * $P < 0.05$ when compared with the vehicle group; two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. [§] $P < 0.05$ when compared with indomethacin group; two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. # $P < 0.05$ when compared with basal mechanical threshold, B; one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

up to 6 h or from 0.5 up to 4 h after treatments, respectively, compared to the vehicle group. Post-treatment with indomethacin ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) also did not alter the spontaneous

nociception score of animals. Pretreatment with indomethacin, however, was effective in decreasing the spontaneous nociception score induced by surgical incision, when

compared to the vehicle group, with a maximum inhibition of $77 \pm 11\%$ (Figure 2).

α -Spinasterol reduces the infiltration of cells after surgical incision. A histological analysis was conducted to measure the infiltration of inflammatory cells into the paw tissue of mice subjected to postoperative pain (pretreatment). The surgical incision induced a significant increase in cell infiltration in the vehicle group, compared to the sham group. Pretreatment with α -spinasterol ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or indomethacin ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) reduced the number of inflammatory cells in the paw tissue compared to the vehicle group (Figure 3A, B).

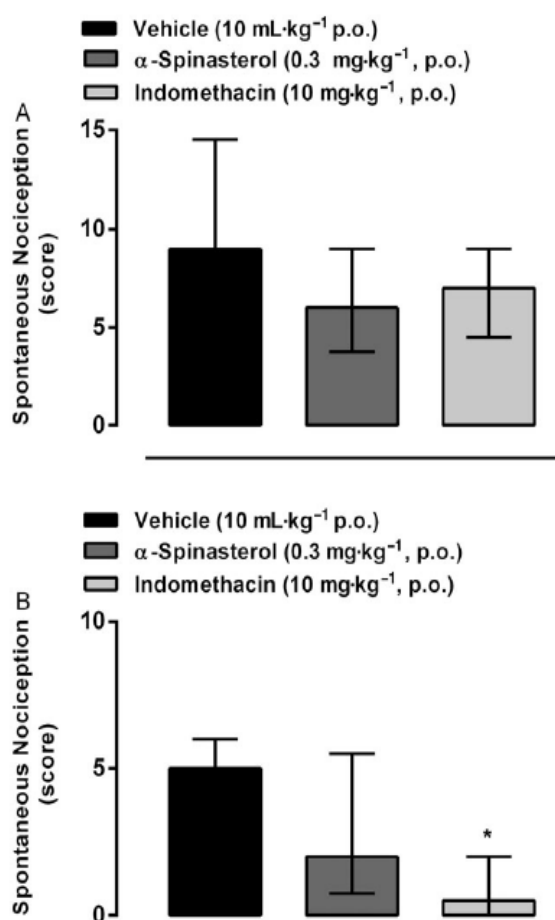


Figure 2

Effects of α -spinasterol and indomethacin on spontaneous nociception induced by surgical incision. Spontaneous nociception score in animals that received vehicle ($10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), α -spinasterol ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or indomethacin ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), 0.5 h after incision (post-treatment) (A) or 0.5 h before incision (pretreatment) (B). Data are expressed as the medians followed by their 25th and 75th percentiles of six animals per group. * $P < 0.05$ when compared with the vehicle group; Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test.

α -Spinasterol reduces the partial sciatic nerve ligation-induced neuropathic pain

Treatment with α -spinasterol ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or celecoxib ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) did not alter the mechanical PWT in sham-operated animals compared to the vehicle group (Figure 4A). Moreover, in another group of animals, partial sciatic nerve ligation produced a significant decrease in the PWT in response to mechanical stimuli with von Frey filaments compared to the baseline (B), 7 days after the surgery, apparent as mechanical allodynia (Figure 4B). Treatment with α -spinasterol ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or celecoxib ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) reversed the mechanical allodynia induced by partial sciatic nerve ligation, from 1 up to 2 h, after its treatment, compared to the vehicle group, with maximum inhibition of 50 ± 9 and $63 \pm 11\%$, respectively, at 1 h after administration (Figure 4B).

α -Spinasterol reduces chemotherapy-induced neuropathic pain

Single (acute) or repeated (chronic) paclitaxel administration decreased the PWT in response to mechanical stimuli of von Frey filaments compared to the baseline (B), which was apparent as mechanical allodynia (Figure 5A, B). Treatment with α -Spinasterol ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or acetaminophen ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) reversed the mechanical allodynia induced by acute paclitaxel administration, from 2 up to 4 h or from 0.5 up to 4 h, after treatments, respectively, with maximal inhibitions of $39 \pm 9\%$ for α -spinasterol at 2 h and $51 \pm 5\%$ for acetaminophen at 1 h after treatments (Figure 5A). Moreover, α -spinasterol ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or acetaminophen ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) also reversed the mechanical allodynia induced by chronic paclitaxel administration, from 1 up to 4 h and from 1 up to 2 h, following treatments with maximum inhibitions of 38 ± 4 and $44 \pm 9\%$ at 2 h after treatments respectively (Figure 5B).

Apart from mechanical allodynia, paclitaxel is also known to cause cold allodynia in patients. Therefore, we evaluated the effect of α -spinasterol on acetone-induced cold allodynia after acute or chronic paclitaxel injections. Treatment with α -spinasterol ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or acetaminophen ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) reversed the acetone-induced cold allodynia following acute paclitaxel administration, from 1 up to 2 h or at 1 and 4 h after treatments respectively. The maximal inhibition observed at 1 h after treatments was 55 ± 6 and $56 \pm 10\%$ respectively (Figure 6A, B). Treatments with α -spinasterol or acetaminophen, however, were not able to reverse the acetone-induced cold allodynia following chronic paclitaxel administration (data not shown).

α -Spinasterol inhibits the activities of COX-1 and COX-2

Since the antinociceptive effects of α -spinasterol were similar to known COX inhibitors (i.e. indomethacin, celecoxib and acetaminophen), we evaluated the possible action of α -spinasterol on COX-1 and COX-2 enzyme activities. α -Spinasterol inhibited COX-1 and COX-2 enzyme activities, with IC_{50} values of 16.17 (15.12–17.30) μM and 7.76 (1.27–47.52) μM respectively (Figure 7).

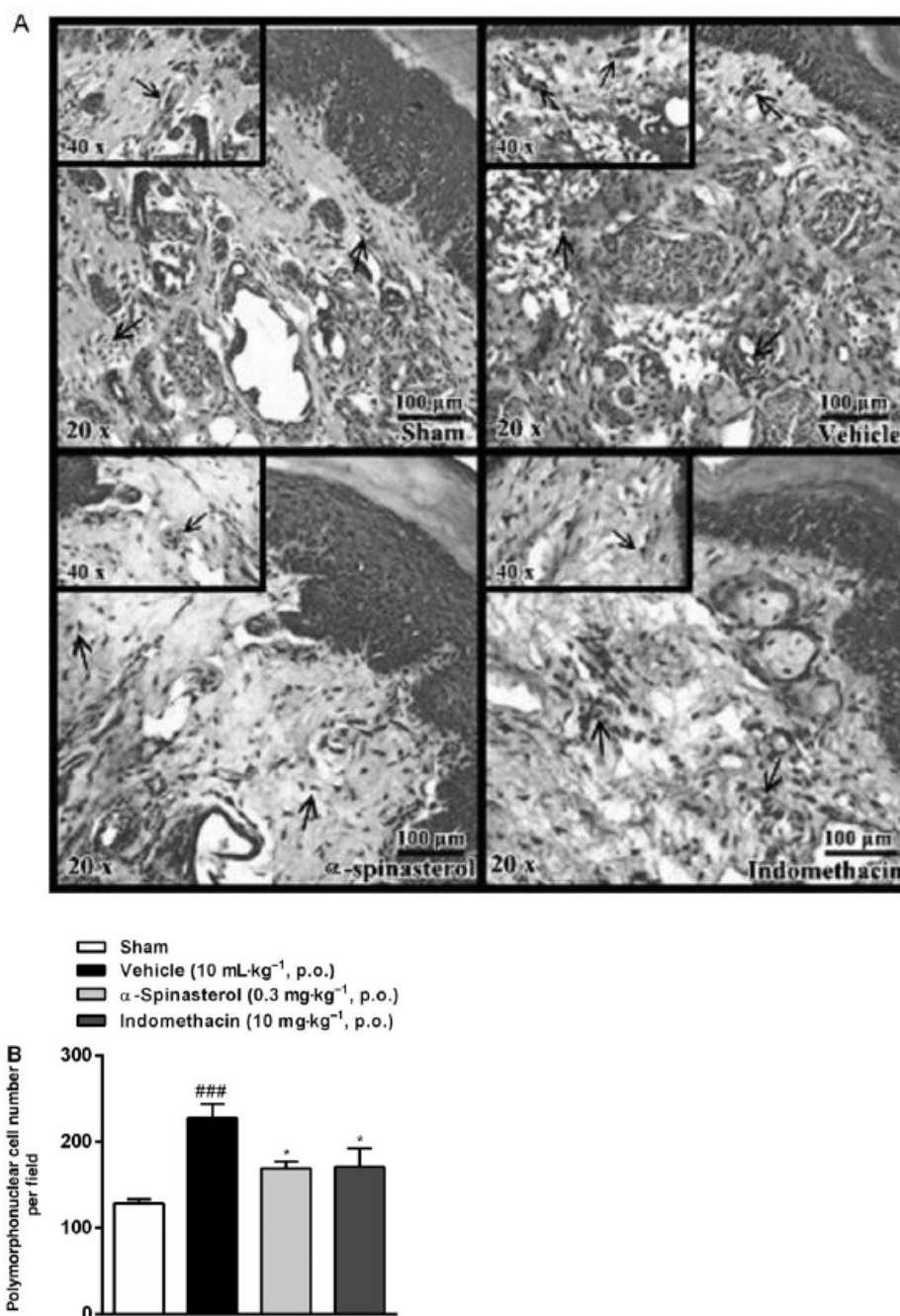


Figure 3

Effects of α -spinasterol and indomethacin on cell infiltration induced by surgical incision. Representative light microphotograph of the right hind paw (A; arrows indicate polymorphonuclear cells) 2 h after treatments in animals that received vehicle (10 mL·kg⁻¹, p.o.), α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.) or indomethacin (10 mg·kg⁻¹, p.o.), 0.5 h before the incision (pretreatment) or sham group. Quantification of polymorphonuclear cells per field (B) of the paw tissue of mice. Data are presented as the mean \pm SEM ($n = 6$ per group). $^{\#}P < 0.05$ when compared to the sham group; $^*P < 0.05$ when compared to the vehicle group; one-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* test.

α -Spinasterol did not cause adverse effects

α -Spinasterol did not alter the cell viability in the cerebral cortex and spinal cord slices. Cerebral cortex and spinal cord sections were treated with different concentrations of α -spinasterol (1–1000 nM) to assess its effects on cell viability. From exploratory data, it was observed that α -spinasterol did not

damage these tissues or alter cell viability, as evaluated by LDH and MTT assays, respectively, compared to the vehicle group (Table 1).

α -Spinasterol did not cause gastric lesions. α -Spinasterol treatment (10 mg·kg⁻¹, p.o.) did not induce significant

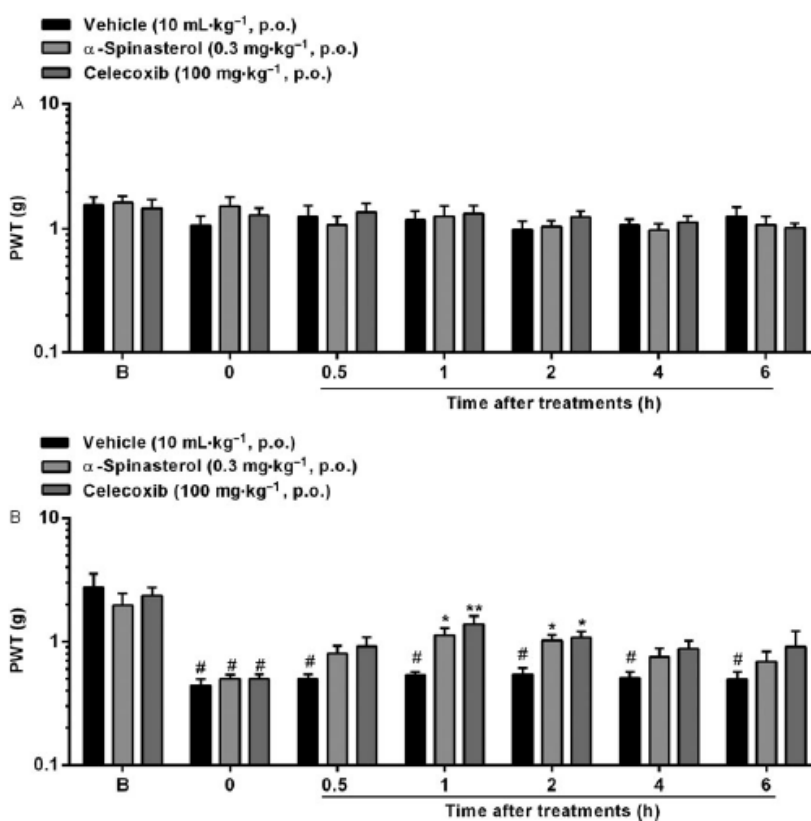


Figure 4

Effects of α -spinasterol and celecoxib on mechanical allodynia induced by partial sciatic nerve ligation. Time-response curves in animals that received vehicle ($10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), α -spinasterol ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or celecoxib ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), 7 days after the surgical procedure. (A) Sham-operated mice. (B) Mice subjected to partial sciatic nerve ligation. B denotes the basal mechanical threshold before surgical incision, while 0 indicates the basal mechanical threshold 7 day after surgical incision. Data are expressed as the mean \pm SEM of six animals per group. * $P < 0.05$ when compared with the vehicle group; two-way ANOVA, followed by Bonferroni's *post hoc* test. # $P < 0.05$ when compared with basal mechanical threshold (B); one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test.

gastric mucosal lesions in the animals, 4 h after its administration, compared to the vehicle ($10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.). However, in comparison to the vehicle, the positive control indomethacin ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) induced gastric lesions in the stomach mucosa of the mice 4 h after its administration (Table 2).

α -Spinasterol did not cause changes in the kidney or liver In comparison to the vehicle, α -spinasterol ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or indomethacin ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) caused no significant changes in the levels of urea and creatinine or in activity of ALT and AST, which are biochemical markers of changes in the kidney and liver, respectively, 4 h after its administration (Table 2).

α -Spinasterol did not alter the locomotor activity of animals. The treatment with α -spinasterol ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), indomethacin ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or AMG9810 ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) had no significant effect on the number of crossings or rearing in the open-field test and the number of falls in the rotarod test when compared to the vehicle group (Table 3).

α -Spinasterol did not alter the body temperature of the animals. Treatment with α -spinasterol ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or indomethacin ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) did not change the body temperature 1 h after its administration. The TRPV1 antagonist AMG9810 ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), however, significantly increased the rectal temperature compared to the vehicle group (Table 3).

Discussion

Pain is a major health problem, which generates socio-economic losses and substantially reduces patients' quality of life (Kammerman *et al.*, 2015). A common form of acute inflammatory pain is the postoperative pain that is experienced by most patients who undergo surgical procedures (Chou *et al.*, 2016; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2017). Another type of pain is neuropathic pain, which results from a lesion or abnormal functioning of the CNS and presents distinct pathological characteristics (Grace *et al.*, 2014). Both postoperative and neuropathic pain cause incapacitating symptoms, but remain inadequately treated since most analgesics that are currently available are relatively ineffective and have

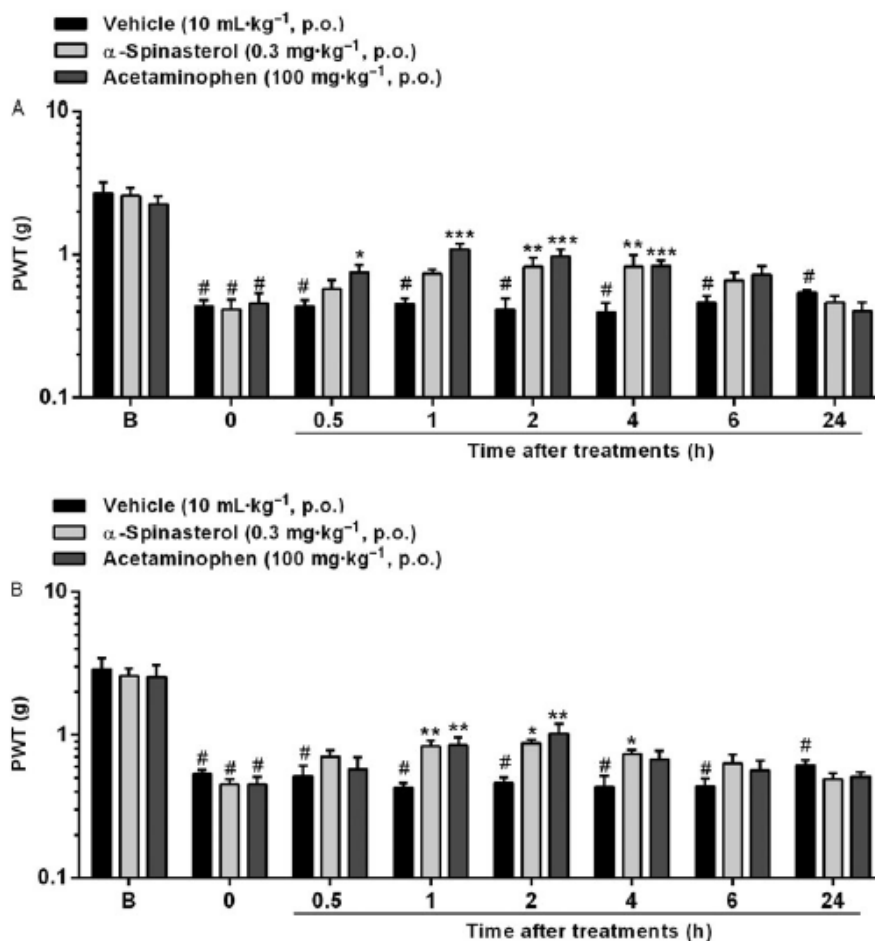


Figure 5

Effects of α -spinasterol and acetaminophen on paclitaxel-induced mechanical allodynia. Time-response curves in animals that received vehicle ($10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), α -spinasterol ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.) or acetaminophen ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, p.o.), 1 day after acute paclitaxel administration ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) (A) or 21 days after the first repeated paclitaxel administration ($4 \times 1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) (B). B denotes the basal mechanical threshold before paclitaxel administration, while 0 indicates the basal mechanical threshold after paclitaxel administration and before treatments. Data are expressed as the mean \pm SEM of six animals per group. * $P < 0.05$ when compared with the vehicle group; two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. # $P < 0.05$ when compared with basal mechanical threshold (B); one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

adverse effects (Gan *et al.*, 2014; Gilron *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2016; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2017). Moreover, despite the investment by the pharmaceutical industry, there has been little progress in developing safe and effective analgesics (Woolf, 2010).

In the current study, α -spinasterol, which has already been characterized as a TRPV1 antagonist, had an antinociceptive effect on postoperative and neuropathic pain models, without impairing the locomotor activity of animals. Moreover, α -spinasterol inhibited COX-1 and COX-2 enzyme activities, reduced the infiltration of inflammatory cells into the injured paw and did not alter cell viability. Importantly, α -spinasterol did not cause the adverse effects that are commonly observed with COX inhibitors or induce severe hyperthermia, which is a known adverse effect of TRPV1 antagonists like AMG9810 (Trevisan *et al.*, 2012; Migliore *et al.*, 2016).

Acute postoperative pain is characterized by spontaneous nociception, hyperalgesia (increased pain in response to noxious stimuli) and allodynia (pain in response to

innocuous stimuli) in the region of the incision. This occurs due sensitization of peripheral nociceptors mediated by the infiltration of inflammatory cells and release of inflammatory mediators (Kehlet *et al.*, 2006; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2007; Ren and Dubner, 2010; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2017). In the current study, α -spinasterol and indomethacin presented preventive (treatment before surgical incision) and curative (treatment after surgical incision) effects on the plantar incision-induced mechanical allodynia. Our results corroborate those of Trevisan *et al.* (2012), who demonstrated that α -spinasterol exerts an antinociceptive effect in an inflammatory pain model. Given the reduction in the number of polymorphonuclear cells in the paw tissue subjected to a surgical incision, this antinociceptive effect can be attributed to the ability α -spinasterol to reduce the number of inflammatory cells infiltrating into the injured paw. This result is in agreement with the study conducted by Borges *et al.* (2014) where α -spinasterol reduced the inflammatory cell infiltration induced by LPS. Moreover, it is likely that TRPV1 antagonism also contributes to the antinociceptive effect of

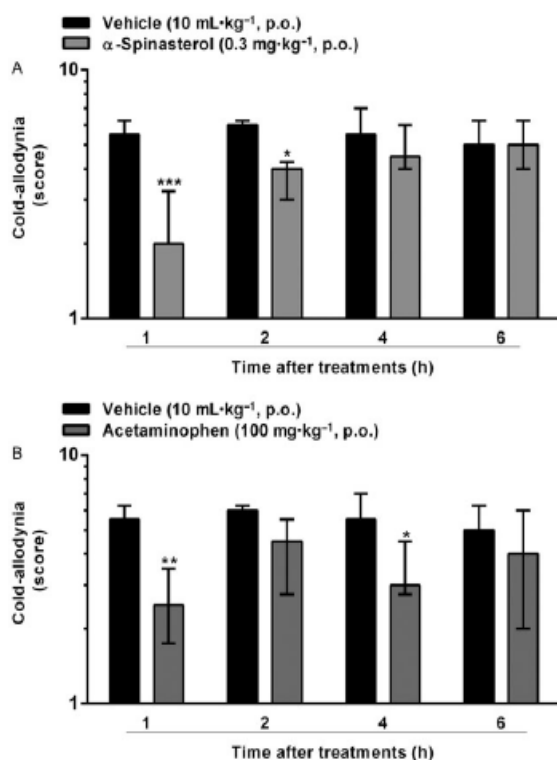


Figure 6

Effects of α -spinasterol and acetaminophen on acetone-induced cold-allodynia after paclitaxel administration. Time-response curves in animals that received vehicle (10 mL·kg⁻¹, p.o.), α -spinasterol (0.3 mg·kg⁻¹, p.o.) (A) or acetaminophen (100 mg·kg⁻¹, p.o.) (B), 1 day after acute paclitaxel administration (1 mg·kg⁻¹, i.p.). Data are expressed as the medians followed by their 25th and 75th percentiles of six animals per group. * $P < 0.05$ when compared with the vehicle group; two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

α -spinasterol, since previous studies demonstrated that the TRPV1 inhibition attenuates postoperative pain (Honore *et al.*, 2009; Uchytlova *et al.*, 2014).

The antinociceptive action of α -spinasterol is also similar to that of classical analgesic drugs, such as nonselective COX inhibitors, since α -spinasterol inhibited COX-1 and COX-2 enzyme activities. These results corroborate those observed in a study conducted by Jeong *et al.* (2010), where α -spinasterol suppressed the LPS-induced expression of COX-2. Since COX-1 plays an important role in pain processing and sensitization in the spinal cord after surgery, COX inhibitors may be effective in treating postoperative pain (Zhu *et al.*, 2003). Moreover, COX-1 and COX-2 are up-regulated in the spinal cord following surgical incision (Zhu *et al.*, 2003; Kroin *et al.*, 2004). Therefore, the inhibition of COX by α -spinasterol could also contribute to its ability to attenuate postoperative pain, since NSAIDs alone, or in combination with other analgesics (multimodal analgesia), are one of the main recommended therapies for the clinical management of postoperative pain (Chou *et al.*, 2016; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2017). Furthermore, it was found that the combined therapy of α -spinasterol and indomethacin

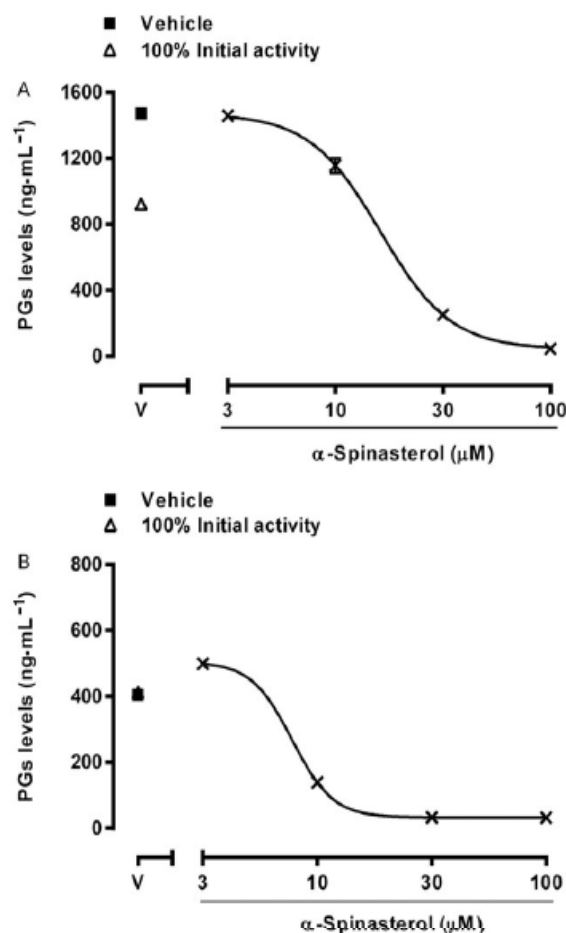


Figure 7

Effects of α -spinasterol on COX-1 and COX-2 enzyme activities. COX-1 activity (A) and COX-2 activity (B) following the administration of different concentrations of α -spinasterol (3–100 μ M). Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 4$ measurements).

increased the analgesic effect of either α -spinasterol (19 \pm 5%) or indomethacin (20 \pm 5%) administered alone. This may have occurred as indomethacin inhibits the COX enzymes whereas α -spinasterol antagonizes TRPV1, in addition to inhibiting COX-1 and COX-2.

Indomethacin and other COX inhibitors are effective at reducing incision-induced mechanical allodynia (Whiteside *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2014; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2017). However, although effective against mechanical allodynia, α -spinasterol was not able to reduce incision-induced spontaneous nociception while indomethacin was only effective when administered before the surgical procedure. In fact, results from previous studies about the efficacy of COX inhibitors are controversial (Gilron *et al.*, 2000; Eisenach *et al.*, 2010) as are the ability of TRPV1 antagonists (Honore *et al.*, 2009; Okun *et al.*, 2012) to reduce spontaneous pain in painful inflammatory conditions. Moreover, compared with other analgesics, spontaneous pain is more sensitive to morphine and buprenorphine in animal models of acute postoperative pain (Kabadi *et al.*, 2015). Hyperalgesia and allodynia are more severe and longer lasting in patients,

Table 1Effects of α -spinasterol on cell viability in cerebral cortex and spinal cord slices

Treatments	Cerebral cortex slices		Spinal cord slices	
	MTT (% of control)	LDH (% released)	MTT (% of control)	LDH (% released)
Vehicle	105.2 ± 8	19.9 ± 7	124.4 ± 28	28.3 ± 4
α -Spinasterol 1 nM	90.1 ± 36	10.9 ± 2	111.3 ± 10	34.3 ± 4
α -Spinasterol 10 nM	135.0 ± 27	18.9 ± 4	87.09 ± 36	30.7 ± 0.4
α -Spinasterol 100 nM	119.9 ± 4	23.2 ± 2	136.5 ± 7	29.2 ± 5
α -Spinasterol 1000 nM	136.9 ± 8	33.1 ± 11	106.5 ± 6	45.3 ± 5

Slices were pre-incubated for 6 h in the presence of α -Spinasterol (1–1000 nM). Thereafter, LDH release and MTT reduction were measured. These exploratory data represent mean ± SEM of four animals per group.

Table 2Effects of α -spinasterol and indomethacin on gastric damage score, urea and creatinine levels, or ALT and AST activity, 4 h after their administration

Treatments	Gastric damage (score)	Urea (mg·dL ⁻¹)	Creatinine (mg·dL ⁻¹)	ALT (U·L ⁻¹)	AST (U·L ⁻¹)
Vehicle (10 mL·kg ⁻¹ , p.o.)	0 (0.0–2.0)	29.2 ± 1.7	1.19 ± 0.24	30.7 ± 1.4	17.9 ± 2.5
α -Spinasterol (10 mg·kg ⁻¹ , p.o.)	0 (0.0–1.5)	31.2 ± 2.6	0.7 ± 0.10	39.6 ± 7.7	23.6 ± 9.0
Indomethacin (100 mg·kg ⁻¹ , p.o.)	4 (2.3–4.5)*	30.4 ± 2.8	1.30 ± 0.29	37.0 ± 3.8	20.7 ± 3.4

Data are expressed as the mean ± SEM of six animals per group, except for the gastric damage scores, which are expressed as medians followed by their 25th and 75th percentiles.

* $P < 0.05$ when compared to vehicle group; one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

Table 3Effects of α -spinasterol, indomethacin and AMG9810 on locomotor activity and body temperature, 1 h after their administration

Treatments	Crossings (number)	Rearing (number)	Falls (number)	Body temperature change (°C)
Vehicle (10 mL·kg ⁻¹ , p.o.)	63.0 ± 8	30.3 ± 3	0.6 ± 0.5	0.08 ± 0.07
α -Spinasterol (0.3 mg·kg ⁻¹ , p.o.)	65.6 ± 4	32.2 ± 6	0.4 ± 0.2	-0.04 ± 0.04
Indomethacin (10 mg·kg ⁻¹ , p.o.)	53.0 ± 3	30.4 ± 2	0.2 ± 0.2	0.18 ± 0.17
AMG9810 (30 mg·kg ⁻¹ , p.o.)	69.0 ± 5	44.6 ± 3	0.2 ± 0.2	0.75 ± 0.08*

Data are expressed as mean ± SEM of six animals per group;

* $P < 0.05$ when compared to the vehicle group; one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

while spontaneous nociception is usually short lasting and moderate (Pogatzki-Zahn *et al.*, 2007; 2017). Thus, it is important to note that the efficacies of both α -spinasterol and indomethacin at reducing surgical incision-induced mechanical allodynia are similar.

Neuropathic pain, like postoperative pain, may also occur spontaneously, or be amplified, in tum causing hyperalgesia and allodynia (Costigan *et al.*, 2009; Gilron *et al.*, 2015). α -Spinasterol was also effective in reversing mechanical allodynia in a neuropathic pain model induced by trauma. Although celecoxib, a COX-2 inhibitor used as reference drug, and α -spinasterol showed similar efficacy

in reducing neuropathic pain, α -spinasterol was much more potent than celecoxib. The higher potency of α -spinasterol improves its therapeutic index since it minimizes its circulating concentrations, and thereby reduces the likelihood of adverse effects (Daley-Yates, 2015). Thus, α -spinasterol is a more favourable treatment. Moreover, the antinociceptive effect of α -spinasterol in traumatic neuropathy can be attributed to its ability to antagonize TRPV1 and inhibit COXs. Although the topical application of a high-concentration capsaicin patch (8%) is considered as second line of treatment for peripheral neuropathic pain (post-traumatic painful neuropathies and painful polyneuropathies), TRPV1 antagonists

have been shown to reduce the nociception in models of nerve injury-induced neuropathy (Tributino *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2014; Finnerup *et al.*, 2015).

Although generally ineffective against neuropathic pain, celecoxib and other COX inhibitors can reduce trauma-induced neuropathy (Guindon and Beaulieu, 2006; Ma *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2014). COX-2 and its end-product, PGE₂, are up-regulated in injured nerves cells and spinal dorsal horn after the development of neuropathy following nerve ligation (Lau *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2012). Moreover, they facilitate the production of other pain mediators in inflammatory cells of injured nerves and dorsal root ganglion (DRG) neurons, which contributes to the establishment of neuropathic pain (Ma *et al.*, 2012).

In addition to trauma, neuropathic pain may originate from different aetiologies, such as chemotherapy-induced neuropathy. Chemotherapy-induced neuropathic pain is a severe dose- and therapy-limiting adverse effect of antineoplastic pharmacotherapy (Sisignano *et al.*, 2014). The use of the antineoplastic paclitaxel is associated with an acute pain syndrome, which develops during the first days after its administration, in addition to a peripheral sensory neuropathy that can begin weeks to months after initial treatment (Loprinzi *et al.*, 2011; Pachman *et al.*, 2011). This painful condition is characterized by paresthesia, sensory ataxia and mechanical and cold allodynia (Pachman *et al.*, 2011; Sisignano *et al.*, 2014). α -Spinasterol and acetaminophen reversed mechanical allodynia in both the acute and neuropathic pain induced by paclitaxel and cold allodynia in the acute pain. Li *et al.* (2015) demonstrated that TRPV1 plays a role in paclitaxel-induced acute pain and chronic painful neuropathy. Furthermore, TRPV1 antagonists may have therapeutic potential for treating paclitaxel-induced neuropathy, since the paclitaxel may up-regulate the expression of TRPV1 in small- and medium-diameter DRG neurons (Hara *et al.*, 2013; Sisignano *et al.*, 2014).

Moreover, COX inhibitors also can relieve paclitaxel-induced peripheral neuropathy (Ito *et al.*, 2012) since inflammatory components of the spinal dorsal horn release pro-algesic mediators, which increase the expression of COX-2 (Souich *et al.*, 2009; Sisignano *et al.*, 2014). Inflammation usually occurs after the acute phase of paclitaxel treatment and might contribute to the neuropathic symptoms. Therefore, COX inhibition can be effective at the onset of the paclitaxel-induced painful symptoms (Sisignano *et al.*, 2014). Our results are particularly relevant, because α -spinasterol is a compound that is able to inhibit TRPV1 as well as having additional anti-inflammatory properties and, therefore, shows promise as a candidate for the monotherapy of paclitaxel-induced pain (Sisignano *et al.*, 2014).

α -Spinasterol presents good oral absorption with high penetration into the brain and spinal cord of mice (Trevisan *et al.*, 2012). Since α -spinasterol is well distributed in the CNS, we assessed whether it could cause changes in cell viability in the cerebral cortex and spinal cord slices. As already reported by Jeong *et al.* (2010), α -spinasterol neither altered cell viability in cerebral cortex nor spinal cord slices. Thus, the antinociceptive effects of α -spinasterol observed here is associated with its ability to access the nervous system, where TRPV1 and COX-1 and COX-2 enzymes are expressed (Trevisan *et al.*, 2012; Yagami *et al.*, 2016). Moreover, the

antioxidant (Coballase-Urrutia *et al.*, 2010) and anti-inflammatory (Borges *et al.*, 2014) properties of α -spinasterol may indirectly contribute to its antinociceptive activity, since oxidants and inflammation could be the underlying mechanisms of postoperative and neuropathic pain (Oliveira *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2012; Sisignano *et al.*, 2014; Saad *et al.*, 2016).

The inhibitors of COX-1 and COX-2 enzymes that are used for pain treatment characteristically cause adverse effects, such as gastrointestinal and kidney alterations (Ingrasciotta *et al.*, 2015; Migliore *et al.*, 2016) and hepatotoxicity (Unzueta and Vargas, 2013). Since α -spinasterol presented antinociceptive effects and inhibited COX-1 and COX-2 activities, we also evaluated its possible adverse effects. Unlike indomethacin, a known inhibitor of COX that causes gastric damage, a high dose of α -spinasterol did not induce gastric mucosal lesions in mice. Moreover, this high dose of α -spinasterol also did not alter the levels of urea and creatinine or the activity of ALT and AST, which are biochemical markers of kidney or hepatic dysfunction respectively (Oliveira *et al.*, 2014). In conclusion, α -spinasterol did not elicit the adverse effects that are considered to be common with analgesic COX inhibitors. We also evaluated locomotor activity to rule out possible nonspecific muscle-relaxant or sedative effects, which can cause false-positive results in the nociceptive tests. According to Trevisan *et al.* (2012), α -spinasterol does not cause motor deficits in animals.

Although COX inhibitors can cause gastrointestinal and renal changes, TRPV1 antagonists evoke hyperthermia (Trevisan *et al.*, 2012). Thus, since α -spinasterol is a TRPV1 antagonist, we also evaluated its effect on body temperature, but no change was found; this finding corroborates that of Trevisan *et al.* (2012). Since we characterized α -spinasterol as a COX-1 and COX-2 inhibitor in the current study and Trevisan *et al.* (2012) characterized it as a TRPV1 antagonist, this compound can be considered a multi-target agent. Therefore, due its multi-target characteristics, α -spinasterol could offset the hyperthermic effect induced by blocking TRPV1, by inhibiting COX-2, which is an enzyme that is known to be involved in the regulation of body temperature (Yun *et al.*, 2011). This counterbalancing effect on the temperature between targets such as TRPV1 and COX-2 has also been attributed to another multi-target agent (Lima *et al.*, 2014). New approaches using drug combinations or multi-target compounds to alleviate pain, especially chronic pain such as neuropathic pain, have been tested previously (Lima *et al.*, 2014). Agents that modulate multiple targets simultaneously can be used to enhance the efficacy and safety of drugs; this trend has been mainly observed with COX inhibitors (Morphy and Rankovic, 2005).

Our results are particularly relevant for patients with chemotherapy-induced neuropathy. Since these patients usually already receive a combination of different drugs, they are exposed to various adverse effects and cross reactions that can affect the efficacy of the antineoplastic drugs. Therefore, the administration of α -spinasterol as a monotherapy would be critical for the management of chemotherapy-induced neuropathy, since α -spinasterol could reduce the number of adverse effects, compared to those caused by multiple therapies. In this sense, it has been suggested that lipid compounds, which exert a dual effect of blocking TRP ion channels and reducing glial activity and cytokine release,



could be more useful for treating chemotherapy-induced neuropathies, such as paclitaxel-induced peripheral neuropathy (Ji *et al.*, 2014; Sisignano *et al.*, 2014).

In this study, we showed that α -spinasterol is an efficacious and safe multi-target compound with antinociceptive effects on postoperative and neuropathic pain. The inhibition of targets such as TRPV1, COX-1 and COX-2 could contribute to the efficacy of α -spinasterol and reduce any adverse effects compared with drugs that act on only one of these targets. Our findings suggest that α -spinasterol is a suitable drug prototype for treating pathological pain, such as postoperative and neuropathic pain, with no detectable adverse effects.

Acknowledgements

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS (process number 16/2551-0000281-9) and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (process number 401437/2014-0) (Brazil). We thank CNPq and CAPES for their fellowship support.

Author contributions

I.B. and S.M.O. conceived and designed the study. I.B., C.C., F.B.C. and S.M.O. carried out the acquisition, analysis and interpretation of data. I.B., C.C., F.B.C., M.R.C.S., M.S.O., G. T., J.F. and S.M.O. wrote the manuscript. S.M.O. supervised the study.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Declaration of transparency and scientific rigour

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research recommended by funding agencies, publishers and other organisations engaged with supporting research.

References

Alexander SPH, Catterall WA, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE *et al.* (2015a). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Voltage-gated ion channels. *Br J Pharmacol* 172: 5904–5941.

Alexander SPH, Fabbro D, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE *et al.* (2015b). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Enzymes. *Br J Pharmacol* 172: 6024–6109.

Boller S, Soldi C, Marques MC, Santos EP, Cabrini DA, Pizzolatti MG *et al.* (2010). Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated

compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. *J Ethnopharmacol* 130: 262–266.

Borges FRM, Silva MD, Cordova MM, Schambach TR, Pizzolatti MG, Santos ARS (2014). Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid α -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. *J Ethnopharmacol* 151: 144–150.

Brusco I, Silva CR, Trevisan G, Velho CDC, Rigo FK, La L *et al.* (2016). Potentiation of paclitaxel-induced pain syndrome in mice by angiotensin I converting enzyme inhibition and involvement of kinins. *Molecul Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0275-7>.

Calixto JB (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *J Ethnopharmacol* 100: 131–134.

Carvalho FB, Mello CF, Marisco PC, Tonello R, Girardi BA, Ferreira J *et al.* (2012). Spermidine decreases Na⁺,K⁺ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. *Eur J Pharmacol* 684: 79–86.

Chou R, Gordon DB, de Leon-Casasola O, Rosenberg JM, Bickler S *et al.* (2016). Management of postoperative pain: a clinical practice guideline from the American Pain Society, the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine, and the American Society of Anesthesiologists Committee on Regional Anesthesia, Executive Committee. *J Pain* 17: 131–157.

Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Camacho-Carranza R, Cárdenas-Rodríguez N, Huerta-Gertrudis B *et al.* (2010). Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology* 276: 41–48.

Costigan M, Scholz J, Woolf CJ (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 32: 1–32.

Curtis MJ, Bond RA, Spina D, Ahluwalia A, Alexander SP, Giembycz MA *et al.* (2015). Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br J Pharmacol* 172: 3461–3471.

Daley-Yates PT (2015). Inhaled corticosteroids potency and therapeutic index. *Br J Clin Pharmacol* 80: 372–380.

Dixon WJ (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20: 441–462.

Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS *et al.* (2007). Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132: 237–251.

Eisenach JC, Curry R, Rauck R, Pan P, Yaksh TL (2010). Role of spinal cyclooxygenase in human postoperative and chronic pain. *Anesthesiology* 112: 1225–1233.

Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH *et al.* (2015). Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 14: 162–173.

Gan TJ, Habib AS, Miller TE, White W, Apfelbaum JL (2014). Incidence, patient satisfaction, and perceptions of post-surgical pain: results from a US national survey. *Curr Med Res Opin* 30: 149–160.

Gilron I, Max MB, Lee G, Booher SL, Sang CN, Chappell AS *et al.* (2000). Effects of the 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid/kainite antagonist LY293558 on spontaneous and evoked postoperative pain. *Clin Pharmacol Ther* 68: 320–327.

Gilron I, Baron R, Jensen T (2015). Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 90: 532–545.



- Grace PM, Hutchinson MR, Maier SF, Watkins LR (2014). Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat Rev Immunol* 14: 217–231.
- Guindon J, Beaulieu P (2006). Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 50: 814–823.
- Hara T, Chiba T, Abe K, Makabe A, Ikeno S, Kawakami K *et al.* (2013). Effect of paclitaxel on transient receptor potential vanilloid 1 in rat dorsal root ganglion. *Pain* 154: 882–889.
- Honore P, Chandran P, Hernandez G, Gauvin DM, Mikusa JP, Zhong C *et al.* (2009). Repeated dosing of ABT-102, a potent and selective TRPV1 antagonist, enhances TRPV1-mediated analgesic activity in rodents, but attenuates antagonist-induced hyperthermia. *Pain* 142: 27–35.
- Ingrasciotta Y, Sultana J, Giorgianni F, Fontana A, Santangelo A, Tari DU *et al.* (2015). Association of individual non-steroidal anti-inflammatory drugs and chronic kidney disease: a population-based case control study. *PLoS One* 10: e0122899.
- Ito S, Tajima K, Nogawa M, Inoue N, Kyoji T, Takahashi Y *et al.* (2012). Etodolac, a cyclooxygenase-2 inhibitor, attenuates paclitaxel-induced peripheral neuropathy in a mouse model of mechanical allodynia. *J Pharmacol Exp Ther* 342: 53–60.
- Jeong GS, Li B, Lee DS, Kim KH, Lee IK, Lee KR *et al.* (2010). Cytoprotective and anti-inflammatory effects of spinasterol via the induction of heme oxygenase-1 in murine hippocampal and microglial cell lines. *Int Immunopharmacol* 10: 1587–1594.
- Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ (2014). Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov* 13: 533–548.
- Kabadi R, Kouya F, Cohen HW, Banik RK (2015). Spontaneous pain-like behaviors are more sensitive to morphine and buprenorphine than mechanically evoked behaviors in a rat model of acute postoperative pain. *Anesth Analg* 120: 472–478.
- Kammerman PR, Wadley AL, Davis KD, Hietajarju A, Jain P, Kopf A *et al.* (2015). World Health Organization essential medicines lists: where are the drugs to treat neuropathic pain? *Pain* 156: 793–797.
- Kehlet H, Jensen TS, Woolf CJ (2006). Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *The Lancet* 367: 1618–1625.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). Animal research: reporting *in vivo* experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1577–1579.
- King NB, Fraser V (2013). Untreated pain, narcotics regulation, and global health ideologies. *PLoS Med* 10: 2–5.
- Kroin JS, Ling ZD, Buvanendran A, Tuman KJ (2004). Upregulation of spinal cyclooxygenase-2 in rats after surgical incision. *Anesthesiology* 100: 364–369.
- Lau WK, Lau YM, Zhang HQ, Wong SC, Bian ZX (2010). Electroacupuncture versus Celecoxib for neuropathic pain in rat SNL model. *Neuroscience* 170: 655–661.
- Li Y, Adamek P, Zhang H, Tatsui CE, Rhines LD, Mrozkova P *et al.* (2015). The cancer chemotherapeutic paclitaxel increases human and rodent sensory neuron responses to TRPV1 by activation of TLR4. *J Neurosci* 35: 13487–13500.
- Lima CKF, Silva RM, Lacerda RB, Santos BLR, Silva RV, Amaral LS *et al.* (2014). LASSBio-1135: a dual TRPV1 antagonist and anti-TNF alpha compound orally effective in models of inflammatory and neuropathic pain. *PLoS One* 9: 6.
- Loprinzi CL, Reeves BN, Dakhil SR, Sloan JA, Wolf SL, Burger KN *et al.* (2011). Natural history of paclitaxel-associated acute pain syndrome: prospective cohort study NCCTG N08C1. *J Clin Oncol* 29: 1472–1478.
- Ma W, St-Jacques B, Duarte PD (2012). Targeting pain mediators induced by injured nerve-derived COX2 and PGE2 to treat neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets* 16: 527–540.
- Marwaha L, Bansal Y, Singh R, Saroj P, Bhandari R, Kuhad A (2016). TRP channels: potential drug target for neuropathic pain. *Inflammopharmacology* 6: 305–317.
- McGrath JC, Lilley E (2015). Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. *Br J Pharmacol* 172: 3189–3193.
- Migliore M, Habrant D, Sasso O, Albani C, Bertozzi SM, Amirotti A *et al.* (2016). Potent multitarget FAAH-COX inhibitors: design and structure-activity relationship studies. *Eur J Med Chem* 109: 216–237.
- Mishra BB, Tiwari VK (2011). Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem* 46: 4769–4807.
- Morphy R, Rankovic Z (2005). Designed multiple ligands. an emerging drug discovery paradigm. *J Med Chem* 48: 6523–6543.
- Mozes E, Hunya A, Posa A, Penke B, Datki Z (2012). A novel method for the rapid determination of beta-amyloid toxicity on acute hippocampal slices using MTT and LDH assays. *Brain Res Bull* 87: 521–525.
- Okun A, Liu P, Davis P, Ren J, Remeniuk B, Brion Tet *et al.* (2012). Afferent drive elicits ongoing pain in a model of advanced osteoarthritis. *Pain* 153: 924–933.
- Oliveira SM, Gewehr C, Dalmolin GD, Cechinel C, Wentz A, Loureg RV *et al.* (2009). Antinociceptive effect of a novel tosylpyrazole compound in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 104: 122–129.
- Oliveira SM, Drewes CC, Silva CR, Trevisan G, Boschen SL, Moreira CG *et al.* (2011). Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. *Eur J Pharmacol* 672: 88–95.
- Oliveira SM, Silva CR, Ferreira J (2013). Critical role of protease-activated receptor 2 activation by mast cell tryptase in the development of postoperative pain. *Anesthesiology* 118: 679–690.
- Oliveira SM, Silva CR, Wentz AP, Paim GR, Correa MS, Bonacorso HG *et al.* (2014). Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole. A Celecoxib structural analog in models of pathological pain. *Pharmacol Biochem Behav* 124: 396–404.
- Pachman DR, Barton DL, Watson JC, Loprinzi CL (2011). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment. *Clin Pharmacol Ther* 90: 377–387.
- Pogatzki-Zahn EM, Zahn PK, Brennan TJ (2007). Postoperative pain—clinical implications of basic research. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 21: 3–13.
- Pogatzki-Zahn EM, Segelcke D, Schug SA (2017). Postoperative pain—from mechanisms to treatment. *Pain Reports* 2: e588.
- Ren K, Dubner R (2010). Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med* 16: 1267–1276.
- Saad SST, Hamza M, Bahr MH, Masoud SI (2016). Nitric oxide is involved in ibuprofen preemptive analgesic effect in the plantar incisional model of postsurgical pain in mice. *Neurosci Lett* 614: 33–38.
- Silva CR, Oliveira SM, Hoffmeister C, Funck V, Guerra GP, Trevisan G *et al.* (2016). The role of kinin B 1 receptor and the effect of



- angiotensin I-converting enzyme inhibition on acute gout attacks in rodents. *Ann Rheum Dis* 75: 260–268.
- Sisignano M, Baron R, Scholich K, Geisslinger G (2014). Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. *Nat Rev Neurol* 10: 694–707.
- Socala K, Nieoczym D, Pieróg M, Wlaż P (2015). α -Spinasterol, a TRPV1 receptor antagonist, elevates the seizure threshold in three acute seizure tests in mice. *J Neural Transm* 122: 1239–1247.
- Socala K, Wlaż P (2016). Evaluation of the antidepressant- and anxiolytic-like activity of α -spinasterol, a plant derivative with TRPV1 antagonistic effects, in mice. *Behav Brain Res* 303: 19–25.
- Souich P, García AG, Vergés J, Montell E (2009). Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of chondroitin sulphate. *J Cell Mol Med* 13: 1451–1463.
- Southan C, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Alexander SPH *et al.* (2016). The IUPHAR/BPS guide to PHARMACOLOGY in 2016: towards curated quantitative interactions between 1300 protein targets and 6000 ligands. *Nucl Acids Res* 44 (Database Issue): D1054–D1068.
- Taylor SJC, Carnes D, Homer K, Kahan BC, Hounsome N, Eldridge S *et al.* (2016). Novel three-day, community-based, nonpharmacological group intervention for chronic musculoskeletal pain (COPERS): a randomised clinical trial. *PLoS Med* 13: 1–18.
- Trevisan G, Rossato MF, Walker CIB, Klafke JZ, Rosa F, Oliveira SM *et al.* (2012). Identification of the plant steroid α -spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. *J Pharmacol Exp Ther* 343: 258–269.
- Tributino J, Santos M, Mesquita C, Lima C, Silva L, Maia R *et al.* (2010). LASSBio-881: an N-acylhydrazone transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 antagonist orally effective against the hypernociception induced by capsaicin or partial sciatic ligation. *Br J Pharmacol* 159: 1716–1723.
- Uchytlova E, Spicarova D, Palecek J (2014). TRPV1 antagonist attenuates postoperative hypersensitivity by central and peripheral mechanisms. *Mol Pain* 10: 67.
- Unzueta A, Vargas HE (2013). Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 17: 643–656.
- Vaurio LE, Sands LP, Wang Y, Mullen EA, Leung JM (2006). Postoperative delirium: the importance of pain and pain management. *Anesth Analg* 102: 1267–1273.
- Villarinho JG, Oliveira SM, Silva CR, Cabreira TN, Ferreira J (2012). Involvement of monoamine oxidase B on models of postoperative and neuropathic pain in mice. *Eur J Pharmacol* 690: 107–114.
- Whiteside GT, Harrison J, Boulet J, Mark L, Pearson M, Gottshall S *et al.* (2004). Pharmacological characterisation of a rat model of incisional pain. *Br J Pharmacol* 141: 85–91.
- Woolf CJ (2010). Overcoming obstacles to developing new analgesics. *Nat Med* 16: 1241–1247.
- Wu CL, Raja SN (2011). Treatment of acute postoperative pain. *The Lancet* 377: 2215–2225.
- Yagami T, Koma H, Yamamoto Y (2016). Pathophysiological roles of cyclooxygenases and prostaglandins in the central nervous. *Mol Neurobiol* 53: 4754–4771.
- Yun CH, Kin JG, Park SB, Lee MH, Kim DH, Kim EO *et al.* (2011). TTF-1 action on the transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 gene in the rat brain. *PLoS One* 6: e28959.
- Zeni ALB, Vandresen-Filho S, Dal-Cim T, Martins WC, Bertoldo DB *et al.* (2014). *Aloysia gratissima* prevents cellular damage induced by glutamatergic excitotoxicity. *J Pharm Pharmacol* 66: 1294–1302.
- Zheng H, Xiao WH, Bennett GJ (2012). Mitotoxicity and bortezomib-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Exp Neurol* 238: 225–234.
- Zhu X, Conklin D, Eisenach JC (2003). Cyclooxygenase-1 in the spinal cord plays an important role in postoperative pain. *Pain* 104: 15–23.
- Zimmermann M (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109–110.

ANEXO II

Segue abaixo os certificados de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA) para o artigo publicado e também para os dois manuscritos desenvolvidos.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "ENVOLVIMENTO DAS CININAS EM UM MODELO DE DOR TIPO FIBROMIALGIA", protocolado sob o CEUA nº 2770030516, sob a responsabilidade de **Sara Marchesan de Oliveira e equipe; Indiara Brusco; Gabriela Becker; Gessica Brum Milani; Maria Fernanda Pessano Fialho** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 09/06/2016.

We certify that the proposal "INVOLVEMENT OF THE KININS IN A PAIN MODEL FIBROMYALGIA- LIKE", utilizing 312 Heterogenics mice (312 males), protocol number CEUA 2770030516, under the responsibility of **Sara Marchesan de Oliveira and team; Indiara Brusco; Gabriela Becker; Gessica Brum Milani; Maria Fernanda Pessano Fialho** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 06/09/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2016 a 12/2018**

Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Procedência: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **4 a 4 semanas**

N: **312**

Linhagem: **Swis**

Peso: **25 a 30 g**

Resumo: A fibromialgia é uma síndrome músculo-esquelética caracterizada por dor crônica generalizada, sensibilidade à palpação, e vários sintomas concomitantes, incluindo distúrbios afetivos, tais como depressão. Pacientes com fibromialgia apresentam dor espontânea, alodinia e hiperalgesia, com reduzido limiar frente a estímulos mecânicos e térmicos, além disso, alguns deles apresentam neuropatia. Entre os mecanismos envolvidos na dor aguda e neuropática estão os receptores de cininas, desta forma, no presente estudo pretendemos investigar o envolvimento das cininas em um modelo tipo fibromialgia. Camundongos adultos machos receberão por via subcutânea (s.c.) uma injeção de reserpina (1 mg/kg, s.c.) uma vez por dia durante três dias consecutivos para indução da fibromialgia. Serão avaliados o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela reserpina, bem como, o comportamento de nocicepção espontânea induzida por doses submáximas dos agonistas dos receptores B1 (DABK 1 nmol/pata, i.pl.) ou B2 (Bradicinina 1 nmol/pata, i.pl.) administrados intraplantarmente (i.pl.), bem como, o comportamento de nocicepção espontânea após a administração do inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) Enalapril (30 mg/kg, v.o.) e do inibidor da Cininase I Mergepta (2,4 mg/kg, i.p.); Além disso, será verificado o efeito da administração prévia (30 minutos) dos antagonistas peptídicos do receptor B1 (DALBK, 150 nmol/kg, i.p.) ou B2 (HOE140, 100 nmol/kg, i.p.) e dos antagonistas não peptídicos do receptor B1 (SSR240612, 150 nm/kg, i.p.) ou B2 (FR173657, 100 nm/kg, i.p.) sobre a hiperalgesia mecânica, térmica e a nocicepção espontânea induzida por reserpina. Além disso, será avaliada a hiperalgesia mecânica e térmica após a administração do inibidor da ECA (Enalapril 30 mg/kg, v.o.) e do inibidor da cininase I (Mergepta 2,4 mg/kg, i.p.). O envolvimento dos receptores B1 e B2 na fibromialgia induzida por reserpina será também analisada por meio da expressão desses receptores por Western blot no nervo ciático, medula espinhal, córtex cerebral e gânglio da raiz dorsal dos animais. Também será avaliada a atividade das enzimas cininase I e II (ECA) no nervo ciático, no soro, no córtex cerebral, medula espinhal e gânglio da raiz dorsal dos animais após a administração de reserpina, assim como, duas horas após a administração prévia do inibidor da ECA (Enalapril 30 mg/kg, v.o.) ou inibidor da cininase I (Mergepta 2,4 mg/kg, i.p.). Serão ainda avaliados os níveis de bradicinina (agonista do receptor B2) e seus metabólitos des-Arg-cininas (agonistas B1) no nervo ciático, no soro, no córtex cerebral, medula espinhal e gânglio da raiz dorsal, bem como, o conteúdo de aminas biogênicas no cérebro após a indução da fibromialgia com a reserpina. E por fim, serão avaliados comportamentos de tigmotaxia, burrowing, atividade locomotora e nado forçado no modelo tipo fibromialgia. Assim esperamos com nossos resultados evidenciar o envolvimento das cininas e seus receptores no modelo de dor tipo fibromialgia induzido por reserpina e apontar o potencial dos antagonistas dos receptores de cininas para o tratamento dessa síndrome.

Local do experimento: laboratório de neurotoxicidade e psicofarmacologia prédio 18

Santa Maria, 10 de junho de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DOS INIBIDORES DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA I SOBRE A DOR ASSOCIADA À FIBROMIALGIA", protocolada sob o CEUA nº 3189251018, sob a responsabilidade de **Sara Marchesan de Oliveira e equipe; Indiara Brusco** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFMS) na reunião de 22/11/2018.

We certify that the proposal "EFFECT OF ANGIOTENSIN I CONVERTING ENZYME INHIBITORS ON FIBROMYALGIA-ASSOCIATED PAIN", utilizing 96 Heterogenics mice (96 males), protocol number CEUA 3189251018, under the responsibility of **Sara Marchesan de Oliveira and team; Indiara Brusco** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFMS) in the meeting of 11/22/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2019** a **12/2019**

Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Origem: **Biotério Central UFMS**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **4 a 4 semanas**

N: **96**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Resumo: A fibromialgia é uma doença incapacitante caracterizada como dor primária crônica e generalizada além de várias comorbidades como a hipertensão. Evidências têm demonstrado a contribuição das cininas e seus receptores B1 e B2 em condições dolorosas crônicas. Além disso, o uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina I (ECA) por pacientes hipertensos tem sido associado com uma potencialização de sintomas dolorosos. Desta forma, investigaremos o efeito do uso de inibidores da ECA sobre a dor associada à fibromialgia e o envolvimento das cininas sobre esse efeito. Camundongos Swiss machos receberão uma injeção subcutânea de reserpina (1 mg/kg) uma vez por dia por 3 dias consecutivos. Serão avaliados parâmetros nociceptivos (alodínia mecânica e ao frio, teste de força muscular e nocicepção espontânea) após a administração de dois inibidores da ECA (enalapril e captopril 30 mg/kg, v.o.), inibidor da cininase I (mergepta 3 mg/kg, i.p.) e de antagonistas dos receptores B1 e B2 de cininas (DALBk; 150 nmol/kg, i.p., Icatibant; 100 nmol/kg, i.p. ou SSR240612; 150 nmol/kg, i.p. e FR173657; 100 nmol/kg, i.p.). Adicionalmente, os níveis de bradicinina e substância P serão dosados no nervo ciático, medula espinhal e córtex cerebral dos animais após a administração de reserpina, dos inibidores da ECA e do inibidor da cininase I. Nas mesmas amostras também será avaliada a atividade da ECA e da cininase I. Esperamos evidenciar o efeito da inibição da ECA na dor associada a fibromialgia induzida por reserpina e apontar um risco de potencialização da dor após o uso de inibidores da ECA por pacientes hipertensos e com fibromialgia a fim de que estes resultados sirvam como um alerta para médicos e pacientes sobre o risco no uso de inibidores da ECA por pacientes com fibromialgia.

Local do experimento: Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia do Prédio 18.

Santa Maria, 22 de novembro de 2018

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO γ -ESPINASTEROL EM MODELOS DE DOR CLINICAMENTE RELEVANTE", protocolado sob o CEUA nº 3652150416, sob a responsabilidade de **Sara Marchesan de Oliveira e equipe; Indiara Brusco** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) em reunião de 05/05/2016.

We certify that the proposal "Effect antinociceptive of γ -spinasterol in pain models clinically relevant", utilizing 210 Heterogenics mice (210 males), protocol number CEUA 3652150416, under the responsibility of **Sara Marchesan de Oliveira and team; Indiara Brusco** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 05/05/2016.

Vigência da Proposta: de 08/2016 a 12/2017

Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Procedência: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **4 a 4 semanas**

N: **210**

Linhagem: **Swis**

Peso: **25 a 30 g**

Resumo: A dor pós-operatória é uma causa comum de dor persistente e de hiperalgesia e é um dos maiores problemas enfrentados pelos pacientes após as cirurgias. Já a dor neuropática é um grande desafio na medicina clínica, porque é grandemente resistente aos analgésicos atualmente disponíveis. A neuropatia periférica induzida por quimioterapia também pode ser dolorosa e/ou incapacitante. Sabe-se que o γ -espinasterol, composto esteróide extraído da *Vernonia tweedieana* Bake, possui atividade anti-inflamatória, antioxidante, entre outras (Boller et al., 2010; Coballase-Urrutia et al., 2010). Além disso, estudos demonstraram o efeito antinociceptivo deste composto em um modelo de dor artrítica, efeito este desencadeado pelo antagonismo dos receptores de potencial transitório vanilóide do tipo 1 (TRPV1), o qual responde à estímulos nocivos (Trevisan et al., 2013). Desta forma, pretende-se avaliar o efeito do γ -espinasterol sobre a dor pós-operatória, a dor neuropática induzida por ligação parcial do nervo ciático e a dor neuropática induzida por quimioterapia em camundongos, visando colaborar com alternativas para o tratamento destas dores. Os modelos de dor serão induzidos pela incisão plantar na pata traseira direita, pela ligação parcial do nervo ciático ou pela administração do quimioterápico paclitaxel, respectivamente. Serão avaliados os possíveis efeitos antinociceptivos do γ -espinasterol sobre a hiperalgesia mecânica por meio dos filamentos de von Frey e sobre a alodínia ao frio por meio da gota de acetona. Também serão avaliados os possíveis efeitos adversos e a viabilidade celular, os níveis de interleucina 1 β e prostaglandinas E2, histologia e agregação plaquetária após o tratamento com o γ -espinasterol.

Santa Maria, 05 de maio de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Brock Rosemberg
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria