



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**EFEITO HIPERALGÉSICO PRODUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE  
BRADICININA NA AMÍGDALA DE RATOS**

---

**Gerusa Duarte Dalmolin**

**PPGBT**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

**EFEITO HIPERALGÉSICO PRODUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE  
BRADICININA NA AMÍGDALA DE RATOS**

---

por

**Gerusa Duarte Dalmolin**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito

parcial para a obtenção do grau de

**Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

**PPGBT**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2006**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A comissão examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO HIPERALGÉSICO PRODUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE  
BRADICININA NA AMÍGDALA DE RATOS**

elaborada por

**Gerusa Duarte Dalmolin**

como requisito parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Juliano Ferreira  
(Orientador)**

---

**Adair Roberto Soares dos Santos**

---

**Kátia Padilha Barreto**

**Santa Maria, 31 de agosto de 2006**

*“ Não desças os degraus do sonho  
Para não despertar os monstros.  
Não subas aos sótãos - onde  
Os deuses, por trás das suas máscaras,  
Ocultam o próprio enigma.  
Não desças, não subas, fica.  
O mistério está é na tua vida!  
E é um sonho louco este nosso mundo...”*

(Mário Quintana)

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Juliano Ferreira, pela orientação, pelo exemplo e por todos os ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores Maribel Antonello Rubin e Carlos Fernando de Mello, pela oportunidade, pela contribuição na minha formação científica e pelo auxílio na realização deste trabalho.

Ao professor João Batista Calixto por colaborar para a execução deste trabalho.

Aos meus pais, Maria Tereza e Helvio, meus maiores exemplos, pelo apoio incessante e incentivo constante na busca dos meus objetivos.

À minha irmã, Lila, que com sua sabedoria e amizade, contribuiu para essa conquista. Obrigada pela força, pelas palavras amigas e por compartilhar de tantos momentos importantes.

Ao Marcelo, pelo carinho e compreensão em todos os momentos.

Aos colegas de laboratório, pelo sorriso, pelo companheirismo e por tantos momentos compartilhados... em especial à minha grande amiga Nádia, minha primeira “orientadora”, e à querida Cássia, meu “amuleto”, sem as quais

esse trabalho não seria possível. Obrigada pela dedicação, pela lealdade, pela amizade e por tornarem tão agradável a realização deste trabalho.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica que, de diferentes formas, contribuíram para a minha formação científica.

Agradeço, enfim, à Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade, e à CAPES, pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	viii
Lista de figuras .....	ix
Resumo .....	x
Abstract .....	xi
<b>I - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
I.1 - DOR E NOCICEPÇÃO .....	2
I.2 – TRANSMISSÃO DA DOR .....	4
I.3 – PROCESSAMENTO CENTRAL DA DOR.....	7
I.4 – MEDIADORES DA DOR.....	12
<b>II - OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>III - ARTIGO .....</b>	<b>20</b>
<b>IV - DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>V - CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DAG	Diacilglicerol
ECA	Enzima conversora da angiotensina
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
μL	Microlitro
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
P2X <sub>3</sub>	Receptor purinérgico ionotrópico 3
PAG	Substância cinzenta periaqueductal
PBS	Salina tamponada com fosfato
pmol	Picomol
Ret	Receptor para o fator neurotrófico derivado da glia
RVM	Porção rostral da medula oblonga ventromedial
TrkA	Receptor para o fator de crescimento do nervo



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> - Effects of intra-amygdala administration of bradykinin on the thermal noxious stimulus sensitivity.....	43
<b>Figura 2</b> - Effects of intra-amygdala administration of selective kinin receptor antagonists on bradykinin-induced hyperalgesia.....	44
<b>Figura 3</b> - Effects of intra-amygdala administration of a glutamate NMDA receptor antagonist and a cyclooxygenase inhibitor on bradykinin-induced hyperalgesia.....	45
<b>Figura 4</b> - Effect of glial amygdala disruption on bradykinin-induced hyperalgesia.....	46
<b>Tabela 1</b> - Effect of intra-amygdala administration of bradykinin on behaviour of rats in the open-field test.....	47

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### EFEITO HIPERALGÉSICO PRODUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE BRADICININA NA AMÍGDALA DE RATOS

Autora: Gerusa Duarte Dalmolin

Orientador: Juliano Ferreira

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de agosto de 2006.

O peptídeo bradicinina está entre as mais potentes substâncias algogênicas, e seu papel na nocicepção tem sido intensamente estudado no sistema periférico. No entanto, sua participação na transmissão da dor no sistema nervoso central permanece obscura. Neste trabalho avaliou-se a ação desse peptídeo na amígdala, uma estrutura límbica que está amplamente envolvida na modulação da dor, através de um modelo de dor por estimulação térmica. A administração de bradicinina (0,025-0,5 nmol/sítio) na amígdala direita de ratos promoveu hiperalgisia térmica, verificada como uma redução na latência do reflexo de retirada da pata causado por estimulação térmica nociva, apenas na pata ipsilateral á amígdala injetada. O efeito hiperalgésico da bradicinina (0,25 nmol/sítio) não foi mediado por alteração na atividade locomotora dos animais, avaliada no teste do campo aberto. A hiperalgisia produzida pela injeção intra-amígdalar de bradicinina (0,25 nmol/sítio) foi abolida pela sua co-administração com o antagonista do receptor B<sub>2</sub>, Hoe 140 (5 pmol/sítio), mas não pela sua co-administração com o antagonista do receptor B<sub>1</sub>, des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradicinina (0,05 nmol/sítio). Esse efeito hiperalgésico também foi inibido pela co-administração de bradicinina (0,25 nmol/sítio) com o antagonista do receptor glutamatérgico do tipo NMDA, MK-801 (5 nmol/sítio), com o inibidor da ciclooxigenase, indometacina (10 nmol/sítio), ou com inibidor do metabolismo da glia, fluorocitrato (1 nmol/sítio), na amígdala de ratos. Os resultados demonstraram que a administração intra-amígdalar de bradicinina induz sensibilização à dor através da liberação de produtos da ciclooxigenase e da ativação dos receptores NMDA e B<sub>2</sub> presentes em células neuronais e gliais da amígdala. Esses achados fornecem evidências da participação da bradicinina na modulação central da dor.

## **ABSTRACT**

Dissertation of Master's Degree  
Post-Graduate Course in Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **HYPERALGESIC EFFECT INDUCED BY BRADYKININ ADMINISTRATION INTO AMYGDALA OF RATS**

Author: Geresa Duarte Dalmolin

Advisor: Juliano Ferreira

Place and date: Santa Maria, 31 de agosto de 2006.

The peptide bradykinin is one of the most potent algogenic substances and its role in nociception has been intensively studied in the peripheral nervous system. However, its action in pain transmission in central nervous system remains unclear. In this work, we studied the action of this peptide into amygdala, a limbic structure highly involved on pain modulation, in the thermal noxious threshold of rats. Administration of bradykinin (0.025-0.5 nmol/site) into right amygdala of rats promoted a thermal hyperalgesia, verified by a reduction in paw withdrawal latency produced by noxious heat, only in the ipsilateral paw. The hyperalgesic effect of bradykinin (0.25 nmol/site) was not due to an unspecific effect on locomotor activity, visualized on open-field test. The hyperalgesia induced by intra-amygdala injection of bradykinin (0.25 nmol/site) was abolished by co-administration of this peptide with the B<sub>2</sub> receptor antagonist Hoe 140 (5 pmol/site), but not by its co-administration with the B<sub>1</sub> receptor antagonist des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradykinin (0.05 nmol/site). This hyperalgesic effect was also inhibited by co-administration of bradykinin (0.25 nmol/site) with the glutamatergic NMDA antagonist MK-801 (5 nmol/site), with the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (10 nmol/site) or with the glial metabolic inhibitor fluorocitrate (1 nmol/site) into amygdala of the rats. The results showed that intra-amygdalar administration of bradykinin induces pain sensitization through the release of cyclooxygenase products and the activation of NMDA and B<sub>2</sub> receptors present in amygdala's neurones and glia. These findings provide evidence that bradykinin participates of the central pain-modulating circuit.

---

## I. INTRODUÇÃO

## **I.1 - DOR E NOCICEPÇÃO**

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos que sugerem tal dano (MERSKEY e BOGDUK, 1994). Em indivíduos sadios, a dor serve para propósitos altamente adaptativos relacionados com a sobrevivência. O primeiro propósito da dor aguda é alertar sobre estímulos que podem provocar lesão tecidual (estímulos nocivos), permitindo que mecanismos de defesa ou de fuga sejam adotados (MILLAN, 1999). A perda da capacidade de sentir este tipo de dor produz efeitos desastrosos, como pode ser observado em portadores da insensibilidade congênita à dor, uma doença hereditária rara. Estes pacientes suportam estímulos dolorosos intensos sem apresentar qualquer reação de retirada, o que pode produzir lesões graves (MOGIL et al., 2000). Desta forma, fica claro que esta modalidade de dor eminentemente aguda possui grande valor adaptativo.

Ao contrário destes propósitos claramente protetores, a dor pode se tornar crônica quando o organismo não é capaz de produzir resolução da lesão ou quando a plasticidade neuronal que ocorre durante a doença mantém a dor mesmo após a resolução da lesão. É o que acontece, por exemplo, em doenças inflamatórias ou após a lesão nervosa (neuropatias). As dores crônicas mais comuns incluem a neuralgia do trigêmeo, a fibromialgia, a dor associada com a artrite, a dor do membro fantasma e as síndromes dolorosas centrais (ASHBURN e STAATS, 1999). Nesses quadros patológicos, o processamento sensorial é anormal (BESSION, 1999). Estímulos ambientais

que normalmente são inócuos, tais como leve toque ou pequenas alterações na temperatura ambiente, produzem a sensação de dor, isto é, alodínia. Estímulos que normalmente são percebidos como dolorosos produzem percepção exagerada de dor, isto é, hiperalgesia. Finalmente, a dor pode ainda aparecer espontaneamente, sem a necessidade de estimulação externa, podendo ser descrita como dor em queimação ou choque. A dor crônica difere substancialmente da dor aguda não somente em relação ao seu caráter persistente, mas está principalmente associada com alterações adaptativas, tais como à neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, sendo de difícil tratamento (BESSION, 1999; WOOLF e MANNION, 1999).

A dor, além de uma sensação, é uma experiência. Sensações possuem vias neuroanatômicas importantes com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. Experiências incorporam os componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes. O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, ou seja, a sensação determinada pela estimulação das fibras aferentes primárias. A nocicepção é a progenitora da dor, experiência complexa e subjetiva que, por sua vez, causa o sofrimento. Além disso, a nocicepção não é uma sensação uniforme, e a qualidade da dor e o início das respostas protetoras são determinadas por muitos fatores na medula espinhal e em estruturas supra-espinhais envolvidas na integração e modificação dos sinais nociceptivos (RUSSO e BROSE, 1998).

## **I.2 - TRANSMISSÃO DA DOR**

Os estímulos nocivos tais como calor, frio ou compressão intensos e algumas substâncias químicas, ativam subtipos de fibras aferentes sensoriais delgadas mielinizadas ou não, do tipo A $\delta$  e C, chamadas de nociceptores. Estas fibras são formadas por neurônios cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios da raiz dorsal e trigeminal e que conduzem as informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinhal e o núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente (DRAY e PERKINS, 1997; RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999).

As fibras não mielinizadas C, na sua maioria, são nociceptores polimodais que respondem a várias formas de estímulos nociceptivos (térmicos, mecânicos e químicos). Essas fibras são classificadas em dois grupos, de acordo com o seu conteúdo de peptídeos e a localização de seus terminais sinápticos no corno dorsal da medula espinhal (HUNT e ROSSI, 1985). As fibras C que expressam o receptor purinérgico P2X<sub>3</sub>, o receptor para o fator neurotrófico derivado da glia Ret e sítios de ligação para a isolecitina B4, cujos terminais sinápticos localizam-se mais internamente na substância gelatinosa da medula espinhal (especialmente na lâmina II), são classificadas como fibras C não-peptidérgicas. O outro grupo de fibras sintetiza peptídeos como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e expressa receptores de alta afinidade para o fator de crescimento do nervo (TrkA). Essas fibras, denominadas fibras C peptidérgicas, fazem conexões com neurônios da lâmina mais externa do corno dorsal da medula (especialmente na lâmina I) (CUELLO et al., 1993; AVERIL et al., 1995). As fibras aferentes

somáticas (que inervam a pele, as articulações e os músculos) e as fibras aferentes viscerais (que inervam os sistemas cardiovascular, respiratório, renal, reprodutivo, bem como o trato gastrointestinal) diferem quanto as suas propriedades bioquímicas e fisiológicas. Além disso, quadros de dor persistente podem alterar o fenótipo dessas fibras, por exemplo, na inflamação ocorre um significativo aumento na produção de substância P e CGRP na medula espinhal, enquanto que na dor neuropática ocorre uma diminuição desses peptídeos (ZHANG et al., 1995; CALZA et al., 1998).

Estudos neuroquímicos e eletrofisiológicos sugerem que essas diferentes classes de fibras, presentes em regiões distintas das lâminas superficiais do corno dorsal da medula, estão envolvidas em diferentes vias de transmissão da dor (HUNT e ROSSI, 1985; CRAIG, 2003). Nas lâminas superficiais (lâminas I e II) do corno dorsal da medula espinhal, as terminações dos nociceptores liberam vários neurotransmissores que estimulam neurônios de segunda ordem. Os neurônios de segunda ordem formam, então, vias paralelas que irão distribuir informações para circuitos supraespinhais responsáveis pela produção das dimensões sensoriais (discriminativa) e afetiva/motivacionais (descontentamento) da dor (HUNT e MANTYH, 2001; PRICE, 2002).

A via espino-talâmica clássica origina-se na lâmina II (substância gelatinosa) da medula espinhal e se estende até o tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem enviam terminações ao córtex somatosensorial, onde ocorre a discriminação do estímulo. A via espino-talâmica clássica está anatomicamente interconectada com estruturas límbicas através da via somatosensorial córtico-límbica. Essa via forma conexão das áreas



somatosensoriais do córtex ( $S_1$  e  $S_2$ ) com áreas corticais parietais posteriores e com o córtex insular. O córtex insular envia eferências para estruturas como amígdala, córtex perirrinal e hipocampo, que conferem o caráter emocional à dor (FRIEDMAN et al., 1986). A via espino-talâmica córtico-límbica converge para as mesmas estruturas límbicas e subcorticais que são diretamente acessadas por outra via ascendente da dor, a via espino-parabraquial-amigdalóide (BERNARD et al., 1989; BERNARD e BESSON, 1990).

A via espino-parabraquial-amigdalóide origina-se da lâmina I da medula espinhal e conecta-se com a área parabraquial. Os neurônios da área parabraquial, que são ativados especificamente por estímulos nociceptivos, enviam projeções para a amígdala, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e medula oblonga ventrolateral (GAURIAU and BERNARD, 2002). Na amígdala, as projeções nociceptivas da área parabraquial atingem primeiramente a cápsula lateral do núcleo central (BERNARD et al., 1993; JASMIN et al., 1997). O núcleo central da amígdala, bem como o hipotálamo, envia eferências para a PAG, que através de conexões com neurônios da porção rostral da medula oblonga ventromedial (RVM), modula a via descendente da dor (FIELDS, 2004).

### **I.3 - PROCESSAMENTO CENTRAL DA DOR**

A transmissão da dor envolve interações complexas de estruturas periféricas e centrais. Após ativar as fibras aferentes primárias, o estímulo nociceptivo é enviado a áreas supra-espinhais, onde diversas estruturas cerebrais inter-relacionadas irão integrar a informação nociceptiva com informações contextuais e com a memória e, dessa forma, determinar a resposta individual ao estímulo. Essa percepção supra-espinhal produz várias respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais relacionadas à defesa (CRAIG, 2003).

Além de desempenhar importante papel na interpretação da informação nociceptiva ascendente, estruturas supra-espinhais estão fortemente envolvidas na modulação de circuitos descendentes que controlam a dor. Desde a descoberta, por Wall (1967), de que os neurônios presentes nas lâminas (I, II e IV-VI) da medula espinhal estão sujeitos à modulação por estruturas supra-espinhais, o entendimento do circuito modulatório descendente da dor tem progredido drasticamente (para revisão, ler: FIELDS and BASBAUM, 1999). Esse circuito é formado por conexões de áreas encefálicas como o córtex cingulado anterior, regiões do córtex pré-frontal, o hipotálamo e o núcleo central da amígdala com a PAG, no mesencéfalo. A PAG, por sua vez, controla indiretamente a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula através de conexões com neurônios da RVM (FIELDS, 2004).

Uma das descobertas mais interessantes a respeito do circuito modulatório da dor é que esse pode tanto facilitar quanto inibir a transmissão

nociceptiva (LIEBESKIND et al, 1973; URBAN et al., 1999a; 1999b; PORRECA et al, 2002). Por exemplo, estimulação elétrica de diversas estruturas que compõem esse circuito promove redução da dor (MAYER et al., 1971; LIEBESKIND et al., 1973). Além disso, o circuito modulatório descendente parece estar envolvido no efeito analgésico da morfina (MANNING et al., 1994; MANNING, 1998; McGARAUGHTY et al., 2004). Por outro lado, a estimulação de alguns neurônios na RVM é capaz de exacerbar as respostas a estímulos nociceptivos (URBAN et al., 1999a; NEUBERT et al., 2004). Além disso, estimulações nociceptivas persistentes presentes, por exemplo, na inflamação e na injúria de nervos, produz um quadro de hiperalgesia que é revertido por lesões ou pela inativação da RVM (MORGAN et al., 1994; URBAN et al., 1999b; PORRECA et al, 2002). Portanto, a estimulação de neurônios da RVM pode tanto facilitar como inibir a transmissão nociceptiva, em diferentes situações. Esse aparente paradoxo pode ser explicado pela presença de duas subpopulações neuronais presentes na PAG e na RVM que modulam de maneira oposta os estímulos nociceptivos periféricos. Esse controle dual foi verificado através de medidas eletrofisiológicas de neurônios da RVM durante a aplicação de um estímulo térmico periférico (FIELDS et al., 1983; FIELDS e HEINRICHER, 1985). Constatou-se que a estimulação térmica da cauda de ratos causava mudanças no disparo de duas subpopulações de neurônios da RVM. Enquanto um grupo parava, o outro grupo aumentava o disparo imediatamente antes da resposta de retirada da cauda do animal. A partir dessas observações, os diferentes grupos de neurônios foram denominados células *off* e células *on*, respectivamente. Enquanto a ativação das células *on* facilita a transmissão nociceptiva, a ativação das células *off* inibe tal ação.

Logo, o balanço entre a ativação dessas duas subpopulações de neurônios determina a resposta a um estímulo nociceptivo periférico. No entanto, em situações de dor persistente, a ocorrência de neuroplasticidade em estruturas supraespinhais, como a amígdala e a RVM, pode resultar em uma estimulação facilitatória sustentada, que ocasiona resposta persistente e exagerada à dor (PORRECA et al., 2002; NEUGEBAUER e LI, 2003).

Entre as estruturas que participam do processamento central da dor, a amígdala desempenha um importante papel, uma vez que essa estrutura límbica integra a via ascendente da dor (através da via espino-parabraquial-amigdalóide ou, indiretamente, através da via somatosensorial córtico-límbica) e participa do circuito descendente da dor (amígdala-PAG-RVM-medula espinhal). Portanto, pode-se inferir que a amígdala é uma estrutura encefálica que está posicionada para receber, integrar e modular a informação nociceptiva (para revisão, ler: NEUGEBAUER et al., 2004).

A amígdala está localizada no lobo temporal medial e é composta por diversos núcleos (lateral, basolateral, medial e central). Informações provenientes de todos os sistemas sensoriais chegam até a amígdala. Em particular, as informações sensoriais nociceptivas que ascendem pela via espino-talâmica clássica atingem a amígdala, após serem processadas pelo tálamo e áreas corticais, através de conexões com o núcleo lateral e basolateral que, então, projeta eferências para o núcleo central. Além dessa via indireta, o núcleo central da amígdala recebe aferência direta da via espino-parabraquial-amigdalóide. O núcleo central forma conexões diretas e indiretas

com áreas do cérebro e tronco encefálico que estão envolvidas no controle sensorial e emocional da dor (para revisão, ler: NEUGEBAUER et al, 2004).

Técnicas eletrofisiológicas permitiram a identificação de diferentes grupos de neurônios no núcleo central da amígdala. Neurônios que respondem tanto a estímulos nociceptivos quanto a estímulos inócuos foram classificados como neurônios multireceptivos. Esses neurônios estão, provavelmente, envolvidos na integração do estímulo nociceptivo com outras informações sensoriais. Os neurônios que respondem exclusivamente a estímulos nociceptivos foram denominados neurônios nociceptivos. Foram identificados ainda, neurônios que não respondem a nenhum estímulo sensorial em condições normais, mas que podem contribuir para condições de dor persistente, e neurônios inibitórios, que reduzem sua atividade em resposta ao estímulo nociceptivo (NEUGEBAUER e LI, 2002). Esses neurônios contribuem, de diferentes maneiras, para a produção da dor e (particularmente os neurônios multireceptivos e os neurônios não responsivos) parecem estar sujeitos à plasticidade em quadros de dor persistente, como a artrite (NEUGEBAUER e LI, 2003; NEUGEBAUER et al, 2003).

De fato, estudos de neuroimagem funcional em humanos indicam que a amígdala é realmente ativada em situações de dor (BECERRA et al., 1999; BORNHÖVD et al., 2002). Estímulos térmicos e mecânicos nocivos estimulam, também, os neurônios amigdalares de ratos (BERNARD et al., 1990; NEUGEBAUER e LI, 2002). Além disso, essa estrutura contribui para a produção de analgesia mediada por opióides e canabinóides (MANNING, 1998; MANNING et al., 2003) provavelmente através da modulação do circuito descendente da dor (McGARAUGHTY e HEINRICHER, 2002;

McGARAUGHTY et al., 2004). Portanto, a amígdala parece exercer um papel chave na integração da informação nociceptiva proveniente da medula espinhal com estruturas encefálicas que irão atribuir características emocionais individuais ao estímulo e promover respostas autonômicas, neuroendócrina e comportamentais de defesa.

Estudos farmacológicos, eletrofisiológicos e anatômicos têm contribuído para o entendimento do sistema modulatório da dor. Embora o principal foco de investigação tenha sido a modulação inibitória (FIELDS e BASBAUM, 1999), a modulação facilitatória da dor parece desempenhar um papel considerável em quadros de dor persistente (PORRECA et al., 2002). A importância dessa modulação é, no entanto, menos óbvia. Porém, a identificação de mediadores que promovem a ativação desse circuito facilitatório pode ser útil para o desenvolvimento de novas drogas que auxiliem no tratamento da dor crônica.

#### **I.4 - MEDIADORES DA DOR**

A ação direta ou indireta de mediadores químicos, tais como metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), aminoácidos ou seus derivados (glutamato, noradrenalina, serotonina, dopamina e óxido nítrico), peptídeos (cininas, taquicininas, CGRP, galanina, colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo), proteínas (citocinas, fator de crescimento do nervo), entre outros, são responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, tanto no sistema nervoso periférico quanto no central (para revisão, ler: BESSON, 1999; FÜRST, 1999; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000).

Entre os mediadores da dor, ação das cininas é vista como crítica para a iniciação da dor, bem como para produção de alodínia e hiperalgesia (DRAY e PERKINS, 1997). As vias bioquímicas envolvidas na síntese e degradação das cininas compreendem mecanismos bem estabelecidos (REGOLI e BARABÉ, 1980; BHOOLA et al., 1992). As cininas são formadas em resposta a estímulos fisiológicos ou durante o processo inflamatório, a partir de precursores chamados cininogênios, que podem ser  $\alpha$ -globulinas de alto (120 KDa) ou de baixo peso molecular (66 KDa), através da ação de enzimas denominadas de cininogenases. O grupo mais importante de cininogenases é representado pelas calicreínas, um grupo de proteases encontradas no sangue (calicreína plasmática) e na maioria das glândulas exócrinas (calicreína tecidual) (MURRAY et al., 1990; BEAUBIEN et al., 1991). A calicreína plasmática é sintetizada no fígado e circula na corrente sangüínea na forma inativa, denominada de pré-calicreína (fator de Fletcher). A pré-calicreína é

rapidamente convertida em calicreína num processo dependente da ativação do fator XII da coagulação sanguínea (Fator de Hagemann) (BATHON e PROUD 1991; BHOOLA et al., 1992). A ação da calicreína plasmática sobre o cininogênio de alto peso molecular resulta na formação do nonapeptídeo bradicinina. A calicreína tecidual atuando sobre os cininogênios de baixo peso molecular origina o decapeptídeo calidina (Lys-bradicinina). A calidina pode, ainda, ser convertida em bradicinina através da clivagem da sua porção amino-terminal por aminopeptidases plasmáticas (GUIMARÃES et al., 1973).

Logo depois de formadas, as cininas circulantes se difundem através da parede dos capilares ou dos vasos linfáticos dos tecidos e são rapidamente inativadas por peptidases, classificadas como cininases I e cininases II. O grupo das cininases I é representado pelas enzimas carboxipeptidase N (plasmática) e carboxipeptidase M (de membrana). Essas enzimas removem o aminoácido arginina da porção carboxi-terminal da bradicinina e da calidina, formando os metabólitos ativos des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>10</sup>-calidina, respectivamente (ERDÖS, 1990; MARCEAU, 1995). O grupo das cininases II é representado pela enzima conversora de angiotensina e pela endopeptidase neutra 24.11. A enzima conversora da angiotensina (ECA) é responsável pela clivagem do dipeptídeo da porção C-terminal da bradicinina, transformando-a em um metabólito inativo (BHOOLA et al., 1992). Em alguns casos, a ECA é capaz de clivar o tripeptídeo da extremidade carboxi-terminal da des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina, embora esse fenômeno não ocorra com frequência devido à baixa afinidade dessa enzima por metabólitos des-Arg<sup>9</sup> (INOKUCHI e NAGAMATSU, 1981). A endopeptidase neutra 24.11, ou encefalinase, é uma



metalopectidase capaz de clivar o dipeptídeo carboxi-terminal da molécula da bradicinina, de maneira semelhante à ECA (GAFFORD et al., 1983).

A maioria das ações biológicas das cininas é mediada pela interação com receptores de membrana. A existência de dois subtipos de receptores para cininas, denominados B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, foi proposta, inicialmente, com base na determinação da ordem de potência de agonistas e da sensibilidade a antagonistas em diversos tecidos isolados (REGOLI e BARABÉ, 1980). Esses receptores são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G que apresentam 7 domínios transmembrana, cuja ativação envolve múltiplas vias de transdução de sinal através de segundos mensageiros. Os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> para as cininas são preferencialmente acoplados à proteína G do tipo G<sub>q</sub> (GUTOWSKI et al., 1991) e, na maioria das vezes, suas ativações estão relacionadas com a estimulação da fosfolipase C e conseqüente formação de trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O aumento dos níveis de IP<sub>3</sub> resulta em aumento dos níveis intracelulares de cálcio (LEE et al., 1993), enquanto que a formação de DAG resulta na ativação de isoformas específicas de proteína quinase C (TIPPMER et al., 1994). A estimulação dos receptores para cininas pode, ainda, aumentar os níveis de prostanoídes (através da ativação da fosfolipase A<sub>2</sub>), ativar a adenilato ciclase, modular canais de potássio sensíveis ao cálcio, estimular o transporte de íons cloreto e promover a formação de óxido nítrico (BURCH e AXELROD, 1987; BHOOLA et al., 1992; HALL, 1992). Enquanto a bradicinina e a calidina possuem maior afinidade pelos receptores B<sub>2</sub>, a des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e a des-Arg<sup>10</sup>-calidina possuem alta afinidade pelos receptores B<sub>1</sub>.

Os receptores B<sub>2</sub> das cininas são geralmente expressos constitutivamente nos tecidos, e são responsáveis pela maioria das ações fisiológicas das cininas. Esses receptores foram identificados nos sistemas gastrointestinal, cardiovascular, respiratório, genitourinário, bem como no sistema nervoso central e periférico (HALL e MORTON, 1997). Por outro lado, o nível de expressão do receptor B<sub>1</sub> é geralmente baixo, ou mesmo ausente, em situações fisiológicas, podendo ser induzido por vários estímulos como, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias (interleucina-1 $\beta$ , -2, -8, fator de necrose tumoral- $\alpha$ ), alguns fatores de crescimento e endotoxinas (MARCEAU, 1997). Apesar de serem compostos por número de aminoácidos semelhantes (o receptor B<sub>2</sub> humano possui 359 aminoácidos, enquanto que o receptor B<sub>1</sub> humano possui 353 aminoácidos), os receptores para cininas apresentam apenas 36% de homologia entre si (MENKE et al., 1994). Esse dado sugere que estes receptores são diferentes quanto à regulação da atividade e à produção de sinais intracelulares. De fato, enquanto a estimulação de receptores B<sub>1</sub> causa respostas prolongadas, as respostas mediadas pelo receptor B<sub>2</sub> são geralmente mais transitórias (BLAUKAT, 2003).

Na periferia, uma das ações mais importantes da bradicinina é a produção de dor. Esse evento parece ser mediado pela ativação de receptores B<sub>2</sub>. Além da ativação direta de fibras sensoriais, a bradicinina pode causar a sensibilização das mesmas, o que resulta em resposta exacerbada a estímulos sensoriais. Além disso, a estimulação de receptores B<sub>2</sub> pela bradicinina também induz um grande número de eventos secundários, como a liberação de prostaglandinas e de óxido nítrico, a degranulação de mastócitos (com conseqüente liberação de histamina e outros agentes inflamatórios), a ativação

de células imunes e a excitação de fibras simpáticas pós-ganglionares, que contribuem, de diferentes maneiras, para a geração de dor (DRAY e PERKINS, 1997).

Da mesma forma que o sistema periférico, o sistema nervoso central contém todos os componentes do sistema das cininas (para revisão ler, WALKER et al., 1995) Diversas técnicas demonstraram a presença de calicreínas, cininases e cininas (CAMARGO et al., 1973; PERRY e SNYDER, 1984; SCICLI et al., 1984; CHAO et al., 1987; KITAGAWA et al., 1991), além de receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em diversas estruturas encefálicas, inclusive naquelas envolvidas na modulação central da dor, como a ponte, a medula oblonga, o tálamo e o hipotálamo (FUJIWARA et al, 1989; RAIDOO AND BHOOLA, 1997; MURONE et al., 1997; ONGALI et al., 2003; SHUGRUE et al., 2003). Da mesma forma que as células neuronais, as células gliais também expressam receptores para as cininas (CHOLEWINSKI et al., 1991; HOSLI e HOSLI, 1993; NODA et al., 2003). De fato, astrócitos e os oligodendrócitos são ativados pela bradicinina, o que ocasiona a produção de fosfoinosítídeos que, por sua vez, aumentam a concentração intracelular de cálcio (RITCHIE et al., 1987; STEPHENS et al., 1993; HOSLI et al., 1992; LIN e CHUANG, 1992) e a estimulação e a liberação de ácido araquidônico e glutamato (BURCH e KNISS, 1988; BURCH e TIFFANY, 1989; PARPURA et al., 1994). Essa estimulação da liberação de mediadores, tais como glutamato e ácido araquidônico, sugerem um possível envolvimento da bradicinina na modulação central da dor.

Interessantemente, uma alta densidade de receptores B<sub>2</sub> foi encontrada na amígdala (ONGALI et al, 2003). Porém, o papel funcional desses receptores

e do sistema das cininas nessa estrutura não foi elucidado. Levando-se em consideração a importância da amígdala no processamento central da dor, o estudo de mediadores químicos nessa estrutura, tais como a bradicinina, poderá melhorar a compreensão desse processamento e fornecer subsídios para o uso de drogas que modulam as cininas no tratamento de processos dolorosos, especialmente os quadros de dor crônica, que permanecem sem uma terapia adequada.

---

## II. OBJETIVOS

## **II.1 - OBJETIVO GERAL**

O objetivo do presente trabalho foi verificar a ação da bradicinina na amígdala de ratos em um modelo de nocicepção por estimulação térmica.

## **II.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliar o efeito da administração de bradicinina na amígdala de ratos na nocicepção térmica aguda;
2. Elucidar a participação de receptores B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> na possível ação da bradicinina administrada na amígdala de ratos;
3. Verificar a participação do receptor glutamatérgico do tipo *N*-metil-D-aspartato (NMDA) e de cicloxigenases na possível ação da bradicinina intra-amígdala em ratos;
4. Verificar o envolvimento de células gliais na ação da bradicinina administrada na amígdala de ratos no teste de nocicepção térmica aguda.

---

### III. ARTIGO

Artigo submetido à revista Neuropeptides

**BRADYKININ INTO AMYGDALA INDUCES THERMAL  
HYPERALGESIA IN RATS**

<sup>1</sup>G. D. Dalmolin; <sup>1</sup>C. R. Silva; <sup>1</sup>N. A. Bellé; <sup>1</sup>M. A. Rubin, Ph.D.; <sup>2</sup>C. F. Mello,  
Ph.D.; <sup>3</sup>J. B. Calixto, Ph.D.; <sup>1\*</sup>J. Ferreira, Ph.D.

<sup>1</sup>Department of Chemistry, CCNE, Universidade Federal e Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Physiology and Pharmacology, CCS, Universidade Federal e Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

\*Corresponding author: Juliano Ferreira, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima nº 1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brazil. Tel: +5555 32208053; Fax: +5555 32208031.  
E-mail: [ferreiraj99@gmail.com.br](mailto:ferreiraj99@gmail.com.br)

Sources of support: CNPq, PRONEX, FAPERGS (Brazil).



**ABSTRACT**

Bradykinin is one of the most potent endogenous algescic substances and its role in pain transmission has been intensively studied in the periphery. However, whether bradykinin produces nociception in the central nervous system remains unclear. Administration of bradykinin (0.25 nmol) into the right amygdala of adult male Wistar rats induced thermal hyperalgesia, evaluated by the paw-flick test. Bradykinin-induced hyperalgesia was abolished by the co-administration of the B<sub>2</sub> receptor antagonist Hoe 140 (5 pmol/site), the NMDA antagonist MK-801 (5 nmol/site), the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (10 nmol/site) and the glial metabolic inhibitor fluorocitrate (1 nmol/site). Since the intra-amygdala administration of bradykinin did not alter spontaneous locomotion in an open-field test, it is unlikely that the current described hyperalgesic effect of bradykinin is due to an unspecific effect on locomotor activity. These findings provide evidence that bradykinin, through activation of amygdalar B<sub>2</sub> receptors induces hyperalgesia, and that glutamatergic and prostanoid-mediated mechanisms are involved in such an effect.

**Key words:** kinin, B<sub>2</sub> receptor, amygdala, hyperalgesia, glia, glutamate, cyclooxygenase, prostanoids.

## **1. Introduction**

Kinins are naturally occurring peptides that play important roles in a variety of biological functions, including the control of blood pressure, smooth muscle contraction or relaxation, inflammation and pain (for review see: Regoli and Barabé, 1980; Marceau et al., 1998). Moreover, kinins are implicated in some pathological states, such as rheumatoid arthritis, pancreatitis, asthma and endotoxic shock (for review: Marceau et al., 1998, Calixto et al., 2000; 2001). The family of kinins include the nonapeptide bradykinin and other structurally related peptide metabolites, which have their effects mediated through two G-protein coupled receptors, named B<sub>2</sub> and B<sub>1</sub> receptors, respectively. B<sub>2</sub> receptors are constitutively expressed and widely distributed in most tissues under normal conditions. Conversely, B<sub>1</sub> receptor expression is limited under normal conditions, but can be induced and up-regulated by pro-inflammatory agents, or after injury (for review see: Marceau et al., 1998; Calixto et al., 2000; 2001). Thus, most of the physiological actions of kinins seem to be mediated by constitutive B<sub>2</sub> receptors (Marceau et al., 1998).

In the periphery, kinins have been associated with the onset and the development of pain process (Dray and Perkins, 1997; Calixto et al., 2000; 2001). Some pronociceptive effects of these peptides are related to the release of other mediators, such as prostanoids, which sensitise sensory fibres to thermal, mechanical and chemical stimuli (Dray and Perkins, 1993). Besides their peripheral actions, there is growing evidence that kinins mediate various pathophysiological processes in the central nervous system (for review see: Walker et al., 1995; Raidoo and Bhoola, 1998). All of the components of the

kallikrein-kinin system have been identified in mammalian brain (Perry and Snyder, 1984; Scicli et al., 1984; Chao et al., 1987; Raidoo and Bhoola, 1997). Furthermore, recent studies have demonstrated the presence of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors in various brain structures that modulate pain transmission, including amygdala (Fujiwara et al, 1989; Murone et al., 1997; Raidoo and Bhoola, 1997; Ongali et al., 2003; Shughrue et al., 2003).

Several lines of evidence implicate amygdala in pain modulation. Amygdala is a forebrain structure that is well positioned to receiving, integrating and encoding pain information (Neugebauer et al., 2004). This limbic structure is apparently involved in both pain enhancement and pain reduction (Manning and Mayer, 1995a; 1995b; Fields, H., 2004). Despite the studies have demonstrated the presence of kinin receptors in amygdala, the functional action of these peptides in this structure remains unknown. Thus, the present study aimed to verify the effect of intra-amygdalar bradykinin in the thermal noxious threshold in rats.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Animals**

Male Wistar rats (250-350 g), provided by the Animal House of the Federal University of Santa Maria, kept in controlled room temperature (22 ± 2 °C) under a 12h:12 h light-dark cycle (lights on 06:00 h) were used. The animals were habituated to the laboratory for at least 2h before testing, and were used only once throughout the experiments. The experiments were carried out in accordance with current guidelines for the care of laboratory animals and ethical

guidelines for investigations of experiments in conscious animals (Zimmermann, 1983). All protocols employed had been approved by the Local Ethic's Committee (process number: 23081.008569/2006-60). The number of animals and intensity of noxious stimuli were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of drug treatments.

## **2.2. Surgical Procedure**

Rats were anesthetized with Equitesin (1% Phenobarbital, 2% magnesium sulphate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol; 3ml/kg, i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under a stereotaxic guidance, a cannula was inserted unilaterally into the right amygdala at the anterior (-3.0), lateral (5.0) and ventral (8.5) coordinates relative to bregma from the atlas of Paxinos and Watson (1986). Immediately before the surgical procedure, the animals received an injection of the antibiotic cefotaxim (100 mg/kg, i.p.) and, after surgery, the surface of the skull was covered with sulfadiazine powder.

## **2.3. Paw-flick test**

Three days after surgery, the animals were subjected to a thermal nociception test, as previously described by Saadé et al. (2002), with minor modifications. In brief, in the first day of experimental testing (habituation session), the animals were transferred to the laboratory and, after 2 h, each rat was gently handheld and had its right and left hind paws dipped into a bath containing water kept at  $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Immediately after withdrawing the paw from the water, the animal was gently returned to a clean home cage.

In the second day of testing, the animals were subjected to the same experimental procedure, and had their hind paws dipped into the water bath in the same way that was made in the first day. The latency to withdraw the paw from the hot bath was recorded manually with a stopwatch, and this measure constituted the baseline paw withdrawal latency. This low intensity of thermal stimulation ( $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) yields baseline latencies (6-8 seconds) that are wide enough to observe hyperalgesia or analgesia. Each animal was tested twice before the administration of drugs, in order to obtain the baseline withdrawal latency and five to sixty minutes after drug treatments. If no response occurred in 24 seconds, the test was terminated to avoid tissue damage. The results were expressed in % Baseline Latency, calculated as follows: % Baseline Latency = (latency post-drug – latency pre-drug) / (latency pre-drug) x 100.

#### **2.4. Intra-amygdala injections**

Separate groups of rats received a 0.5  $\mu\text{L}$ -injection of 100 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) or bradykinin (0.025-0.5 nmol/site) unilaterally into the right amygdala. Other groups received bradykinin (0.25 nmol/site) plus the selective  $B_2$  receptor antagonist Hoe 140 (5 pmol/site), the selective  $B_1$  receptor antagonist des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-bradykinin (0.05 nmol/site), the glutamatergic NMDA receptor antagonist MK-801 (5 nmol/site) or the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (10 nmol/site). A different group of animals received PBS or the glial metabolic inhibitor, fluorocitrate (1 nmol/site) unilaterally into amygdala 30 minutes before the intra-amygdalar injection of bradykinin (0.25 nmol/site) or PBS. The injection (0.5  $\mu\text{l}$ /site) was carried out over 1 minute, and the injector was left in place during 1 minute after infusion to avoid drug reflux. The drug doses used were selected based on previous

studies (Walker et al., 1996; Watkins et al., 1997; Jafari-Sabet, 2006) or determined by pilot experiments. Injection placements were verified immediately after the last testing session, as described previously (Rubin et al., 2004). Only data from the animals with the correct placement of cannulas were analysed.

### **2.5. Open-field test**

Immediately after the thermal nociception evaluation, the animals were transferred to a round open field (56 cm in diameter), which had its floor divided into 10 equal areas. The number of areas crossed and rearing responses was recorded for 5 minutes.

### **2.6. Drugs**

The following drugs were used: PBS, bradykinin, des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradykinin, MK-801, indomethacin and fluorocitrate were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). Hoe 140 (icatibant) was kindly provided by Aventis (Frankfurt am Main, Germany).

### **2.7. Statistical analysis**

The results are presented as the mean  $\pm$  SEM of 5-9 animals per group. Statistical analysis of withdrawal latencies was carried out by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls' test. P values  $< 0.05$  were considered significant. When possible, the ED<sub>50</sub> values (i.e. the dose which bradykinin produces half maximal response in relation to control value) were determined. The ED<sub>50</sub> values were determined by graphical interpolation from individual experiments by use of at least three doses of drug, and are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits.

---

### 3. Results

#### ***3.1. Effects of intra-amygdala administration of bradykinin on the thermal noxious stimulus sensitivity***

The intra-amygdala administration of bradykinin (0.025-0.5 nmol/site) resulted in a thermal hyperalgesia in rats, evaluated in the paw-flick test, 15 min after injection (Figure 1A). Accordingly, bradykinin injection into right amygdala reduced right paw withdrawal latencies when compared to control ( $-55.3 \pm 6.2$  and  $10.1 \pm 2.6$ , for bradykinin 0.25 nmol/site and PBS, respectively). The calculated mean ED<sub>50</sub> value (and the 95 % confidence limits) for bradykinin-induced hyperalgesia was 0.04 (0.02-0.08) nmol/site. The hyperalgesia induced by bradykinin (0.25 nmol/site) installed slowly. It was significant at 10 minutes, peaked at 15 minutes and lasted for up to 20 minutes, returning to baseline level 30 minutes after injection (Figure 1B).

The unilateral bradykinin administration into amygdala produced an ipsilateral hyperalgesia. When bradykinin was administered into right amygdala only the right paw showed a reduction of withdrawal latency, whereas the contralateral paw did not present difference in paw withdrawal latency in relation to the baseline withdrawal latency when compared to control ( $-4.6 \pm 13.0$  and  $-3.5 \pm 8.3$  for bradykinin 0.25 nmol/site and PBS, respectively).

Immediately after the thermal nociceptive test, we assessed the locomotor behavior of the animals in the open field, in order to identify any motor disability that might influence the paw withdrawal performance. Statistical analysis of open-field data revealed that intra-amygdala bradykinin injection did not affect the number of crossing or rearing responses in a subsequent open-

field testing session (Table 1). These data suggest that the effects of bradykinin on paw-flick test were not due to an unspecific effect on locomotor activity.

### ***3.2. Effects of intra-amygdala administration of selective kinin receptor antagonists on bradykinin-induced hyperalgesia***

The co-administration of bradykinin (0.25 nmol/site) with the selective B<sub>2</sub> receptor antagonist Hoe 140, at a dose that had no effect *per se* (5 pmol/site), abolished bradykinin-induced hyperalgesia (Figure 2A). Conversely, the selective B<sub>1</sub> receptor antagonist des-Arg<sup>9</sup>-Leu<sup>8</sup>-bradykinin (0.05 nmol/site) did not reduce the hyperalgesic effect of bradykinin (0.25 nmol/site), when co-administered with this peptide (Figure 2B). These data suggest that the hyperalgesic effect induced by bradykinin involves B<sub>2</sub>, but not B<sub>1</sub> receptors.

### ***3.3. Effects of intra-amygdala administration of a glutamate NMDA receptor antagonist and a cyclooxygenase inhibitor on bradykinin-induced hyperalgesia***

The co-administration of bradykinin (0.25 nmol/site) with the glutamate NMDA receptor antagonist MK 801, at a dose that had no effect *per se* (5 nmol/site), reduced in 91.1±19.3% the bradykinin-induced hyperalgesia (Figure 3A). Furthermore, the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (10 nmol/site) was able to diminish in 81±23.4% the hyperalgesia when co-administered with bradykinin (0.25 nmol/site) (Figure 3B). These results suggest that hyperalgesic effect induced by bradykinin is indirectly mediated by NMDA receptor stimulation and cyclooxygenase-derived products release.



### **3.4. Effect of glial amygdala disruption on bradykinin-induced hyperalgesia**

It has been showed that glia can, upon activation, release a variety of substances known to mediate hyperalgesia, including glutamate and cyclooxygenase products. In the present study, pre-treatment with the glial metabolic inhibitor fluorocitrate (1 nmol/site) was able to partially reduce ( $36.2 \pm 6.8\%$ ) the hyperalgesia induced by intra-amygdalar injection of bradykinin (0.25 nmol/site) (Figure 5). These results support the hypothesis that amygdalar glia contribute to pain sensitization following bradykinin administration.

## **4. Discussion**

The peptide bradykinin has long been established as an important peripheral mediator of pain (for review see: Dray and Perkins, 1997; Calixto et al., 2001). Although much is known about the peripheral actions of bradykinin and other kinins on pain induction, their functional actions on pain transmission at the central nervous system are not well understood. All of the components of the kallikrein-kinin system have been identified in various regions of the central nervous system (Perry and Snyder, 1984; Scicli et al., 1984; Chao et al., 1987; Raidoo and Bhoola, 1997). Of note, the presence of kinin receptors has been demonstrated in many brain structures involved in pain transmission, including amygdala (Murone et al., 1997; Ongali et al., 2003; Shughrue et al., 2003;). In the present study we showed that the injection of bradykinin into the right amygdala of rats caused thermal hyperalgesia mediated by B<sub>2</sub> receptor activation. In addition, a NMDA receptor antagonist, an inhibitor of prostaglandin production and an inhibitor of glial metabolic activity decreased bradykinin-induced hyperalgesia.

An increasing body of evidence implicates the amygdala in the modulation of pain behavior and pain sensation. Electrophysiological studies have indicated that mechanical and thermal noxious stimuli activate amygdaloid neurons (Bernard et al., 1990; Neugebauer and Li, 2002). Functional neuroimaging studies in humans have indicated that noxious stimulation produces amygdala activation (Bornhövd et al., 2002; Becerra et al., 2001). Furthermore, this limbic structure also contributes to the production of morphine antinociception in the thermal and chemical models of pain in rats (Manning and Mayer, 1995a; 1995b; McGaraughty et al, 2004). Our results showed that bradykinin administration into the amygdala reduces the paw withdrawal latency from a noxious thermal stimulus. Although the paw withdrawal seems to be a simple spinal reflex, this behavior is under the influence of supraspinal structures that modulate the descending pain-modulating pathways (Basbaum and Fields, 1984). The central nucleus of amygdala forms widespread direct and indirect connections with forebrain and brainstem areas that are part of the pain-modulating system, including periaqueductal gray matter (PAG), rostral ventromedial medulla (RVM) and dorsal horn of the spinal cord (Fields, H., 2004; Neugebauer et al., 2004). This descending control can either facilitate or inhibit nociceptive transmission through the activity of two neuronal subpopulations present in PAG and RVM: off-cells inhibit withdrawal reflex whereas on-cells facilitate such response (Fields et al., 1983; Heinricher et al., 1989). It has been demonstrated that microinjections of morphine, at doses capable of inducing analgesia in the tail-flick test, into the amygdala decrease on-cells and increase off-cell firing (McGaraughty et al, 2004). Thus, morphine seems to cause analgesia through the stimulation of inhibitory descendent pain

pathways. On the other hand, we can suggest that the hyperalgesia produced by injection of bradykinin into amygdala is result of activation of facilitating pain pathway. Kinins could also modulate the central descending pain pathways in other structures. In fact, it has been demonstrated that bradykinin injected into PAG promotes a hyperalgesic effect (Burdin et al., 1992). Apparently, bradykinin and morphine stimulate the descending pain pathway, but in an opposite manner.

We have also observed that intra-amygdala bradykinin produces thermal hyperalgesia only in the paw ipsilateral to the injected amygdala. In agreement with our results, a previous study has demonstrated that unilateral amygdala lesions result in an ipsilateral disruption of analgesic effect of systemic morphine (Manning, 1998). Moreover, earlier neuroanatomical tracing studies suggesting an ipsilateral topography of descending pain control circuits. The present results are in agreement with earlier neuroanatomical. In example, projections from the central nucleus of amygdala to the ventrolateral PAG are primarily ipsilateral in nature (Rizvi et al., 1991; Manning, 1998).

The actions of kinins are mediated through stimulation of two subtypes of seven transmembrane G-protein coupled receptors, named B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>. It is well known that kinin receptors are different entities (for review, see: Calixto et al., 2001; 2004). The B<sub>1</sub> receptor exhibits higher affinity for the kinin active carboxypeptidase metabolites des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin and des-Arg<sup>10</sup>-kallidin, and is rarely expressed in non-traumatized tissues. On the other hand, bradykinin and kallidin exhibit great affinity for the B<sub>2</sub> receptors, which are normally constitutive and widely distributed throughout central and peripheral tissues. Thus, most of the physiological kinin actions seem to be mediated by stimulation of

constitutive B<sub>2</sub> receptors. Therefore, most actions of bradykinin, including the activation of nociceptors and the production of pain, are mediated through the B<sub>2</sub> receptor (Dray and Perkins, 1997; Calixto et al., 2001). In line with view, we have found that bradykinin-induced hyperalgesia was mediated by B<sub>2</sub>, but not B<sub>1</sub> receptor stimulation. Moreover, *in vitro* autoradiography studies have shown that rat amygdala presents more B<sub>2</sub> receptors than B<sub>1</sub> receptors (Ongali et al., 2003), although the expression of B<sub>1</sub> receptors in the amygdala increases in epileptic and diabetic animals (Ongali et al., 2003; Campos et al., 2005). Therefore, the role of amygdalar B<sub>1</sub> receptors in chronic painful pathological conditions remains to be determined.

The strong synergy between the actions of bradykinin and prostaglandins is well known. The activation of B<sub>2</sub> receptors stimulates phospholipase A<sub>2</sub> to generate arachidonic acid metabolites, such as prostaglandins (Rang et al., 1991). In fact, it has been reported that peripheral bradykinin-induced nociceptor sensitisation *in vitro* and heat hyperalgesia *in vivo* are mediated by cyclooxygenase products (Schuligoi et al, 1994; Pethö et al., 2001). Similar to periphery, results reported in the current study demonstrated that hyperalgesic state induced by intra-amygdala bradykinin is partially mediated by cyclooxygenase products. Interestingly, there are some evidences that prostaglandins can induce hyperalgesia through activation of descending pain-modulating circuit (Heiricher et al., 2004; Oliva et al., 2006).

An additional mechanism that may contribute to bradykinin-induced central sensitization is the modulation of the glutamatergic synaptic transmission. It has been recently demonstrated that bradykinin increases spinal cord glutamate release pre-synaptically and enhances the sensitivity of

glutamate ionotropic receptors post-synaptically (Wang et al., 2005). Besides, the glutamatergic NMDA receptor antagonist MK-801 abolished the thermal hyperalgesia induced by the intrathecal injection of bradykinin (Wang et al., 2005). Our results support the view that glutamate NMDA receptors also contribute to central sensitisation and, therefore, to the hyperalgesia induced by the intra-amygdala injection of bradykinin. Some evidence point to a close relationship between prostaglandins and glutamate regulation. Cyclooxygenase inhibitors block the hyperalgesia induced by spinal glutamate injection (Malmberg and Yaksh, 1992). In addition, activation of glutamatergic NMDA receptors stimulates the release of arachidonic acid or its metabolites in striatal neurons (Dumuis et al., 1988). Thus, the combination of cyclooxygenase metabolites and glutamate release induced by bradykinin seems to be essential to thermal hyperalgesia induction.

There is an extensively communication between neurons and the neighbouring glial cells that modulate pain sensitization through the release of some mediators, such as glutamate and prostanoids. Indeed, recent studies have documented a glial key role in hyperalgesia mechanisms (for review see: Watkins e Maier, 2003). Activation of spinal cord glia is involved in hyperalgesic state induced by peripheral nerve injury, intraplantar zymosan or formalin administration (Meller et al., 1994; Watkins et al., 1997; Milligan et al., 2003). Here, we have shown that glial cells are also important components of pain induction at amygdalar level since the inhibitor of glial metabolism fluorocitrate reduced thermal hyperalgesia. Microglia and astrocytes express B<sub>2</sub> receptors (Cholewinski et al., 1991; Hosli and Hosli, 1993; Noda et al., 2003) and bradykinin is capable of inducing calcium-dependent release of glutamate from

cultured astrocytes (Jeftinija et al., 1997). Similarly, prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes (Bezzi et al., 1998) and arachidonic acid inhibits glutamate uptake into glial cells (Barbour et al., 1989). Accordingly, the results of the current study indicate that glia represents a relevant site for hyperalgesic action of bradykinin.

In conclusion, in this study we showed that the activation of amygdalar B<sub>2</sub> receptors results in pain sensitization mediated by prostaglandins and glutamate that probably modulate descending pain pathways. Together, these findings support that bradykinin participates of the central pain-modulating circuit.

### **Acknowledgements**

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), by Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX) and by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Brazil). G.D.D. is the recipient of a CAPES (Brazil) fellowship.

### **References**

- Barbour, B., Szatkowski, M., Ingledeu, N., Attwell, D., 1989. Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells. *Nature* 342, 918-920.
- Basbaum, A.I., Fields, H.L., 1984. Endogenous pain control systems. *Ann Rev Neurosc* 7, 309-338.
- Becerra, L., Breiter, H.C., Wise, R., Gonzáles, R.G., Borsook, D., 2001. Reward circuitry activation by noxious thermal stimuli. *Neuron* 2001 32, 927-946.

- Bernard, J.F., Huang, G.F., Besson, J.M., 1990. Effect of noxious somesthetic stimulation on the activity of neurons of the nucleus centralis of the amygdala. *Brain Res* 523, 347-50.
- Bezzi, P., Carmignoto, G., Pasti, L., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B.L., Pozzan, T., Volterra, A., 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391, 281-285.
- Bornhövd, K., Quante, M., Glauche, V., Bromm, B., Weiller, C., Büchel, C., 2002. Painful stimuli evoke different stimulus-response functions in the amygdala, prefrontal, insula and somatosensory cortex: a single-trial fMRI study. *Brain* 125, 1326-1336.
- Burdin, T.A., Graeff, F.G., Pelá, I.R., 1992. Opioid mediation of the antiaversive and hyperalgesic actions of bradykinin injected into the dorsal periaqueductal gray of the rat. *Physiol Behav* 52, 405-410.
- Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M., 2000. Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87, 15.
- Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M., 2001. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr Opin Anaesthesiol* 14, 519-526.
- Calixto, J.B., Medeiros, R., Fernandes, E.S. Ferreira, J., Cabrini, D.A., Campos, M.M., 2004. Kinin B<sub>1</sub> receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* 143, 803-818.
- Campos, M.M. Ongali, B., De Souza, B.H., Schanstra, J.P., Girolami, J.P., Chabot, J.G., Couture, R. 2005. Expression and distribution of kinin B<sub>1</sub> receptor in the rat brain and alterations induced by diabetes in the model of streptozotocin. *Synapse* 57, 29-37.

- Chao, J., Chao, L., Swain, C.C., Tsai, J., Margolius, H.S., 1987. Tissue kallikrein in rat brain and pituitary: regional distribution and estrogen induction in the anterior pituitary. *Endocrinology* 120, 475-482.
- Cholewinski, A.J., Stevens, G., McDermott, A.M., Wilkin, G.P., 1991. Identification of B<sub>2</sub> bradykinin binding sites on cultured cortical astrocytes. *J Neurochem* 57, 1456-1458.
- Dray, A., Perkins, M., 1993. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* 16, 99-104.
- Dray, A., Perkins, M., 1997. Kinins and pain. In: Farmer SG (ed), *The Kinin System*. Academic Press Inc., San Diego, CA , pp. 157-172.
- Dumuis, A., Sebben, M., Haynes, L., Pin, J.-P., Bockaert, J., 1988. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature* 336, 68-70.
- Fields, H., 2004. State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci.* 5, 565-575.
- Fields, H.L., Bry, J., Hentall, I., Zorman, G., 1983. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J Neurosc* 3, 2545-2552.
- Fugiwara, Y., Mantione, C.R., Vavrek, R.J., Stewart, J.M., Yamamura, H.I., 1989. Characterization of [<sup>3</sup>H]-bradykinin binding sites in guinea-pig central nervous system: possible existence of B<sub>2</sub> subtypes. *Life Sci* 44, 1645-1653.
- Heinricher, M.M., Barbaro, N.M. Fields, H.L., 1989. Putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla of the rat: firing of on- and off-cells is related to nociceptive responsiveness. *Somatosens Mot Res* 6, 427-439.



- Heinricher, M.M., Martenson, M.E., Neubert, M.J., 2004. Prostaglandin E<sub>2</sub> in the midbrain periaqueductal gray produces hyperalgesia and activates pain-modulating circuitry in the rostral ventromedial medulla. *Pain* 110, 419-426.
- Hosli, E., Hosli, L., 1993. Autoradiographic localization of binding sites for neuropeptide Y and bradykinin on astrocytes. *Neuroreport* 4, 159-162.
- Jafari-Sabet, M., 2006. NMDA receptor antagonist antagonize the facilitatory effects of post-training intra-basolateral amygdala NMDA and physostigmine on passive avoidance learning. *Eur J Pharmacol* 529, 122-128.
- Jeftinija, S.D., Jeftinija, K.V., Stefanovic, G., 1997. Cultured astrocytes express proteins involved in vesicular glutamate release. *Brain Res* 750, 41-47.
- Malmberg, A.B., Yaksh, T.L., 1992. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science* 257, 1276-1279.
- Manning, B.H., Mayer, D.J., 1995a. The central nucleus of the amygdala contributes to production of morphine antinociception in the formalin test. *Pain* 63, 141-152.
- Manning, B.H., Mayer, D.J., 1995b. The central nucleus of the amygdala contributes to the production of morphine antinociception in the rat tail flick test. *J Neurosci* 15, 8199-8213.
- Manning, B.H., 1998. A lateralized deficit in morphine antinociception after unilateral inactivation of the central amygdala. *J Neurosci* 18, 9453-9470.
- Marceau, F., Hess, F., Bachvarov, D.R., 1998. The B<sub>1</sub> receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50, 357-386.

- McGaraughty, S., Farr, D.A., Heinricher, M.M., 2004. Lesions of the periaqueductal gray disrupt input to the rostral ventromedial medulla following microinjections of morphine into the medial or basolateral nuclei of the amygdala. *Brain Res* 1009, 223-227.
- Meller S.T., Dykstra, C., Grzybycki, D., Murphy, S., Gebhart, G.F. 1994. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* 33, 1471-1478.
- Milligan, E.D., Twining, C., Chacur, M., Biedenkapp, J., O'Connor, K., Poole, S., Tracey, K., Martin, D., Maier, S.F., Watkins, L.R. 2003. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23, 1026-1040.
- Murone, C., Paxinos, G., McKinley, M.J., Oldfield, B.J., Müller-Esterl, W., Mendelsohn, F.A.O., Chai, S.Y., 1997. Distribution of bradykinin B<sub>2</sub> receptors in sheep brain and spinal cord visualized by in vitro autoradiography. *J Comp Neurol* 381, 203-218.
- Neugebauer, V. , Li, W., 2002. Processing of nociceptive mechanical and thermal information in central amygdala neurons with knee-joint input. *J Neurophysiol* 87, 103-112.
- Neugebauer, V. Li, W., Bird, G.C., Han, J.S., 2004. The amygdala and persistent pain. *Neuroscientist* 10, 221-233.
- Noda, M., Kariura, Y., Amano, T., Manago, Y., Nishikawa, K., Aoki, S., Wada, K., 2003. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. *Life Sci* 72, 1573-1581.
- Oliva, P., Berrino, L., de Novellis, V., Palazzo, E., Marabese, I., Siniscalco, D., Scafuro, M., Mariani, L., Rossi, F. Maione, S., 2006. Role of periaqueductal

- grey prostaglandin receptors in formalin-induced hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 530, 40-47.
- Ongali, B., Campos, M.M., Bregola, G., Rodi, D., Regoli, D., Thibault, G., Simonato, M., Couture, R., 2003. Autoradiographic analysis of rat brain kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors: normal distribution and alterations induced by epilepsy. *J Comp Neurol* 461, 506-519.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic press
- Perry, D.C., Snyder, S.H., 1984. Identification of bradykinin in mammalian brain. *J Neurochem* 43, 1072-1080.
- Pethö, G., Derow, A., Reeh, P.W., 2001. Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated by cyclooxygenase products in isolated rat skin. *Eur J Neurosci* 14, 210-218.
- Raidoo, D.M., Bhoola, K.D., 1997. Kinin receptors on human neurones. *J Neuroimmunol* 77, 39-44.
- Raidoo, D.M., Bhoola, K.D. 1998. Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol Ther* 79, 105-127.
- Rang, H.P., Bevan, S.J, Dray, A., 1991. Chemical activation of nociceptive peripheral neurons. *Br Med Bull* 47, 534-548.
- Regoli, D., Barabé, J., 1980. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 32, 1-46.
- Rizvi, T.A., Ennis, M., Behbehani, M.M., Shipley, M.T., 1991. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *J Comp Neurol* 303, 121-131.

- Rubin, M.A., Berlese, D.B., Stiegemeier, J.A., Volkweis, M.A., Oliveira, D.M., dos Santos, T.L., Fenili, A.C., Mello, C.F., 2004. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci* 24, 2328-2334.
- Saadé, N.E., Massad, C.A., Ochoa-Chaar, C.I., Jabbur, S.J., Safieh-Garabedian, B., Atweh, F., 2002. Upregulation of proinflammatory cytokines and nerve growth factor by intraplantar injection of capsaicin in rats. *J Physiol* 545, 241-253.
- Schuligoj, R., Donnerer, J., Amann, R., 1994. Bradykinin-induced sensitization of afferent neurons in the rat paw. *Neuroscience* 59, 211-215.
- Scicli, A.G., Forbes, G, Nolly, H., Dujovny, M., Carretero, O.A., 1984. Kallikrein-kinin in the central nervous system. *Clin Exp Theory Pract* A6 (10 e 11), 1731-1738.
- Shughrue, P.J., Ky, B., Austin, C.P., 2003. Localization of B<sub>1</sub> bradykinin receptor mRNA in the primate brain and spinal cord: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 465, 372-384.
- Walker, K., Perkins, M., Dray, A., 1995. Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int* 26, 1-16.
- Walker, K., Dray, A., Perkins, M., 1996. Hyperalgesia in rats following intracerebroventricular administration of endotoxin: effect of bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor antagonist treatment. *Pain* 65, 211-219.
- Wang, H., Kohno, T., Amaya, F., Brenner, G.J., Ito, N., Allchorne, A., Ji, R-R., Woolf, C.J., 2005. Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci* 25, 7986-7992.

Watkins, L.R., Martin, D., Ulrich, P., Tracey, K.J., Maier, S.F., 1997. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Pain* 71, 225-235.

Watkins, L.R., Maier, S.F., 2003. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov* 12, 973-985.

Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-10.

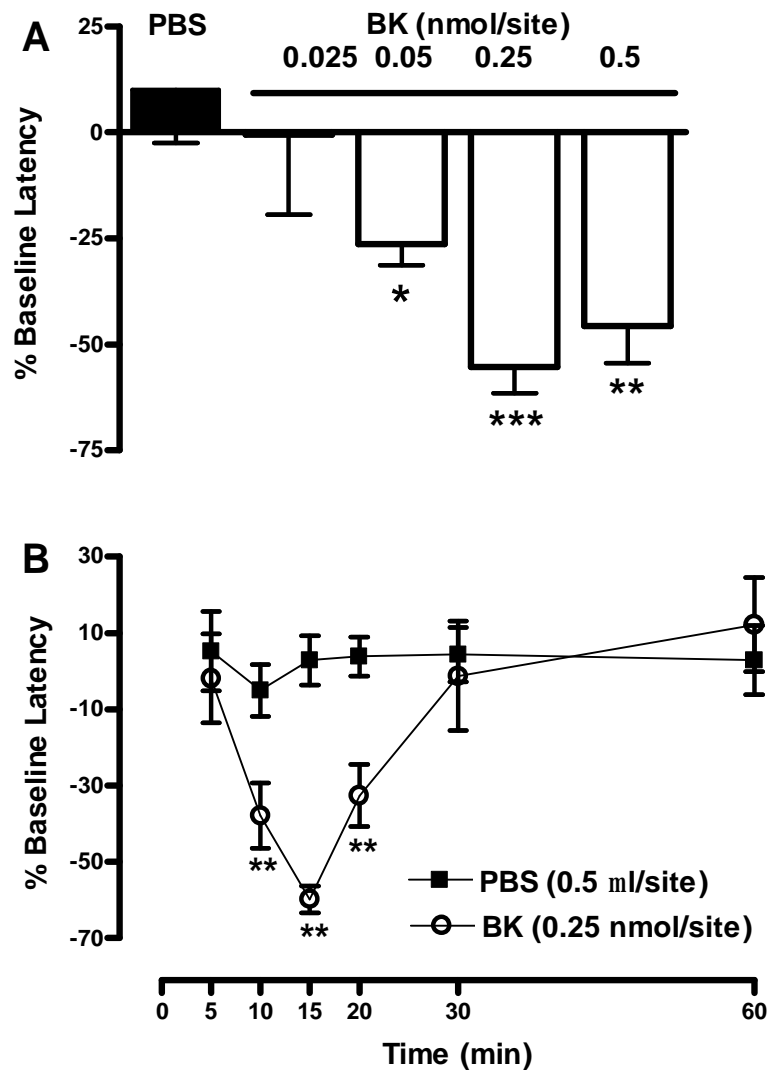


Figure 1. (A) Dose-response curve for the hyperalgesic action caused by intra-amygdala injection of bradykinin (BK). (B) Time-course for the hyperalgesic action caused by intra-amygdala injection of bradykinin (0.25 nmol/site) in rats. The effects of drugs are expressed as % of baseline latency. For dose-response curves the % baseline latency was calculated at the hyperalgesia peak (15 minutes). Each column or point represents the mean of six to nine animals and vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance levels in comparison with control (PBS-treated group) values (one-way ANOVA (A) or two-way ANOVA (B) followed by Student-Newman-Keuls' test), \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

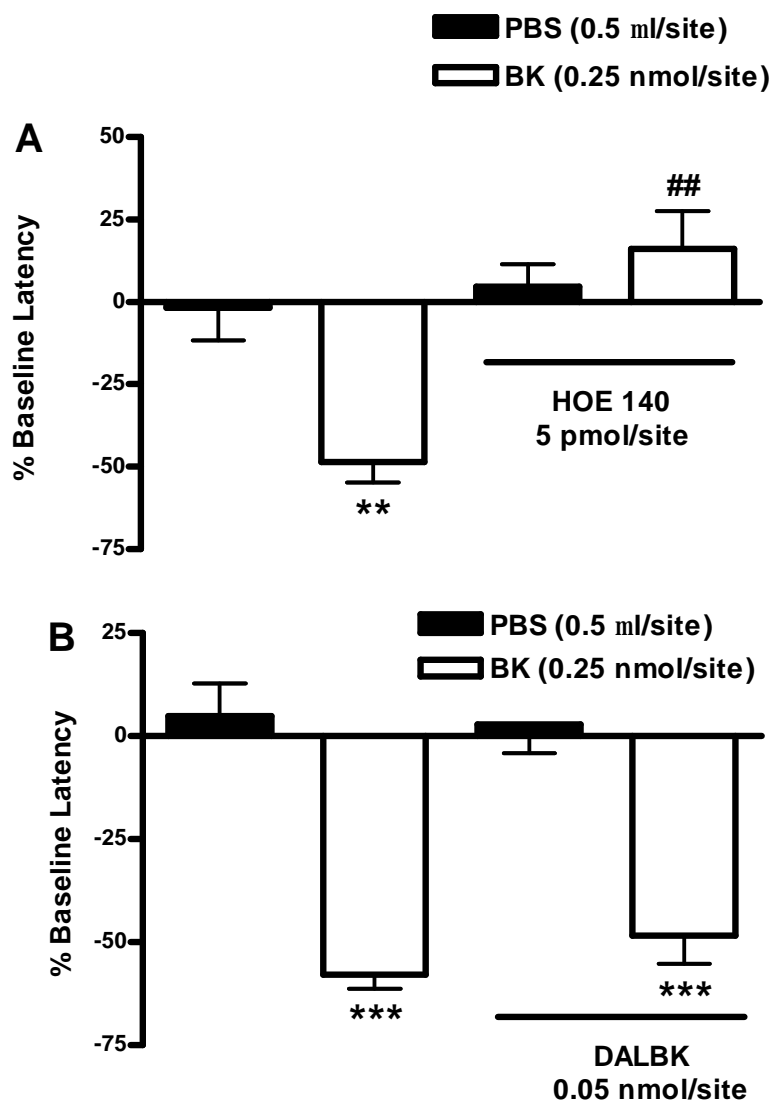


Figure 2. Effect of the co-administration of the selective B<sub>2</sub> kinin receptor antagonist Hoe 140 (A) or the selective B<sub>1</sub> kinin receptor antagonist des-Arg<sup>9</sup>-[Leu<sup>8</sup>]-bradykinin (DALBK) (B) on the hyperalgesia assessed 15 minutes after the intra-amygdala injection of bradykinin (BK, 0.25 nmol/site) in rats. The effects of drugs are expressed as % of baseline latency. Each column represents the mean of six to nine animals and the vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance levels in comparison with control (PBS-treated group) values and # denote the significance levels in comparison with PBS plus bradykinin-treated group (one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test), \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, ##P<0.001.

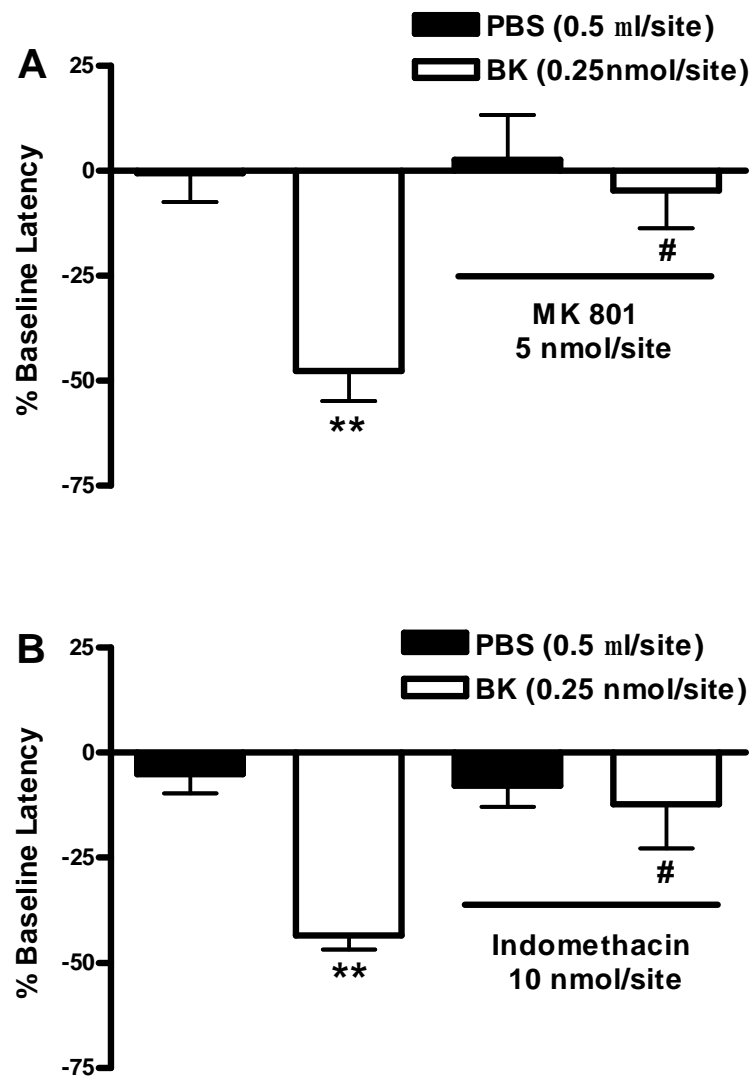


Figure 3. Effect of the co-administration of the NMDA receptor antagonist MK-801 (A) or the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (B) on the hyperalgesia assessed 15 minutes after the intra-amygdala injection of bradykinin (BK, 0.25 nmol/site) in rats. The effects of drugs are expressed as % of baseline latency. Each column represents the mean of six to nine animals and the vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance levels in comparison with control (PBS-treated group) values and # denote the significance levels in comparison with PBS plus bradykinin-treated group (two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test), \*\* $P < 0.01$ , # $P < 0.01$ .



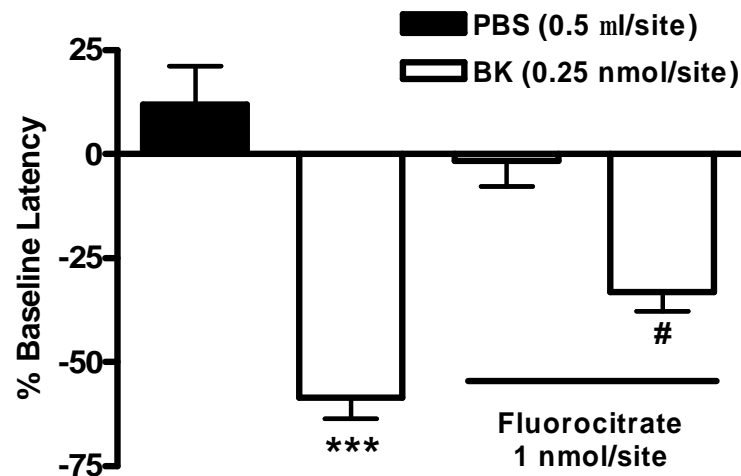


Figure 4. Effect of the pre-treatment with the glial metabolic inhibitor fluorocitrate on hyperalgesia assessed 15 minutes after the intra-amygdala injection of bradykinin (BK, 0.25 nmol/site) in rats. The effects of drugs are expressed as % of baseline latency. Each column represents the mean of five to seven animals and the vertical lines show the SEM. Asterisks denote the significance levels in comparison with control (PBS-treated group) values and # denote the significance levels in comparison with PBS plus bradykinin-treated group (two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' test), \*\*\* $P < 0.001$ , # $P < 0,01$ .

**Table 1.** Effect of intra-amygdala administration of bradykinin on behaviour of rats in the open-field test.

Group	Crossing	Rearing	N
PBS (0.5 µl/site)	39.5±5.8	10.8±2.8	6
Bradykinin (0.25 nmol/site)	32.0±4.3	7.6±2.4	5

Data are means ± SEM.

**Carta referente à submissão do artigo**

Dear Mr Juliano Ferreira, PhD,

Your submission entitled "BRADYKININ INTO AMYGDALA INDUCES THERMAL HYPERALGESIA IN RATS" has been received by Neuropeptides. You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/npep/>.

Your username is: gerusa

Your password is: ferreira43


Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Neuropeptides

Neuropeptides					
Home   Journals   Submit your article for authors   Register   Change details   Help us				 User name: gerusa Password: ferreira43	
Submissions Being Processed for Author Juliano Ferreira, PhD					
Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">View Submitted</a> <a href="#">View Submitted Details</a>		BRADYKININ INTO AMYGDALA INDUCES THERMAL HYPERALGESIA IN RATS	Aug 17 2008	Aug 17 2008	Submitted to Journal
Back to Main Menu					

---

## IV. DISCUSSÃO

O peptídeo bradicinina é considerado um importante mediador da dor. Embora as ações periféricas da bradicinina, e de outras cininas, na indução da dor estejam bem estabelecidas (para revisão, ler: DRAY e PERKINS, 1997; CALIXTO et al., 2001), a participação desse peptídeo na transmissão da dor no sistema nervoso central permanece obscura. Todos os componentes do sistema das cininas foram identificados no sistema nervoso central (CAMARGO et al., 1973; PERRY e SNYDER, 1984; SCICLI et al., 1984; CHAO et al., 1987; FUGIWARA et al., 1989; RAIDOO e BHOOLA, 1997). A presença de receptores para as cininas foi evidenciada em diversas estruturas encefálicas envolvidas na transmissão da dor, inclusive na amígdala (MURONE et al., 1997; ONGALI et al., 2003; SHUGHRUE et al., 2003). No presente estudo, verificou-se que a administração de bradicinina na amígdala de ratos resultou em hiperalgesia térmica. O efeito hiperalgésico desse peptídeo foi mediado pela estimulação de células neuronais e gliais através da ativação de receptores B<sub>2</sub> e NMDA e liberação de produtos das ciclooxigenases.

Várias evidências indicam que a amígdala está envolvida no processamento da dor. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que estímulos nociceptivos térmicos e mecânicos ativam neurônios amigdalares (BERNARD et al., 1990; NEUGEBAUER e LI, 2002). Estudos de neuroimagem funcional em humanos indicam que a amígdala é ativada em situações de dor (BORNHÖVD et al., 2002; BECERRA et al., 1999). Além disso, essa estrutura participa do controle endógeno da dor e da analgesia mediada por opióides e canabinóides (MANNING e MAYER, 1995a 1995b MANNING et al., 2003; McGARAUGHTY et al, 2004).

Os resultados do presente estudo demonstram que a administração de bradicinina na amígdala provoca redução na latência do reflexo de retirada causado por estimulação térmica. Embora o reflexo de retirada pareça um simples reflexo espinhal, esse comportamento é intensamente regulado por estruturas supra-espinhais envolvidas no circuito descendente da dor. O circuito descendente da dor é formado por conexões entre estruturas límbicas e corticais com a PAG, que envia eferentes à RVM e essa ao corno dorsal da medula (para revisão, ler: FIELDS, 2004). Esse circuito descendente pode tanto facilitar como inibir a transmissão nociceptiva através da atividade de duas subpopulações neuronais presentes na PAG e na RVM, que exercem ações modulatórias opostas após a estimulação nociceptiva periférica. Enquanto as células *off* inibem o reflexo de retirada, as células *on* facilitam tal resposta (FIELDS et al., 1983; HEINRICHER et al., 1989). Alguns estudos comprovam esta afirmativa. Microinjeções de morfina no núcleo basolateral ou no núcleo medial da amígdala em dose que promove analgesia (avaliada no teste de retirada da cauda), promovem uma diminuição da atividade das células *on* e um aumento na atividade das células *off* da RVM (McGARAUGHTY et al., 2004). Portanto, a morfina parece causar analgesia através da ativação do circuito descendente inibitório. Por outro lado, a ativação seletiva das células *on* da RVM diminui consideravelmente a latência da resposta de retirada da pata causada por estimulação térmica (NEUBERT et al., 2004), e, também, parece contribuir para a nocicepção exagerada presente em quadros de dor persistente, como a observada em alguns processos inflamatórios e após lesão de nervos (PORRECA et al., 2002).

Uma vez que a amígdala tem conexões diretas e recíprocas com a PAG e, dessa forma, participa do circuito modulatório descendente (amígdala-PAG-RVM-medula espinhal), pode-se sugerir que a hiperalgesia produzida por administração de bradicinina nessa estrutura é resultado da ativação do circuito descendente facilitatório. Da mesma forma que na amígdala, as cininas parecem modular a transmissão da dor em outras estruturas que integram esse circuito descendente. Por exemplo, foi demonstrado que a injeção de bradicinina na PAG de ratos causa hiperalgesia (BURDIN et al., 1992). Embora a administração de morfina na amígdala cause analgesia (McGARAUGHTY e HEINRICHER, 2002; McGARAUGHTY et al., 2004), aparentemente tanto a bradicinina quanto a morfina estimulam o circuito descendente da dor, porém de maneira oposta.

Curiosamente, a administração intra-amigdalar de bradicinina induziu hiperalgesia apenas na pata ipsilateral ao hemisfério injetado. Sabe-se que o estímulo periférico sensorial normalmente ativa regiões encefálicas localizadas no hemisfério contralateral ao lado estimulado, logo a via sensorial e/ou nociceptiva ascendente apresenta uma topografia contralateral. Por outro lado, estudos prévios sugerem uma topografia ipsilateral para o circuito modulatório descendente da dor (RIZVI et al., 1991; MANNING, 1998). Por exemplo, foi demonstrado que a lesão unilateral da amígdala inibe a analgesia induzida por injeção sistêmica de morfina apenas na pata ipsilateral à lesão (MANNING, 1998). Interessantemente, nesse mesmo estudo, a lesão unilateral da amígdala não interrompeu a transmissão ascendente do estímulo nociceptivo, uma vez que a inativação da amígdala não foi capaz de inibir a nocicepção induzida por formalina na pata ipsilateral (MANNING, 1998). Esses dados sugerem que a

amígdala está envolvida de forma importante na modulação do circuito descendente da dor, que segue uma trajetória ipsilateral. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os trabalhos anteriores e reforçam a hipótese de que o efeito hiperalgésico da bradicinina se dá através da estimulação desse circuito.

As ações das cininas são mediadas por estimulação de subtipos de receptores acoplados à proteína G, denominados B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Sabe-se que esses receptores são diferentes entidades (para revisão, ler: CALIXTO et al., 2001; 2004). Os receptores B<sub>1</sub> possuem alta afinidade pelos metabólitos ativos des-Arg<sup>9</sup>-bradicinina e des-Arg<sup>10</sup>-calidina e são raramente expressos nos tecidos. Por outro lado, os receptores B<sub>2</sub> são expressos constitutivamente na maioria dos tecidos e apresentam grande afinidade pela bradicinina e pela calidina. Logo, a maioria das ações da bradicinina são mediadas pela ativação do receptor B<sub>2</sub> (DRAY e PERKINS, 1997; CALIXTO et al., 2001). Em acordo com essas características, os dados desse trabalho indicam que a hiperalgesia causada por injeção intra-amigdalár de bradicinina é mediada por ativação de receptores do subtipo B<sub>2</sub>. Além do mais, estudos autoradiográficos *in vitro* demonstraram que a densidade de receptores B<sub>2</sub> na amígdala é consideravelmente maior que a de receptores B<sub>1</sub> (ONGALI et al., 2003). Curiosamente, foi observada uma maior densidade de receptores B<sub>1</sub> amigdalares em animais submetidos a modelos animais de epilepsia e diabetes mellitus (ONGALI et al., 2003; CAMPOS et al., 2005). No entanto, a participação dos receptores B<sub>1</sub> da amígdala em processos dolorosos patológicos permanece obscuro. Estudos adicionais serão necessários para o esclarecimento do papel desses receptores em tais processos.



Existe uma forte sinergia entre as ações da bradicinina e das prostaglandinas. A ativação de receptores B<sub>2</sub> estimula a produção de prostaglandinas através da estimulação da fosfolipase A<sub>2</sub> (RANG et al., 1991). De fato, alguns trabalhos indicam que a sensibilização de nociceptores periféricos (*in vitro*) e a hiperalgesia (*in vivo*) induzida por administração intraplantar de bradicinina são eventos mediados por prostanóides (SCHULIGOI et al, 1994; PETHÖ et al., 2001). De forma similar aos efeitos periféricos induzidos pela bradicinina, os resultados descritos nesse estudo demonstram que o efeito hiperalgésico induzido pela administração amigdalar de bradicinina é parcialmente mediado por prostanóides. Interessantemente, alguns relatos corroboram que as prostaglandinas induzem hiperalgesia através da ativação do circuito descendente facilitatório da dor (HEIRICHER et al., 2004; OLIVA et al., 2006).

Outro provável mecanismo pelo qual a bradicinina causa sensibilização á dor é através da sua ação modulatória na transmissão sináptica glutamatérgica. Recentemente foi demonstrado que a bradicinina promove o aumento da liberação espinal de glutamato pré-sinápticamente e aumenta a sensibilidade de receptores glutamatérgicos ionotrópicos pós-sinápticamente (WANG et al, 1995). Além disso, administração intratecal de bradicinina induz hiperalgesia térmica que é abolida pelo pré-tratamento com MK-801, um antagonista do receptor glutamatérgico ionotrópico do tipo NMDA (WANG et al., 2005). Os resultados aqui apresentados estão de acordo com a suposição de que a modulação de sinapses glutamatérgicas (através da liberação de glutamato e/ou da sensibilização de receptores do tipo NMDA) possivelmente

contribui para a sensibilização e conseqüente hiperalgesia induzida pela bradicinina.

Algumas evidências indicam que os mecanismos de regulação das prostaglandinas e do glutamato estão intimamente relacionados. Por exemplo, inibidores da ciclooxigenase bloqueiam a hiperalgesia induzida por administração intratecal de glutamato (MALMBERG e YAKSH, 1992), e a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA estimula a liberação de ácido araquidônico e de seus metabólitos em neurônios do estriado (DUMUIS et al, 1988). No presente estudo demonstrou-se que tanto a inibição da produção de prostaglandinas quanto o bloqueio de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA são capazes de inibir o efeito da bradicinina. Esses dados sugerem que a hiperalgesia induzida por bradicinina é resultado da interação das ações mediadas por prostanóides e glutamato.

A comunicação entre os neurônios e as células gliais adjacentes contribui para mecanismos envolvidos na sensibilização à dor. A propósito, recentes estudos demonstraram que a glia desempenha um importante papel no desenvolvimento da hiperalgesia (para revisão, ler: WATKINS e MAIER, 2003). Por exemplo, a ativação de células gliais da medula espinhal está envolvida na hiperalgesia induzida pela inflamação, pela injúria de nervos e pela administração subcutânea de formalina (MELLER, 1994; WATKINS et al., 1997; MILLIGAN, 2003). No presente estudo verificou-se que, assim como os neurônios, as células gliais estão envolvidas na hiperalgesia induzida pela bradicinina, uma vez que o inibidor do metabolismo da glia (fluorocitrato) reduziu parcialmente tal efeito. Como a micróglia e os astrócitos expressam receptores B<sub>2</sub> (CHOLEWINSKI et al., 1991; HOSLI e HOSLI, 1993; NODA et

al., 2003), é possível que a bradicinina esteja envolvida na ativação dessas células, bem como na liberação de mediadores da dor pelas mesmas. De fato, existem evidências de que a bradicinina é capaz de induzir liberação de glutamato em astrócitos (JEFTINIJA et al., 1997) de forma similar à liberação de glutamato mediada por prostaglandinas nessas células (BEZZI et al., 1998). Curiosamente, o ácido araquidônico também modula os níveis de glutamato nos astrócitos através da inibição da recaptação desse neurotransmissor por células gliais (BARBOUR et al., 1989). Os resultados do presente trabalho demonstram que a glia representa um relevante sítio de ação da bradicinina.

A partir dos resultados desse trabalho pode-se inferir que existe uma interação sinérgica entre as ações do glutamato e das prostaglandinas que modula o efeito da bradicinina. Em outras palavras, a estimulação dos receptores  $B_2$  resulta em uma cadeia de eventos que pode levar à sensibilização de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, bem como à liberação de glutamato e de prostaglandinas. As prostaglandinas podem agir diretamente, promovendo sensibilização neuronal ou indiretamente, liberando glutamato em células gliais. O aumento nos níveis de glutamato livre e/ou a sensibilização de receptores NMDA promove o aumento da estimulação desses receptores glutamatérgicos, o que pode, por sua vez, resultar na liberação de mais prostanóides, em um processo cíclico. Esses mecanismos parecem envolver ações inter-relacionadas de células neuronais e gliais.

Em conclusão, a ativação de receptores  $B_2$  na amígdala resulta em sensibilização central à dor, mediada pela ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e liberação de prostanóides, que leva à estimulação do circuito descendente facilitatório da dor. Esses resultados

indicam que a bradicinina é um dos mediadores que participam da modulação central da dor. Como a transmissão da dor está sob forte modulação de mecanismos centrais, tais como o circuito modulatório descendente, a descoberta de mediadores que participam desse circuito pode contribuir consideravelmente para o entendimento dos mecanismos envolvidos em processos dolorosos persistentes e/ou ininterruptos que estão provavelmente associados á estimulação do circuito descendente facilitatório. Os resultados desse trabalho indicam que a bradicinina é possivelmente um dos mediadores envolvidos na estimulação do circuito facilitatório da dor. No entanto, mais estudos são necessários para a confirmação do papel da bradicinina endógena nessa modulação.

---

**V.CONCLUSÃO**

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. A administração de bradicinina na amígdala de ratos causa hiperalgesia térmica;
2. O efeito hiperalgésico da bradicinina é mediado por ativação de receptores B<sub>2</sub> amigdalares;
3. A hiperalgesia produzida pela bradicinina se deve, em parte, à formação de produtos da ciclooxigenase e à ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA;
4. A ação hiperalgésica da bradicinina envolve a ativação da glia.

Logo, a administração de bradicinina na amígdala de ratos resulta em sensibilização central à dor, através da ativação de receptores B<sub>2</sub>, produção de prostanóides e estimulação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Essas ações envolvem mecanismos inter-relacionados de células gliais e neuronais e resultam na estimulação do circuito descendente facilitatório da dor.

---

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHBURN, M.A., STAATS, P.S. 1999. Management of chronic pain. **Lancet** 353, 1865-1869.
- AVERIL, S., McMAHON, S.B., CLARLY, D.O.L., REICHARDT, L.F., PRIESTLEY, J.V., 1995. Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. **Eur J Neurosci.** 7, 1484-1494.
- BARBOUR, B., SZATKOWSKI, M., INGLEDEW, N., ATTWELL, D., 1989. Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells. **Nature** 342, 918-920.
- BATHON, J.M., PROUD, D., 1991 Bradykinin antagonists. **Ann Rev Pharmacol** 31, 129-162.
- BEAUBIEN, G., ROSINSKI-CHUPIN, I., MATTEI, M.G., MBIKAY, M., CHRETIEN, M., SAIDAH, N.G., 1991. Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. **Biochemistry** 30, 1628-1635.
- BECERRA, L.R., BREITER, H.C., STOJANOVIC, M., FISHMAN, S. EDWARDS, A., 1999. Human brain activation under controlled thermal stimulation and habituation to noxious heat: an fMRI study. **Magn Reson Med** 41, 1044-1057.
- BENNETT, D.L., 2001. Neurotrophic factors: important regulators of nociceptive function. **Neuroscientist** 7, 13-7.
- BERNARD, J.F., ALDEN, M., BESSON, J.M., 1993. The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) study in rat. **J Comp Neurol** 329, 201-229.
- BERNARD, J.F., BESSON, J.M., 1990. The spino(trigemino)pontoamygdaloid



- pathway: Electrophysiological evidence for an involvement in pain process. **J Neurophysiol** 63, 473-490.
- BERNARD, J.F., HUANG, G.F., BESSON, J.M., 1990. Effect of noxious somesthetic stimulation on the activity of neurons of the nucleus centralis of the amygdala. **Brain Res** 523, 347-350.
- BERNARD, J.F., PESCHANSKI, M., BESSON, J.M., 1989. A possible spino(trigemino)-ponto-amygdaloid pathway for pain. **Neurosc Lett** 100, 83-88.
- BESSON, J.M., 1999. The neurobiology of pain. **Lancet** 353, 1610-1615.
- BEZZI, P., CARMIGNOTO, G., PASTI, L., VESCE, S., ROSSI, D., RIZZINI, B.L., POZZAN, T., VOLTERRA, A., 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. **Nature** 391, 281-285.
- BHoola, K.D., FUGREROA, C.D., WORTHY, K., 1992. Bioregulation of kinins: kalikreins, kininogens, and kininases. **Pharmacol Rev**, 44: 1-44.
- BLAUKAT, A., 2003. Structure and signalling pathways of kinin receptors. **Andrologia** 35, 17-23.
- BORNHÖVD, K., QUANTE, M., GLAUCHE, V., BROMM, B.; WEILLER, C., BÜCHEL, C., 2002. Painful stimuli evoke different stimulus-response functions in the amygdala, prefrontal, insular and somatosensory cortex: a single-trial fMRI study. **Brain** 125, 1326-1336.
- BURCH, R.M., AXELROD, J., 1987. Dissociation of bradykinin-stimulated arachidonic acid and release of inositol phosphate in Swiss 3T3 fibroblasts. Evidence for G-protein coupled phospholipase A<sub>2</sub>. **Proc Natl Acad Sci USA** 85, 6374-6378.
- BURCH, R.M., KNISS, DA., 1988. Modulation of receptor-mediated signal

- transduction by diacylglycerol mimetics in astrocytes. **Cell Mol Neurobiol** 8, 251-257.
- BURCH, R.M., TIFFANY, C.W., 1989. Tumor necrosis factor causes amplification of arachidonic acid metabolism in response to interleukin 1, bradykinin, and other agonists. **J Cell Physiol** 141, 85-89.
- BURDIN, T.A., GRAEFF, F.G., PELÁ, I.R., 1992. Opioid mediation of the antiaversive and hyperalgesic actions of bradykinin injected into the dorsal periaqueductal gray of the rat. **Physiol Behav** 52, 405-410.
- CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M., 2000. Kinins in pain and inflammation. **Pain** 87, 15.
- CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., CAMPOS, M.M., 2001. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Curr Opin Anaesthesiol** 14, 519-526.
- CALIXTO, J.B., MEDEIROS, R., FERNANDES, E.S., FERREIRA, J., CABRINI, D.A., CAMPOS, M.M., 2004. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br J Pharmacol** 143, 803-818.
- CALZA, L., POZZA, M., ZANNI, M., MANZINI, C.U., MANZINI, F., HOKFELT, T., 1998. Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord during adjuvant-induced arthritis in the rat: an immunocytochemical and *in situ* hybridization study. **Neuroscience** 82, 575-589.
- CAMARGO, A.C.M., SHAPANKA, R., GREENE, L.J., 1973. Preparation, assay, and partial characterization of a neutral endopeptidase from rabbit brain. **Biochemistry** 12, 1838-1844.
- Campos, M.M. Ongali, B., De Souza, B.H., Schanstra, J.P., Girolami, J.P.,

- Chabot, J.G., Couture, R. 2005. Expression and distribution of kinin B1 receptor in the rat brain and alterations induced by diabetes in the model of streptozotocin. **Synapse** 57, 29-37.
- CHAO, J., CHAO, L., SWAIN, C.C., TSAI, J., MARGOLIUS, H.S., 1987. Tissue kallikrein in rat brain and pituitary: regional distribution and estrogen induction in the anterior pituitary. **Endocrinology** 120, 475-482.
- CHOLEWINSKI, A.J., STEVENS, G., MCDERMOTT, A.M., WILKIN, G.P., 1991. Identification of B<sub>2</sub> bradykinin binding sites on cultured cortical astrocytes. **J Neurochem** 57, 1456-1458.
- CRAIG, A.D., 2003. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. **Annu Rev Neurosci** 26, 1-30.
- CUELLO, A.C., RIBEIRO-DA-SILVA, A., MA, W., DE KONINCK, Y., HENRY, J.L., 1993. Organization of substance P primary sensory neurons: ultrastructural and physiological correlates. **Regul Pept** 46, 155-164.
- DRAY, A., PERKINS, M., 1997. Kinins and pain. In: FARMER, S.G. **The handbook of immunopharmacology: The kinin system**. Londres: Academic Press, pp. 157-172.
- DUMUIS, A., SEBEN, M., HAYNES, L., PIN, J.-P., BOCKAERT, J., 1988. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. **Nature** 336, 68-70.
- ERDÖS, E.G., 1990. Some old and some new ideas of kinin metabolism. **J Cardiovasc Pharmacol** 15, S20-S24.
- FIELDS, H., 2004. State-dependent opioid control of pain. **Nat Rev Neurosci** 5, 565-575.

- FIELDS, H.L., BASBAUM, A.I., 1999. In: WALL, P.D, MELZACK, R. **Textbook of pain**. Edimburgo: Churchill Livingstone, pp. 309-329.
- FIELDS, H.L., BRY, J., HENTALL, I., ZORMAN, G., 1983. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. **J Neurosc** 3, 2545-2552.
- FIELDS, H.L., HEINRICHER, M.M., 1985. Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 308, 361-374.
- FRIEDMAN, D.P., MURRAY, E.A., O'NEILL, J.B., MISHKIN, M., 1986. Cortical connections of the somatosensory fields of the lateral sulcus of macaques: evidence for a corticolimbic pathway for touch. **J Comp Neurol** 252, 323-347.
- FUGIWARA, Y., MANTIONE, C.R., VAVREK, R.J., STEWART, J.M., YAMAMURA, H.I., 1989. Characterization of [<sup>3</sup>H]-bradykinin binding sites in guinea-pig central nervous system: possible existence of B<sub>2</sub> subtypes. **Life Sci** 44, 1645-1653.
- FÜRST, S., 1999. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res Bull** 48, 129-141.
- GAFFORD, J.T., SKIDGEL, R.A., ERDÖS, E.G., HERSH, L.B., 1983. Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. **Biochemistry** 22, 3265-3271.
- GAURIAU, C., BERNARD, J-F., 2002. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. **Exp Physiol** 87, 251-258.
- GUIMARÃES, J.A., BORGES, B.R., PRADO, E.S., PRADO, J.L., 1973. Kinin-

- converting aminopeptidase from human serum. **Biochem Pharmacol** 22, 3157-3172.
- GUTOWSKI, S., SMRCKA, A., NOWAK, L., WU, D.G., SIMPM, M., STERNWEISS, P.C., 1991. Antibodies to the  $\alpha_q$  subfamily of guanine nucleotide binding regulatory proteins subunits attenuate activation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones. **J Biol Chem** 266, 20519-20524.
- HALL, J.M., 1992. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. **Pharmacol Ther** 56, 131-190.
- HALL, J.M., MORTON, I.K.M., 1997. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In: FARMER, S.G. **The handbook of immunopharmacology: The kinin system**. Londres: Academic Press: pp. 9-43.
- HEINRICHER, M.M., BARBARO, N.M., FIELDS, H.L., 1989. Putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla of the rat: firing of on- and off-cells is related to nociceptive responsiveness. **Somatosens Mot Res** 6, 427-439.
- HEINRICHER, M.M., MARTENSON, M.E., NEUBERT, M.J., 2004. Prostaglandin E<sub>2</sub> in the midbrain periaqueductal gray produces hyperalgesia and activates pain-modulating circuitry in the rostral ventromedial medulla. **Pain** 110, 419-426.
- HOSLI, E., HOSLI, L., 1993. Autoradiographic localization of binding sites for neuropeptide Y and bradykinin on astrocytes. **Neuroreport** 4, 159-162.
- HOSLI, L., HOSLI, E., KAESER, H., LEFKOVITS, M., 1992. Colocalization of

- receptors for vasoactive peptides on astrocytes of cultured rat spinal cord and brain stem: electrophysiological effects of atrial and brain natriuretic peptide, neuropeptide Y and bradykinin. **Neurosci. Lett** 148, 114-116.
- HUNT, S.P., MANTYH, P.W., 2001. The molecular dynamics of pain control. **Nat Rev Neurosci** 2, 83-91.
- HUNT, S.P., ROSSI, J., 1985. Peptide- and non-peptide-containing unmyelinated primary afferents: the parallel processing of nociceptive information. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 308, 283-289.
- INOKUCHI, J.I., NAGAMATSU, A., 1981. Tripeptidyl carboxypeptidase activity of kininase II (angiotensin converting enzyme). **Biochem Biophys Acta** 662, 300-307.
- JAFARI-SABET, M., 2006. NMDA receptor antagonist antagonize the facilitatory effects of post-training intra-basolateral amygdala NMDA and physostigmine on passive avoidance learning. **Eur J Pharmacol** 529, 122-128.
- JASMIN, L, BURKEY, A.R., CARD, J.P., BASBAUM, A.I., 1997. Transneuronal labeling of a nociceptive pathway, the spino-(trigemino-)parabrachio-amygdaloid, in the rat. **J Neurosci** 17, 3751-3765.
- JEFTINIJA, S.D., JEFTINIJA, K.V., STEFANOVIC, G., 1997. Cultured astrocytes express proteins involved in vesicular glutamate release. **Brain Res** 750, 41-47.
- KITAGAWA, A., KIZUKI, K., MORIYA, H., KUDO, M., NOGUCHI, T., 1991. Localization of kallikrein in rat pineal glands. **Endocrinol Jpn** 38, 109-112.
- LEE, K.M, TOSCAS, K., VILLERREAL, M.L., 1993. Inhibition of bradykinin- and thapsigargin-induced  $Ca^{2+}$  entry by tyrosine kinase inhibitors. **J Biol Chem**

268, 9945-9948.

LIEBESKIND, J.C., GUILBAUD, G., BESSON, J.M., OLIVEIRAS, J.L., 1973.

Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the cat: behavioral observation and inhibitory effects on spinal cord interneurons. **Brain Res** 50, 441-446.

LIN, W.W., CHUANG, D.M., 1992. Regulation of bradykinin-induced

phosphoinositide turnover in cultured cerebellar astrocytes: possible role of protein kinase C. **Neurochem Int** 21, 573-579.

MALMBERG, A.B., YAKSH, T.L., 1992. Hyperalgesia mediated by spinal

glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science** 257, 1276-1279.

MANNING, B.H., 1998. A lateralized deficit in morphine antinociception after

unilateral inactivation of the central amygdala. **J Neurosci** 18, 9453-9470.

MANNING, B.H., MAYER, D.J., 1995a. The central nucleus of the amygdala

contributes to production of morphine antinociception in the formalin test. **Pain** 63, 141-152.

MANNING, B.H. MAYER, D.J., 1995b. The central nucleus of the amygdala

contributes to the production of morphine antinociception in the rat tail flick test. **J Neurosci** 15, 8199-8213.

MANNING, B.H., MARTIN, W.J., MENG, I.D., 2003. The rodent amygdala

contributes to the production of cannabinoid-induced antinociception. **Neuroscience** 120, 1157-1170.

MANNING, B.H., MORGAN, M.J., FRANKLIN, K.B.J., 1994. Morphine

analgesia in the formalin test: evidence for forebrain and midbrain sites of action. **Neuroscience** 63, 289-294.

- MARCEAU, F., 1995. Kinin B<sub>1</sub> receptors: a review. **Immunopharmacology** 30, 1-26.
- MARCEAU, F., 1997. Kinin B<sub>1</sub> receptor induction and inflammation. In: FARMER, S.G. **The handbook of immunopharmacology: The kinin system**. London: Academic Press: pp. 143-156.
- MAYER, D.J., WOLFE, T.L., AKIL, H., CARDER, B., LIEBESKIND, J.C., 1971. Analgesia from electrical stimulation in the brain stem of the rat. **Science** 174, 1351-1354.
- McGARAUGHTY, S., FARR, D.A., HEINRICHER, M.M., 2004. Lesions of the periaqueductal gray disrupt input to the rostral ventromedial medulla following microinjections of morphine into the medial or basolateral nuclei of the amygdala. **Brain Res** 1009, 223-227.
- McGARAUGHTY, S., HEINRICHER, M.M., 2002. Microinjection of morphine into various amygdaloid nuclei differentially affects nociceptive responsiveness and RVM neuronal activity. **Pain** 96, 153-162.
- MELLER, S.T., DYKSTRA, C., GRZYBYCKI, D., MURPHY, S., GEBHART, G.F., 1994. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. **Neuropharmacology** 33, 1471-1478.
- MENKE, J.G., BORKOWSKI, J.A., BIERILO, K.K., MACNEIL, T., DERRICK, A.W., SCHNECK, K.A., RANSOM, R.W., STRADER, C.D., LINEMEYER, D.L., HESS, J.F., 1994. Expression cloning of a human B<sub>1</sub> bradykinin receptor. **J Biol Chem** 269, 21583-21586.
- MERSKEY, H., BOGDUK, N., 1994. Classification of Chronic Pain. In: HAROLD and BOGDUK. **Classification of Chronic Pain**. Seattle: IASP



press, pp. 209-214.

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

MILLIGAN, E.D., TWINING, C., CHACUR, M., BIEDENKAPP, J., O'CONNOR, K. POOLE, S., TRACEY, K., MARTIN, D., MAIER, S.F., WATKINS, L.R., 2003. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. **J Neurosci** 23, 1026-1040.

MOGIL, J.S., WILSON, S.G., BON, K., LEE, S.E., CHUNG, K., RABER, P., PIEPER, J.O., HAIN, H.S., BELKNAP, J.K., HUBERT, L., ELMER, G.I., CHUNG, J.M., DEVOR, M., 1999. Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. **Pain** 80, 67-82.

MORGAN, M.M., HEINRICHER, M.M., FIELDS, H.L., 1994. Inhibition and facilitation of different nocifensor reflexes by spatially remote noxious stimuli. **J Neurophysiol** 72, 1152-1160.

MURONE, C., PAXINOS, G., MCKINLEY, M.J., OLDFIELD, B.J., MÜLLER-ESTERL, W., MENDELSON, F.A.O., CHAI, S.Y., 1997. Distribution of bradykinin B<sub>2</sub> receptors in sheep brain and spinal cord visualized by in vitro autoradiography. **J Comp Neurol** 381, 203-218.

MURRAY, S.R., CHAO, J., LIN, F., CHAO, L., 1990. Kallikrein multigenes families and the regulation of their expression. **J Cardiovasc Pharmacol** 15, S7-S15.

NEUBERT, M.J., KINCAID, W., HEINRICHER, M.M., 2004. Nociceptive facilitating neurons in the rostral ventromedial medulla. **Pain** 110, 158-165.

NEUGEBAUER, V. LI, W., BIRD, G.C., HAN, J.S., 2004. The amygdala and persistent pain. **Neuroscientist** 10, 221-233.

- NEUGEBAUER, V., LI, W., 2002. Processing of nociceptive mechanical and thermal information in central neurons with knee-joint-imp. **J Neurophysiol** 87, 103-112.
- NEUGEBAUER, V., LI, W., 2003. Differential sensitization of amygdala neurons to afferent inputs in a model of arthritic pain. **J Neurophysiol** 89, 716-727.
- NEUGEBAUER, V., LI, W., BIRD, G.C., BHAVE, G., GEREAU, R.W., 2003. Synaptic plasticity in the amygdala in a model of arthritic pain: differential roles of metabotropic glutamate receptors 1 and 5. **J Neurosci** 23, 52-63.
- NODA, M., KARIURA, Y., AMANO, T., MANAGO, Y., NISHIKAWA, K., AOKI, S., WADA, K., 2003. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. **Life Sci** 72, 1573-1581.
- OLIVA, P., BERRINO, L., DE NOVELLIS, V., PALAZZO, E., MARABESE, I., SINISCALCO, D., SCAFURO, M., MARIANI, L., ROSSI, F. MAIONE, S., 2006. Role of periaqueductal grey prostaglandin receptors in formalin-induced hyperalgesia. **Eur J Pharmacol** 530, 40-47.
- ONGALI, B., CAMPOS, M.M., BREGOLA, G., RODI, D., REGOLI, D., THIBAUT, G., SIMONATO, M., COUTURE, R., 2003. Autoradiographic analysis of rat brain kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors: normal distribution and alterations induced by epilepsy. **J Comp Neurol** 461, 506-519.
- PARPURA, V., BASARSKY, T.A., LIU, F., JEFTNIJA, K., JEFTNIJA, S., HAYDON, P.G., 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. **Nature** 369, 744-747.
- PAXINOS, G., WATSON, C., 1986. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Nova York: Academic press

- PERRY, D.C., SNYDER, S.H., 1984. Identification of bradykinin in mammalian brain. **J Neurochem** 43, 1072-1080
- PETHÖ, G., DEROW, A., REEH, P.W., 2001. Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated by cyclooxygenase products in isolated rat skin. **Eur J Neurosci** 14, 210-218.
- PORRECA, F., OSSIPOV, M.H, GEBHART, G.F., 2002. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci** 25, 319-325.
- PRICE, D., 2002. Central neural mechanisms that interrelate sensory and affective dimensions of pain. **Mol Interv** 2, 392-402.
- RAIDOO, D.M., BHOOLA, K.D., 1997. Kinin receptors on human neurones. **J Neuroimmunol** 77, 39-44.
- RANG, H.P., BEVAN, S.J., DRAY, A., 1991. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. **Br Med Bull** 47, 534-548.
- REGOLI, D., BARABÉ, J., 1980. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol Rev** 32, 1-46.
- RITCHIE, T., COLE, R., KIM, H.S., DE VELLIS, J., NOBLE, E.P., 1987. Inositol phospholipid hydrolysis in cultures astrocytes and oligodendrocytes. **Life Sci** 41, 31-39.
- RIZVI, T.A., ENNIS, M., BEHBEHANI, M.M., SHIPLEY, M.T., 1991. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. **J Comp Neurol** 303, 121-131.
- RUBIN, M.A., BERLESE, D.B., STIEGEMEIER, J.A., VOLKWEIS, M.A., OLIVEIRA, D.M., DOS SANTOS, T.L., FENILI, A.C., MELLO, C.F., 2004. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in

- rats. **J Neurosci** 24, 2328-2334.
- RUSSO, C.M, BROSE, W.G., 1998. Chronic pain. **Annu Rev Med** 49, 123-133.
- SAADÉ, N.E., MASSAD, C.A., OCHOA-CHAAR, C.I., JABBUR, S.J., SAFIEH-GARABEDIAN, B., ATWEH, F., 2002. Upregulation of proinflammatory cytokines and nerve growth factor by intraplantar injection of capsaicin in rats. **J Physiol** 545, 241-253.
- SCHULIGOI, R., DONNERER, J., AMANN, R., 1994. Bradykinin-induced sensitization of afferent neurons in the rat paw. **Neuroscience** 59, 211-215.
- SCICLI, A.G., FORBES, G., NOLLY, H., DUJOVNY, M., CARRETERO, O.A., 1984. Kallikrein-kinin in the central nervous system. **Clin Exp Theory Pract** A6 (10 e 11), 1731-1738.
- SHUGHRUE, P.J., KY, B., AUSTIN, C.P., 2003. Localization of B<sub>1</sub> bradykinin receptor mRNA in the primate brain and spinal cord: an in situ hybridization study. **J Comp Neurol** 465, 372-384.
- STEPHENS, G.J., MARRIOT, D.R., DJAMGOZ, M.B.A., WILKIN, G.P., 1993. Electrophysiological and biochemical evidence for bradykinin receptors on cultures rat cortical oligodendrocytes. **Neurosci Lett** 153, 223-226.
- TIPPMER, S., QUITTERER, U., KOLM, V., FAUSSENER, A., ROSCHER, A.A., MOSTHAF, L., MÜLLER-ESTERL, W., HÄRING, H., 1994. Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms  $\alpha$ ,  $\epsilon$ , and  $\zeta$ . **Eur J Biochem** 225, 297-304.
- URBAN, M.O., COUTINHO, S.V., GEBHART, G.F., 1999a. Biphasic modulation of visceral nociception by neurotensin in rat rostral ventromedial medulla. **J Pharmacol Exp Ther** 290, 207-213.

- URBAN, M.O., GEBHART, G.F., 1999b Supraspinal contributions to hyperalgesia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96, 7687-7692.
- WALKER, K., DRAY, A., PERKINS, M., 1996. Hyperalgesia in rats following intracerebroventricular administration of endotoxin: effect of bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor antagonist treatment. **Pain** 65, 211-219.
- WALKER, K., PERKINS, M., DRAY, A., 1995. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochem Int** 26, 1-16.
- WALL, P.D., 1967. The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. **J Physiol (Lond)** 188, 403-423.
- WANG, H., KOHNO, T., AMAYA, F., BRENNER, G.J., ITO, N., ALLCHORNE, A., JI, R-R., WOOLF, C.J., 2005. Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. **J Neurosci** 25, 7986-7992.
- WATKINS, L.R., MAIER, S.F., 2003. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nat Rev Drug Discov** 12, 973-985.
- WATKINS, L.R., MARTIN, D., ULRICH, P., TRACEY, K.J., MAIER, S.F., 1997. Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. **Pain** 71, 225-235.
- WOOLF, C.J., MANNION, R.J., 1999. Neuropathic pain: etiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet** 353, 1959-1964.
- ZHANG, X., BEAN, A.J., WIESENFELD-HALLIN, Z., XU, X., HOKFELT, T., 1995. Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the rat spinal cord III. Effects of peripheral axotomy with special reference to galanin. **Neuroscience** 64, 893-915.
- ZIMMERMANN, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental

pain in conscious animals. **Pain** 16, 109-110.