

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO ANALGÉSICO DA MELATONINA EM UM
MODELO ANIMAL DA SÍNDROME DE DOR
COMPLEXA REGIONAL TIPO I**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Josiel Mileno Mack

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

EFEITO ANALGÉSICO DA MELATONINA EM UM MODELO ANIMAL DA SÍNDROME DE DOR COMPLEXA REGIONAL TIPO I

Josiel Mileno Mack

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Mack, Josiel Mileno

EFEITO ANALGÉSICO DA MELATONINA EM UM MODELO ANIMAL DA SÍNDROME DE DOR COMPLEXA REGIONAL TIPO I / Josiel Mileno Mack.-2013.

75 p.; 30cm

Orientador: Adair Roberto Soares dos Santos

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2013

1. Síndrome de dor complexa regional tipo I 2. Dor crônica pós-isquemia 3. Melatonina I. Santos, Adair Roberto Soares dos II. Título.

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada
aprova a Dissertação de Mestrado

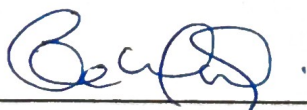
**EFEITO ANALGÉSICO DA MELATONINA EM UM MODELO ANIMAL DA
SÍNDROME DE DOR COMPLEXA REGIONAL TIPO I**

elaborada por
Josiel Mileno Mack

e orientada por
Adair Roberto Soares dos Santos

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

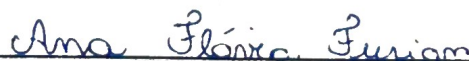
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Carlos Fernando de Mello (Presidente/UFSM)



Dr. Francisney Pinto do Nascimento (McGill University, Canadá)



Dr. Ana Flávia Furian (UFSM)

Santa Maria, 15 de Fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família. Aos meus pais, José e Evanir, por compreender os momentos de ausência e pelo apoio incondicional nesta, assim como em todas as outras etapas de minha vida. Ao meu irmão Eloi, pela amizade, apoio, ensinamentos e por ser um exemplo de esforço e profissionalismo.

Ao professor Adair, pela oportunidade, orientação e contribuição para minha formação.

Aos colegas (e agregados) do Landi, Ana, Catharina, Cirene, Deise, Fernandinha, Fran, Leidi, Marina, Tati, Tátilla, Tay, Rafaela, Bira, Daniel, Igão, Gaúcho, Muguilo, Ney, Neninho, Serginho, que nesse pouco mais de um ano de convivência, com diferentes graus de afinidade, se tornaram uma segunda família. Com vocês muito aprendi e me diverti, o que certamente tornou esta etapa menos árdua.

Ao professor Alcir, por disponibilizar a estrutura do Labdef para a realização dos experimentos envolvendo estresse oxidativo, ensinamentos e amizade. Também aos demais colegas do Labdef, Ariane, Daiane, Trevisan, Luiz, Dani, Mari e demais, pela amizade, ensinamentos e conversas agradáveis durante os experimentos que lá realizei.

Ao professor Carlos Mello pela grande ajuda na resolução de problemas técnicos.

A Taíse, pela amizade e apoio ao longo desta jornada.

Ao seu Carlos, assim como outros colegas da fisiologia pela amizade e conversas durante o café.

Aos demais não citados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO ANALGÉSICO DA MELATONINA EM UM MODELO ANIMAL DA SÍNDROME DE DOR COMPLEXA REGIONAL TIPO I

AUTOR: Josiel Mileno Mack
ORIENTADOR: Adair Roberto Soares dos Santos
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 15 de fevereiro de 2013

A síndrome de dor complexa regional tipo I (SDCR-I) é uma patologia que atinge membros superiores ou inferiores de forma distal, levando a sintomas como dor crônica, edema, alterações tróficas e comprometimento motor. Esta síndrome geralmente tem início após lesões como fraturas e torções. A patofisiologia da SDCR-I ainda não é completamente entendida, porém, sugere-se que uma redução no aporte de oxigênio devido a alterações microvasculares esteja relacionada a manutenção da síndrome. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antinociceptiva da melatonina, uma indolamina endógena liberada principalmente pela glândula pineal, na hipersensibilidade mecânica e térmica (ao frio) presente no modelo de dor crônica pós-isquemia (DCPI) em camundongos, o qual mimetiza os sinais e sintomas da SDCR-I em humanos, bem como a participação dos receptores MT1/MT2 e do estresse oxidativo neste efeito. A indução da DCPI em camundongos Suíços machos foi feita através do posicionamento de um torniquete próximo ao tornozelo dos animais, o qual foi mantido por 3 horas, seguido da remoção para permitir a reperfusão dos tecidos. A hipersensibilidade mecânica (através do filamento de Von Frey, 0,4 g) e térmica (placa fria, 4° C) e o edema da pata foram avaliados no segundo e no sétimo dia após a reperfusão. Além disto, foi analisada a atividade das enzimas catalase (CAT), glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx) e a imunorreatividade ao aduto malondialdeído-preteína (MDA) 2 h, 2 e 7 dias após a reperfusão, sendo que os tecidos foram coletados 30 min após o tratamento com melatonina (100 mg/kg, i.p.). O efeito da melatonina (10 – 100 mg/kg, i.p., ou 10 – 100 ng/pata, i.pl.) também foi avaliada frente à nocicepção espontânea evocada por agonistas de TRPV1 (capsaicina 30,5 ng/pata), TRPA1 (cinamaldeído 1,32 µg/pata), TRPM8 (mentol 187,5 µg/pata) e ASICs (salina acidificada, pH 1,98). A melatonina (10-100 mg/kg, i.p.) reduziu de forma dependente da dose a hipersensibilidade mecânica no segundo e no sétimo dia após a reperfusão, sendo que na dose de 100 mg/kg seu efeito persistiu por até 2 horas após a administração. Além disto, a melatonina (100 mg/kg, i.p.) também reduziu a hipersensibilidade térmica (ao frio) no segundo e no sétimo dia após a reperfusão. Contudo, o efeito da melatonina (100 mg/kg, i.p.) na hipersensibilidade mecânica e térmica (placa fria) não foi alterada pela administração prévia de luzindol

(10 mg/kg, i.p., antagonista não-seletivo de receptores MT1/MT2). O tratamento com melatonina (100 mg/kg, i.p.) também reverteu o edema gerado pela indução de DCPI. A atividade da enzima GR se apresentou reduzida 2 h após a reperfusão, e o tratamento com melatonina não alterou esse parâmetro. A atividade das enzimas GR e GPx, e CAT e GPx, se apresentou aumentada no segundo e no sétimo dia, respectivamente, sendo que o tratamento com melatonina reverteu este aumento. A administração sistêmica de melatonina (via i.p.) foi capaz de inibir a nocicepção evocada pela capsaicina, cinamaldeído, mentol e salina acidificada, com inibição de $63 \pm 16\%$, $41 \pm 13\%$, $62 \pm 10\%$ e $47 \pm 12\%$, respectivamente. Além disto, a administração periférica da melatonina (via i.pl.) inibiu somente a resposta evocada pela capsaicina ($49 \pm 6\%$) e cinamaldeído ($60 \pm 6\%$). Em conclusão este estudo estendeu os dados da literatura demonstrando que a melatonina foi capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica e térmica (ao frio) e o edema provocados pela indução do modelo de DCPI em camundongos. O seu mecanismo de ação não está completamente elucidado, contudo, o efeito da melatonina provavelmente depende da sua ação antioxidante através da modulação do estado redox da célula e por consequência da atividade das enzimas antioxidantes, podendo também estar atuando através da inibição da transmissão nociceptiva por inibir a ativação de nociceptores periféricos, em especial dos TRPV1 e TRPA1.

Palavras-chave: Síndrome de dor complexa regional tipo I, dor crônica pós-isquemia, melatonina, estresse oxidativo, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Dissertation of Master
Graduate Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ANTIOXIDANT-ANALGESIC EFFECT OF MELATONIN IN A ANIMAL MODEL OF COMPLEX REGIONAL PAIN SYNDROME TYPE I

AUTOR: Josiel Mileno Mack
ADVISER: Adair Roberto Soares dos Santos
Date and Place of the Defense: Santa Maria, February 15th, 2013

Complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I) affects upper or lower limbs distal parts, leading symptoms like chronic pain, edema, trophic changes and motor function abnormalities. This syndrome commonly follows fractures and sprains. The pathophysiology of CRPS-I is not completely understood and it is suggested that microvessels changes related to the syndrome maintenance lead to a reduction in oxygen supply. In this study the objective was to evaluate the time course of the antinociceptive activity of melatonin, an endogenous indolamine released mainly by pineal gland, in the mechanical and cold hypersensitivity and in the edema presented in the chronic post-ischemic pain (CPIP) in mice; an animal model of human CRPS-I, and participation of MT1/MT2 receptors and oxidative stress in this model. The antinociceptive activity of melatonin in the nociception evoked by TRPs (transient receptors potential) and ASICs (acid-sensing ion channels). CPIP was induced in Swiss male mice by placing a tourniquet proximal to the ankle joint for 3 hours, followed by removal to allow tissue reperfusion. The mechanical (0.4 g von Frey filaments) and cold (cold plate 4 °C) hypersensitivity was measured on second and seventh days after reperfusion. Catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPx) enzyme activity and malondialdehyde (MDA) levels were measured 2 h, 2 and 7 days after reperfusion, tissues were collected 30 min after melatonin treatment (100 mg/kg, i.p.). Melatonin activity (10 – 100 mg/kg, i.p., or 10 – 100 ng/paw, i.pl.) was also evaluated by measuring of nociception evoked by TRPV1 agonists (capsaicin, 30,5 ng/paw, i.pl.), TRPA1 (cinnamaldehyde, 1,32 µg/paw), TRPM8 (menthol, 1.2 µg/paw) and ASICs (acetic acid 2%, pH 1.98). The treatment with melatonin (10-100 mg/kg, i.p.) dose-dependently reduced the mechanical hypersensitivity 2 and 7 days after reperfusion and with 100 mg/kg the effect remained for up to 2 h after administration. Furthermore, the treatment with melatonin (100 mg/kg, i.p.) also reduced the cold hypersensitivity 2 and 7 days after reperfusion. However, the melatonin effect (100 mg/kg) was not affected by pretreatment with luzindole (10 mg/kg, i.p., non-selective MT1/MT2 antagonist). The melatonin (100 mg/kg, i.p.) also reduced the edema evoked by CPIP in the second day after reperfusion. GR enzyme activity was reduced 2 h after reperfusion and melatonin treatment didn't change this parameter. GR and GPx, and, Cat and GPx

enzymes activities were elevated on days 2 and 7, respectively, and melatonin reversed this increase. The systemic administration (i.p.) of melatonin inhibited the nociception evoked by capsaicin, cinnamaldehyde, menthol and acid saline, inhibitions of $63 \pm 16\%$, $41 \pm 13\%$, $62 \pm 10\%$ e $47 \pm 12\%$, respectively. Moreover, the peripheral administration of melatonin only inhibited the nociception evoked by capsaicin ($49 \pm 6\%$) and cinnamaldehyde ($60 \pm 6\%$). In conclusion, this study extends the literature and shows that melatonin is able to reduce the mechanical and thermal hypersensitivity and the edema in the CPIP model, probably by a modulation of redox status of the cell through its antioxidant properties and inhibition of peripheral nociceptors.

Key-words: Complex regional pain syndrome-type I, chronic post-ischemic pain, melatonin, oxidative stress, antioxidant enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sinais clínicos na SDCR.....	15
Figura 2 - Formação de EROs e defesas antioxidantes.....	21
Figura 3 - Síntese da melatonina na glândula pineal.....	24
Figura 4 - Mecanismos de ação da atividade antinociceptiva da melatonina.....	26
Figura 5 - Posicionamento do anel elástico na pata traseira de camundongo para a indução de DCPI.....	34
Figura 6 - Decurso temporal da atividade antinociceptiva da melatonina na hipersensibilidade mecânica em animais submetidos à DCPI no segundo dia após a reperfusão.....	42
Figura 7 - Decurso temporal da atividade antinociceptiva da melatonina na hipersensibilidade mecânica em animais submetidos à DCPI no sétimo dia após a reperfusão.....	43
Figura 8 - Avaliação da participação dos receptores de MT1 e MT2 na antinocicepção promovida pela melatonina em testes de hipersensibilidade mecânica e térmica (ao frio) induzidas pelo modelo de DCPI em camundongos.....	44
Figura 9 - Avaliação da redução do edema na pata de animais submetidos ao modelo de DCPI pelo tratamento com melatonina.....	45
Figura 10 - Avaliação do tratamento de melatonina sobre a atividade das enzimas CAT, GR e GPx nos tecidos da pata de camundongos submetidos ao modelo de DCPI, 2 h após a reperfusão.....	46
Figura 11 - Avaliação do tratamento de melatonina sobre a atividade das enzimas CAT, GR e GPx nos tecidos da pata de camundongos submetidos ao modelo de DCPI, 2 dias após a reperfusão.....	47
Figura 12 - Avaliação do tratamento de melatonina sobre a atividade das enzimas CAT, GR e GPx nos tecidos da pata de camundongos submetidos ao modelo de DCPI, 7 dias após a reperfusão.....	48
Figura 13 - Avaliação do tratamento de melatonina sobre a imunorreatividade ao aduto MDA-proteína nos tecidos da pata de camundongos submetidos ao	

modelo de DCPI, 2 h, 2 e 7 dias após a
reperusão.....49

Figura 14 - Atividade antinociceptiva da melatonina administrada por via sistêmica e
periférica frente a nocicepção evocada pela injeção intraplantar de
capsaicina.....50

Figura 15 - Atividade antinociceptiva da melatonina administrada por via sistêmica e
periférica frente a nocicepção evocada pela injeção intraplantar de
cinamaldeído.....51

Figura 16 - Atividade antinociceptiva da melatonina administrada por via sistêmica e
periférica frente à nocicepção evocada pela injeção intraplantar de
mentol.....52

Figura 17 - Atividade antinociceptiva da melatonina por via sistêmica e periférica
frente à nocicepção evocada pela injeção intraplantar de salina acidificada
2%.....53

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE - 4-hidroxinonenal

4-P-PDOT - 4-fenil-2-propionamidotetralina

5-LOX - 5-lipooxigenase

AANAT - arilalquilamina N-acetiltransferase

AMP - monofosfato de adenosina

ASC - área sob a curva

ASICs - canais iônicos sensíveis a ácido

CaM - calmodulina

CAT - catalase

CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

Cu/Zn-SOD - superóxido dismutase com Cu/Zn no sítio ativo

DCPI – dor crônica pós-isquemia

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

DSR - distrofia simpático-reflexa

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs - espécies reativas de oxigênio

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor

GCS - gânglio cervical superior

GMP - monofosfato de adenosina

GPx - glutationa peroxidase

GR - glutationa redutase

GSH - glutationa reduzida

GSSG - dissulfeto de glutationa ou glutationa oxidada

i.c.v. - intracerebroventricular

IL-1 - interleucina 1

IL-1 β - interleucina 1 β

IL-2 - interleucina 2

IL-6 - interleucina 6

IL-8 - interleucina 8

i.p. - intraperitoneal
i.pl. - intraplantar
IR - isquemia-reperfusão
MDA - malondialdeído
Mn-SOD- superóxido dismutase com Cu/Zn no sítio ativo
NAC - N-acetilcisteína
NADPH - fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida
NE - norepinefrina
NFκB - fator nuclear kappa B
OMS - Organização Mundial da Saúde
PAGE - eletroforese com gel de poliacrilamida
PKA – proteína quinase A
PKC - proteína quinase C
PKCα - proteína quinase Cα
Prx - peroxirredoxina
RZRα - receptor retinóide nuclear órfão α
RZRβ - receptor retinóide nuclear órfão β
SDCR - síndrome de dor complexa regional
SDCR-I - síndrome de dor complexa regional tipo I
SDCR-II - síndrome de dor complexa regional tipo II
SDS - dodecil sulfato de sódio
SNC – sistema nervosa central
SOD - superóxido dismutase
SP - substância P
TNF-α - fator de necrose tumoral-α
TRPA1 - receptor de potencial transiente anquirina-1
TRPM8 - receptor de potencial transiente melastina-8
TRPs - receptores de potencial transiente
TRPV1 - receptor de potencial transiente vanilóide-1
TrxR - tiorredoxina redutase
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Dor	12
1.2 Síndrome de Dor Complexa Regional	13
1.3 Dor crônica pós-isquemia	18
1.3.1 IR e estresse oxidativo	19
1.4 Receptores de potencial transiente e canais iônicos sensíveis a ácido	22
1.5 Melatonina.....	23
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Animais	33
4.2 Dor crônica pós-isquemia	33
4.3 Hipersensibilidade mecânica	34
4.4 Hipersensibilidade térmica.....	35
4.5 Edema.....	36
4.6 Análises bioquímicas.....	36
4.6.1 Coleta e preparação das amostras.....	36
4.6.2 Atividade de enzimas antioxidantes	37
4.6.2.1 Catalase	37
4.6.2.2 Glutathiona Redutase.....	37
4.6.2.3 Glutathiona peroxidase.....	37
4.6.3 Imunorreatividade ao aduto MDA-proteína.....	38

4.7 Avaliação da atividade antinociceptiva da melatonina frente à nocicepção evocada por agonistas TRPs e ASICs	39
4.8 Análise estatística	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 Decurso temporal na hipersensibilidade mecânica	41
5.2 Avaliação da participação dos receptores MT1 e MT2 na antinocicepção promovida pela melatonina	43
5.3 Avaliação da atividade da melatonina no edema evocado pelo modelo de DCPI.....	45
5.4 Atividade das enzimas antioxidantes	46
5.6 Imunorreatividade ao aduto MDA-preteína	48
5.7 Atividade antinociceptiva da melatonina frente à nocicepção evocada por agonistas de TRPs e ASICs.....	50
6 DISCUSSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor

A dor é uma experiência sensorial com a função primária de alertar o organismo sobre a possível presença de um estímulo agressor. Foi definida em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável a qual está associada a lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões”. Sendo, portanto, uma experiência única, a qual varia de indivíduo para indivíduo, também dependendo do estado emocional e experiências passadas (JULIUS e BASBAUM, 2001; LOESER e TREEDE, 2008; LOESER e MELZAK, 1999; MERSKEY e BOGDUK, 1994).

A sensação dolorosa, que pode ser originada por estímulos mecânicos, térmicos e químicos, é percebida na periferia através de receptores específicos (nociceptores) ou ainda ter outras origens lesões nervosas ou mesmo psicológica, e transmitida através de fibras nervosas até o corno dorsal da medula espinal (BASBAUM et al., 2009; MERSKEY e BOGDUK, 1994). As fibras que transmitem a informação nociceptiva podem ser classificadas em: fibras C, as quais não são mielinizadas, de pequeno diâmetro, e conduzem informações de origem mecânica e térmica, por isso são também chamadas de polimodais, e; fibras A δ pouco mielinizadas, assim conduzem o impulso de forma mais rápida em comparação as fibras C, são divididas em tipo I e II, sendo ativadas em temperaturas de ~53 e ~43 °C, respectivamente. Essas fibras diferem das fibras A β de grande diâmetro, que transmitem de forma rápida a informação mecânica inócua (MILLAN, 1999; WALL e MELZACK, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001).

Os terminais centrais das fibras nociceptivas ativadas liberam mediadores, dentre os quais se destacam: glutamato, substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Estes mediadores ativam neurônios de segunda ordem que levam a informação até o tálamo, onde neurônios de terceira ordem transmitem o estímulo até o córtex somatosensorial, levando a percepção da dor. O processo neurofisiológico envolvido na transmissão do estímulo doloroso é chamado de nocicepção, diferindo da dor por não possuir componente emocional em sua

percepção. Portanto, a nocicepção torna-se o termo adequado para a utilização em modelos animais (BASBAUM et al., 2009; LAWSON et al., 1997;LAWSON et al., 2002).

Embora a dor tenha um caráter protetor, existem casos patológicos onde ela pode ser exacerbada, transformando-se em processos crônicos, levando a perda de sua função inicial. Essa exacerbção pode tornar-se debilitante, afetando aspectos físicos, psicológicos e comportamentais da vida do paciente. Esta transição entre dor aguda e crônica pode dar-se por mudanças em nível de sistema nervoso, ocorrendo uma plasticidade e facilitação da transmissão nociceptiva, ou ainda, por uma modulação nos neurônios de primeira ordem, onde a mensagem dolorosa é iniciada (JULIUS e BASBAUM, 2001).

1.2 Síndrome de Dor Complexa Regional

Os primeiros registros históricos da síndrome de dor complexa regional (SDCR) são datados do século 16, quando um cirurgião francês, Ambroise Pare, descreveu os sintomas de dor persistente relatados pelo rei Charles IX após um procedimento de sangria. Já no século 18, nos Estados Unidos, Mitchell descreveu esta patologia em soldados com ferimentos penetrantes. Posteriormente, em 1872, Mitchell chamou a síndrome dolorosa de causalgia (do grego *kausis*: fogo) devido à elevada temperatura apresentada no membro afetado. Mitchell fez ainda um relato da apresentação de dor exagerada em relação ao dano tecidual. Sendo que suas descrições da SDCR são consideradas até hoje os melhores relatos clínicos (FELIU e EDWARDS, 2010; SHAH e KIRCHNER, 2011).

Por volta de 1900, Sudeck, na Alemanha, descreveu uma atrofia pós-traumática do osso, também chamada de atrofia de Sudeck, acompanhada de dor pós-traumática, na qual se observou edema e modificações tróficas. Em 1939, Leriche descreveu a característica circular que é associada com a SDCR, e tratou com sucesso alguns pacientes utilizando a cirurgia de simpatectomia. Então, em 1946, Evans cunhou o termo distrofia simpático-reflexa (DSR), o qual se tornou popular e foi o mais utilizado para descrever esta patologia. Hoje em dia, devido aos avanços no esclarecimento da fisiopatologia da SDCR, a descrição feita por Evans

foi considerada, de certa forma, responsável por desviar o foco das pesquisas e tratamentos desta patologia. Um ano após a descrição de Evans, Foisie, descreveu o que chamou de vasoespasma arterial traumático, como uma síndrome dolorosa ocasionada por espasmos arteriais que levavam a uma diminuição da suplementação sanguínea ocasionando alterações degenerativas no sistema músculo-esquelético. Esta nomenclatura caiu em desuso, embora hoje se saiba que seria mais correta do que DSR (MAIHÖFNER et al., 2005; FELIU e EDWARDS, 2010; CODERRE, 2011).

Devido à falta de esclarecimento sobre a real causa e manutenção desta doença, surgiram diversos outros termos na história, tais como: dor simpático-independente, vasospasmo traumático, distrofia pós-traumática, osteoporose pós-traumática, algodistrofia, entre outros. Esta múltipla nomenclatura contribuiu para a falta de progresso na identificação da etiologia, progressão e resolução clínica da SDCR. Foi somente em 1994 que um grupo designado pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) para revisar a nomenclatura, chegou ao consenso de Síndrome de Dor Complexa Regional. Essa definição teve por base a complexidade da síndrome, o fato de acometer primariamente uma região corporal e de que a dor é um componente essencial do quadro clínico (MAIHÖFNER et al., 2005; FELIU e EDWARDS, 2010).

A SDCR é uma condição que geralmente ocorre como consequência de fraturas, contusões, esmagamentos, cirurgias artroscópicas, entre outros. É considerada relativamente rara, sendo que dados epidemiológicos mostram que na América do Norte existe uma taxa de incidência de 5,46/100000/ano, com uma taxa de prevalência calculada de 20,57/100000 e, um estudo realizado na Holanda encontrou uma taxa de incidência de 26,2/100000/ano (CODERRE, 2011; MOS et al., 2007; ALLEN et al., 1999; SANDRONI et al., 2003).

Os sintomas podem variar de acordo com o indivíduo, mas geralmente seguem uma tríade característica de distúrbios autonômicos, sensoriais e motores. Os distúrbios autonômicos incluem edema e alterações na temperatura do membro afetado, que se apresentam em cerca de 80% dos pacientes, sendo que a temperatura da pele geralmente diminui ao longo do curso da doença. A coloração da pele do local apresenta uma coloração avermelhada no início da síndrome, passando a pálida com o decorrer do tempo. Além disto, pelos e unhas também são afetados, podendo ter seu crescimento aumentado nos primeiros estágios (fig. 1)

(JÄNIG e BARON, 2003; SHAH e KIRCHNER, 2011). Os sintomas sensoriais, por sua vez, estão presentes em quase 90% dos pacientes, os quais não ocorrem em pontos específicos, mas são distribuídos em forma de “luva” ou “meia”, e aproximadamente 75% dos pacientes apresentam dor espontânea. A hiperalgesia e alodínia mecânica também são relatadas, sendo que estes sintomas dolorosos podem ser exacerbados por exercícios físicos, ansiedade, entre outros fatores (SHAH e KIRCHNER, 2011). As funções motoras podem ser dificultadas pelo edema e, em estágios mais avançados, por contraturas e fibroses, ocorrendo dificuldade em agarrar objetos e alguns pacientes passaram a apresentar tremores (JÄNIG e BARON, 2003; MAIHÖFNER et al., 2005, FELIU e EDWARDS, 2010).

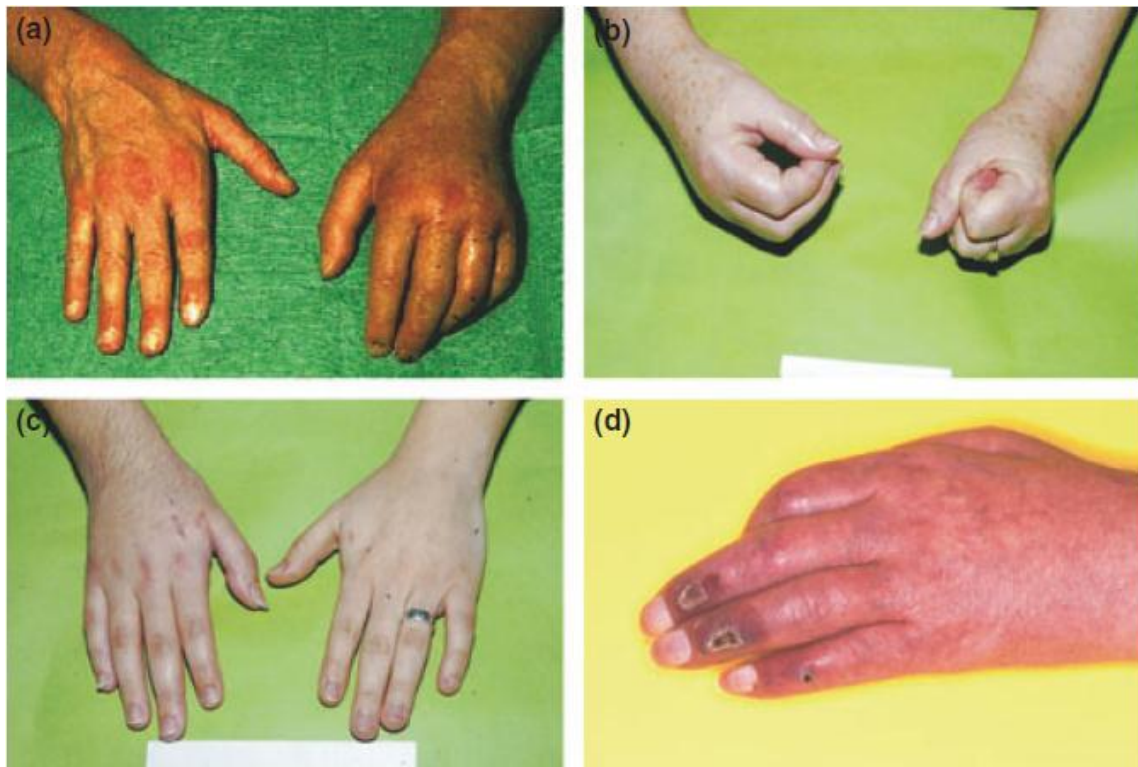


Figura 1 - Sinais clínicos na SDCR.

(a) Estágio agudo da SDCR-I com edema, perda de cor e comprometimento da função na mão esquerda, posterior a fratura distal do rádio. (b) Edema e comprometimento da mobilidade na tentativa de cerrar o punho em SDCR-II após cirurgia de liberação do túnel do carpo. (c) Hipertricose da mão direita em SDCR-I. (d) Contraturas, pele cianótica e com distúrbios tróficos em SDCR-I (adaptado de MAIHÖFNER et al., 2005).

A patofisiologia da SDCR ainda não está esclarecida, porém avanços nesta área demonstraram que, ao contrário do que se pensava, o início da síndrome não é

provocado pela atividade do sistema simpático e, na verdade, no início do quadro a atividade simpática está diminuída no membro afetado. Isso poderia levar a uma hipersensibilidade a vasoconstritores simpáticos na fase tardia da SDCR, justificando os achados de que estas drogas aumentariam a dor de alguns pacientes. Baseando-se nas descrições de Foisie e nos achados mais recentes, sugere-se que somente em alguns pacientes a dor gerada na fase tardia da doença é dependente da aferência simpática, sendo que as descargas simpáticas podem piorar o quadro clínico da síndrome (CODERRE, 2011).

O início da SDCR está relacionado com uma condição isquêmica no tecido. Achados clínicos em membros amputados de pacientes com SDCR mostraram a presença de lipofuscina (pigmento relacionado com degeneração celular), fibras atroficas e membranas basais dos capilares severamente espessadas (van der LAAN et al., 1998). Sugere-se que em danos por compressão tecidual, onde a tensão no tecido é aumentada, ocorre um aumento da permeabilidade vascular e acumulação do fluido intersticial, causando um aumento da pressão intracompartimental. O aumento da pressão intracompartimental provoca quadros de isquemia devido à compressão de microvasos, porém, pequenas alterações na pressão intracompartimental podem bloquear e reestabelecer o fluxo sanguíneo de microvasos, causando um quadro de isquemia e reperfusão (IR) no tecido. A IR causa um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na produção de citocinas pró-inflamatórias, levando a uma disfunção microvascular nos tecidos adjacentes (CODERRE e BENNETT, 2010; CODERRE, 2011).

Eisenberg e colaboradores (2008) comprovaram a participação de EROs através da análise da saliva e do soro de pacientes com SDCR, onde encontraram um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), um metabólito da peroxidação lipídica, além de um aumento em parâmetros antioxidantes em comparação ao grupo de pacientes saudáveis. Este aumento das defesas antioxidantes pode se dar por um efeito compensatório frente ao estado oxidativo do meio. Além disto, estudos encontraram níveis elevados de mediadores inflamatórios (IL-2, IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF- α) no sangue e no líquido presente nas bolhas formadas no membro afetado (EISENBERG et al., 2008; GECHEV et al., 2002).

A SDCR é dividida em tipo I e II, sendo que a segunda apresenta lesão nervosa enquanto a primeira não. Até o momento não existem testes laboratoriais específicos para realizar o diagnóstico da SDCR. O diagnóstico realizado atualmente

é baseado em observações clínicas dos sinais e sintomas, além de testes quantitativos sensoriais, como a escala analgésica da Organização Mundial da Saúde (OMS) entre outros. Na tabela 1 estão dispostos os critérios para diagnóstico da SDCR-I e II estabelecidos pela IASP (CODERRE, 2011).

Tabela 1 - Critérios para o diagnóstico da SDCR-I e II estabelecidos pela IASP.

SDCR-I	SDCR-II
<p>1. Presença de um evento iniciador doloroso ou uma causa de imobilização;</p> <p>2. Dor contínua ou hiperalgesia desproporcionais ao evento iniciante;</p> <p>3. Evidência em algum momento de edema, alterações no fluxo sanguíneo ou atividade sudomotora anormal na região afetada;</p> <p>4. O diagnóstico é excluído pela existência de alguma condição que poderia de alguma forma ser causadora de algum grau da disfunção ou dor; Nota: Os critérios 2 e 4 devem ser satisfeitos</p>	<p>1. Presença de dor contínua, alodinia ou hiperalgesia após um dano nervoso, não necessariamente limitado a distribuição do nervo lesado;</p> <p>2. Evidência em algum momento de edema, alterações no fluxo sanguíneo ou atividade sudomotora anormal na região afetada;</p> <p>3. O diagnóstico é excluído pela existência de alguma condição que poderia de alguma forma ser causadora de algum grau da disfunção ou dor; Nota: Todos os 3 critérios devem ser satisfeitos.</p>

FONTE: Adaptado de Coderre (2011)

O tratamento da SDCR é baseado em uma abordagem multidisciplinar objetivando a redução do quadro doloroso e uma posterior recuperação da função. A fisioterapia tem se mostrado útil em reduzir a sensação dolorosa assim como melhorar as funções motoras, utilizando-se de terapia ocupacional, drenagem linfática e a terapia do espelho, onde um espelho é colocado na frente do paciente de modo que ele só veja o lado não afetado, então durante os exercícios é criada uma ilusão de movimentos normais do membro afetado (GOEBEL, 2011; FELIU e EDWARDS, 2010; MAIHÖFNER et al., 2005).

O tratamento farmacológico tendo como alvo os aspectos patofisiológicos da SDCR também tem sido utilizado. O uso de glicocorticoides, especialmente na fase

inicial tem se mostrado eficaz, isso se deve a sua capacidade de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios, além de reduzir a expressão de neuropeptídios. Os *scavengers* de radicais livres como o dimetilsulfóxido (DMSO), vitamina C e N-acetilcisteína (NAC), têm se mostrado eficazes em reduzir sinais e sintomas da síndrome (CODERRE e BENNETT, 2010; ZUURMOND et al., 1996; ZOLLINGER et al., 1999). Porém, o bloqueio simpático, estabelecido como tratamento padrão durante anos, não apresenta estudos convincentes a seu favor, sendo assim, o mesmo não é indicado normalmente. Além disto, fármacos para o tratamento sintomático da dor, como agentes gabaérgicos, opioides, e anti-inflamatórios não esteroidais, também apresentam efeitos positivos (MAIHÖFNER et al., 2005; SHAH e KIRCHNER, 2011).

1.3 Dor crônica pós-isquemia

Coderre e colaboradores (2004) descreveram um modelo animal que mimetiza a SDCR-I e é baseado em uma prolongada isquemia, seguida de reperfusão. Este modelo, primeiramente utilizado em ratos, foi chamado de dor crônica pós-isquemia (DCPI). Os animais submetidos à DCPI apresentam hiperemia e edema por um período de 2 a 4 horas após a reperfusão. Além disto, os animais apresentam sintomas comportamentais como hipersensibilidade mecânica e térmica, sendo que a hipersensibilidade mecânica se inicia 8 horas após a reperfusão e permanece por até 4 semanas. Análises por microscopia óptica e eletrônica do nervo tibial, próximo ao local onde foi colocado o torniquete, não encontraram sinais de dano nervoso. Por outro lado, os registros eletrofisiológicos de fibras individuais de axônios aferentes primários apresentaram disparos espontâneos de fibras A β , A δ e C de 2 a 9 dias após a reperfusão (LAFERRIÈRE et al., 2008).

Estudos subsequentes mostraram que tecidos da pata submetida a IR (nervo e músculo digital) apresentam dano microvascular, o qual é indicativo do fenômeno *slow-flow/no-reflow*. Este fenômeno é caracterizado pelo inchamento das células endoteliais dos microvasos, agregação plaquetária e obstrução do lúmen capilar pelo acúmulo de leucócitos e eritrócitos. Este acúmulo leva ao “*slow-flow*”, quando o fluxo sanguíneo é diminuído e, ao “*no-reflow*”, impedindo completamente o fluxo

sanguíneo. O *slow-flow/no-reflow* normalmente produz um aumento da produção de EROs, além de um estado inflamatório persistente. Corroborando com esta ideia, encontrou-se um aumento nos níveis de MDA 2 horas após a reperfusão, e o tratamento com drogas antioxidantes como o NAC e o 4-hidróxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol) reduziram de forma dependente da dose a hipersensibilidade mecânica apresentada por animais submetidos a DCPI. Além disto, algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) e o fator nuclear kappa B (NFkB) estão aumentados entre 2 e 48 horas após a reperfusão (LAFERRIÈRE et al., 2008; CODERRE et al., 2004; CODERRE e BENNETT, 2010).

Os animais (ratos) submetidos à DCPI também demonstraram aumento nos níveis de lactato no tecido muscular da pata, sendo que este aumento foi exacerbado em animais DCPI exercitados, o que causou um aumento também da hipersensibilidade mecânica destes animais. Sabe-se que o aumento nos níveis de lactato após a indução de isquemia causa a ativação de canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs). Sendo assim, demonstrou-se que o tratamento com amilorida (antagonista de ASICs) reduziu significativamente a hipersensibilidade mecânica em animais com DCPI (LAFERRIÈRE et al., 2008). Outros achados em animais submetidos à DCPI incluem a hipersensibilidade a norepinefrina (NE) e um aumento nos receptores ETA de endotelina, evidenciado por um aumento do comportamento nociceptivo após o tratamento com endotelina-1 (XANTHOS et al., 2008; MILLECAMPS et al., 2010).

1.3.1 IR e estresse oxidativo

A isquemia é um fenômeno multifatorial, caracterizado por diversos fatores patológicos que atuam causando danos em arteríolas, capilares e vênulas. É considerada uma redução severa ou um completo bloqueio do fluxo sanguíneo, reduzindo drasticamente o aporte de oxigênio ao tecido irrigado (ZEMKE et al., 2004; BLAISDELL, 2002).

Nos tecidos isquêmicos ocorre um aumento da expressão de enzimas oxidativas, principalmente xantina oxidase e NADPH (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida) oxidase. Após a reperfusão e a presença

abundante de oxigênio, essas oxidases reduzem o oxigênio molecular, liberando grandes quantidades de EROs, causando danos as células vasculares e do músculo liso. O aumento da produção de EROs leva a um desequilíbrio do balanço entre oxidação e redução (equilíbrio redox) existente dentro da célula. Este desequilíbrio induz o chamado estresse oxidativo (CODERRE e BENNETT, 2010; CHONG et al., 2005).

As EROs são substâncias tóxicas que podem ser geradas durante o transporte de elétrons na mitocôndria, reações enzimáticas, reações de auto-oxidação, ou pelo grupo heme de proteínas. Podem ser radicais livres, como o ânion superóxido, ou agentes oxidantes não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Os radicais livres são definidos como moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais atômicos ou moleculares, dando a essa molécula um elevado grau de reatividade. O oxigênio molecular (O_2), uma molécula altamente eletrofílica, ao receber um elétron, forma o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual é considerado a ERO “primária” e pode reagir com outras moléculas para formar as EROs “secundárias”, diretamente ou através de reações catalisadas por enzimas ou metais presentes no meio. Além do ânion superóxido as principais EROS são: o radical hidroxil ($\cdot OH$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical peroxila ($\cdot OOH$) e o oxigênio *singlet* (1O_2). Estas EROs possuem reatividades diferentes e podem reagir de forma específica a alguns tipos de moléculas, como o peróxido de hidrogênio, ou inespecífica, reagindo com inúmeras moléculas, como o radical hidroxil (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

As EROs podem causar danos celulares através de ataques a lipídios, proteínas e também ao DNA. O ataque de EROs a lipídios (peroxidação lipídica) envolve uma reação complexa que passa pelas etapas de iniciação, através da abstração de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno com um posterior rearranjo molecular, propagação, com uma reação oxidativa em cadeia, e terminação, por neutralização dos radicais, formação de produtos não radicalares ou consumo dos reagentes. Esta reação leva a formação de diversos produtos dentre os quais, destacam-se os aldeídos MDA e 4-hidroxinonenal (4-HNE), os quais são amplamente utilizados para mensurar níveis de estresse oxidativo *in vivo*. Assim como os peróxidos lipídicos, os peróxidos proteicos são de difícil degradação por não serem substratos para enzimas antioxidantes. O ataque oxidativo ao DNA pode levar a formação de produtos como 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodGuo)

e está ligado a processos como mutações e envelhecimento. Para neutralizar os danos causados pelas EROs e outros radicais livres as células utilizam defesas antioxidantes que podem ser enzimáticas ou não-enzimáticas (DRAPER, 1990; DIZDAROGLU et al., 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

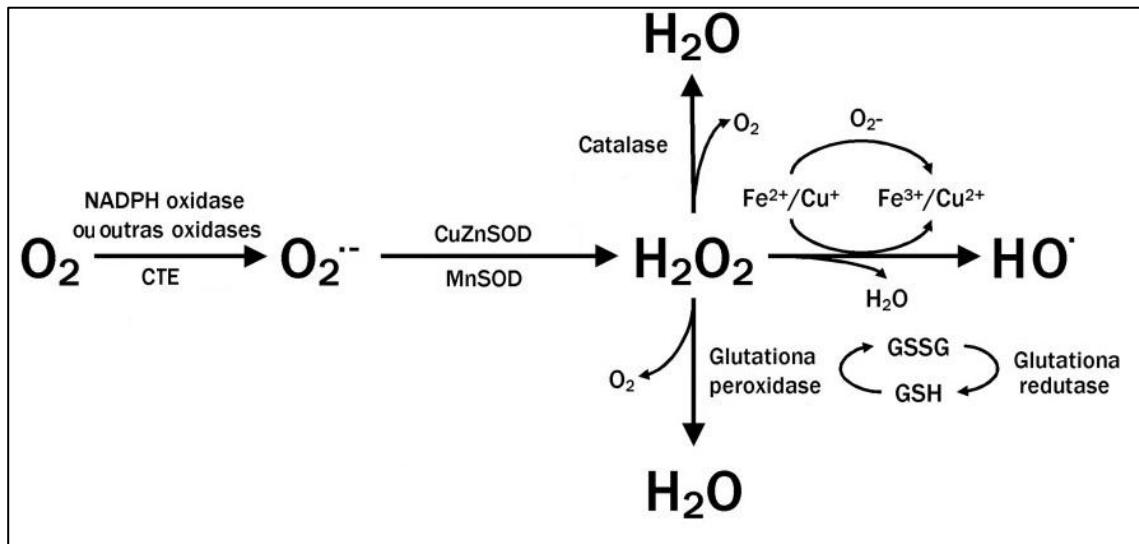


Figura 2 - Formação de EROs e defesas antioxidantes.

As EROs podem ser formadas em processos como reações enzimáticas ou atividade da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. O ânion superóxido formado pode ser convertido a peróxido de hidrogênio, o qual pode ser detoxificado através da atividade da catalase, glutaciona peroxidase ou outras peroxidases, gerando H_2O e O_2 . O peróxido de hidrogênio pode ainda reagir com íons metálicos, através da reação de Fenton, produzindo o radical hidroxil. CuZnSOD – Superóxido dismutase Cobre/Zinco; MnSOD – Superóxido dismutase Manganês; CTE – Cadeia transportadora de elétrons; GSSG – Glutaciona oxidada; GSH; Glutaciona reduzida (adaptado de VALKO et al., 2007).

As principais defesas antioxidantes enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), peroxirredoxina (Prx) e tioredoxina redutase (TrxR). Nos mamíferos são encontradas três diferentes formas de SOD; sendo que uma é citoplasmática e possui cobre e zinco no seu sítio catalítico, uma é mitocondrial e possui manganês no seu sítio ativo e outra também possui cobre e zinco e se encontra extracelularmente, sendo que esta enzima é essencial para a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio pode ser degradado pela CAT, localizada em peroxissomos, ou por peroxidases como a GPx, que também degrada outros peróxidos orgânicos, localizada no citoplasma e extracelularmente. A GPx utiliza a glutaciona reduzida

(GSH) para a detoxificação do peróxido, produzindo dissulfeto de glutathiona, o qual é recuperado para sua forma reduzida através da ação da enzima glutathiona redutase (GR) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; VALKO et al., 2007). O sistema Prx/TrxR também é responsável pela degradação de peróxidos através da reação com resíduos de cisteína presentes nas enzimas. As principais defesas antioxidantes não enzimáticas são as vitaminas C e E, pigmentos biliares, urato e GSH, sendo que essas moléculas atuam captando radicais livres (KENSLEER et al., 2007; VALKO et al., 2007).

1.4 Receptores de potencial transiente e canais iônicos sensíveis a ácido

Como citado anteriormente, as alterações teciduais potencialmente danosas que ocorrem na periferia, de natureza mecânica, térmica, ou química, são detectadas por receptores especializados presentes nas terminações das fibras aferentes nociceptivas. Os receptores de potencial transiente (TRPs, do inglês: *transient receptors potencial*) desempenham um importante papel na transdução sensorial. Os canais TRPs dão origem a uma superfamília, consistindo de sete subfamílias com pouca homologia entre elas. Nos processos dolorosos destacam-se o TRPV1 (vanilóide 1), TRPA1 (anquirina 1) e TRPM8 (melastina 8), além dos canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs, do inglês: *acid-sensing ion channels*) (CORTRIGHT et al., 2007; VENKATACHALAM e MONTELL, 2007).

O canal TRPV1, também conhecido por receptor de capsaicina, é um receptor polimodal, respondendo, além da presença de capsaicina, a temperaturas superiores a 43°C, endovaniloides e ácidos. É um canal de cátions, homotetrâmero, não seletivo, com alta permeabilidade para o íon cálcio (Ca^{2+}). Ativa-se em pH inferiores a 6, porém, com o pH entre 7-6 ele se torna mais sensível a outros estímulos como a capsaicina e o calor. Sua expressão ocorre principalmente em fibras C e A δ (HOLZER, 2009; TOMINAGA et al., 1998; CATERINA et al., 1997).

O TRPA1 é um canal de cátions, permeável a Ca^{2+} , que é ativado por baixas temperaturas (<17°C). Além disto, o TRPA1 pode ser ativado por substâncias pungente presentes em plantas, como o isotiocianato de alila e o cinamaldeído, por mediadores endógenos, como a bradicinina, por aldeídos produzidos durante a

peroxidação lipídica, como o 4-HNE, pela formalina, entre outros. É seletivamente expresso por fibras sensoriais peptidérgicas de pequeno diâmetro (fibras C) que também expressam TRPV1 (STORY et al., 2003; ANDRADE et al., 2008).

O TRPM8 também é um canal de cátions não seletivo, com alta permeabilidade ao Ca^{2+} . Assim como o TRPA1, o TRPM8 também é ativado por baixas temperaturas, porém seu limiar de ativação é na faixa de 22-34°C, sendo considerado o principal receptor responsável pela detecção de baixas temperaturas no sistema somatosensorial. Além disto, pode ser ativado por compostos “refrescantes”, como o mentol, por voltagem e também por diversos agentes inflamatórios. Sua expressão ocorre principalmente em fibras C e A δ negativas para TRPV1 (LATORRE et al., 2011).

Os canais ASICs são permeáveis a cátions, sendo ativados por prótons extracelulares. Sua ativação é modulada pela PKC (proteína quinase C) e pertencem a família dos canais de sódio (Na^+) insensíveis à voltagem e sensíveis a amilorida. Sua expressão é codificada por 3 diferentes genes, os quais codificam a formação de 5 subunidades diferentes de ASICs, as quais podem ter sensibilidade ao pH, distribuição tecidual e características farmacológicas diferentes. Quando ativados, são preferencialmente permeáveis a Na^+ , mas podem permitir o fluxo de outros cátions, como Ca^{2+} e potássio (K^+) (HOLZER, 2009; SLUKA et al., 2003).

1.5 Melatonina

Com o objetivo de desenvolver novos tratamentos para quadros clínicos de dores agudas e crônicas, diversas substâncias têm sido estudadas. Dentre elas, encontra-se a melatonina, isolada pela primeira vez da glândula pineal bovina em 1958 por Lerner e sua equipe. A melatonina é uma indolamina secretada principalmente pela glândula pineal, a qual é a principal responsável pela transdução do fotoperíodo ambiental em sinalização hormonal endócrina (AMBRIZ-TUTUTI et al., 2009).

A biossíntese da melatonina é regulada principalmente através do trato retino-hipotalâmico. Outras vias incluem o núcleo paraventricular hipotalâmico, o feixe medial do prosencéfalo e a formação reticular, que modulam as células do corno

intermédio lateral da medula espinal, sendo estes os neurônios pré-ganglionares que inervam o gânglio cervical superior (GCS). As fibras originadas no GCS regulam a produção de melatonina pela liberação de NE nos sítios receptores dos pinealócitos. A NE interage com receptores adrenérgicos $\beta 1$ (principalmente) e $\alpha 1$ que, através da interação com a via da adenilil ciclase/AMP (monofosfato de adenosina) cíclico, aumentando a expressão de enzimas da via de biossíntese da melatonina. O AMP cíclico estimula a expressão e a fosforilação, através da PKA (proteína quinase A), da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT), sendo este passo considerado a etapa limitante na síntese da melatonina (REITER, 1994; ACKERMANN e STEHLE, 2006).

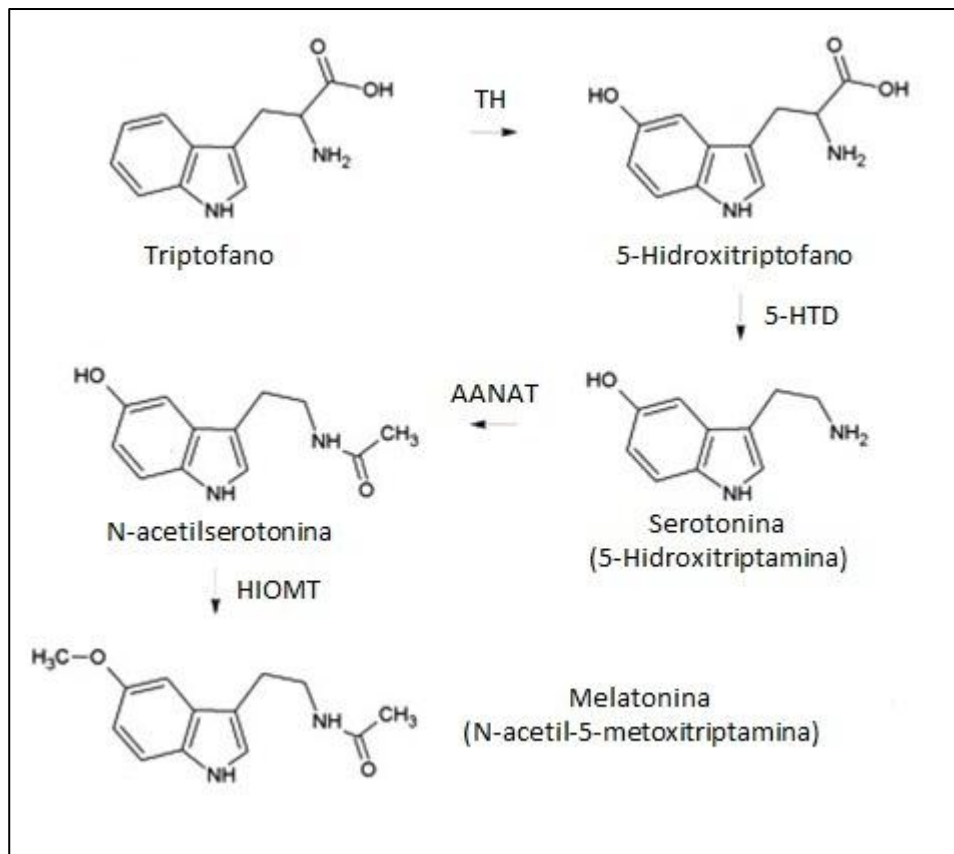


Figura 3 - Síntese da melatonina na glândula pineal.

O triptofano é hidroxilado em 5-hidroxitriptofano pela TH. Posteriormente a molécula sofre uma descarboxilação mediada pela 5-HTD, dando origem a serotonina. A serotonina sofre uma acetilação pela AANAT, formando a N-acetilserotonina, a qual sofre uma metilação, pela HIOMT, formando a melatonina. TH – Tiosina hidroxilase; 5-HTD – 5-hidroxitriptofano descarboxilase; AANAT – arilalquilamina N-acetiltransferase; HIOMT – Hidroxiindol-O-metiltransferase (adaptado de SLOMINSKI et al., 2012).

O pico de liberação de melatonina ocorre geralmente à noite, sendo que sua produção é inibida pelo contato da retina com a luz. A síntese de melatonina acontece a partir do aminoácido (aa) triptofano, captado da circulação sanguínea e convertido a serotonina via 5-hidroxitriptofano. A serotonina é acetilada para formar N-acetilserotonina pela AANAT. A N-acetilserotonina é então convertida em melatonina, como ilustrado na figura 3 (SLOMINSKI et al., 2012).

Devido à característica anfifílica da melatonina, ela é facilmente difundida através dos tecidos até o fluído cerebrospinal e circulação sanguínea, após sua síntese. Através da circulação sanguínea ela é distribuída e exerce suas atividades em quase todos os tecidos do organismo (GUPTA et al., 2003). A melatonina circulante é metabolizada por enzimas do citocromo P-450 no fígado, hidroxilando a molécula no carbono 6, levando a formação de 6-hidroximelatonina. Esta reação é seguida da conjugação com ácido sulfúrico ou glicurônico, sendo que o principal metabólito encontrado na urina é a 6-sulfametoximelatonina (HIRATA e HAIYSHI, 1974; SRINIVASAN et al., 2010).

Estudos têm demonstrado diversas atividades biológicas da melatonina, incluindo controle do ritmo circadiano, regulação do sono, *scavenger* de radicais livres, regulação do humor, ação anti-inflamatória, atividade analgésica, entre outros. Estas atividades podem ser dependentes ou não de receptor (BORJIGIN et al., 1999; LUCHETTI et al., 2010).

A melatonina possui dois receptores ligados à membrana, MT1 e MT2. Um terceiro receptor também foi clonado de *Danio rerio*, *Xenopus* e *G. domesticus*, mas não foi encontrado em mamíferos. Estes receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteína G, com sete domínios transmembrana e podem ser encontrados individualmente ou em dímeros. A probabilidade de formação de homodímeros de MT1 e heterodímeros de MT1/MT2 é igual, enquanto que a probabilidade da formação de homodímeros de MT2 é 3-4 vezes menor. Estruturalmente, o MT1 é uma proteína com 350 aa e apresenta uma homologia de 60% com o MT2, que possui 362 aa (LUCHETTI et al., 2010; DUBOCOVICH e MARKOWSKA, 2005).

O MT1 e o MT2 realizam sua sinalização através do acoplamento com proteínas heterotriméricas *Gi/Go*, promovendo a dissociação das subunidades α e $\beta\gamma$, as quais interagem com moléculas efetoras intracelulares. A sinalização efetora

pode ser via adenilil ciclase, fosfolipase C, fosfolipase A2, guanilil ciclase e canais de Na^+ e K^+ . A melatonina também bloqueia a interação de calmodulina (CaM) com enzimas alvo, através da fosforilação da CaM pela PKC α . A ativação da CaM quinase II leva a fosforilação de CREB (proteína ligante ao elemento responsivo a AMP cíclico) na medula espinal em resposta a estímulos nocivos periféricos induzindo sensibilização central (LUCHETTI et al., 2010; DEVAVRY et al., 2012; AMBRIZ-TUTUTI et al., 2009).

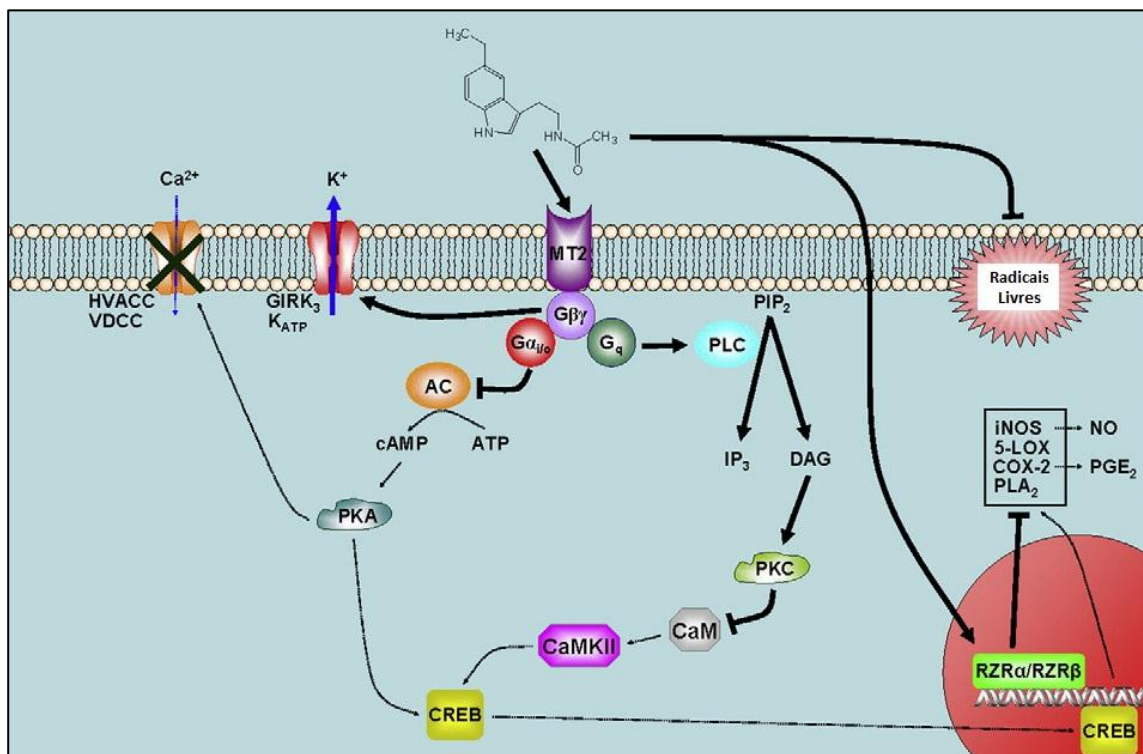


Figura 4 -Mecanismos de ação da atividade antinociceptiva da melatonina.

A melatonina ativa principalmente receptores MT2 localizados na membrana pós-sináptica de neurônios de segunda ordem, assim como em fibras aferentes primárias. Desta maneira, a melatonina modula negativamente os níveis de AMP cíclico, Ca^{2+} e ativação de CREB. Canais de potássio são ativados e canais de cálcio são bloqueados pela melatonina, provavelmente pela ativação das subunidades $\text{G}\beta\gamma$. Também pode atuar como *scavenger* de radicais livres. Adicionalmente, a melatonina ativa receptores nucleares e, por esta via, pode reduzir a expressão de óxido nítrico sintase, 5-lipooxigenase, ciclooxigenase-2 e fosfolipase A2. HVACC – canais de cálcio ativados por alta voltagem; VDCC – canais de cálcio dependentes de voltagem; GIRK_3 – canais de potássio retificadores internos regulados por proteína G; K_{ATP} – canais de potássio sensíveis a ATP; AC – adenilato ciclase; PLC – fosfolipase C; PKC, proteína quinase C; CaM – calmodulina; CaMKII – proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina (adaptado de AMBRIZ-TUTUTI et al., 2009).

Os receptores MT1 e MT2 foram identificados em regiões do sistema nervoso central (SNC) envolvidas na transmissão nociceptiva como o tálamo, hipotálamo,

corno dorsal da medula espinal, núcleo e trato trigeminal. Na medula espinal estes receptores foram encontrados com uma distribuição nas lâminas I-V e X, as quais são importantes no controle da dor (SLOMINSKI et al., 2012; SRINIVASAN et al., 2010).

Além disto, a melatonina pode se ligar com receptores retinoides nucleares órfãos, chamados, RZR α e RZR β . Estes receptores foram encontrados no sistema nervoso central e periférico e têm sido associados com proliferação celular e regulação da resposta imune. O RZR β foi encontrado em algumas regiões motoras, incluindo o corno dorsal da medula espinal. Enquanto o RZR α tem sido relacionado com a redução da expressão de 5-lipooxigenase (5-LOX), uma enzima importante na sinalização inflamatória (AMBRIZ-TUTUTI et al., 2009).

A atividade antinociceptiva da melatonina tem sido evidenciada em vários estudos (WILHELMSSEN et al., 2011). O possível envolvimento dos receptores MT1 e MT2 nesta atividade foi investigado através da utilização de antagonistas, como o luzindol, antagonista MT1/MT2 não seletivo, e o 4-P-PDOT (4-fenil-2-propionamidotetralina), antagonista seletivo MT2. Estudos em diversos modelos de dor demonstraram que a administração por via sistêmica ou intracerebroventricular (i.c.v.) destes antagonistas reverte a antinocicepção promovida pela melatonina (AMBRIZ-TUTUTI e GRANADOS-SOTO, 2007; MANTOVANI et al., 2006; LI et al., 2005).

O sistema opioide também tem sido relacionado com a atividade antinociceptiva da melatonina, sendo que a naloxona (antagonista opioide não seletivo) preveniu a atividade antinociceptiva da melatonina (AMBRIZ-TUTUTI e GRANADOS-SOTO, 2007; MANTOVANI et al., 2006). O receptor δ -opioide é expresso na glândula pineal e sua ativação demonstrou estimular a atividade da enzima AANAT (LOWENSTEIN et al., 1984). Além disto, a administração de melatonina está relacionada com a liberação de β -endorfinas. Alguns estudos sugerem que a melatonina possa atuar diretamente em receptores opioides, porém, a relação entre a melatonina e o sistema opioide é complexa e não está completamente compreendida (SRINIVASAN et al., 2010).

A ação antinociceptiva da melatonina também pode ser mediada pela ativação de canais de potássio e inibição de canais de cálcio, através da interação indireta por proteínas quinases ou pela ação direta das subunidades da proteína G com o canal. A melatonina também diminui a produção de mediadores pró-

inflamatórios, via inibição da 5-LOX e ciclooxigenase, facilita a transmissão gabaérgica e atua diminuindo os níveis de radicais livres, os quais estão envolvidos com diversos processos dolorosos, incluindo dor neuropática e inflamatória (LUCETTI et al., 2010; BILICI et al., 2002; RIOJA et al., 2002; WU et al., 1999; REITER et al., 2000).

2 JUSTIFICATIVA

A SDCR-I é uma patologia geralmente desenvolvida em um membro, superior ou inferior após lesões como fraturas ou torções, apresentando um quadro de dor crônica com edema, alterações tróficas e comprometimento da função, alterando de forma significativa a qualidade de vida dos indivíduos afetados, sendo que os pacientes não demonstram remissão espontânea dos sinais e sintomas apresentados (CODERRE E BENNETT, 2010; SCHWARTZMAN et al., 2009). Dados epidemiológicos demonstram uma taxa de incidência de 5,46/100000/ano na América do Norte e de 26,2/100000/ano na Holanda (ALLEN et al., 1999; SANDRONI et al., 2003). A patofisiologia desta síndrome ainda não está completamente esclarecida, porém, as pesquisas realizadas neste sentido apontam para um provável aumento da pressão compartimental, provocando uma compressão de microvasos e, por consequência, redução do aporte de oxigênio para os tecidos do membro afetado, provocando, dentre outras, alterações inflamatórias e oxidativas no local (FELIU e EDWARDS, 2010; CODERRE, 2011). Além disto, o tratamento da SDCR-I não é satisfatório e permanece controverso e inclui tratamento farmacológico, tendo como alvo os aspectos patofisiológicos da síndrome, e não farmacológico, como a fisioterapia (SHAH e KIRCHNER, 2011). Sendo assim, a pesquisa por novos tratamentos visando melhorar a qualidade de vida dos pacientes com SDCR-I torna-se de extrema importância.

Neste sentido, pesquisas no campo da dor utilizando a melatonina, uma indolamina endógena liberada principalmente pela glândula pineal, vem acumulando evidências que apontam para a sua promissora atividade analgésica em diversos modelos de nocicepção (SRINIVASAN et al., 2010). Os mecanismos pelos quais a melatonina exerce sua atividade antinociceptiva incluem a ativação de receptores MT1/MT2, interação com o sistema opioide, modulação de segundos mensageiros intracelulares independentemente de receptores, atividade anti-inflamatória, uma potente atividade *scavenger* de radicais livres, entre outros (SRINIVASAN et al., 2010; LUCHETTI et al., 2010; AMBRIZ-TUTUTI et al., 2009).

Coderre e colaboradores (2004) desenvolveram um modelo animal que mimetiza sintomas apresentados por pacientes com SDCR-I. O modelo baseia-se na

indução de uma isquemia prolongada seguida de reperfusão, com a utilização de um torniquete, e provoca uma hipersensibilidade mecânica persistente por até quatro semanas, a qual, assim como em pacientes com SDCR-I, responde bem a tratamentos com drogas antioxidantes (CODERRE et al., 2004; MILLECAMPS e CODERRE, 2008).

Diante disso, o presente trabalho se propõe a analisar a atividade antinociceptiva da melatonina em um modelo animal da SDCR-I, bem como o envolvimento de receptores de melatonina e parâmetros do estresse oxidativo neste efeito.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antinociceptiva da melatonina na hipersensibilidade, mecânica e térmica (ao frio), no edema gerado pelo modelo de DCPI e a participação dos receptores de melatonina nesta atividade, além da possível modulação da atividade de enzimas antioxidantes e imunorreatividade ao aduto MDA-proteína nos tecidos da pata destes animais. Além disto, avaliar o efeito da melatonina frente à nocicepção evocada por agonistas de TRPs e ASICs.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o decurso temporal da atividade da melatonina na hipersensibilidade mecânica gerada pela indução do modelo de DCPI, no segundo e no sétimo dia após a reperfusão;
- Avaliar a atividade da melatonina na hipersensibilidade térmica (ao frio) gerada pela indução do modelo de DCPI, no segundo e no sétimo dia após a reperfusão;
- Avaliar a atividade da melatonina no edema gerado pela indução do modelo de DCPI, no segundo dia após a reperfusão;
- Avaliar a participação dos receptores de melatonina (MT1/MT2) na atividade antinociceptiva da melatonina na hipersensibilidade mecânica e térmica (ao frio) gerada pela indução do modelo de DCPI, através da administração prévia de luzindol, no segundo e no sétimo dia após a reperfusão;
- Mensurar a ação do tratamento com melatonina na atividade das enzimas antioxidantes; CAT, GR e GPx, nos tecidos da pata ipsilateral de animais induzidos com o modelo de DCPI, 2 horas, 2 e 7 dias após a reperfusão;

- Mensurar a ação do tratamento com melatonina na imunorreatividade ao aduto MDA-proteína nos tecidos da pata ipsilateral de animais induzidos com o modelo de DCPI, 2 horas, 2 e 7 dias após a reperfusão;
- Avaliar a atividade antinociceptiva da melatonina administrada sistêmica ou periféricamente na nocicepção evocada pela injeção intraplantar de agonistas de TRPs e ASICs.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss machos de aproximadamente dois meses de idade, pesando entre 25 e 35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, em 05 de Outubro de 2010, sob número de registro PP00745.

Uma vez recebidos do Biotério Central, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, Departamento de Ciências Fisiológicas, em microisoladores com circulação de ar, em gaiolas de 12x30x18cm (6 animais por gaiola), com temperatura mantida a 22 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12h, com água e comida à vontade. Antes dos experimentos, os animais foram aclimatados ao laboratório por período mínimo de 1h, e todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas de cuidados com animais de laboratório e as diretrizes éticas para investigação de dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

4.2 Dor crônica pós-isquemia

Os animais foram previamente anestesiados com uma injeção intraperitoneal de hidrato de cloral (7%, 0,6 ml/kg). Após a verificação da perda do estado de consciência do animal (através do pinçamento da cauda e das pregas interdigitais), posicionou-se um anel elástico com 1,2 mm de diâmetro interno (Elástico Ligadura 000-1237 Uniden) proximal a articulação do tornozelo direito de modo a fazer um torniquete (fig. 5), como descrito anteriormente (BRATTI, 2011). O animal foi mantido sob anestesia com reforços de 20% do volume inicial por três horas e então

o anel foi cortado permitindo a reperfusão da pata. Após a isquemia, os animais permaneceram próximos a uma lâmpada para aquecimento até retornarem a deambular pela caixa, voltando posteriormente para o biotério do laboratório.



Figura 5 -Imagens representativas da pata de camundongos antes, durante e após a isquemia e posicionamento do anel elástico para a indução de DCPI.

(A) antes da exposição ao torniquete.(B) durante a isquemia, quando a pata se apresenta cianótica e fria, mostrando hipóxia tecidual, sendo que o elástico é posicionado próximo à articulação do tornozelo da pata traseira direita dos animais (seta vermelha).(C) cinco minutos após a isquemia a pata se mostra ingurgitada com sangue e edematosa, refletindo uma hiperemia reativa intensa.(D) quatro dias após a reperfusão, a hiperemia e o edema ainda estão presentes e a pele apresenta modificações tróficas (adaptado de BRATTI, 2011).

4.3 Hipersensibilidade mecânica

A hipersensibilidade mecânica foi mensurada como descrito previamente (BORTALANZA et al., 2002).Os animais foram primeiramente aclimatados em caixas acrílicas transparentes individuais (9 x 7 x 11 cm), em uma tela de arame (6 mm) elevada em uma plataforma de forma a permitir acesso a superfície ventral das patas dos animais. A pata direita dos animais foi estimulada com uma pressão constante de 0,4 g com um filamento de von Frey (Stoelting, Chicago, USA). O

comportamento de retirada e/ou agitação da pata foi considerado como indicativo de nocicepção. Os resultados são expressos como o percentual de retiradas a 10 estímulos com o filamento de von Frey, com intervalos de 1 min entre cada aplicação. No dia anterior à indução do modelo de DCPI, a resposta basal dos animais foi avaliada.

No segundo e sétimo dia após a indução de DCPI avaliou-se o decurso temporal, 0,5, 1, 2 e 3 horas após o tratamento com 10, 30 e 100 mg/kg, i.p., de melatonina ou veículo (10 mL/kg, i.p.). Além disto, para avaliar a participação dos receptores MT1/MT2, em outro experimento, os animais foram pré-tratados com luzindol (10 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.), 20 min antes do tratamento com melatonina (100 mg/kg i.p.) ou veículo (10 mL/kg i.p.), e após 30 min foram avaliados.

4.4 Hipersensibilidade térmica

A atividade da melatonina na hipersensibilidade térmica ao frio e a participação dos receptores MT1/MT2 no modelo de DCPI foi avaliada através do teste da placa fria, adaptado do previamente descrito (RUIZ-MEDINA et al., 2011). Os animais foram aclimatados ao aparelho (CQF/AVS – Brasil) por uma hora, no dia anterior ao teste. Para a avaliação, os animais foram colocados na placa fria ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) por 5 min, e o número de elevações das patas traseiras ipsi e contralateral, direita e esquerda, respectivamente, foi registrado. A diferença entre o número de elevações das patas foi considerado como comportamento nociceptivo. No segundo e no sétimo dia os animais foram pré-tratados com luzindol (10 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.), 20 min antes do tratamento com melatonina (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.) e após 30 min foram avaliados.

4.5 Edema

O edema nas patas dos animais no segundo dia após a reperfusão foi mensurado utilizando-se um aparelho de pletismômetro (EFF/304 - Insight), subtraindo o volume da pata ipsi pelo volume da pata contralateral. Os animais *sham* e induzidos com DCPI foram tratados com melatonina (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.) 30 min antes da avaliação.

4.6 Análises bioquímicas

4.6.1 Coleta e preparação das amostras

A atividade das enzimas antioxidantes e a imunorreatividade ao aduto MDA-proteína foram determinados 2 h, 2 e 7 dias após a indução de DCPI. Os animais *sham* e operados foram tratados com melatonina (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.) 30 min antes da coleta dos tecidos.

Os animais foram eutanasiados por decapitação sobre anestesia com isoflurano (1 – 2%, a 100% de O₂). Imediatamente, as amostras de músculo e pele da camada plantar superficial da pata ipsilateral ao dano por IR foram retiradas e rapidamente congeladas a -80°C até o processamento. Para a realização dos ensaios de atividade enzimática as amostras foram homogeneizadas em tampão Hepes 20 mM, pH 7, com uma solução inibidora de proteases (Coquetel de inibidores – Sigma, E2714) e centrifugadas a 15000 g por 30 min. a 4°C, os *pellets* foram descartados e os sobrenadantes foram utilizados para análise. Para a mensuração da imunorreatividade ao aduto MDA-proteína as amostras foram homogeneizadas em tampão Tris 20 mM, pH 7,5, com solução inibidora de proteases, centrifugadas a 12000 g por 20 min. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi diluído em tampão laemli, com 10% glicerol, 2% 2-mercaptoetanol, 2% SDS (dodecil sulfato de sódio), 0,004% azul de bromofenol e 0,106 M Tris-HCL, pH 6,8, e posteriormente utilizado para análise.

4.6.2 Atividade de enzimas antioxidantes

4.6.2.1 Catalase

Conforme descrito anteriormente por Aebi (1984), a atividade da catalase foi determinada pelo monitoramento do decréscimo da absorvância em 240 nm. Em uma placa de 96 poços foi pipetado 250 μ l de 50 mM tampão fosfato, 0.5 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 10 mM H_2O_2 , 0,012% (vol/vol.) triton X-100. Posteriormente, as amostras foram adicionadas ao meio reacional, acompanhando-se a reação nos primeiros 60 segundos por espectrofotometria.

4.6.2.2 Glutathiona Redutase

A atividade da GR foi medida pela monitoração da redução da concentração de NADPH acompanhado em 340 nm durante 5 min. em espectrofotômetro, conforme o método descrito por Carlberg e Mannervik (1985). As amostras foram colocadas em meio reacional contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0; 1 mM de EDTA e NADPH 0,225 mM. Ao adicionar 1 mM GSSG (dissulfeto de glutathiona), a GR presente na amostra reduz essa molécula, consumindo NADPH no processo.

4.6.2.3 Glutathiona peroxidase

Assim como a atividade da GR, a atividade da GPx foi medida pelo decréscimo da concentração de NADPH em 340 nm durante 5 min em espectrofotômetro, conforme método descrito por Wendel (1981). As amostras foram colocadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0; 1 mM EDTA, GSH 1 mM, NADPH 0,225 mM e 0,2 U/ml de GR. A reação foi iniciada pela adição de peróxido de cumeno (1

mM). A enzima GPx presente na amostra degrada o CHP utilizando a GSH como doador de elétrons, resultando em Cumeno-OH, GSSG e água. O GSSG formado é então rapidamente reduzido pela GR adicionada ao meio reacional com o consumo de NADPH. A atividade da GPx é proporcional ao consumo de NADPH. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford, usando albumina bovina como padrão.

4.6.3 Imunorreatividade ao aduto MDA-proteína

As proteínas (30 µg/poço) foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese com gel de poliacrilamida) usando um aparato mini-protean tetra (Bio-Rad, São Paulo). Para todos os experimentos foram usados gel de entrada 4% e gel de separação 12%. A eletroforese foi realizada com uma voltagem fixa de 150 V por 90 minutos, ou até o corante ter alcançado o final do gel, utilizando-se um tampão de corrida contendo 190 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1% de SDS.

Após a separação, as proteínas foram transferidas por eletroforese para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o aparato Mini Trans-Blot (Bio-Rad, São Paulo). A eletrotransferência foi realizada por 50 min. a 100 V, mantida sob-refrigeração. As membranas foram bloqueadas pela incubação com leite em pó desnatado 5%, dissolvido em TBS-T por 1h e 30min. à temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas com os anticorpos primários anti MDA (Santa Cruz/SC-130087), 1:2000, à 10°C, *overnight*, o excesso de anticorpos foi retirado pela lavagem (5 vezes) com TBS-T. Posteriormente, estas membranas foram incubadas com os anticorpos secundários anti goat IgG (Santa Cruz/SC-130087), 1:8000, conjugado com peroxidase de rábano durante 1 h à temperatura ambiente e então, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T. As membranas foram incubadas durante 3 min com a solução de revelação quimioluminescente (2,2 mg luminol, 0,1 M Tris-HCL, 6,8 mM ácido P-cumárico, 0,3% H₂O₂ e pH 8,5,) e, posteriormente, as bandas foram detectadas pela exposição em filme radiográfico. A intensidade das bandas foi calculada por densitometria usando o software livre ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, USA).

4.7 Avaliação da atividade antinociceptiva da melatonina frente à nocicepção evocada por agonistas TRPs e ASICs

4.7.1 Avaliação da atividade antinociceptiva da melatonina administrada por via sistêmica

A atividade antinociceptiva da melatonina administrada sistemicamente, via i.p., foi avaliada na nocicepção evocada por agonistas de TRPs e ASICs. A melatonina foi administrada nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg ou veículo (10 mL/kg), 30 min antes da injeção intraplantar (i.pl.) de 20 µL de capsaicina (agonista TRPV1), 30,5 ng/pata, cinamaldeído (agonista TRPA1), 1,32 µg/pata, mentol (agonista TRPM8), 187,5 µg/pata, ou salina acidificada (agonista ASICs), pH 1,98. Além disto, os antagonistas/bloqueadores, vermelho de rutênio (TRPV1, 3 mg/kg, i.p.), cânfora (TRPA1, 7,6 mg/kg, i.p.), amilorida (TRPM8, 10 mg/kg, i.p.), e amilorida (ASICs, 100 mg/kg, i.p.) foram utilizados como controles positivos, sendo administrados 30 min antes dos agonistas. Após a injeção i.pl. dos agonistas, os animais foram colocados, individualmente, em funis de vidro e o tempo que o animal permaneceu lambendo e/ou mordendo a pata, foi considerado indicativo de nocicepção. O tempo de avaliação para a capsaicina e o cinamaldeído foi de 5 min e, para o mentol e a salina acidificada foi de 20 min. As doses das drogas utilizadas foram determinadas de acordo com dados da literatura e resultados descritos previamente pelo nosso grupo (MANTOVANI et al., 2006; ANDRADE et al., 2008; STORY et al., 2003; MEOTTI et al., 2010).

4.7.2 Avaliação da atividade antinociceptiva da melatonina administrada por via periférica

A atividade antinociceptiva da melatonina administrada periféricamente, via i.pl., foi avaliada na nocicepção evocada por agonistas de TRPs e ASICs. A melatonina foi administrada nas doses de 10, 30 e 100 ng/pata em um volume de 10

μL , ou veículo (10 μL /pata), em associação com a injeção intraplantar (i.pl.) de 10 μL de capsaicina, 30,5 ng/pata, cinamaldeído, 1,32 μg /pata, ou mentol, 187,5 μg /pata, sendo que o volume total injetado foi de 20 μL . Para evitar possíveis alterações a nível estrutural, as doses de melatonina e o veículo foram administrados 5 min antes da injeção de 20 μL de salina acidificada (pH 1,98). Além disto, os antagonistas/bloqueadores, vermelho de rutênio, 786,35 ng/pata, cânfora (TRPA1), 7,6 μg /pata, amilorida (TRPM8), 2,6 μg /pata e amilorida (ASICs), 26,6 μg /pata, foram utilizados como controles positivos, sendo administrados em associação com os agonistas em um volume de 20 μL . Após a injeção i.pl. dos agonistas, os animais foram colocados, individualmente, em funis de vidro e o tempo que o animal permaneceu lambendo e/ou mordendo a pata, foi considerado indicativo de nocicepção. O tempo de avaliação para a capsaicina e o cinamaldeído foi de 5 min e, para o mentol e a salina ácida foi de 20 min. As doses das drogas utilizadas foram determinadas de acordo com dados da literatura e resultados descritos previamente pelo nosso grupo (MANTOVANI et al., 2006; ANDRADE et al., 2008; STORY et al., 2003; MEOTTI et al., 2010).

4.8 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como media \pm erro padrão da media (EPM), exceto os valores de DI50 (doses do tratamento que reduziram as respostas nociceptivas em 50% em relação ao grupo controle), as quais estão apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. Os valores de DI50 foram obtidos através do método de regressão não linear utilizando-se o software Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA) versão 4.03. Para os dados do teste de avaliação da participação dos receptores, ASC, edema TRPs e ASICs, a significância estatística dos diferentes grupos foi determinada por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Para a análise dos dados da avaliação do decurso temporal, atividade enzimática e MDA, utilizou-se ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni. Em todos os casos, foi considerada diferença significativa quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Decurso temporal na hipersensibilidade mecânica

Na figura 6 está representado o decurso temporal (fig. 6A) e a área sob a curva (ASC) (fig. 6B) do tratamento com melatonina no segundo dia após a reperfusão. Como observado, na fig. 6A, o modelo de DCPI gerou um aumento significativo na hipersensibilidade ao estímulo mecânico quando comparado com o grupo *sham*. Este aumento foi reduzido significativamente na dose de 30 mg/kg de melatonina, de 0,5 a 1 h, sendo que em 2 h os grupos não demonstraram diferença. Na dose de 100 mg/kg, a melatonina também reduziu significativamente a frequência de respostas, sendo que este efeito se iniciou em 30 min e persistiu por até 2h. A dose de 10 mg/kg de melatonina não causou nenhum efeito significativo. A fig. 6B demonstra a ASC e pode-se observar que os animais com DCPI foram significativamente diferentes do grupo *sham*. Porém, somente o tratamento com 100 mg/kg reverteu a hipersensibilidade mecânica gerada pela DCPI, com uma inibição de $44 \pm 9\%$.

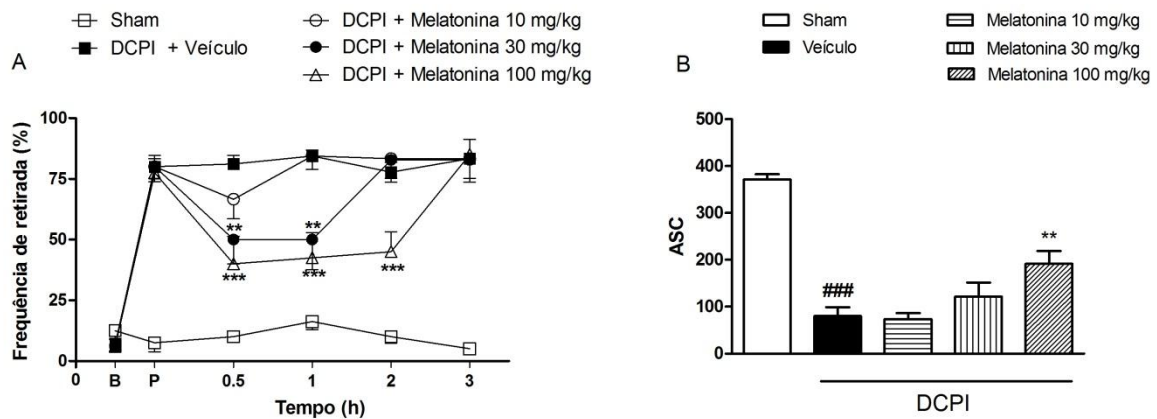


Figura 6 - Decurso temporal da atividade antinociceptiva da melatonina na hipersensibilidade mecânica em animais submetidos à DCPI no segundo dia após a reperfusão.

(A) Os animais foram avaliados antes, e 2 dias após a reperfusão para obtenção dos níveis basais de resposta. Posteriormente, foram avaliados 0,5, 1, 2 e 3 h após o tratamento com melatonina (10-100 mg/kg, i.p.) ou veículo. (B) ASC dos resultados da fig. A. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 6$ a 8). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Bonferroni para o decurso temporal, e ANOVA de uma via, seguida do teste de Newman Keuls para a AUC. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo DCPI + Veículo, ### $p < 0,001$ em relação ao grupo sham + veículo. DCPI – dor crônica pós-isquemia; ASC – área sob a curva. B – Basal; P – pós-cirurgia.

Na fig. 7, estão apresentados os resultados do decurso temporal e sua respectiva ASC da atividade de melatonina administrada 7 dias após a reperfusão. Na fig. 7A, pode-se observar um aumento significativo na hipersensibilidade mecânica no grupo com DCPI quando comparado com o grupo sham. Além disto, o tratamento com 100 mg/kg inibiu significativamente este aumento. Entretanto, o tratamento com melatonina nas doses de 10 e 30 mg/kg não alterou a hipersensibilidade mecânica em animais com DCPI. A ASC esta apresentada na fig. 7 B, claramente mostra que ocorreu uma diferença significativa entre o grupo sham e DCPI, e, a reversão pelo tratamento com melatonina, 100 mg/kg, com uma inibição de $34 \pm 10\%$, sem demonstrar atividade nas doses de 10 e 30 mg/kg.

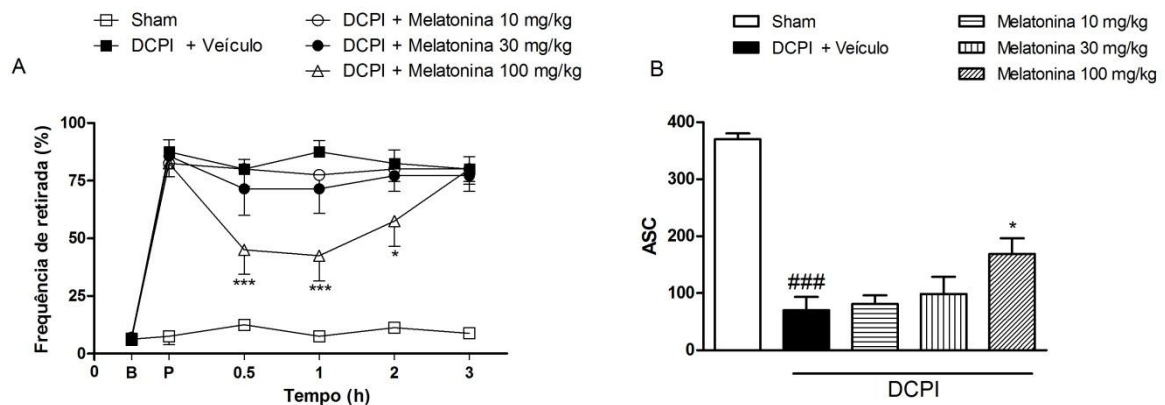


Figura 7. Decurso temporal da atividade antinociceptiva da melatonina na hipersensibilidade mecânica em animais submetidos à DCPI no sétimo dia após a reperfusão.

(A) Os animais foram avaliados antes, e 7 dias após a reperfusão para obtenção dos níveis basais de resposta. Posteriormente, foram avaliados 0,5, 1, 2 e 3 h após o tratamento com melatonina (10-100 mg/kg) ou veículo. (B) ASC dos resultados da fig. A. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 6$ a 8). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Bonferroni para o decurso temporal, e ANOVA de uma via, seguida do teste de Newman Keuls para a AUC. * $p < 0,5$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo DCPI + veículo, ### $p < 0,001$ em relação ao grupo *sham* + Veículo. DCPI – dor crônica pós-isquemia; ASC – área sob a curva. B – Basal; P – pós-cirurgia.

5.2 Avaliação da participação dos receptores MT1 e MT2 na antinocicepção promovida pela melatonina

Na fig. 8 são apresentados os dados da avaliação da atividade antinociceptiva da melatonina, administrada posteriormente ao luzindol, nas hipersensibilidades, mecânica e térmica, evocadas pelo modelo de DCPI em camundongos. Como já observado anteriormente, os animais DCPI demonstraram um aumento significativo na hipersensibilidade mecânica, em comparação ao grupo *sham*, e esta atividade foi significativamente revertida pelo tratamento com 100 mg/kg de melatonina, no segundo e no sétimo dia após a reperfusão (A e C), com uma inibição de $56 \pm 8\%$ e $63 \pm 9\%$, respectivamente. No teste de placa fria também foi observado um aumento da hipersensibilidade frente ao estímulo térmico no grupo DCPI comparado ao grupo *sham*, o qual também foi revertido pelo tratamento com melatonina (100 mg/kg), no segundo ($69 \pm 6\%$) e no sétimo ($66 \pm 15\%$) dia. Porém, em todos os testes, o pré-

tratamento com luzindol não foi eficaz em prevenir o efeito da melatonina, nos animais submetidos ao modelo de DCPI.

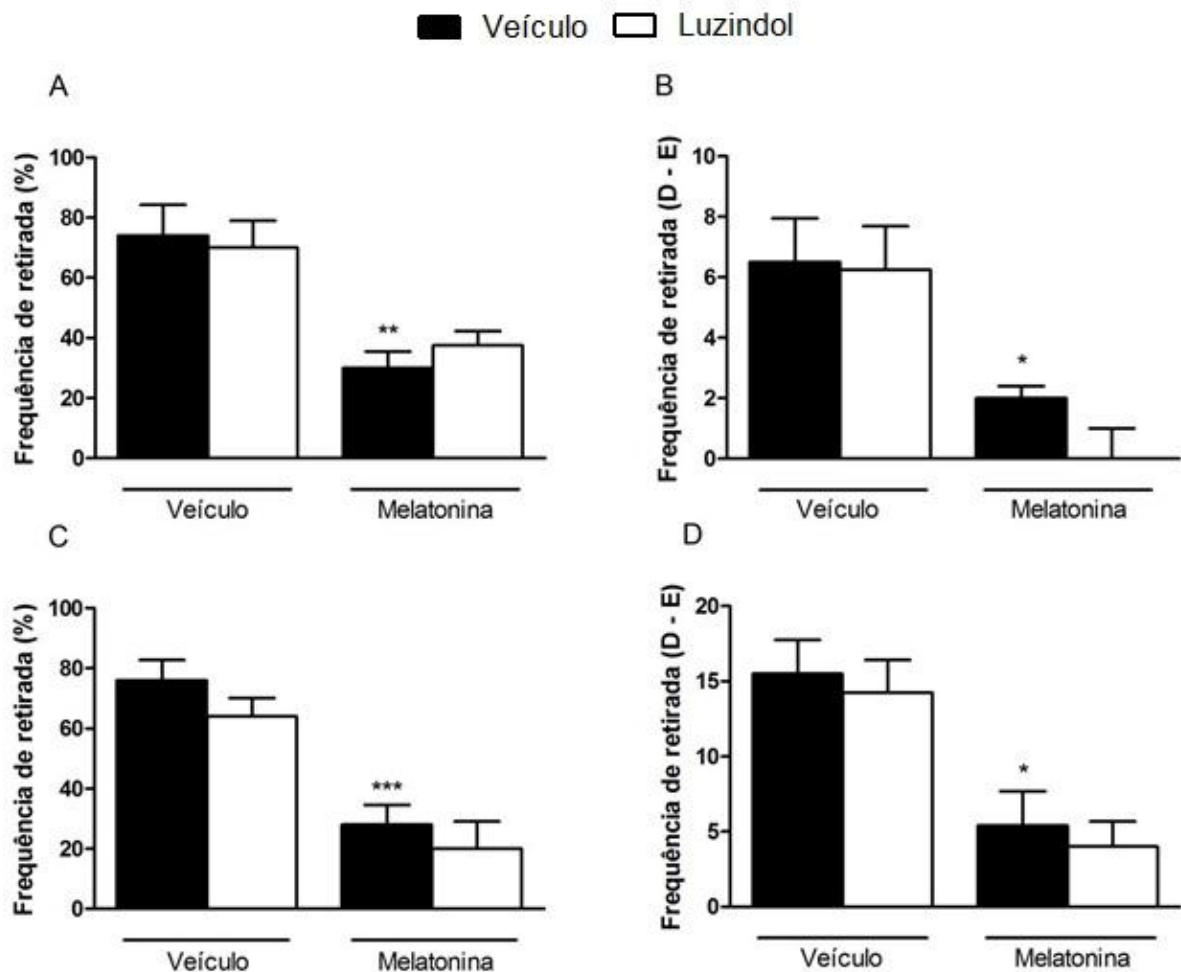


Figura 8 - Avaliação da participação dos receptores de MT1 e MT2 na atividade da melatonina em testes de hipersensibilidade mecânica e térmica (ao frio) induzidas pelo modelo de DCPI em camundongos.

No segundo (A e B) e no sétimo (C e D) dia após a reperfusão, os animais receberam luzindol (10 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.), 20 min antes da administração de melatonina (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.). Após 30 min, os animais foram avaliados quanto a hipersensibilidade mecânica (A e C) ou térmica (B e D). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n = 6 a 8). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman Keuls. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo veículo + veículo. D – pata direita; E – pata esquerda.

5.3 Avaliação da atividade da melatonina no edema evocado pelo modelo de DCPI

A fig. 9 apresenta os dados da avaliação do edema na pata de camundongos submetidos ao modelo de DCPI, no segundo dia após a reperfusão, 30 minutos após o tratamento com melatonina (10-100 mg/kg, i.p.) ou veículo. O edema foi significativamente maior no grupo com DCPI quando comparado com o grupo *sham*. Sendo que este aumento teve um decréscimo significativo após o tratamento com 100 mg/kg de melatonina, com uma inibição de $93 \pm 16\%$. As doses de 10 e 30 mg/kg de melatonina não foram estatisticamente diferentes do controle.

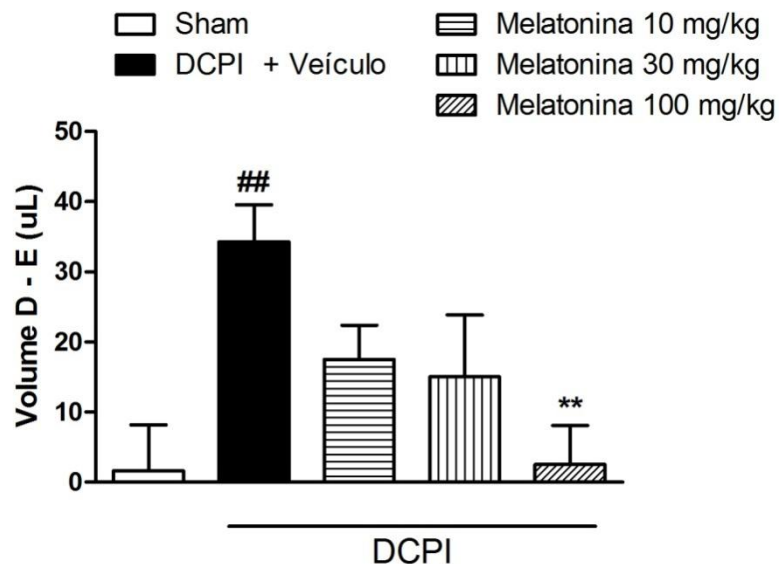


Figura 9 - Avaliação da redução do edema na pata de animais submetidos ao modelo de DCPI pelo tratamento com melatonina.

2 dias após a reperfusão, os animais foram tratados com melatonina (10-100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.), e avaliados quanto ao volume das patas traseiras. O edema foi considerado pela subtração do volume da pata ipsi pela contralateral. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 6$ a 8). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman Keuls. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo DCPI + Veículo, ## $p < 0,01$ em relação ao grupo *sham* + veículo. D – pata direita; E – pata esquerda; DCPI – dor crônica pós-isquemia.

5.4 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes (CAT, GR e GPx), foi avaliada em 3 tempos diferentes após a reperfusão (2 h, 2 e 7 dias), sendo que os tecidos da pata dos animais foram retirados 30 minutos após os tratamentos. A avaliação da atividade 2 h após a reperfusão (fig. 10) demonstrou que a atividade das enzimas CAT (fig. 10A) e GPx (fig. 10C) não foram alteradas significativamente, tanto com indução de DCPI, como pelos tratamentos, comparando-se os grupos com seus respectivos controles. Entretanto, a atividade da enzima GR (fig. 10B) apresentou um decréscimo significativo no grupo com DCPI em comparação ao grupo *sham*, e este decréscimo não foi revertido pelo tratamento com melatonina (100 mg/kg).

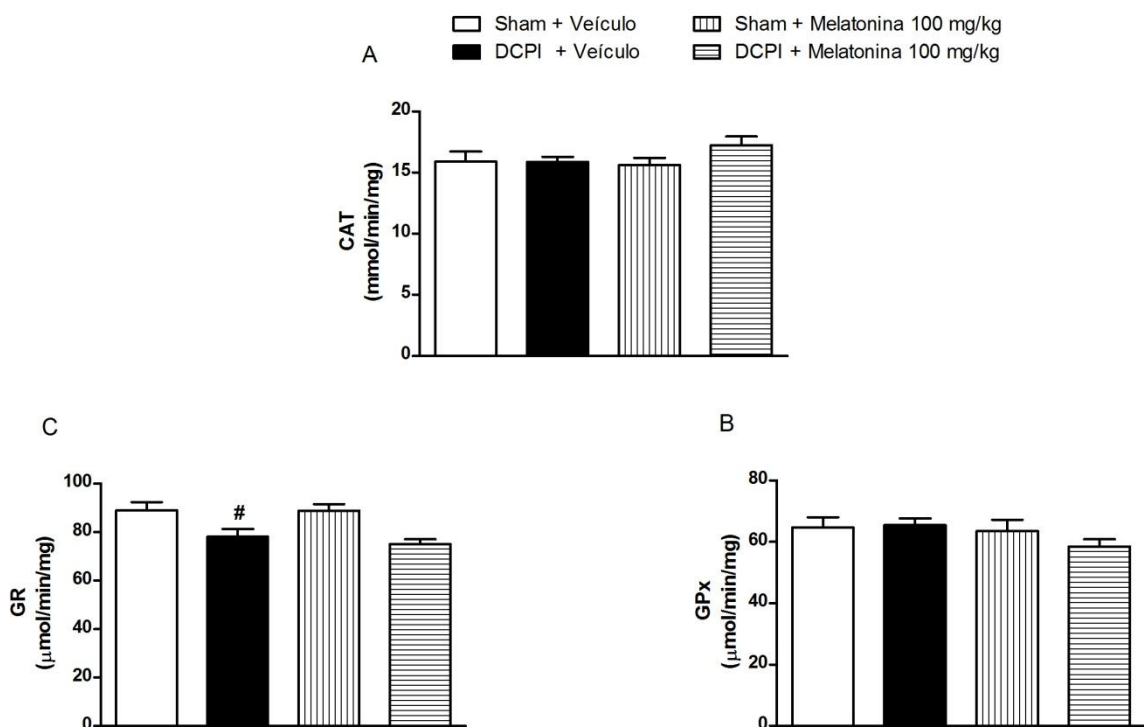


Figura 10 - Avaliação do tratamento de melatonina sobre a atividade das enzimas CAT, GR e GPx nos tecidos da pata de camundongos submetidos ao modelo de DCPI, 2 h após a reperfusão.

1,5 h após a reperfusão, os animais foram tratados com melatonina (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.) e após 30 min os tecidos foram retirados para avaliação da atividade das enzimas CAT (A), GR (B) e GPx (C). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. # $p < 0,5$ em relação ao grupo *sham* + veículo. CAT – catalase; GR – glutathiona redutase; GPx – glutathiona peroxidase; DCPI – dor crônica pós-isquemia.

Na figura 11 estão apresentados os dados das enzimas antioxidantes no segundo dia após a reperfusão. A atividade da enzima CAT (fig. 11 A) não demonstrou alteração significativa entre os grupos. No entanto, as enzimas GR e GPx (fig. 11 B e C, respectivamente) apresentaram uma atividade significativamente maior no grupo com DCPI em comparação com o grupo *sham*, sendo que este aumento foi revertido com inibições de $29 \pm 4\%$ e $26 \pm 7\%$, respectivamente, pelo tratamento com melatonina (100 mg/kg). O grupo *sham* que recebeu o tratamento com melatonina, não demonstrou alteração significativa na atividade das enzimas.

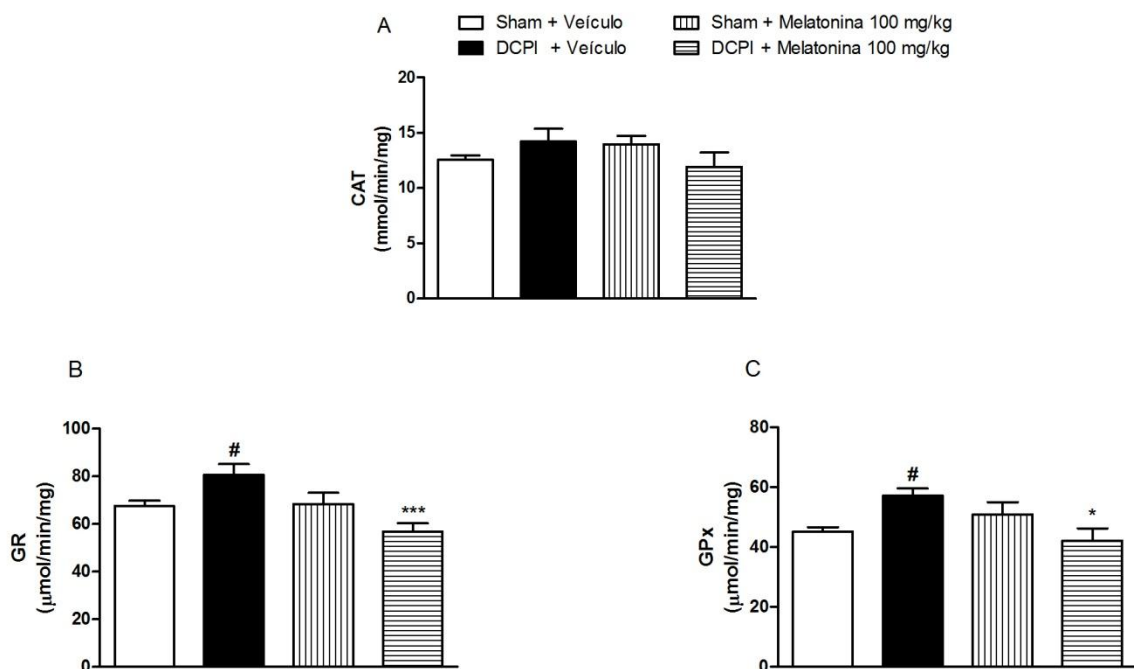


Figura 11 - Avaliação do tratamento de melatonina sobre a atividade das enzimas CAT, GR e GPx nos tecidos da pata de camundongos submetidos ao modelo de DCPI, 2 dias após a reperfusão.

No segundo dia após a reperfusão, os animais foram tratados com melatonina (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.) e após 30 min os tecidos foram retirados para avaliação da atividade das enzimas CAT (A), GR (B) e GPx (C). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. # $p < 0,5$ em relação ao grupo *sham* + Veículo, * $p < 0,5$, e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo DCPI + Veículo. CAT – catalase; GR – glutathiona redutase; GPx – glutathiona peroxidase; DCPI – dor crônica pós-isquemia.

A fig. 12 demonstra os resultados da atividade enzimática avaliada no sétimo dia após a reperfusão. A enzima GR (fig. 12A) não apresentou diferença significativa entre os grupos. No entanto, as enzimas CAT e GPx (fig. 12A e C) demonstraram

um aumento significativo na atividade no grupo com DCPI comparado ao grupo *sham*, o qual foi significativamente reduzido com inibições de $17 \pm 3\%$ e $23 \pm 2\%$, respectivamente, pelo tratamento com melatonina (100 mg/kg). Os animais *sham* tratados com melatonina não apresentaram diferença estatística quando comparados aos tratados com veículo.

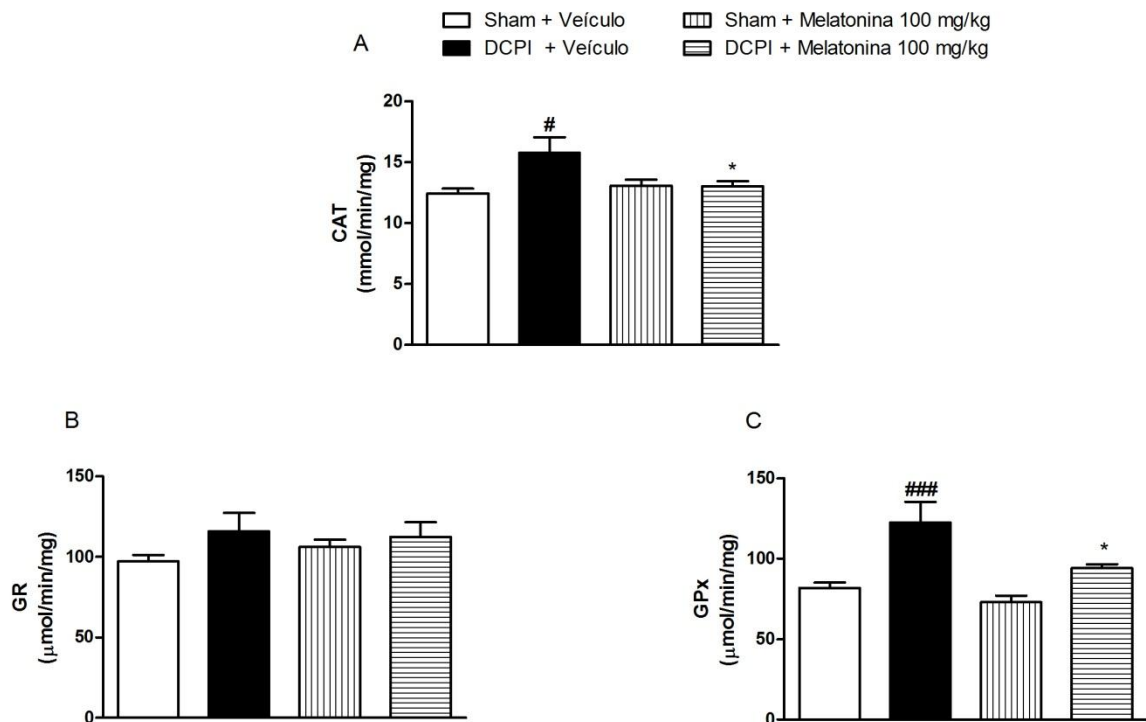


Figura 12 - Avaliação do tratamento de melatonina sobre a atividade das enzimas CAT, GR e GPx nos tecidos da pata de camundongos submetidos ao modelo de DCPI, 7 dias após a reperfusão.

No sétimo dia após a reperfusão, os animais foram tratados com melatonina (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.) e após 30 min os tecidos foram retirados para avaliação da atividade das enzimas CAT (A), GR (B) e GPx (C). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. # $p < 0,5$, ### $p < 0,001$ em relação ao grupo *sham* + veículo, * $p < 0,5$ em relação ao grupo DCPI + Veículo. CAT – catalase; GR – glutatona redutase; GPx – glutatona peroxidase; DCPI – dor crônica pós-isquemia.

5.6 Imunorreatividade ao aduto MDA-proteína

Assim como a atividade enzimática, a imunorreatividade ao aduto MDA-proteína (fig. 13) foi avaliada nos tecidos das patas de animais submetidos à DCPI,

retirados 30 minutos após a administração de melatonina, em 3 tempos diferentes (2h, 2 e 7 dias) após a reperfusão. Na segunda hora e no sétimo dia (fig. 13A e C) após a reperfusão, não houve diferença significativa na imunorreatividade ao aduto MDA-proteína entre os grupos. Entretanto, no segundo dia (fig. 13B), a imunorreatividade foi significativamente menor no grupo com DCPI, quando comparados ao grupo *sham*. Esta diminuição não foi alterada pelo tratamento com melatonina (100 mg/kg). Além disto, o tratamento com melatonina nos animais *sham*, não alterou a imunorreatividade ao aduto MDA-proteína em comparação aos que receberam veículo.

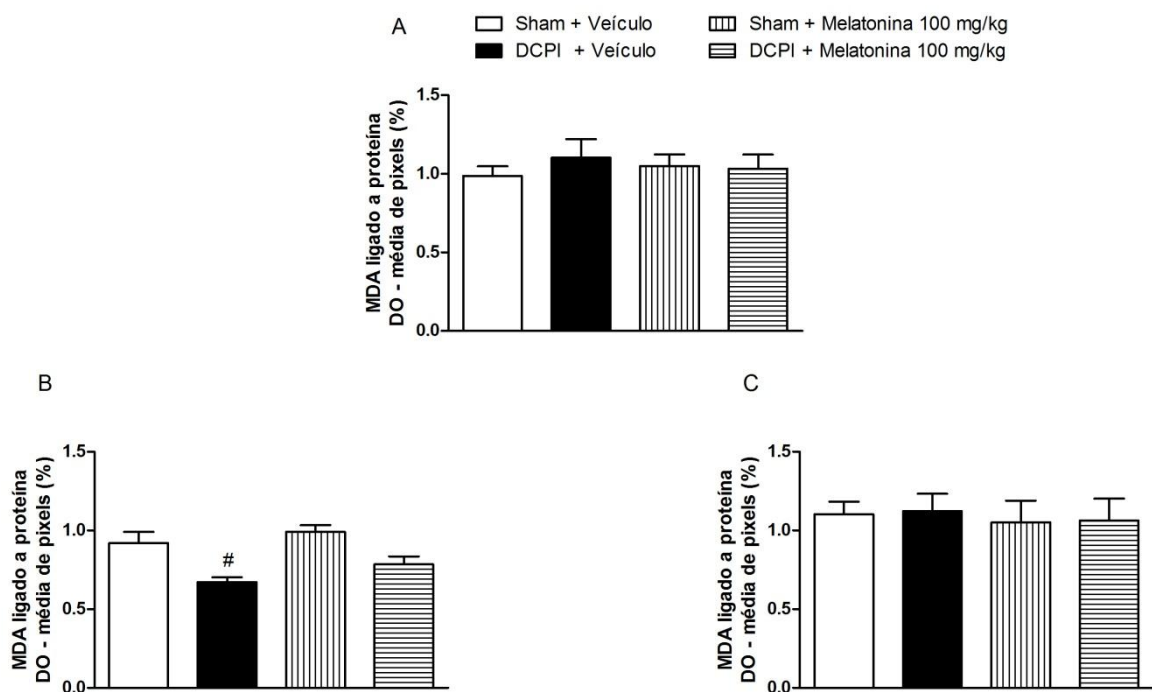


Figura 13 - Avaliação do tratamento de melatonina sobre a imunorreatividade ao aduto MDA-proteína nos tecidos da pata de camundongos submetidos ao modelo de DCPI, 2 h, 2 e 7 dias após a reperfusão.

2 h (A), 2 (B) e 7 (C) dias após a reperfusão, os animais foram tratados com melatonina (100 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 mL/kg, i.p.) e após 30 min os tecidos foram retirados para avaliação da imunorreatividade ao aduto MDA-proteína através da técnica de *Western Blot*. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. # p < 0,5 em relação ao grupo *sham* + veículo. CAT – catalase; GR – glutathiona redutase; GPx – glutathiona peroxidase; DCPI – dor crônica pós-isquemia; DO – densidade óptica.

5.7 Atividade antinociceptiva da melatonina frente à nocicepção evocada por agonistas de TRPs e ASICs

A fig. 14 mostra os dados obtidos da avaliação da atividade antinociceptiva da melatonina frente a injeção i.pl. de capsaicina. Na fig. 14A observa-se que a melatonina, nas doses de 30 e 100 mg/kg, administrada i.p., foi eficaz em reduzir significativamente o comportamento nociceptivo em comparação aos animais que receberam veículo com uma inibição de $63 \pm 16\%$ para a dose de 100 mg/kg de melatonina. A atividade da melatonina por via i.pl. é demonstrada na fig. 14B, onde se observa uma redução significativa no comportamento nociceptivo causado pela capsaicina nas doses de 30 e 100 ng/pata de melatonina, com inibição de $49 \pm 6\%$ comparado com o grupo veículo. O controle positivo, vermelho de rutênio, administrado sistemicamente (3 mg/kg) ou periféricamente (786,35 ng/pata) causou inibição de $49 \pm 18\%$ e de $53 \pm 11\%$, respectivamente, da nocicepção causada pela capsaicina (fig. 14).

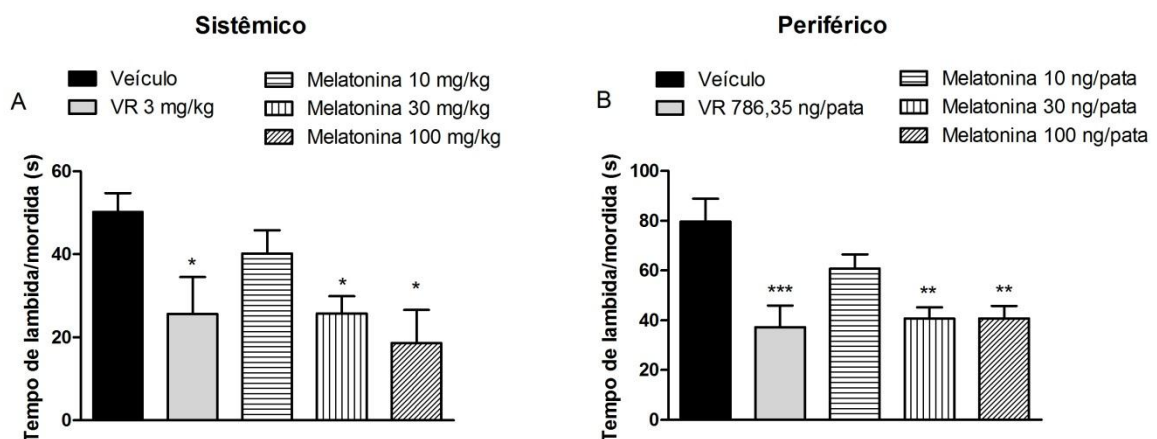


Figura 14 - Atividade antinociceptiva da melatonina administrada por via sistêmica e periférica frente a nocicepção evocada pela injeção intraplantar de capsaicina.

(A) Melatonina (10-100 mg/kg, i.p.), vermelho de rutênio (3 mg/kg, i.p.), ou veículo (10 mL/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes da injeção de 30,5 ng/pata de capsaicina. (B) Melatonina (10-100 ng/pata) ou vermelho de rutênio (786,35 ng/pata), foram administrados concomitantemente com 30,5 ng/pata de capsaicina. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 6$ a 8). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Dunnett. VR – vermelho de rutênio. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo Veículo.

Na fig. 15 estão apresentados os dados da atividade antinociceptiva da melatonina, administrada sistêmica ou periféricamente, na nocicepção evocada por

cinamaldeído (1,32 $\mu\text{g/pata}$, i.pl.). Na fig. 15A observa-se que a dose de 100 mg/kg, i.p., de melatonina e de 7,6 mg/kg, i.p., de cânfora, reduziram significativamente a nocicepção evocada pelo cinamaldeído, com inibições de $41 \pm 13\%$ e $33 \pm 5\%$, respectivamente, comparando-se com o grupo veículo. A fig. 15B apresenta a atividade antinociceptiva das doses de 30 e 100 ng/pata de melatonina, com uma dose inibitória de 50% (DI50) de 60,68 ng/pata e uma inibição de $60 \pm 6\%$. A cânfora na dose de 7,6 $\mu\text{g/pata}$ também inibiu significativamente a nocicepção evocada pelo cinamaldeído, com uma inibição de $85 \pm 5\%$.

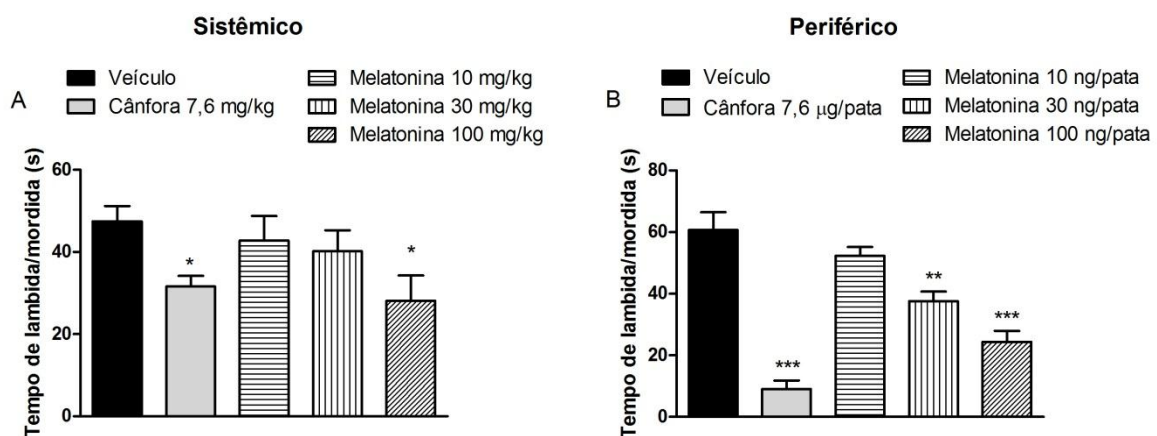


Figura 15 - Atividade antinociceptiva da melatonina administrada por via sistêmica e periférica frente a nocicepção evocada pela injeção intraplantar de cinamaldeído.

(A) Melatonina (10-100 mg/kg, i.p.), cânfora (7,6 mg/kg, i.p.), ou veículo (10 mL/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes da injeção de 1,32 $\mu\text{g/pata}$ de cinamaldeído. (B) Melatonina (10-100 ng/pata) ou cânfora (7,6 $\mu\text{g/pata}$), foram administrados concomitantemente com 1,32 $\mu\text{g/pata}$ de cinamaldeído. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 6$ a 8). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo Veículo.

Na fig. 16 estão apresentados os dados da atividade da melatonina, administrada sistêmica e periféricamente, na nocicepção evocada por mentol. A fig. 16A apresenta o efeito antinociceptivo da dose de 100 mg/kg de melatonina ou 10 mg/kg de amilorida, com inibições de $62 \pm 10\%$ e $48 \pm 6\%$, respectivamente. Porém, quando administrada periféricamente (fig. 16B), o grupo tratado com melatonina não apresentou diferença significativa em comparação ao grupo tratado com veículo. Entretanto, a dose de 2,6 $\mu\text{g/pata}$ de amilorida foi eficaz em reduzir significativamente a nocicepção evocada pelo mentol.

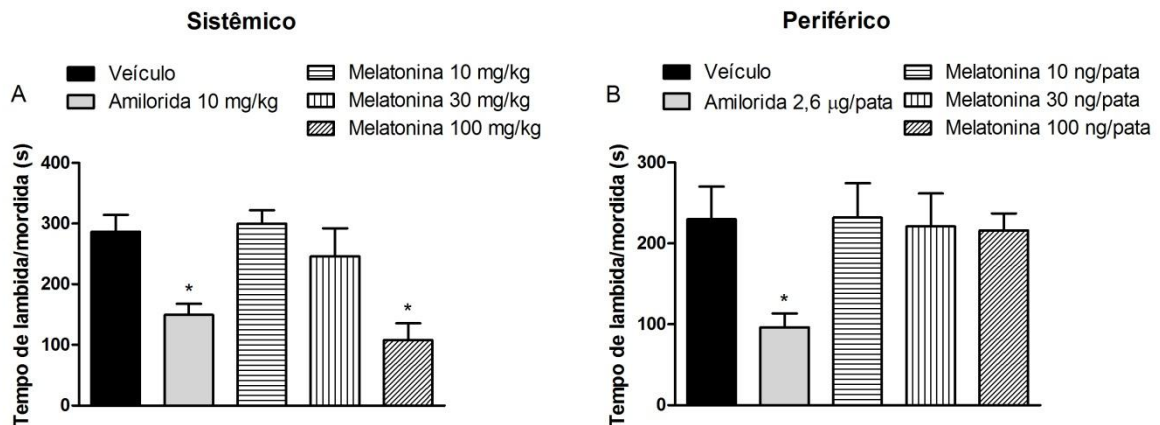


Figura 16 - Atividade antinociceptiva da melatonina administrada por via sistêmica e periférica frente a nocicepção evocada pela injeção intraplantar de mentol.

(A) Melatonina (10-100 mg/kg, i.p.), amilorida (10 mg/kg, i.p.), ou veículo (10 mL/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes da injeção de 187,5 µg/pata de mentol. (B) Melatonina (10-100 ng/pata) ou amilorida (2,6 µg/pata), foram administrados concomitantemente com 187,5 µg/pata de mentol. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 6 a 8). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Dunnett. * p<0,5 em relação ao grupo Veículo.

A melatonina (100 mg/kg) e a amilorida (100 mg/kg), administradas sistemicamente, reduziram de forma significativa a nocicepção evocada pela injeção intraplantar de salina acidificada, com inibições de $47 \pm 12\%$ e $86 \pm 4\%$, respectivamente (fig. 17A). Entretanto, a administração periférica de melatonina não apresentou atividade antinociceptiva em nenhuma das doses testadas (fig. 17B). A amilorida na dose de 26,6 µg/pata reduziu significativamente o comportamento nociceptivo.

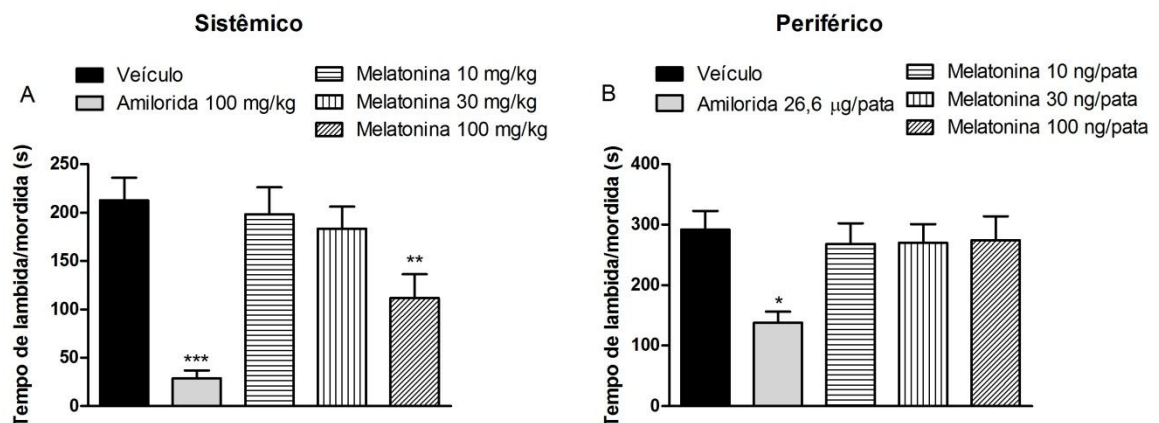


Figura 17 - Atividade antinociceptiva da melatonina por via sistêmica e periférica frente a nocicepção evocada pela injeção intraplantar de salina acidificada.

(A) Melatonina (10-100 mg/kg, i.p.), amilorida (100 mg/kg, i.p.), ou veículo (10 mL/kg, i.p.) foram administrados 30 min antes da injeção de salina acidificada (ácido acético 2%, pH 1,98). (B) Melatonina (10-100 ng/pata) ou amilorida (26,6 µg/pata), foram administrados 5 min antes da injeção de salina acidificada (ácido acético 2%, pH 1,98). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 6 a 8). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Dunnett. * p<0,5, ** p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao grupo veículo.

6 DISCUSSÃO

A dor crônica está presente em diversas patologias e pode levar a consequências físicas, psicológicas e comportamentais, prejudiciais ao indivíduo, sendo que apesar dos avanços no esclarecimento dos mecanismos patofisiológicos, as estratégias terapêuticas são baseadas, em sua maioria, no tratamento paliativo dos sintomas (ROCHA et al., 2007; JULIUS E BASBAUM, 2001). Dentre estas, está a SDCR, a qual causa enorme sofrimento aos indivíduos acometidos. Como discutido anteriormente, a patofisiologia desta síndrome ainda não foi completamente esclarecida. Além disto, o tratamento farmacológico ainda não está bem estabelecido, sendo baseado no uso de anti-inflamatórios, *scavengers* de radicais livres, opioides e fármacos gabaérgicos (CODERRE e BENNETT, 2010; ZUURMOND et al., 1996; ZOLLINGER et al., 1999). Neste contexto, a busca por novas substâncias para o tratamento de SDCR-I torna-se necessário.

A melatonina possui uma atividade antinociceptiva bem estabelecida em modelos animais de nocicepção mecânica, térmica e química, atuando através dos receptores MT1/MT2, interagindo com o sistema opioide, modulando a atividade do receptor GABA_A, atividade anti-inflamatória, atividade *scavenger* de radicais livres, entre outros mecanismos (LUCHETTI et al., 2010; BILICI et al., 2002; RIOJA et al., 2002; WU et al., 1999; REITER et al., 2000; MANTOVANI et al., 2006). Além disto, os resultados apresentados no presente trabalho estendem estas observações e demonstram pela primeira vez que a melatonina também apresenta importante atividade antinociceptiva em um modelo animal que mimetiza a SDCR-I (DCPI).

Corroborando com dados da literatura, onde se demonstrou que a indução de DCPI levou a uma hipersensibilidade mecânica que perdurou por até 4 semanas, nossas avaliações demonstraram que hipersensibilidade mecânica está aumentada no segundo e no sétimo dia (CODERRE et al., 2004). Esta hipersensibilidade foi reduzida de forma dependente da dose pela melatonina administrada por via sistêmica, sendo que na dose de 100 mg/kg o efeito foi iniciado em 30 min e permaneceu significativo por até 2 h, nos dois momentos avaliados. Yu e colaboradores (2000) encontraram resultados semelhantes em um modelo de nocicepção térmica em ratos, demonstrando que o tratamento com melatonina, i.p. ou i.c.v. (intracerebroventricular), apresentou uma atividade antinociceptiva

dependente da dose, com doses de 30, 60 e 120 mg/kg, i.p., as quais foram significativamente diferentes do controle tratado com veículo, por 45, 60 e 120 min, respectivamente. Além disto, também foi demonstrada a atividade antinociceptiva da melatonina em modelos químicos, utilizando-se doses semelhantes de melatonina (MANTOVANI et al., 2006). Entretanto, com doses menores (0,5 e 1 mg/kg, i.p.) de melatonina, demonstrou-se um aumento do limiar na hipersensibilidade evocada por carragenina, frente a estimulação elétrica, e doses de 5 e 10 mg/kg, i.p., reduziram a hipersensibilidade térmica induzida por LPS (lipopolissacarídeo) (EL SHENAWY et al., 2002; RAGHAVENDRA et al., 2000). Esta disparidade entre os dados encontrados na literatura pode ser justificada pelos diferentes estímulos empregados para provocar os comportamentos indicativos de nociceção ou também pela presença de mecanismos de ação diferentes em altas e baixas doses, sendo que os receptores (MT1/MT2) são ativados ainda em baixas doses e doses mais elevadas são necessárias para ações independentes de receptor, como a atividade *scavenger* de radicais livres (SRINIVASAN et al., 2010).

Estudos de modificações estruturais da melatonina, incluindo a remoção do grupo 5-metóxi (luzindol) ou 4-fenil (4-P-PDOT), têm mostrado tendências em induzir antagonismo dos receptores MT1/MT2. O luzindol foi o primeiro ligante identificado que demonstrou atividade antagonista competitiva com receptores de melatonina e, desde então, tem sido extensivamente usado para avaliar a ação dos receptores de melatonina (DUBOCOVICH et al., 2000; AMBRIZ-TUTUTI et al., 2009). A afinidade do luzindol para os receptores de melatonina é considerada relativamente não seletiva, tendo uma taxa de ligação com MT1/MT2 de 16/26, diferentemente do antagonista 4-P-PDOT, o qual é considerado seletivo para MT2, com uma afinidade de 66/22000 para MT1/MT2 (DUBOCOVICH et al., 2000).

Diversos trabalhos têm demonstrado a participação dos receptores de melatonina na sua atividade antinociceptiva. Laurido e colaboradores (2002) demonstraram que a melatonina reduziu de forma dependente da dose (30 – 120 mg/kg, i.p.) a nociceção evocada por estímulos elétricos e esta ação foi antagonizada totalmente pela administração de 50 µg de luzindol, via i.c.v. Os autores propuseram que a melatonina pode atuar inibindo a excitabilidade no corno dorsal da medula espinal através da hiperpolarização dos neurônios, causada pela ativação dos receptores de melatonina. Em outro estudo, Ambriz-Tututi e Granados-Soto (2007) avaliaram a atividade antinociceptiva da melatonina [administrada por

via i.c.v. (3 – 100 µg) ou i.p. (37,5 – 300 mg/kg)] na hipersensibilidade mecânica causada pelo modelo de dor neuropática evocada pela ligação dos nervos espinais (L5/L6), sendo que a melatonina apresentou uma atividade dependente da dose em ratos. Esta atividade foi diminuída de forma dose dependente pela administração i.c.v. de luzindol (1 – 100 µg) e 4-P-PDOT, ou administração v.o. (via oral) de 4-P-PDOT (0,01 – 1 mg/kg). Mantovani e colaboradores (2006) demonstraram que a melatonina [administrada i.p. (10 – 100 mg/kg), i.c.v. (250 – 500 pmol/sítio) ou i.pl. (30 – 100 ng/sítio)] também possui atividade antinociceptiva dependente da dose na nocicepção evocada pela administração de glutamato, via i.pl. A atividade antinociceptiva causada pela dose de 100 mg/kg de melatonina foi completamente prevenida pela administração de luzindol (10 mg/kg, i.p.). Além disto, estudos demonstram que a utilização de antagonistas de receptores MT1/MT2 previnem a atividade da melatonina em outros modelos de nocicepção, como formalina, retirada da cauda (estímulo térmico), hipersensibilidade induzida por capsaicina, entre outros (ARREOLA-ESPINO et al., 2007; RAGHAVENDRA et al., 2000; MANTOVANI et al., 2006).

No presente trabalho, avaliamos a participação dos receptores de melatonina no seu efeito de reduzir a hipersensibilidade mecânica e térmica presente no modelo de DCPI, através do pré-tratamento dos animais com luzindol (10 mg/kg, i.p.). Corroborando com os dados da literatura, a indução de DCPI nos camundongos levou aumento na hipersensibilidade mecânica e térmica no segundo e no sétimo dia, avaliado pelo aumento do comportamento nociceptivo nos testes realizados. Além disto, o tratamento sistêmico com 100 mg/kg de melatonina, reduziu significativamente a hipersensibilidade mecânica e térmica nos dois momentos avaliados.

Embora vários dados da literatura apontem para a participação dos receptores MT1/MT2 na atividade antinociceptiva promovida pela melatonina, os nossos dados demonstraram que a administração prévia de luzindol não foi capaz de reverter esta atividade, sendo que o grupo tratado previamente com luzindol e posteriormente com melatonina não apresentou diferença estatística do grupo que recebeu veículo e melatonina. Uma possível explicação para este achado é o fato de que, segundo dados da literatura, este modelo animal responde bem ao tratamento com drogas antioxidantes como o NAC e o Tempol. Por outro lado, drogas como ibuprofeno, acetaminofeno e amitriptilina não foram efetivas. Além disto, morfina,

dexametasona, e pregabalina só foram efetivas na redução da hipersensibilidade mecânica em altas doses (MILLECAMPS e CODERRE, 2008). Como se sabe, a melatonina possui uma potente atividade *scavenger* de radicais livres, como foi demonstrado no trabalho publicado por Tan e colaboradores (1993), onde a melatonina demonstrou ser mais eficiente na remoção de radicais hidroxila do que substâncias conhecidamente antioxidantes, como a glutatona e o manitol. Enquanto que, em outros estudos, a melatonina demonstrou ter atividade de *scavenger* em outras espécies reativas, como o óxido nítrico, ânion peroxinitrito, oxigênio *singlet*, ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso (REITER et al., 2009; ALLEGRA et al., 2003; MATUSZAK et al., 2003; PANDI-PERUMAL et al., 2006). Além disto, Mathes e colaboradores (2008) demonstraram que o luzindol possui uma atividade antioxidante semelhante a apresentada pela melatonina, sendo superior a do ácido ascórbico. Ainda, Ray e colaboradores (2004) demonstraram que o luzindol (2,5 – 5 mg/kg, i.p.) potencializou a atividade antinociceptiva da melatonina (50 mg/kg, i.p.) na nocicepção induzida por formalina.

Além do comportamento nociceptivo, dados da literatura demonstram que no modelo de DCPI, durante as primeiras horas (2 – 12) após a reperfusão, ocorre hiperemia e formação de edema (CODERRE e BENNETT, 2010). O edema é uma resposta inflamatória causada pelo aumento na permeabilidade de vasos e extravasamento líquido, o qual se acumula no interstício, em resposta a mediadores liberados por processos inflamatórios, além disto, ele é considerado uma das causas do aumento da pressão compartimental, ligada a compressão dos microvasos e o fenômeno *slow-flow/no-reflow* que ocorre na SDCR-I (CODERRE, 2011).

Neste trabalho, avaliou-se a atividade da melatonina, na redução do edema presente no segundo dia após a indução de DCPI em camundongos. Os animais submetidos ao modelo de DCPI demonstraram um aumento significativo no volume da pata ipsilateral, comparados aos animais do grupo *sham*. Este aumento foi revertido, significativamente, somente pela maior dose de melatonina (100 mg/kg) administrada 30 min antes da avaliação. Estes dados corroboram com dados da literatura que demonstram uma atividade anti-inflamatória e de redução da formação de edema após a injeção i.pl. de carragenina, pelo tratamento sistêmico com melatonina (EL-SHENAWY et al., 2002; XU et al., 1996). Porém, pode-se inferir que além da atividade anti-inflamatória, a melatonina pode ter provocado este efeito

através da inibição da produção de ON, diminuindo a vasodilatação provocada pelo processo inflamatório (HERNÁNDEZ-PACHECO et al., 2008)

No presente trabalho, investigamos o envolvimento do estresse oxidativo no modelo de DCPI, através da atividade de enzimas antioxidantes e imunorreatividade ao aduto MDA-proteína nos tecidos da pata dos animais com DCPI e a possível modulação destes parâmetros pela administração prévia de melatonina, 2 h, 2 e 7 dias após a reperfusão.

A atividade das enzimas CAT e GPx não foi alterada entre os animais do grupo *sham* e operados, 2 h após a reperfusão. Entretanto, a atividade da GR apresentou-se significativamente reduzida após a reperfusão, sendo que os animais tratados com melatonina não apresentaram diferença significativa. Diversos estudos têm demonstrado a redução da atividade de enzimas antioxidantes após indução de IR, logo após a reperfusão. Outros modelos que causam um aumento pronunciado do estresse oxidativo, possivelmente por um dano na maquinaria enzimática (WANG et al., 2012; CONG et al., 2012; SHEN et al., 2002; MAYO et al., 1998).

No segundo dia após a reperfusão as enzimas do sistema glutathiona (GPx e GR) demonstraram um aumento da sua atividade. No sétimo dia, no entanto, as enzimas GPx e CAT apresentaram aumento da atividade. Gechev e colaboradores (2002) demonstraram que níveis moderados de estresse oxidativo induzem um aumento no status antioxidante, refletido por um aumento na atividade de CAT, GPx e do *pool* de glutathiona. Além disto, Eisenberg e colaboradores (2008) encontraram parâmetros antioxidantes como atividade de peroxidases e SOD, concentração de ácido úrico e status antioxidante total, aumentados no soro e na saliva de pacientes com SDCR-I. Este aumento é considerado uma medida compensatória ao desequilíbrio no balanço redox da célula (EISENBERG et al., 2008; GECHEV et al., 2002).

O aumento apresentado na atividade das enzimas antioxidantes, tanto no segundo quanto no sétimo dia, foi revertido pela administração prévia de melatonina (100 mg/kg). Esta redução da atividade enzimática foi dependente da indução de DCPI, sendo que a melatonina administrada em animais do grupo *sham* não provocou alteração na atividade das enzimas. A melatonina é considerada uma molécula antioxidante, não só pela sua capacidade *scavenger* de radicais livres, mas também por estimular a expressão e a atividade de enzimas antioxidantes (SOFIC et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2004). Albarraán e colaboradores (2001)

demonstraram a existência de um ritmo endógeno da atividade e enzimas antioxidantes, regulado pela melatonina. Porém, esta atividade da melatonina tem sido relacionada com doses nanomolares, níveis que correspondem a concentração endógena noturna, no pico de liberação, sem ser demonstrada em doses elevadas. Além disto, os trabalhos demonstram o aumento da atividade/expressão das enzimas iniciando-se no mínimo 1 h após o tratamento (MAYO et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2004; CLERCH e MASSARO, 1993; OKATANI et al., 2000). Assim, em concentrações elevadas, como na utilizada em nosso trabalho, sugere-se que a atividade antioxidante da melatonina ocorra pela sua capacidade *scavenger*, alterando o status redox da célula, o qual pode alterar a atividade e a expressão de enzimas antioxidantes (RODRIGUEZ et al., 2004).

Em nosso estudo, a mensuração da imunorreatividade ao aduto MDA-proteína 2 h e 7 dias após a reperfusão não encontrou diferença significativa entre os animais do grupo *sham* e operados. Porém, no segundo dia após a reperfusão, a imunorreatividade ao aduto MDA-proteína se apresentou diminuída nos animais com DCPI comparados com os animais *sham* e o tratamento com melatonina não alterou significativamente esta redução. Este efeito da indução de DCPI na imunorreatividade ao aduto MDA-proteína no segundo dia pode ser justificado pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes, o qual pode levar a uma diminuição dos níveis basais (*sham*) de MDA, como ocorre em alguns tipos de exercícios físicos, onde, após a estimulação, a atividade de enzimas antioxidantes aumenta e os níveis de MDA reduzem abaixo dos basais (SOMANI et al., 1994; HÜBNER-WOZNIAK et al., 1994). No entanto, no trabalho de Laferrière e colaboradores (2008), analisando ratos submetidos ao modelo de DCPI, foi demonstrado um aumento significativo nos níveis de MDA 2 h, e nenhuma alteração no segundo e no sétimo dia após a reperfusão. Esta discrepância entre os dados pode ser justificada pela utilização de diferentes espécies, e metodologias para a avaliação. A metodologia utilizada pelo grupo de Laferrière para detecção de MDA é baseada na reação com o ácido tiobarbitúrico, o qual pode apresentar certa variabilidade nos resultados (MARCINIAK et al., 2009).

Os sinais e sintomas inflamatórios na SDCR-I (dor, hiperemia, edema e disfunção), acompanhados de parâmetros bioquímicos de inflamação inalterados, quando comparados a pacientes saudáveis, sugerem uma possível inflamação neurogênica. A inflamação neurogênica é caracterizada pela função eferente

secretória de classes distintas de fibras C. De particular interesse nesta inflamação, é a participação de fibras C quimioceptoras insensíveis ao calor. Essas fibras liberam neuropeptídios via reflexo axonal, sendo que os potenciais de ação são conduzidos de forma retrógrada após a ativação dos nociceptores. Os principais neuropeptídeos liberados são a substância P, a qual provoca o extravasamento de proteína plasmática, e o CGRP, que induz vasodilatação, levando a formação de edema no tecido afetado (MAIHÖFNER et al., 2010). Tendo em vista a neuroinflamação presente na SDCR-I, o presente trabalho investigou a possível atividade antinociceptiva da melatonina, por via sistêmica ou periférica, em modelos de nocicepção induzida pela ativação química de nociceptores, através dos receptores TRPV1, TRPA1, TRPM8 e ASICs.

Nosso trabalho demonstrou que a administração prévia (30 min) de melatonina via sistêmica, nas doses de 30 e 100 mg/kg, inibiu significativamente a nocicepção evocada pela injeção i.pl. de capsaicina. O controle positivo com vermelho de rutênio (3 mg/kg, i.p.) também reduziu significativamente a nocicepção. Estes dados vão ao encontro dos apresentados por Mantovani e colaboradores (2006), onde a nocicepção evocada por capsaicina foi prevenida de forma dose dependente pela melatonina (10 – 100 mg/kg, i.p.). Além disto, o presente estudo também demonstra a atividade antinociceptiva da melatonina na dose de 100 mg/kg, i.p., frente a nocicepção induzida por agonistas/ativadores de TRPA1, TRPM8 e ASICs (cinamaldeído, mentol e salina acidificada, respectivamente). Os controles positivos, com antagonistas/bloqueadores dos canais testados também foram efetivos na redução da nocicepção.

Dados da literatura mostram que a melatonina, i.p., possui atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção química, sendo que a nocicepção induzida pelo glutamato i.pl. foi prevenida pelo tratamento prévio com naloxona (um antagonista opioide não seletivo, 1 mg/kg, i.p.), cetanserina (antagonista serotoninérgico, preferencial 5-HT_{2A}, 1 mg/kg, i.p.), sulpirida (antagonista de receptores D₂, 50 mg/kg, i.p.), L-arginina (precursor de óxido nítrico, 600 mg/kg, i.p.), ioimbina (antagonista do receptor α_2 adrenérgico, 0,15 mg/kg, i.p.) e luzindol, indicando a participação de diversas vias na atividade antinociceptiva da melatonina por via sistêmica, sendo que esta pode facilmente alcançar altas concentrações em nível central devido a sua propriedade anfílica (MANTOVANI et al., 2006).

A atividade antinociceptiva da melatonina administrada por via i.pl., em associação com os agonistas dos TRPs também foi avaliada. A nocicepção gerada pela administração de mentol e por salina acidificada não foi bloqueada por nenhuma das doses de melatonina utilizadas. Entretanto, a nocicepção induzida por capsaicina e cinamaldeído foi significativamente bloqueada pelas doses de 30 e 100 ng/pata de melatonina. Mantovani e colaboradores (2006) demonstraram o bloqueio da nocicepção evocada pela injeção i.pl. de glutamato, nas mesmas doses encontradas em nosso trabalho. Porém, os mecanismos de ação da atividade antinociceptiva periférica da melatonina ainda não são compreendidos. Hernández-Pacheco e colaboradores (2008), através da administração prévia de antagonistas, demonstraram a participação da via óxido nítrico-GMP (guanosina monofosfatada) cíclico-proteína quinase G-canais de K^+ na atividade antinociceptiva da melatonina na segunda fase do teste de formalina, levantando a hipótese da hiperpolarização dos nociceptores periféricos. O fato de a melatonina não apresentar atividade periféricamente na ativação de TRPM8 e ASICs pode ter ocorrido devido a concentração maior do agonista/ativador, levando a uma estimulação álgica mais potente, a qual não foi reduzida. Porém, mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo da atividade antinociceptiva da administração periférica da melatonina.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- A melatonina administrada por via sistêmica reverte a hipersensibilidade mecânica e térmica ao frio, induzida pelo modelo de DCPI, no segundo e no sétimo dia após a reperfusão, sendo que esta reversão não é dependente de receptores de melatonina, MT1/MT2;
- A melatonina administrada 2 dias após a reperfusão reverteu significativamente o edema induzido pelo modelo de DCPI;
- O modelo de DCPI induz uma redução da atividade da enzima GR nos tecidos da pata ipsilateral dos animais, 2 h após a reperfusão;
- No segundo dia após a reperfusão as enzimas GR e GPx apresentaram um aumento na sua atividade, sendo que este aumento foi revertido pela administração de melatonina 30 min antes da coleta dos tecidos;
- No sétimo dia após a reperfusão as enzimas CAT e GPx apresentaram um aumento na sua atividade, sendo que este aumento foi revertido pela administração de melatonina 30 min antes da coleta dos tecidos;
- No segundo dia após a reperfusão, ocorreu uma diminuição na imunorreatividade ao aduto MDA-proteína nos tecidos da pata ipsilateral de animais induzidos com o modelo de DCPI;
- A melatonina administrada por via sistêmica inibe a nocicepção induzida por agonistas de TRPV1, TRPA1, TRPM8 e ASICs;
- A melatonina administrada por via periférica inibe a nocicepção induzida por agonistas de TRPV1 e TRPA1.
- Estes resultados estendem os dados da literatura e demonstram que a melatonina possui potencialidade para continuidade de estudos pré-clínicos mais aprofundados e futuramente clínicos visando o desenvolvimento de fármacos analgésicos para o tratamento de dores crônicas, em especial a síndrome de dor complexa regional tipo I.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, K.; STEHLE, J. H. Melatonin synthesis in the human pineal gland: advantages, implications, and difficulties. **Chronobiology International**. 23: 369-379, 2006.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. 105: 121-126, 1984.

ALLEN G., GALER B. S., SCHWARTZ L. Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 134 patients. **Pain**. 80: 539–544, 1999.

AMBRIZ-TUTUTI, M.; GRANADOS-SOTO, V. Oral and spinal melatonin reduces tactile allodynia in rats via activation of MT2 and opioid receptors. **Pain**. 132: 273-280, 2007.

AMBRIZ-TUTUTI, M.; ROCHA-GONZÁLEZ, H. I.; CRUZ, S. L.; GRANADOS-SOTO, V. Melatonin: A hormone that modulates pain. **Life Sciences**. 84: 489-498, 2009.

ANDRADE, E. L.; LUIZ, A. P.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J. B. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**. 152: 511-520, 2008.

ARREOLA-ESPINO, R.; URQUIZA-MARIN, H.; AMBRIZ-TUTUTI, M.; ARAIZA-SALDANA, C. I.; CARAM-SALAS, N. L.; ROCHA-GONZALEZ, H. I.; MIXCOATL-ZECUATL, T.; GRANADOS-SOTO, V. Melatonin reduces formalin-induced nociception and tactile allodynia in diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**. 577: 203-210, 2007.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. 139: 267-284, 2009.

BILICI, D.; AKPINAR, E.; KIZILTUNC, A. Protective effect of melatonin in carrageenan induced acute local inflammation. **Pharmacological Research**. 46: 133-139, 2002.

BLAISDELL, F. W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. **Cardiovascular Surgery**. 10: 620-630, 2002.

BORJIGIN, J.; LI, X.; SNYDER, S. H.; The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. 39: 53-65, 1999.

BORTALANZA, L. B.; FERREIRA, J.; HESS, S. C.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **European Journal of Pharmacology**. 25: 203-208, 2002.

BRATTI, T. **Caracterização comportamental, bioquímica e farmacológica e efeito da natação sobre o modelo experimental da síndrome da dor complexa regional tipo i em camundongos**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**. 113: 484-490, 1985.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. 389: 816-24, 1997.

CHONG, Z. Z.; LI, F.; MAIESE, K. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. **Progress in Neurobiology**. 75: 207-246, 2005.

CLERCH, L. B.; MASSARO, D. Tolerance of rats to hyperoxia. Lung antioxidant enzyme gene expression. **Journal of Clinical Investigation**. 91: 499-508, 1993.

CODERRE, T. J.; BENNETT, G. J. A Hypothesis for the Cause of Complex Regional Pain Syndrome-Type I (Reflex Sympathetic Dystrophy): Pain Due to Deep-Tissue Microvascular Pathology. **Pain Medicine**. 11: 1224-1238, 2010.

CODERRE, T. J. Complex Regional Pain Syndrome: What's in a Name? **The Journal of Pain**. 12: 2-12, 2011.

CODERRE, T. J.; XANTHOS, D. N.; FRANCIS, L.; BENNETT, G. J. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. **Pain**. 112: 94-105, 2004.

CONG, G.; CUI, L.; ZANG, M.; HAO, L.; INT, J. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by a polysaccharide from the roots of *Dipsacus asperoides*. **International Journal of Biological Macromolecules**.doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.12.024. 2012.

CORTRIGHT, D. N.; KRAUSE, J. E.; BROOM, D. C. TRP channels and pain. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1772: 978-988, 2007.

DE MOS, M.; DE BRUIJN, A. G.; HUYGEN, F. J.; DIELEMAN, J. P.; STRICKER, B. H.; STURKENBOOM, M. C. The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. *Pain*, v. 129, p. 12-20. 2007.

DEVAVRY, S.; LEGROS, C.; BRASSEUR, C.; COHEN, W.; GUENIN, S.; DELAGRANGE, P.; MALPAUX, B.; OUVRY, C.; COGÉ, F.; NOSJEAN, O.; BOUTIN, J. A. Molecular pharmacology of the mouse melatonin receptors MT1 and MT2. **European Journal of Pharmacology**. 677: 15-21, 2012.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCIUGLU, M.; RODRIGUEZ, H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. **Free Radical Biology and Medicine**. 32: 1102-1115, 2002.

DUBOCOVICH, M. L.; CARDINALI, D. P.; DELAGRANGE, P.; KRAUSE, D. N.; STROSBURG, D.; SUGDEN, D.; YOCCA, F. D. Melatonin receptors, in: IUPHAR (Ed.), **The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification**, 2nd ed., IUPHAR Media, London. 271–277, 2000.

DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**. 27:101-110, 2005.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. 186: 421-431, 1990.

EISENBERG E.; SHTAHL S.; GELLER R.; REZNICK, A. Z.; SHARF, O.; RAVBINOVICH, M.; ERENREICH, A.; NAGLER, R. M. Serum and salivary oxidative analysis in Complex Regional Pain Syndrome. **Pain**. 138: 226–32, 2008.

EL SHENAWY, S. M.; ABDEL-SALAM, O. M.; BAIUOMY, A. R.; EL BATRAN, S.; ARBID, M. S. Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat. **Pharmacological Research**. 46: 235-243, 2002.

FELIU, M. H.; EDWARDS, C. L. Psychologic Factors in the Development of Complex Regional Pain Syndrome: History, Myth, and Evidence. **The Clinical Journal of Pain**. 26: 258-263, 2010.

GECHEV, T.; GADJEV, I.; VAN BREUSEGEM, F.; INZÉ, D.; DUKIANDJIEV, S.; TONEVA, V.; MINKOV, I. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 59:708-714, 2002.

GOEBEL, A. Complex regional pain syndrome in adults. **Rheumatology**. 50: 1739-1750, 2011.

GUPTA, Y. K.; GUPTA, M.; KOHLI, K. Neuroprotective role of melatonin in oxidative stress vulnerable brain. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**. 47: 373–386, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford University Press, USA, 2007.

HERNÁNDEZ-PACHECO, A.; ARAIZA-SALDAÑA, C. I.; GRANADOS-SOTO, V.; MIXCOATL-ZECUATL, T. Possible participation of the nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channels pathway in the peripheral antinociception of melatonin. **European Journal of Pharmacology**. 596: 70-76, 2008.

HIRATA, F.; HAYAISHI, O. In Vitro and in Vivo Formation of Two New Metabolites of Melatonin. **The Journal of Biological Chemistry**. 249: 1311-1313, 1974.

HOLZER, P. Acid-Sensitive Ion Channels and Receptors. **Handbook of Experimental Pharmacology**. 194, 2009.

HÜBNER-WOZNIAK, E.; PANCZENCO-KRESOWSKA, B.; LERCZAK, K.; PÓŚNIK. Effects of graded treadmill exercise on the activity of blood antioxidant enzymes, lipid peroxides and nonenzymatic antioxidants in long distance skiers. **Biology of Sport**. 11: 217-226, 1994.

JANIG W.; BARON R. Complex regional pain syndrome: mystery explained? **The Lancet Neurology**. 2: 687-697, 2003.

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

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology**. 47: 89-116, 2007.

LAFERRIÈRE, A.; MILLECAMPS, M.; XANTHOS, D. N.; XIAO, W. H.; SIAU, C. DE MOS, M.; SACHOT, C.; RAGAVENDRAN, J. V.; HUYGEN, F. J. P. M.; BENNETT, G. J.; CODERRE, T. J. Cutaneous tactile allodynia associated with microvascular dysfunction in muscle. **Molecular Pain**. 4: 49-60, 2008.

LATORRE, R.; BRAUCHI, S.; MADRID, R.; ORIO, P.A Cool Channel in Cold Transduction. **Physiology**. 26: 273-285, 2011.

LAURIDO, C.; PELISSIE, T.; SOTO-MOYANO, R.; VALLADARES, L.; FLORES, F.; HERNANDEZ, A. Effect of melatonin on rat spinal cord nociceptive transmission. **Neuroreport**. 13: 89-91, 2002.

LAWSON, S.N.; CREPPS, B.A.; PERL, E.R. Calcitonin gene related peptide immunoreactivity and afferent receptive properties of dorsal root ganglion neurons in guinea-pigs. **Journal of Physiology**. 540: 989-1002, 2002.

LAWSON, S.N.; CREPPS, B.A.; PERL, E.R. Relationship of substance p to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurons in guinea-pigs. **Journal of Physiology**. 505: 177-191, 1997.

LI, S. R.; WANG, T.; WANG, R.; DAI, X.; CHEN, Q.; LI, R. D. Melatonin enhances antinociceptive effects of delta-, but not mu-opioid agonist in mice. **Brain Research**. 1043: 132-138, 2005.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**.353: 1607-1609, 1999.

LOWENSTEIN, P.; PEREYRA, E. N.; GONZALEZ SOLVEYRA, C.; CARDINALI, D. P. Effect of naloxone on the nocturnal rise of rat pineal melatonin content. **European Journal of Pharmacology**. 98: 261-264, 1984.

LUCHETTI, F.; CANONICO, B.; BETTI, M.; ARCANGELETTI, M.; PILOLLI F.; PIRODDI, M.; CANESI, L.; PAPA, S.; GALLI, F. Melatonin signaling and cell protection function. **The FASEB Journal**. 24: 3603-3624, 2010.

MAIHÖFNER, C.; SEIFERT, F.; MARKOVIC, K. Complex regional pain syndromes: new pathophysiological concepts and therapies. **European Journal of Neurology**. 17: 649-660, 2010.

MANTOVANI, M.; KASTER, M. P.; PERTILE, R.; CALIXTO, J. B.; RODRIGUES, A. L.; SANTOS, A. R. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. **Journal of Pineal Research**. 41: 382-389, 2006.

MARCINIAK, A.; BRZESZCZYŃSKA, J.; GWOŹDZIŃSKI, K.; JEGIER, A. Antioxidant capacity and physical exercise. **Biology of Sport**. 26: 197-213, 2009.

MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLIN, I.; HERRERA, F.; MARTIN, V.; RODRIGUEZ, C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 59: 1706–1713, 2002.

MEOTTI, F. C.; COELHO, I. S.; SANTOS, A. R. S. The Nociception Induced by Glutamate in Mice Is Potentiated by Protons Released into the Solution. **The Journal of Pain**. 11: 570-578, 2010.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Seattle: IASP Press**. 1994.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**. 57: 1-164, 1999.

MILLECAMPS, M.; CODERRE, T. G. Rats with chronic post-ischemia pain exhibit an analgesic sensitivity profile similar to human patients with complex regional pain syndrome - type I. **European Journal of Pharmacology**. 583: 97-102, 2008.

MILLECAMPS, M.; LAFERRIÈRE, A.; RAGAVENDRAN, J. V.; STONE, L. S.; CODERRE, T. J. Role of peripheral endothelin receptors in an animal model of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS-I). **Pain**. 151: 174-183, 2010.

OKATANI, Y.; WAKATSUKI, A.; KANEDA, C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. **Journal of Pineal Research**. 28: 89-96, 2000.

RAGHAVENDRA, V.; AGREWALA, J. N.; KULKARNI, S. K. Melatonin reversal of lipopolysaccharides-induced thermal and behavioral hyperalgesia in mice. **European Journal of Pharmacology**. 395: 15-21, 2000.

REITER, R. J. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. **Physiology**. 15: 246-250, 2000.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; POEGGELER, B.; MENENDEZ-PELAEZ, A.; CHEN, L. D.; SAARELA, S. Melatonin as a free radical scavenger: Implications for aging and age-related diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 719: 1–12, 1994.

RIOJA, I.; TERCENIO, M. C.; UBEDA, A.; MOLINA, P.; TARRAGA, A.; GONZALEZ-TEJERO, A.; ALCARAZ, M. J. A pyrroloquinazoline derivative with anti-inflammatory and analgesic activity by dual inhibition of cyclo-oxygenase-2 and 5-lipoxygenase. **European Journal of Pharmacology**. 434: 177-185, 2002.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B. S.; SAKATA, R. K. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. 57: 94-105, 2007.

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**. 36: 1-9, 2004.

RUIZ-MEDINA, J.; LEDENT, C.; VALVERDE, O. GPR3 orphan receptor is involved in neuropathic pain after peripheral nerve injury and regulates morphine-induced antinociception. **Neuropharmacology**. 61: 43-50, 2011.

SANDRONI P., BENRUD-LARSON L. M., MCCLELLAND R. L., LOW P. A. Complex regional pain syndrome type I: incidence and prevalence in Olmsted county, a population-based study. **Pain**. 103: 199–207, 2003.

SHAH, A.; KIRCHNER, J. S. Complex Regional Pain Syndrome. **Foot and Ankle Clinics of North America**. 16: 351-366, 2011.

SHEN, Y. X.; XU, S. Y.; WEI, W.; SUN, X. X.; LIU, L. H.; YANG, J.; DONG, C. The protective effects of melatonin from oxidative damage induced by amyloid beta peptide 25–35 in middle-aged rats. **Journal of Pineal Research**. 32: 85-89, 2002.

SLOMINSKI, R. M.; REITER, R. J.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.; OSTROM, R. S.; SLOMINSKI, A. T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues:

Distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 351: 152–166, 2012.

SLUKA, K. A.; PRICE, M. P.; BREESE, N. A.; STUCKY, C. L.; WEMMIE, J. A.; WELSH, M. J. Chronic hyperalgesia induced by repeated acid injections in muscle is abolished by the loss of ASIC3, but not ASIC1. **Pain**. 106: 229–239, 2003.

SOFIC, E.; RIMPAPA, Z.; KUNDUROVIC, Z.; SAPCANIN, A.; TAHIROVIC, I.; RUSTEMBEGOVIC, A.; CAO, G. Antioxidant capacity of the neurohormone melatonin. **Journal of Neural Transmission**. 112: 349-358, 2005.

SOMANI, S. M.; FRANK, S.; RYBAKS, L. P. Responses of Antioxidant System to Acute and Trained Exercise in Rat Heart Subcellular Fractions. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 51: 627-634, 1995.

SRINIVASAN, V.; PANDI-PERUMAL, S. R.; SPENCE, D. W.; MOSCOVITCH, A.; TRAKHT, I.; BROWN, G. M.; CARDINALI, D. P. Potential use of melatonergic drugs in analgesia: Mechanisms of action. **Brain Research Bulletin**. 81: 362-371, 2010.

STORY, G. M.; PEIER, A. M.; REEVE, A. J.; EID, S. R.; MOSBACHER, J.; HRICIK, T. R.; EARLEY, T. J.; HERGARDEN, A. C.; ANDERSSON, D. A.; HWANG, S. W.; MCINTYRE, P.; JEGLA, T.; BEVAN, S. PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**. 112: 819-829, 2003.

TAN, D. X.; CHEN, L. D.; POEGGELER, B.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrine Journal**. 1: 57-60, 1994.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M. J.; MALMBERG, A. B.; ROSEN, T. A.; GILBERT, H., SKINNER, K.; RAUMANN, B. E.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**. 21: 531-543, 1998.

VAN DER LAAN L.; VELDMAN P. H.; GORIS R. J. Severe complications of reflex sympathetic dystrophy: infection, ulcers, chronic edema, dystonia, and myoclonus. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**. 79: 424-429, 1998.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOLA, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZURA, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 39: 44-84, 2007.

VENKATACHALAM, K.; MONTELL, C. TRP channels. **Annual Review of Biochemistry**. 76: 387-417, 2007.

WALL, P.D.; MELZACK, R. Textbook of pain. **Edinburgh: Churchill Livingstone**, 1999.

WANG, D.; YUAN, X.; LIU, T.; LIU, L.; HU, Y.; WANG, Z.; ZHENG, Q. Neuroprotective activity of lavender oil on transient focal cerebral ischemia in mice. **Molecules**. 15: 9803-9817, 2012.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. 77: 325-333, 1981.

WILHELMSSEN, M.; AMIRIAN, I.; REITER, R. J.; ROSENBERG, J.; GÖGENUR, I. Analgesic effects of melatonin: a review of current evidence from experimental and clinical studies. **Journal of Pineal Research**. 51: 270–277, 2011.

WU, F. S.; YANG, Y. C.; TSAI, J. J. Melatonin potentiates the GABA_A receptor-mediated current in cultured chick spinal cord neurons. **Neuroscience Letters**. 260: 177-180, 1999.

XANTHOS, D. N.; BENNETT, G. J.; CODERRE, T. J. Nor epinephrine-induced nociception and vasoconstrictor hypersensitivity in rats with chronic post-ischemia pain. **Pain**. 137: 640-651, 2008.

YU, C. X.; ZHU, B.; XU, S. F.; CAO, X. D.; WU, G. C. The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. **European Journal of Pharmacology**. 403: 49-53, 2000.

ZIMMERMAN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in unconscious animals. **Pain**. 16: 109-110, 1983.

ZEMKE, D.; SMITH, J. L.; REEVES, M. J.; MAJID, A. Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. **Neurotoxicology**. 25: 895-904, 2004.

ZOLLINGER, P. E.; TUINEBREIJER, W. E.; KREIS, R. W.; BREEDERVELD, R. S. Effect of vitamin C on frequency of reflex sympathetic dystrophy in wrist fractures: a randomized trial. **The Lancet**. 345: 2025-2028, 1999.

ZUURMOND, W. W. A; LANGENDIJK, P. H. J.; BEZEMER, P. D.; BRINK, H. E. J.; DE LANGE, J. J.; VAN LOENEN, A. C. Treatment of acute reflex sympathetic dystrophy with DMSO 50% in a fatty cream. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**. 40: 364-637, 1996.