

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**EXPRESSÃO ASTROCITÁRIA DA PROTEÍNA GLIAL  
FIBRILAR ÁCIDA (GFAP) E CONCENTRAÇÕES  
PLASMÁTICAS DE TNF- $\alpha$  E IL-1 $\beta$  EM RATOS  
TRATADOS COM AMITRIPTILINA, GABAPENTINA,  
METADONA E MORFINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

**GISELE FERREIRA AMARAL**

**SÃO PAULO  
2015**

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**EXPRESSÃO ASTROCITÁRIA DA PROTEÍNA GLIAL  
FIBRILAR ÁCIDA (GFAP) E CONCENTRAÇÕES  
PLASMÁTICAS DE TNF- $\alpha$  E IL-1 $\beta$  EM RATOS  
TRATADOS COM AMITRIPTILINA, GABAPENTINA,  
METADONA E MORFINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo F. Bondan

**GISELE FERREIRA AMARAL**

**SÃO PAULO  
2015**

Amaral, Gisele Ferreira.

Expressão astrocitária da proteína fibrilar glial ácida (GFAP) e concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em ratos tratados com amitriptilina, gabapentina, metadona e morfina / Gisele Ferreira Amaral. - 2015.

62 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2015.

Área de Concentração: Toxicologia do Sistema Nervoso Central.  
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

1. Astrócitos. 2. Citocinas. 3. Dor neuropática. 4. Analgésicos.  
I. Bondan, Eduardo Fernandes (orientador). II. Título.

**GISELE FERREIRA AMARAL**

**EXPRESSÃO ASTROCITÁRIA DA PROTEÍNA GLIAL  
FIBRILAR ÁCIDA (GFAP) E CONCENTRAÇÕES  
PLASMÁTICAS DE TNF- $\alpha$  E IL-1 $\beta$  EM RATOS  
TRATADOS COM AMITRIPTILINA, GABAPENTINA,  
METADONA E MORFINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Prof. Dr. Eduardo F. Bondan

\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Martha Bernardi

\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
Profa. Dr. Stefanie Vanessa Santos

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a presente dissertação aos meus  
companheiros de vida, Nathan C. Dee e Billy.

Dedico também a todos os animais que  
participaram desse experimento.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Eduardo Fernandes Bondan, pela confiança, amizade e sobretudo pela orientação hors concours.

À professora Leoni V. Bonamin por gentilmente ceder a utilização do software Metamorf.

A todos os professores do Departamento de Patologia Ambiental e Experimental pelos esforços em prol da pesquisa e crescimento acadêmico da instituição.

À Universidade Paulista pelo apoio sempre concedido.

À Capes pelo auxílio financeiro.

Aos amigos e funcionários do departamento Wilton P. Dos Santos e Fabiana Toshie, sem vocês eu jamais teria concluído essa dissertação.

Aos amigos e mestrandos Luciana Nogueira e Juan Justino, por sempre estarem presentes nos bons e maus momentos e por me incentivarem e ajudarem com inúmeros detalhes.

À amiga Amanda Consoli pela participação da fase experimental do projeto e por estar presente na minha vida a 10 anos.

Aos meus pais por financiarem toda a minha vida, inclusive a acadêmica, e por me apoiarem sempre.

Aos meus familiares por estarem sempre presentes na minha vida, tornando-a mais alegre.

Ao Nathan C. Dee pelo apoio incondicional e compreensão durante todo o decorrer do mestrado.

## RESUMO

Citocinas pró-inflamatórias e células gliais, principalmente micróglia, têm sido implicadas na sensibilização da dor persistente. Menos conhecido é o papel dos astrócitos nessa regulação. O objetivo do estudo foi o de medir, após administração em ratos saudáveis de doses terapêuticas de curta duração de algumas drogas comumente utilizadas no tratamento da dor neuropática, os níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e a expressão do marcador astrocitário GFAP. Ratos Wistar machos foram divididos em 5 grupos, recebendo por 9 dias- (1) amitriptilina (Amt- 10 mg/kg/dia, por gavagem solução); (2) gabapentina (Gb- 60 mg/kg/dia, por gavagem); (3) metadona (Me- 4,5 mg/kg/dia, via intraperitoneal - IP); (4) morfina (Mo- 10 mg/kg/dia, IP); ou (5) salina a 0.9%, IP). Amostras do encéfalo foram coletadas para estudo imuno-histoquímico da expressão astrocitária de GFAP no tronco encefálico e núcleo accumbens (NAc). A área das células GFAP-positivas foi calculada com uso do programa Metamorph e os níveis plasmáticos de citocinas foram determinados por ELISA. Enquanto os níveis de TNF- $\alpha$  diminuíram nos grupos tratados com Mo, Me and Gb, a IL-1 $\beta$  diminuiu apenas com a Me. A expressão astrocitária de GFAP diminuiu no tronco encefálico com todas as drogas, enquanto aumentou no NAc com Amt, Me e Mo.

**Palavras-Chave:** Astrócitos. Citocinas. Analgésicos. Dor neuropática.

## ABSTRACT

Pro-inflammatory cytokines and glial cells, especially microglial cells, have been implicated in persistent pain sensitization. Less is known about the role of astrocytes in its regulation. The aim of this study was to measure, after the administration of short-term therapeutic doses of some commonly used neuropathic pain relievers in healthy rats, the plasma levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and the expression of the astrocytic biomarker GFAP. Male Wistar rats were divided into 5 groups, receiving for 9 days- (1) amitriptyline (Amt- 10 mg/kg/day, by gavage); (2) gabapentin (Gb - 60 mg/kg/day, by gavage; (3) methadone (Me- 4,5 mg/kg/day, intraperitoneal route- IP); (4) morphine (Mo- 10 mg/kg/day, IP); or (5) 0.9% saline solution, IP. Brain samples were collected for immunohistochemical study for GFAP expression in the brainstem and nucleus accumbens (NAc). The area of GFAP-positive cells was calculated using Metamorph software and plasma levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were measured by ELISA. Plasma TNF- $\alpha$  levels were decreased in the groups treated with Mo, Me and Gb, but not in the Amt-treated group. IL-1 $\beta$  decreased only in rats treated with Me. The astrocytic expression of GFAP was decreased in the brainstem with all drugs, while it was increased in the NAc with Amt, Me and Mo.

**Keywords:** Astrocytes. Cytokines. Analgesics. Neuropathic pain.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Vias clássicas e não clássicas da modulação da dor .....	19
Figura 2 – Ação dos opioides dentro da célula.....	28
Figura 3 – Mecanismo de ação dos opioides .....	29

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Peptídeos endógenos, agonistas e antagonistas, seus receptores e resultados de sua estimulação .....	29
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

Rer: Retículo endoplasmático rugoso

LCR: Líquido cefalorraquidiano

IL-1: Interleucina 1

IL-3: Interleucina 3

IL-6: Interleucina 6

IFN- $\delta$ : Interferon- gama

TNF-  $\alpha$ : Fator de necrose tumoral-alfa

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

PTNs: Neurônios de transmissão da dor

EAAs: Aminoácidos excitatórios

NK-1: Receptor de neurocinina-1

AMPA: Ácido propiôinico alfa-amino-3-hidróxi-5-mteil-4-isoxazol

NMDA: N-metil-D-aspartato

cNOS: Óxido nítrico sintetase

NO: Óxido nítrico

NGF: Fator de crescimento neural

kDa: Unidade de massa atômica ou Dalton

IL-2: Interleucina 2

IL-7 : Interleucina 7

IL-4: Interleucina 4

IL-10: Interleucina 10

IL-13: Interleucina 13

FTC  $\beta$ : Fator transformador de crescimento beta

IL-35: Interleucina 35

IL-1 $\alpha$  : Interleucina 1 alfa

IL-1 $\beta$  : Interleucina 1 beta

IL-1RI: Receptor de interleucina 1 tipo I

IL-1RII: Receptor de interleucina 1 tipo II

Pro-IL-1 $\beta$ : Proteína precursora de interleucina 1 beta

PGE2: Prostaglandina da série 2  
TNF $\alpha$  : Fator de necrose tumoral alfa  
TNFR1: Receptor do fator de necrose tumoral tipo 1  
AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico  
Ca $^{++}$ : Cálcio  
PKC: Proteína quinase C  
IP<sub>3</sub>: Receptor de inositol trifosfato  
DAG: Diacilglicerol  
MMP-9: Metaloproteinase de matriz 9  
QT: Intervalo Q, R, S e T do traçado do eletrocardiograma  
PMN: Polimorfonucleares  
ADT: Antidepressivo tricíclico  
5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)  
PSD-95: Proteína 95  
nNOS: Oxido nítrico sintetase neuronal  
PKC- $\gamma$ : Proteína gama quinase  
NR1: Receptor NMDA tipo 1  
 $\alpha$ 2 $\delta$ 1: Receptor alfa 2 gama 1  
AMT: Amitriptilina  
GB: Gabapentina  
ME: Metadona  
MO: Morfina  
PAG: Substância periaquedatal cinzenta  
FGF: Fator de crescimento de fibroblastos  
CNTF: Fator neurotrófico ciliar  
TGF- $\beta$  : Fator de crescimento de transformação beta  
TNFSF: Super família TNF  
MAO B: Monoamina oxidase B  
ABC: Complexo avidina biotina  
pH: Potencial Hidrogenônico  
COMT: Catecol-O-metil transferase

## **LISTA DE SÍMBOLOS**

$\alpha$ : alfa

$\beta$ : beta

$\sigma$ : sigma

$\kappa$ : kappa

$\gamma$ : gama

$\delta$ : delta

$\mu$ : mu

$\mu\text{m}$ : micrometros

$\text{mg}$ : miligramas

$\text{kg}$ : kilo

$\text{C}$ : Celsius

$\text{dL}$ : decilitro

$\text{pg}$ : picograma

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
2.1 Células do Sistema Nervoso Central .....	15
2.2 Dor e células gliais .....	18
2.3 Citocinas .....	21
2.4 Tronco Encefálico .....	23
2.5 Núcleo Accumbens .....	24
2.6 Fármacos empregados no tratamento de dor neuropática utilizados neste estudo .....	26
2.6.1 Morfina .....	26
2.6.2 Metadona .....	32
2.6.3 Amitriptilina.....	33
2.6.4 Gabapentina.....	35
<b>3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>37</b>
3.1 O presente artigo será enviado para publicação para a revista Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.....	37
3.2 Introduction.....	38
3.3 Material and methods .....	39
3.4 Results.....	41
3.5 Discussion .....	46
3.6 Conclusion.....	51
3.7 References .....	51
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) consiste num agregado de células extremamente complexo, e parte delas forma uma rede de comunicação e, outra parte, a matriz de sustentação.

A unidade funcional do sistema nervoso, para as atividades de comunicação, é o neurônio; os outros elementos celulares do sistema nervoso compõem a neuróglia ou glia. As células gliais no SNC que dão suporte às atividades dos neurônios são, principalmente, os astrócitos e a oligodendróglia. Além destas, existem outros tipos celulares como a micróglia e as células ependimais (BERNE et al., 2004)

Os astrócitos têm um papel fundamental na sustentação estrutural do SNC, orientam os neurônios que estão migrando no feto até sua posição final, mantêm uma íntima relação funcional com os neurônios nos adultos, importantes no metabolismo neuronal. São células essenciais para a regulação do transporte de substâncias ao SNC, devido a seu papel na indução da barreira hematoencefálica. Quanto ao aspecto nível bioquímico, essas células estão envolvidas na regulação da concentração dos neurotransmissores, na detoxificação da amônia e outras substâncias tóxicas e na regulação da concentração dos íons de potássio. Após uma agressão, os processos astrocitários, que contêm numerosos filamentos gliais, hipertrofiam, formando a cicatriz glial. (JONES et al., 2000)

Recentes evidências sugerem que os astrócitos podem desempenhar um papel mais ativo nas funções sinápticas do que se pensava anteriormente. Ao envolverem sinapses, adquirem, portanto, uma posição espacial única para regular a transmissão sináptica e as respostas neuronais, incluindo a indução da tolerância aos opioides (SONG e ZHAO, 2001).

Os analgésicos são fármacos que proporcionam a ausência ou redução da percepção da dor sem deprimir inadvertidamente os pacientes. Existe uma extensa variedade de fármacos, de diferentes classes e mecanismos de ação, que podem ser utilizados, como os opioides, os agonistas alfa-2-adrenérgicos e os anestésicos locais. A utilização de antidepressivos, como a amitriptilina, e de antiepilepticos, como a gabapentina, também podem produzir uma analgesia satisfatória na dor neuropática (TRANQUILLI et al., 2013).

Estudos recentes sugeriram que a administração repetida de morfina e de metadona induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1 $\beta$  (IL- $\beta$ ), que se opõe à analgesia de ambas, (JOHNSTON et al., 2004; SHAVIT et al., 2005), contudo, as células da glia participam do desenvolvimento de tolerância a opioides (SONG e ZHAO, 2001). Estudos demonstraram também que a amitriptilina levou à atenuação da ativação astrocitária e a restauração do efeito antinociceptivo da morfina em ratos tolerantes à mesma (HUANG et al., 2012).

A gabapentina, por sua vez, vem demonstrando potencial em reduzir a gliose reativa em astrócitos e micróglia, com a presença de receptores GABAérgicos em neurônios e células gliais (ROSSI et al., 2013), enquanto a metadona é um dos principais fármacos de escolha para o tratamento da dor neuropática, recentemente foi descoberto que seu potencial imunossupressor é tão potente quanto seu potencial analgésico (HUTCHINSON e SOMOGYI, 2004).

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar se a administração de drogas comumente empregadas no tratamento da dor neuropática, como a morfina, a metadona, a amitriptilina e a gabapentina, seriam capazes de interferir nos níveis plasmáticos de citocinas pro-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ , e, ao mesmo tempo, afetar a atividade astrocitária mediante observação da expressão de seu principal marcador – a proteína glial fibrilar ácida (GFAP).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Células do Sistema Nervoso Central

O neurônio, a unidade funcional do sistema nervoso, consiste de um núcleo, com um grande nucléolo, circundado por uma quantidade relativamente abundante de citoplasma, do qual se projetam um ou mais dendritos e um axônio (JOHNSTON et al., 1996). Os neurônios variam em suas dimensões, desde células não maiores que os astrócitos (cerca de 5 µm) até grandes neurônios no cerebelo (células de Purkinje) e no córtex cerebral (células de Betz), que excedem os 75µm. O citoplasma contém grânulos basófilos chamados de substância de Nissl, que se distribui uniformemente, exceto na base do axônio (proeminência axonal). A substância de Nissl pode ser visualizada em maiores detalhes pela microscopia eletrônica de transmissão, constituindo o retículo endoplasmático rugoso (REr), cuja função consiste em sintetizar proteínas de transporte. O axônio distal depende das proteínas de transporte provenientes do corpo neuronal (DEADWYLER e HAMPSON, 1997).

O neurônio, como a principal célula de iniciação e condução dos estímulos, afeta o corpo como um todo mediante o desempenho de funções de informação, cognitivas, motoras, sensitivas e autônomas, além de exercer papel no controle endócrino e emocional. Depois de sua maturação, os neurônios que são destruídos não podem ser mais substituídos, com exceção daqueles situados no nariz e língua, envolvidos, respectivamente, com a olfação e o paladar (JOHNSTON et al., 1996).

Três tipos de células neurogliais podem ser diferenciados. Seus núcleos não possuem nucléolos visíveis ao microscópio óptico, fato que diferencia tais células de quase todos os neurônios (BENVENISTE, 1992).

Os oligodendrócitos encontrados na substância cinzenta alinharam-se em torno dos neurônios em alguns locais e, nesse caso, chamados de células satélites, fornecem nutrientes, particularmente glicose, que é a fonte de energia disponível. Na substância branca, sua localização é interfascicular, formando e mantendo a mielina. Nos nervos periféricos, as células que desempenham essa função de mielinização são chamadas de células de Schwann (PRINEAS e PARRATT, 2012).

As células microgliais são de origem mesodérmica e não neuroectodérmica, como é o caso dos demais componentes da neuróglia (MONTEGOMERY, 1994). A micróglia constitui 5-12% de todas as células do SNC e 5-10% de todas as células

gliais. Sob condições basais a micróglia executa a vigilância imune do SNC (RAIVICH, 2005).

A mudança para o estado de micróglia ativada pode ocorrer devido a sensores requintados de mudanças no microambiente. Os estímulos que podem ativar a micróglia incluem trauma, infecção, isquemia e neurodegeneração. A ativação resulta em mudanças na morfologia (processo de retração), proliferação, suprarregulação da expressão de receptores (receptores do complemento e receptores de macrófagos) e mudança na função (migração para o sítios da lesão, com transformação em fagócitos e liberação de mediadores pró-inflamatórios). Após a resolução do problema, a micróglia pode ou retornar para o estado basal ou continuar em estado ativado por um período prolongado de tempo (PERRY et al., 1985).

A micróglia ativada não produz citocinas pró-inflamatórias (na verdade, pode, em alternativa, liberar citocinas anti-inflamatórias). No entanto, após sofrer repetidas agressões, pode passar a ter uma resposta excessiva, tanto na rapidez quanto na magnitude da liberação dos produtos inflamatórios, de forma similar à resposta imune periférica secundária. A ativação microglial pode ser importante para explicar porque alguns indivíduos respondem em intensidade e duração em um evento que evoque dor (PERRY et al., 1985).

As células do epêndima formam o epitélio que separa o SNC do líquido cefalorraquidiano (LCR) ou líquor nos ventrículos cerebrais e canal central da medula espinhal. Muitas substâncias se difundem rapidamente através do epêndima, que reside entre o espaço extracelular do encéfalo e o LCR (BERNE et al., 2000).

Os astrócitos constituem as maiores e mais numerosas células gliais presentes no SNC dos mamíferos, excedendo o número de neurônios na proporção de 10:1 (BENVENISTE, 1992). Apesar de sua pronunciada heterogeneidade morfológica e bioquímica, os astrócitos caracterizam-se pela presença de prolongamentos dotados de filamentos intermediários (fibrilas gliais), cujo componente principal é o GFAP, servindo como meio de identificação deste tipo celular em estudos *in situ* e em cultivo celular (MONTEGOMERY, 1994).

Os astrócitos constituem 40-50% de todas as células gliais (ALDSKOGIUS e KOZLOVA, 1998), ultrapassando o número de neurônios, (LEE et al., 2000). Envolvem hermeticamente a vasta maioria das sinapses no SNC e modulam a comunicação entre neurônios nas junções sinápticas. A presença astrocitária regula

a comunicação sináptica e deu origem ao termo “sinapse tripla,” por enfatizar que os astrócitos, em adição aos processos neuronais pré-sinápticos e pós-sinápticos, são parte integrante da sinalização neuronal (HAYDON e CARMIGNOTO, 2006).

Além das sinapses, os astrócitos também têm íntimo contato com o corpo neuronal celular, os dendritos e os nódulos de Ranvier. Eles se estendem aos espaços perivasculares para se contactarem aos capilares e aos limites do SNC, a fim de formar a barreira limitante glial (ALDSKOGIUS e KOZLOVA, 1998).

Dentre as inúmeras funções propostas para os astrócitos, destacam-se a manutenção da homeostasia no microambiente neural, exercendo importante papel na detoxificação, na captação de neurotransmissores e na regulação do pH, da osmolaridade e da concentração iônica do tecido nervoso. Os astrócitos relacionam-se com a orientação da migração neuronal durante o desenvolvimento do SNC, o suporte mecânico para os oligodendrócitos durante a mielinização, o reparo após agressões no tecido nervoso, a produção e secreção de proteínas da matriz extracelular, e com a síntese de moléculas de adesão, de fatores neurotróficos e promotores do crescimento de neuritos, a fagocitose de restos celulares e funções imunes, tais como a secreção de citocinas (IL-1, IL-3, IL-6, IFN- $\delta$  e TNF- $\alpha$ ) e expressão de moléculas de MHC (complexo principal de imuno-histocompatibilidade) de classe I e II (MONTEGOMERY, 1994; PETERS et al., 1991; EDDLESTON e MUCKE, 1993).

Independentemente da causa da lesão no SNC, o reparo do tecido é sempre realizado em maior ou menor grau com participação astrocitária. A reação dos astrócitos inclui o aumento de seu número (astrocitose) e de suas dimensões (astroglioze), além de várias outras alterações funcionais, como espessamento dos feixes de filamentos gliais e aumento da intensidade de marcação de GFAP (MONTEGOMERY, 1994; EDDLESTON e MULCKE, 1993). Esses fenômenos têm sido referidos como gliose astrocitária, astrocitose e astroglioze reativas, cicatriz glial ou simplesmente gliose, podendo ter dois tipos de acordo com o dano provocado – isomórfica, em que os processos astrocitários apresentam-se orientados pelos elementos teciduais preservados e o arranjo dos feixes de filamentos gliais é uniforme e paralelo, e anisomórfica, em que sua disposição é irregular ao redor da lesão, geralmente causadora de dano morfológico grosseiro na estrutura do tecido, com ruptura da barreira hematoencefálica (BIGNAMI e DAHL, 1984; FERNAUD-ESPINOSA et al., 1993).

## 2.2 Dor e células gliais

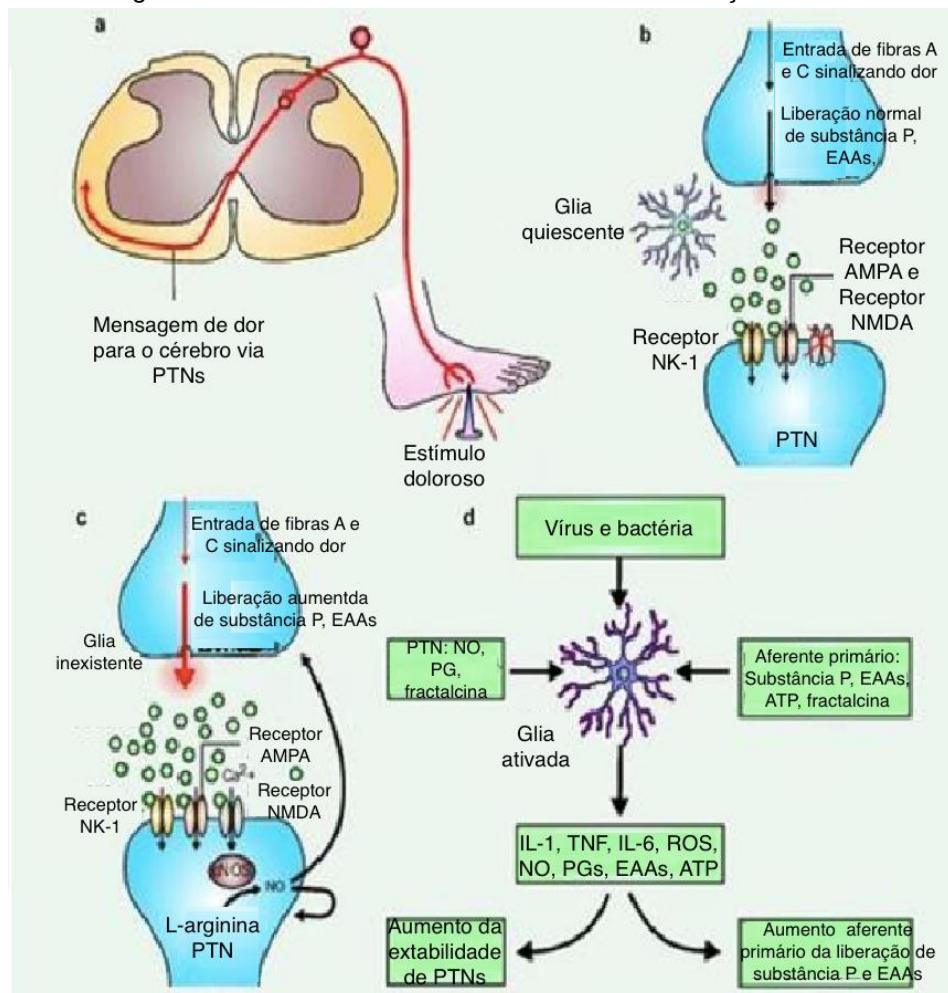
A via clássica de transmissão da dor se inicia quando um estímulo nociceptivo (doloroso) é encontrado, tal como mostrado na Figura 1 (a). Em resposta à dor periférica, ocorre a excitação das fibras nervosas A $\delta$  e C. Esses axônios transmitem potenciais de ação para o corno dorsal da medula espinal; lá, neurotransmissores são liberados pelos neurônios sensoriais e esses produtos químicos se ligam e ativam receptores pós-sinápticos em neurônios de transmissão da dor (PTNs), cujos corpos celulares residem nos cornos dorsais. Axônios dos neurônios de transmissão da dor, em seguida, ascendem para o encéfalo, carregando informações sobre o evento nocivo para os centros superiores. Uma sinapse que interconecta o neurônio periférico sensorial e o PTN do corno dorsal da medula espinal é mostrada em detalhes na Figura 1 em (b) e (c).

Em condições basais, a dor não é modulada pela glia, em tais circunstâncias, a glia encontra-se quiescente e, assim, não libera substâncias neuro-excitatórias em níveis de modulação da dor. Informações sobre o estímulo lesivo chegam da periferia ao longo das fibras A $\delta$  e C, causando a liberação da substância P e de aminoácidos excitatórios (EAAs) em quantidades apropriadas à intensidade e duração do início do estímulo nocivo. A ativação dos receptores de neuropeptídeo Y (NK-1) pela substância P e a ativação dos receptores AMPA (ácido propiôico  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol) pelos aminoácidos excitatórios causa a despolarização transitória dos PTNs, gerando potenciais de ação que são transmitidos ao encéfalo. Canais ligados ao NMDA (N-metil-D-aspartato) estão quiescentes, pois são cronicamente ligados pelos íons de magnésio (WATKINS et al., 2007).

Em resposta a intensos e/ou prolongados sinais de dor, os PTNs se tornam sensibilizados e respondem de forma amplificada aos sinais mandados subsequentemente. A intensidade e/ou manutenção da estimulação despolariza tanto os PTNs que íons de magnésio se afastam do canal NMDA, resultando no influxo de íons de cálcio e ativando constitutivamente a expressão da óxido nítrico sintetase (cNOS), o que causa a conversão da L-arginina para óxido nítrico (NO). Por ser um gás, o óxido nítrico rapidamente se difunde para fora dos PTNs. O óxido nítrico atua pré-sinapticamente causando a liberação exagerada de substância P e de EAAs. Pós-sinapticamente, o óxido nítrico causa a hiperexcitabilidade das membranas dos PTNs. Nesse modelo neural, a glia não tem sido considerada em seu papel na criação e facilitação da dor (DEL REY et al., 2012).

Na nova visão, a ativação glial é considerada como criadora e mantedora da facilitação da dor e o papel da glia é sobreposto ao NMDA-NO mostrado no item (c). A glia é ativada (como mostrado, relativamente hipertrofiada em (d), refletindo as notáveis mudanças morfológicas que essas células sofreram na ativação). Tal ativação pode ter 3 origens: bactérias e vírus, que se ligam em receptores específicos expressos pela micróglia e astrócitos; substância P, EAAs, fractacinas e ATP liberados por fibras A $\delta$  e C nos terminais pré-sinápticos ou pela ampliação da dor via encéfalo, para a medula espinal; e óxido nítrico, prostaglandinas (PGs) e fractacinas liberados pelos neurônios de transmissão da dor. Após a ativação, a micróglia e os astrócitos causam hiperexcitação dos PTNs e exageradas liberações de substância P, EAAs, espécies reativas de oxigênio (ROS), PGs, citocinas pró-inflamatórias (como, IL-1, IL-6 ou TNF) e fator de crescimento neural (NGF) (TSAI et al., 2008).

Figura 1 – Vias clássicas e não clássicas da modulação da dor



Fonte: Adaptado de Watkins et al. (2007).

A dor neuropática é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), como a dor “iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção no sistema nervoso” ([www.IASP - pain.org](http://www.IASP-pain.org)). Embora essa definição tenha sido útil para estabelecer uma diferença entre dor neuropática e dor nociceptiva, a mesma não tem especificidade diagnóstica.

A dor aguda se manifesta de forma transitória, durante um curto período de tempo, e está associada à injúria tecidual ou de órgãos, geralmente desaparecendo quando a causa é corretamente diagnosticada e tratada. Em contrapartida, a dor crônica tem duração prolongada, capaz de se estender de vários meses a anos, e quase sempre está associada a um processo de doença crônica (como, por exemplo na diabetes mellitus) ou relacionada a uma lesão anteriormente tratada (como na neuralgia pós-herpética) (VERDU et al., 2008). Uma nova definição precisa de dor neuropática foi proposta para satisfazer essas deficiências e para ser usada para fins clínicos e de investigação (CHONG e BAJWA, 2003), definida como “a dor que surge como consequência direta de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial”, indicando que uma parte neuroanatomicamente identificável do sistema somatossensorial periférico ou central (incluindo o sistema nociceptivo e suas vias ascendentes e descendentes) deve estar envolvida (TREEDDE et al., 2008).

A modulação ascendente, responsável pela amplificação da informação dolorosa, se dá pela ação de mediadores liberados pelas fibras A-delta e C - aminoácidos, como o glutamato e o aspartato, e neuropeptídios, como a substância P e as neurocininas (LARSSON e BROMAN, 2011). Essas substâncias atuam em receptores específicos como o AMPA e, posteriormente, com receptores NMDA (WOOLF, 2004).

A estimulação do receptor NMDA (chave para a maior duração do aumento da excitabilidade dos neurônios do corno dorsal) produz sensibilização central, devido à redução do limiar excitatório da dor, manifestando-se com uma resposta exagerada ou amplificada a estímulos nocivos (WOOLF, 2011; WOOLF et al., 1995).

Ocorrendo lesão do nervo periférico, a micróglia, os oligodendrócitos e os astrócitos localizados no corno dorsal são ativados e liberam mediadores pró-inflamatórios, que modulam o processamento da dor, afetando a liberação pré-sináptica de neurotransmissores e/ou a excitabilidade pós-sináptica (VALLEJO et al., 2010).

A ativação glial aumenta a liberação de neurotransmissores nociceptivos e a excitabilidade dos neurônios de segunda ordem, causando dor generalizada. Nesse sentido, o conhecimento do papel das células gliais pode levar ao estabelecimento de novas estratégias terapêuticas no tratamento da dor neuropática (INOUC e TSUDA, 2009; ZHUO et al., 2011). A resposta inflamatória e glial frente ao dano neuronal também é necessária para que o reparo nervoso seja eficaz (ZHUO et al., 2011; LACROIX, 2011).

### 2.3 Citocinas

Segundo Lin & Calvano (2000), citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico por meio da ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos. Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas pré-formadas e atuam por mecanismo parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras).

Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia. As citocinas são redundantes em suas atividades, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. Com frequência, são formadas em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas (ZHANG, 2007). Essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevida da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. Algumas citocinas podem ter ações pró-(Th1) ou anti-inflamatórias (Th2), de acordo com o microambiente em que estão localizadas. Dentro as consideradas pro-inflamatórias, há as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7, e TNF (fator de necrose tumoral). As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e TGF $\beta$  (fator transformante de crescimento  $\beta$ ) (CURFS et al., 1997).

As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo o reparo apropriado da

ferida. Após lesões ou infecções graves, a resposta exacerbada e persistente de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. A resposta exacerbada e persistente de citocinas Th1 pode contribuir para lesões em órgão-alvo, levando à insuficiência de múltiplos órgãos e à morte. As citocinas Th2 podem minimizar alguns desses efeitos indesejáveis (LIN & CALVANO, 2000). Como não é possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto à função biológica, foram agrupadas em interleucinas (IL, numeradas sequencialmente de IL-1 a IL-35), fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal (RAEBUM et al., 2008).

A IL-1 é primariamente produzida por macrófagos e monócitos, assim como por células não imunológicas, tais como fibroblastos e células endoteliais ativadas durante lesão celular, infecção, invasão e inflamação. Há dois tipos conhecidos: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  respectivamente, com 31 a 33 kDa cada. Atuam sobre os mesmos receptores, IL-1RI (receptor de interleucina tipo I) e IL-1RII (receptor de interleucina 1 tipo II). O IL-1RI é considerado o receptor ativo, enquanto o IL-RII não possui uma molécula de transdução e é funcionalmente inativo. A IL-1 $\alpha$  é marcadamente associada a membranas celulares e age através de contatos celulares. A IL-1 $\beta$  é sintetizada como uma proteína precursora (Pro-IL-1 $\beta$ ), que não é secretada na forma ativa até ser metabolizada pela enzima caspase-1. Recentemente, descobriu-se que a IL-1 $\beta$  é expressa em neurônios nociceptivos dos gânglios da raiz dorsal da medula espinhal (RAEBUM et al., 2008). A IL-1 $\beta$  produz inflamação sistêmica por meio da ativação da cicloxigenase-2, com a formação de PGE<sub>2</sub> no hipotálamo anterior, causando febre. Também produz substância P, óxido nítrico (ativando a enzima óxido nítrico sintetase) e moléculas de adesão endotelial. Tem importante função no desenvolvimento e na manutenção da dor pós-operatória (WOLF et al., 2008).

O TNF- $\alpha$ , também conhecido como caquectina, é uma citocina pró-inflamatória produzida por monócitos, macrófagos e linfócitos T, que são abundantes no peritônio e no tecido esplânquico. Também está presente nos neurônios e nas células da glia, desempenhando funções importantes tanto na hiperalgesia inflamatória quanto na neuropática. O TNF existe em duas formas: uma transmembrânica de 26 kDa e outra secretada de 17 kDa, ambas biologicamente ativas. É estruturalmente relacionado à linfotoxina- $\alpha$  (LT- $\alpha$ , também chamada TNF- $\beta$ ), tendo os mesmos receptores, TNFR1 (55kDa) e TNFR2 (75 kDa). O TNFR1 é

expresso exclusivamente em neurônios e está associado à maioria dos efeitos biológicos do TNF- $\alpha$ , incluindo respostas inflamatórias e apoptose. O TNFR2 manifesta-se em macrófagos e monócitos no gânglio da raiz dorsal da medula espinhal, estimulando a proliferação de linfócitos T, fibroblastos e células NK (natural killer) (LIN & CALVANO, 2000).

## 2.4 Tronco Encefálico

Localizado entre a medula espinal e o diencéfalo, o tronco encefálico tem um importante papel para o ciclo vigília sono. Um dano nessa estrutura é capaz de afetar profundamente os processos sensoriais e motores, pois aí estão todos os tratos ascendentes que levam informações sensoriais da superfície do corpo até o córtex cerebral e os tratos descendentes do córtex cerebral, levando comandos motores à medula espinal. Um dano ao tronco encefálico também pode afetar a consciência e o sono porque ali está o locus ceruleus, um centro considerado crucial para a atenção e para muitas funções cognitivas. Metade de todos os neurônios noradrenérgicos do encéfalo está agrupada nesse pequeno núcleo. O tronco encefálico contém neurônios que controlam a respiração e os batimentos cardíacos, e os núcleos que dão origem à maioria dos nervos cranianos que inervam a cabeça e o pescoço (MAQUET et al., 1997)

Seis sistemas moduladores neuroquímicos no tronco encefálico regulam os sistemas sensoriais, motores e de alerta. As vias dopaminérgicas que conectam o mesencéfalo ao sistema límbico e ao córtex cerebral são particularmente importantes, pois estão envolvidas no reforço do comportamento e contribuem para o estado motivacional e o aprendizado. Drogas aditivas, como a nicotina, o álcool, os opiáceos e a cocaína agem cooptando as mesmas via neurais que reforçam positivamente comportamentos essenciais para a sobrevivência. Outros transmissores moduladores regulam o sono e a vigília, em parte controlando o fluxo de informações entre o tálamo e o córtex cerebral. Distúrbios de excitação elétrica nos circuitos corticotálâmicos podem resultar em convulsões e epilepsia (STERIADE et al., 1993).

Rostral ao tronco encefálico encontra-se o hipotálamo, sendo uma de suas funções garantir a estabilidade do ambiente interno, mantendo as variáveis fisiológicas dentro dos limites favoráveis aos processos corporais vitais. Os

processos homeostáticos no sistema nervoso trazem profundas consequências para o comportamento e têm intrigado muitos dos fundadores da fisiologia moderna. Neurônios que controlam o ambiente interno concentram-se no hipotálamo, uma pequena área do diencéfalo que compreende menos de 1% do volume total do encéfalo. O hipotálamo, com estruturas do tronco encefálico e do sistema límbico a que está intimamente ligado, age diretamente no ambiente interno por seu controle sobre o sistema endócrino e o sistema nervoso autônomo de modo a estimular comportamentos direcionados a objetivos. Essa estrutura age indiretamente por meio de suas conexões com regiões superiores do encéfalo, controlando estados emocionais e motivacionais. Além de regular comportamentos motivados específicos, o hipotálamo, junto com o tronco encefálico abaixo e o córtex cerebral acima, mantém um estado geral de alerta, que varia de excitação e vigilância à sonolência e torpor (KANDEL et al., 2014).

## 2.5 Núcleo Accumbens

Os circuitos que medeiam a sensação de recompensa obtida pela estimulação encefálica estão amplamente distribuídos. Locais especialmente efetivos situam-se ao longo do curso do feixe prosencefálico medial e ao longo dos feixes de fibras longitudinalmente orientadas que cruzam em proximidade à linha média do tronco encefálico. A estimulação de ambas as vias ativa transinapticamente neurônios dopaminérgicos na área tegmentar ventral do mesencéfalo. Tais neurônios projetam-se para o núcleo accumbens (principal componente do estriado ventral), para a porção ventromedial da cabeça do núcleo caudado (no estriado dorsal), para o prosencéfalo basal e regiões do córtex pré-frontal (HYMAN, MALENKA e NESTLER, 2006).

Os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo são ativados por estímulos incentivadores e têm um papel essencial nas recompensas relacionadas à estimulação encefálica. A busca dessa recompensa é reforçada pelo aumento da transmissão sináptica dopaminérgica e enfraquecida pela redução dessa transmissão. Os neurônios dopaminérgicos recebem sinais excitatórios de células colinérgicas nos núcleos tegumentar laterodorsal e pedunculopontino do rombencéfalo. A estimulação do feixe prosencefálico medial e do tronco encefálico caudal ativa esses neurônios colinérgicos.

As projeções dopaminérgicas da área tegumentar ventral para o núcleo accumbens e outras estruturas prosencefálicas são um componente central dos circuitos de recompensa. Os principais tipos de receptores dopaminérgicos no estriado dorsal e no núcleo accumbens são os receptores D1 e D2, acoplados a proteínas G. Os receptores D1 predominam no córtex pré-frontal. Um transportador de dopamina, localizado nos neurônios pré-sinápticos, interrompe as ações da dopamina liberada na sinapse, bombeando-a de volta para dentro do terminal pré-sináptico (DI CHIARA, 1998).

Tanto estudos farmacológicos, quanto análises de lesões em animais, confirmam a importância das vias dopaminérgicas para a sensação de recompensa no encéfalo. Estudos comportamentais das prioridades recompensadoras de drogas, utilizando paradigmas como a preferência condicional de lugar ou a autoadministração de drogas, mostraram que drogas bloqueadoras dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 diminuem as propriedades de incentivo de recompensas naturais e de drogas. Conclusões similares foram obtidas utilizando outras abordagens para perturbar experimentalmente as vias dopaminérgicas (ROBINSON e BERRIDGE, 2000).

Mudanças nos níveis extracelulares de dopamina dentro do núcleo accumbens e em outras estruturas encefálicas podem ser medidas *in vivo* utilizando um cateter de microdiálise. Embora esse método não possa medir a dopamina dentro das sinapses individuais, pode fornecer estimativas quantitativas que se correlacionam com a liberação sináptica de dopamina. Esse método demonstra que todas as drogas causadoras de adição aumentam os níveis extracelulares de dopamina no núcleo accumbens. Drogas psicotrópicas que não produzem liberação significativa de dopamina no núcleo accumbens não causam adição (KANDEL et al., 2014).

Algumas drogas, como os opioides, também têm receptores em vias da recompensa que são paralelas ou a jusante (mais adiante na via) às sinapses dopaminérgicas. Os opioides produzem a sensação de recompensa por meio de mecanismos tanto dependentes quanto independentes da dopamina. Camundongos geneticamente modificados de modo a não terem dopamina não parecem encontrar recompensa na cocaína, mas parecem encontrar significativa recompensa residual utilizando morfina. Os efeitos dos opioides sobre a recompensa são mais complexos do que aqueles dos psicoestimulantes. Os opioides semelhantes à morfina, incluindo

a heroína (que é metabolizada produzindo morfina), a metadona e a oxicodona, ligam-se com maior afinidade a receptores  $\mu$ . Os receptores  $\mu$  são encontrados em diversas regiões do encéfalo e da medula espinhal, onde têm diferentes funções. No tronco encefálico e na medula espinhal, desempenham um papel crítico na modulação da informação da dor. Em outras regiões do tronco encefálico, desempenham um papel no controle da respiração, razão pela qual uma superdosagem de opioides pode causar parada respiratória (JOHNSON e NORTH, 1992).

Os receptores  $\mu$  também são encontrados em todo o circuito de recompensa do encéfalo. Na área tegmentar ventral, são encontrados em interneurônios GABAérgicos, inibindo tonicamente os neurônios dopaminérgicos que se projetam para o núcleo accumbens e para o córtex pré-frontal. A ligação de opioides a esses receptores  $\mu$  inibe os interneurônios, resultando na desinibição dos neurônios dopaminérgicos e na liberação de dopamina. Uma vez que os receptores  $\mu$  também estão expressos em neurônios do núcleo accumbens, os opioides também podem exercer efeitos de recompensa, independentemente de sinais de entrada dopaminérgicos (KANDEL et al., 2014).

## **2.6 Fármacos empregados no tratamento de dor neuropática utilizados neste estudo**

### **2.6.1 Morfina**

Os opioides são analgésicos que mimetizam a ação dos peptídeos opioides endógenos. Foram isoladas quatro famílias de peptídeos endógenos: as encefalinas, as endorfinas, as dinorfinas e as nociceptinas (HUGHES et al., 1975) que têm como precursores a pró-encefalina (pró-encefalina A), a pró-opiomelanocortina (POMC) e a pró-dinorfina (pró-encefalina B) (PASTERNACK, 1993). Cada família deriva de um polipeptídio precursor distinto e distribui-se de modo particular (KOSTERLITZ, 1985; DICKENSON e SUZUKI, 1999).

Foram identificadas três classes distintas de receptores opioides no SNC que exercem atividade marcante na supressão da dor - os receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\sigma$  (FINLEY et al., 2008). Os peptídeos opioides endógenos apresentam seletividade diferente para

as várias classes de receptores opioides (HERTZ, 1987; RESINE e PASTERNAK, 1996).

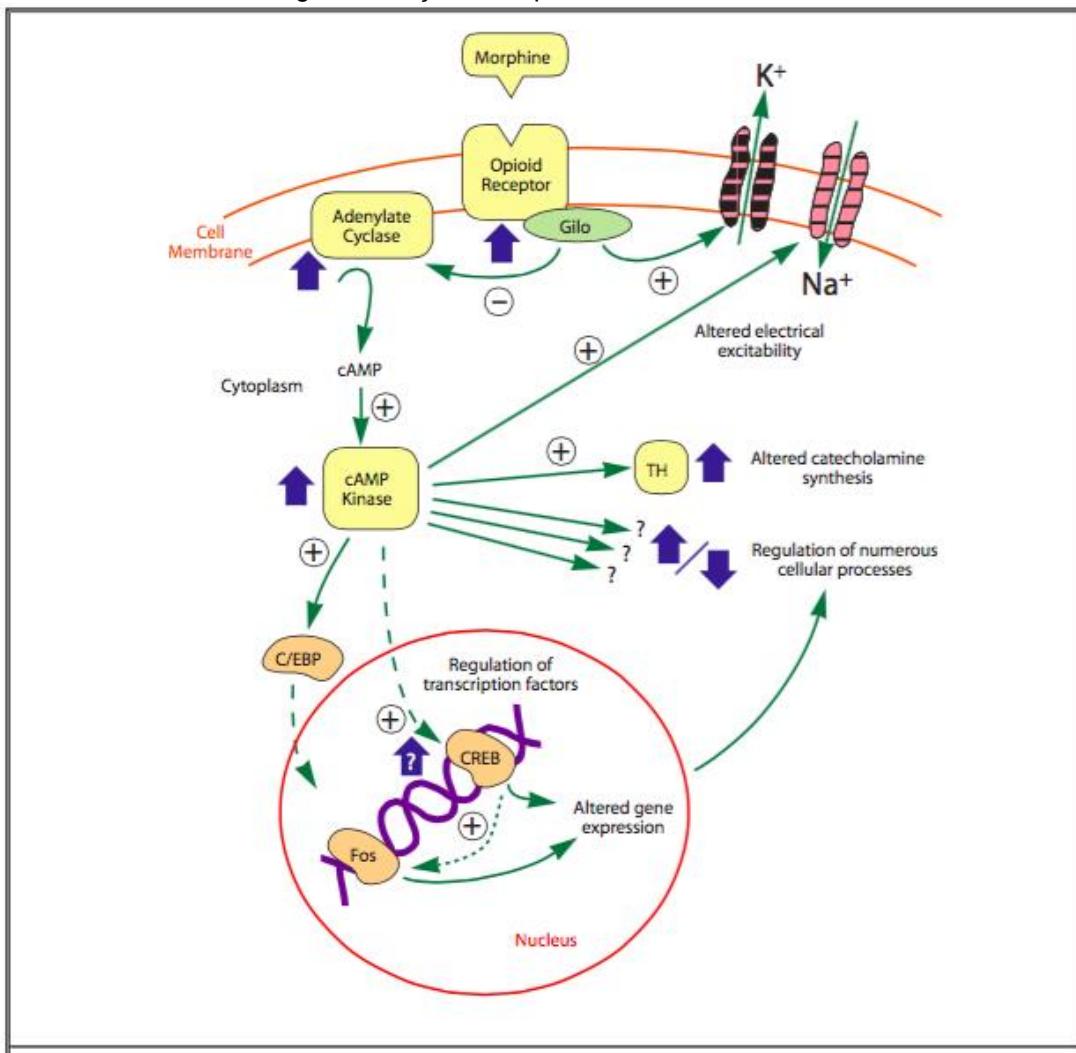
Os sítios receptores para opioides foram isolados com técnicas de imuno-histoquímica e de autoradiografia. Uma elevada concentração de receptores está localizada no corno dorsal da medula espinal (lâminas I e II), no núcleo do nervo trigêmeo, no tálamo, no hipotálamo, na substância cinzenta periaquedatal, nos núcleos da rafe, na região ventral e superior do bulbo e da ponte e no *locus coeruleus*. Algumas dessas regiões estão relacionadas às vias inibitórias descendentes que modulam a transmissão do estímulo doloroso (VALLE et al., 2001; MOLLOY, 2002). Observa-se, também presença de receptores na amígdala, no córtex cerebral, no hipocampo, no núcleo caudado e no globo pálido, na medula suprarrenal, nos plexos nervosos e nas glândulas exócrinas do estômago e intestino, sugerindo a participação dos opioides também na regulação do comportamento motor, afetivo, neurovegetativo e neuroendócrino (PASTERNACK, 1993).

A transmissão nociceptiva é inibida pelos opioides em diferentes regiões do sistema somatossensitivo e supressor das vias de dor (INGRAM, 2000). Em nível molecular, os receptores opioides estão acoplados à proteína G e, uma vez acionados, provocam uma alteração dos canais iônicos, da disponibilidade do cálcio intracelular e da fosforilação de proteínas. Os opioides podem inibir a passagem do estímulo nervoso, hiperpolarizando as membranas celulares pré - ou pós-sinápticas. Isso está relacionado ao aumento da saída de potássio do compartimento intracelular, ou à redução da entrada de cálcio nas terminações pré-sinápticas, com menor liberação de neurotransmissores excitatórios (como acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina e substância P) na fenda sináptica (SILVA, 2010).

A ligação dos opioides ao receptor ativa outras moléculas celulares, denominadas segundos mensageiros. Dessa forma, ocorre uma sequência de eventos complexos no interior da célula (Figura 2). O segundo mensageiro mais conhecido é o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), sintetizado a partir da ativação da enzima adenilatociclase. O AMPc modifica a ação de outras enzimas envolvidas na fosforilação de proteínas. Também, os compostos alfa e beta adrenérgicos, colinérgicos muscarínicos e serotoninérgicos estão acoplados à adenilatociclase, cuja atividade é modulada pela guanosina trifosfato (GTP) da proteína G. As proteínas G são formadas por três subunidades (alfa, beta e gama) e

inibem ou estimulam a adenilatociclase. Os receptores opioides estão associados à adenilatociclase por meio da proteína G inibitória, provocando, assim, uma diminuição dos níveis de AMPc (TRESCOT et al., 2008).

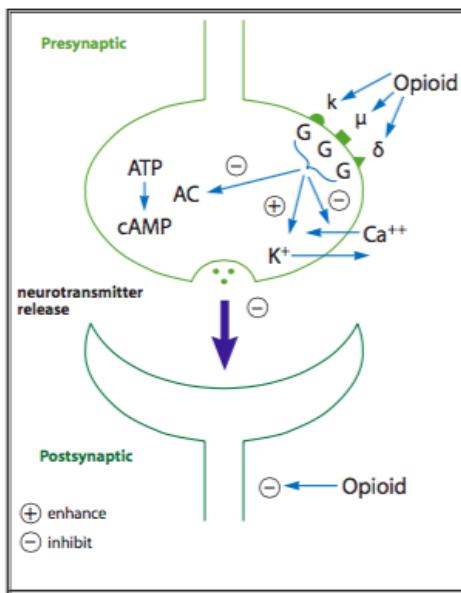
Figura 2 – Ação dos opioides dentro da célula



Fonte: Retirado de Trescot et al. (2008).

Existem diferenças entre os opioides quanto à capacidade de ligação nos seus receptores. Ao serem ativados pelos agonistas opioides, os receptores opioides localizados nas terminações pré-sinápticas das fibras nociceptivas C e A $\delta$  inibem os canais de Ca $^{++}$  dependentes de voltagem, resultando na redução das concentrações do AMPc e no bloqueio da liberação de neurotransmissores excitatórios como glutamato, substância P - peptídeo relacionado geneticamente à calcitonina (CGRP), resultando em alívio da dor (TRESCOT et al., 2008).

Figura 3 – Mecanismo de ação dos opioides



Fonte: Retirado de Trescot et al. (2008).

Tabela 1 – Peptídeos endógenos, agonistas e antagonistas, seus receptores e resultados de sua estimulação

Peptídeos endógenos e fármacos opioides	Receptores opioides				
	Mu ( $\mu$ )	Delta ( $\delta$ )	Kappa ( $\kappa$ )	ORL-1	
	OP3 ou MOR	OP1 ou DOR	OP2 ou KOR	-	
$\mu$ 1 – Analgesia $\mu$ 2 - Sedação, vômito, depressão respiratória, prurido, euforia, retenção urinária, dependência física e liberação de prolactina	Analgesia espinal		Analgesia, sedação, dispneia, efeitos psicomiméticos, miose, depressão respiratória, euforia e disfória	Dor, estresse, emoções, respiração, termorregulação, nociceção, apetite e ação imunológica	
Peptídeos endógenos					
Encefalinas	Agonista	Agonista	-	-	
$\beta$ - endorfina	Agonista	Agonista	-	-	
Dinorfina A	Agonista	-	Agonista		
Nociceptina ou Orfanina	-	-	-	Agonista	
Fármacos opioides					
Morfina	Agonista	-	Agonista fraco	-	
Codeína	Agonista fraco	Agonista fraco	-	-	
Fentanila	Agonista	-	-	-	
Meperidina	Agonista	Agonista	-	-	
Metadona	Agonista	-	-	-	
Antagonistas					
Naloxona	Antagonista	Antagonista fraco	Antagonista	-	
Naltrexona	Antagonista	Antagonista fraco	Antagonista	-	

Fonte: Retirado de Trescot et al. (2008).

A morfina é um dos principais ativos do ópio. É absorvida por todas as vias de administração. O início de sua ação analgésica ocorre em 20 a 40 minutos e sua biodisponibilidade é baixa (aproximadamente 25%) (VALVERDE, 2010). A morfina é comumente utilizada na gestão da dor aguda e crônica (MAO et al., 2002). No entanto, o tratamento com opiáceos como a morfina leva à tolerância analgésica

(ZHU et al., 2012). Os mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento da tolerância induzida por opioides ainda não estão completamente elucidados (MACEY et al., 2009), porém a ação da morfina no receptor  $\mu$  na medula espinal produz inibição na atividade da adenilatociclase e reduz a formação de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Por outro lado, a diminuição do AMPc ativa a proteína cinase C (PKC), que fosforila a G<sub>1</sub> glutamil transpeptidase acoplada ao receptor  $\mu$ , enzima que inativa a adenilatociclase. O emprego de opioides também pode aumentar a atividade da adenilatociclase e do AMPc, caso haja aumento da PKC. A PKC é responsável por outras alterações na membrana, como: (1) modulação dos canais de potássio, facilitando a passagem do estímulo nervoso; (2) aumento da ação da fosfolipase C nos lipídeos da membrana com produção de fosfatidil inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>), mobilizando as reservas de cálcio do meio intracelular, e de diacilglicerol (DAG), que ativa a PKC e aumenta a entrada de cálcio no meio intracelular; (3) o aumento de cálcio intracelular facilita a produção de substâncias agressivas ao neurônio, como metabólitos do ácido araquidônico, óxido nítrico e ativação de proto-oncogenes; (4) redução do bloqueio dos canais de NMDA pelo magnésio e aumento da ação dos neurotransmissores excitatórios, como o glutamato. Assim, no mecanismo intracelular da tolerância, há uma hiperexcitabilidade das células do corno dorsal da medula espinal semelhante ao que ocorre para a transmissão do estímulo doloroso (JONHSON e FLEMING, 1989).

Evidências recentes identificam as células da glia como potenciais causadoras de tolerância por liberar várias citocinas pró-inflamatórias e fatores neurotróficos que levam à regulação da função neuronal, incluindo a transmissão sináptica. Exerceriam, assim, um papel crítico na perda da eficácia antinociceptiva de opioides como a morfina (ZHOU et al., 2010).

A ativação de células gliais na medula espinal foi capaz de promover a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , metaloproteinases e IL-6, que antagonizam a analgesia referente à morfina e causaram tolerância analgésica por meio da sensibilização medular, em particular dos neurônios do corno dorsal (BERTA et al., 2012). A administração intratecal do antagonista do receptor de IL-1, por sua vez, possibilitou o aumento da analgesia da morfina (JOHNSTON et al., 2004).

O flavopiridol é uma flavona sintética capaz de suprimir a ativação de astrócitos (KAO et al., 2012). A morfina foi utilizada neste estudo para induzir a

ativação astrocitária e o posterior desenvolvimento de tolerância analgésica, que foi revertida pelo uso do flavopiridol. Por outro lado, foi verificado que o flavopiridol não foi capaz de suprimir a micróglia, ficando caracterizado que os astrócitos estão mais fortemente envolvidos na indução da tolerância à morfina.

Os níveis de expressão de GFAP na medula espinal não foram afetados pelo tratamento repetido com morfina, embora no mesencéfalo tenha ocorrido aumento da expressão do GFAP. Em estudos realizados com a MMP-9 (metaloproteinase de matriz 9), após o tratamento agudo com morfina, foi relatado ativação astrocitária e posterior produção persistente de MMP-9 no mesencéfalo, diferentemente dos astrócitos da medula espinal que não foram ativados e não produziram MMP-9 (TSUDA et al., 2011).

Para compreensão do papel das células gliais no desenvolvimento de tolerância à morfina, foi utilizada a pentoxifilina e o flavopiridol (ambos inibidores da ativação das células gliais) (NAKAMOTO et al., 2012). O tratamento sistêmico ou focal com pentoxifilina mostrou suprimir completamente o desenvolvimento da tolerância analgésica à morfina (HAMMED et al., 2010).

A supressão das células gliais induzida pela pentoxifilina na medula espinal está envolvida na inibição da tolerância analgésica da morfina, com base em estudos que mostraram que a morfina age diretamente sobre os receptores  $\mu$ -opioides encontrados em células gliais da medula espinal (MIKA et al. 2009).

São reportadas diminuições na função imune após a utilização de morfina. Estudos *in vitro* mostraram que células polimorfonucleares e monócitos de pacientes submetidos ao tratamento com morfina apresentavam propriedades fagocíticas severamente deprimidas (TUBARO et al., 1985). Em camundongos, o tratamento crônico com morfina causou atrofia tímica e alterações em subpopulações de timócitos (ARORA et al., 1990), assim como a exposição aguda de morfina em camundongos é associada com a depleção da atividade do baço e timo, redução do componente C3 do sistema complemento e diminuição de leucócitos circulatórios periféricos, e dos linfócitos T e B circulantes (LEVIER et al., 1994).

Em ratos, os dados disponíveis indicam que o tratamento agudo com morfina suprime respostas mitogênicas proliferativas nos esplenócitos e linfócitos sanguíneos (FLORES et al., 1996), além de também produzir a supressão da atividade de células NK esplênicas (SHAVIT et al., 1984).

Ambas, morfina e metadona, induziram ao aumento da densidade das células dos cordões medulares dos gânglios linfáticos mesentéricos. Esses resultados são indicativos de um aumento do número de plasmócitos e sugerem efeito sobre a imunidade humorai. Além disso, a metadona (em contraste com a morfina), em doses elevadas, foi associada a um aumento na concentração de IgG no soro (VAN DER LAAN et al., 1995).

### **2.6.2 Metadona**

A metadona é um opioide sintético agonista  $\mu$ . Constitui uma mistura racêmica de dois enantiômeros, sendo também uma potente antagonista do receptor NMDA, tornando-a útil na dor neuropática severa e quando há resistência aos opioides. A metadona não está relacionada aos opioides padrão que podem conduzir a alergias por exemplo. É uma droga lipofílica com uma excelente (embora altamente variável) biodisponibilidade oral (40% a 100%), sendo biotransformada no fígado e no intestino e excretada quase que exclusivamente nas fezes, uma vantagem para pacientes com insuficiência renal. Devido a sua elevada solubilidade lipídica, é redistribuída para o tecido adiposo e possui uma fase de eliminação longa, com a meia-vida plasmática entre 12 e 150 horas (MOOLCHAN et al., 2001).

A metadona também tem o potencial de dar início a torsade de pointes, uma arritmia potencialmente fatal causada por um prolongamento do intervalo QT, e situações que prolongam o intervalo QT como hipomagnesemia podem aumentar o risco (KRANTZ et al., 2002). É utilizada como analgésico especialmente em programas de reabilitação, desintoxicação de dependentes de opioides e manutenção temporária da analgesia quando há objetivo de se suprimir outros opioides (TEIXEIRA e TEIXEIRA, 2006).

A imunossupressão causada pela metadona não é puramente uma resposta opioide clássica, mas envolve receptores opioides não clássicos localizados em nível central e a metadona mostrou suprimir a ativação da micróglia e alterar a produção de diversas citocinas inflamatórias no SNC, promovendo, dessa forma, redução da desmielinização e da lesão axonal na encefalomielite autoimune experimental, com aumento da produção de IL-6 e IL-17 e redução da de IL-2 e IFN- $\gamma$  (KAFAMI et al., 2013).

Estudos anteriores indicam que os opioides interagem com o sistema imune e modulam uma variedade de parâmetros imunológicos (TSUDA et al., 2011; SHINICHI et al. 2013). Tais estudos têm mostrado que os opioides modulam aspectos tanto inatos quanto adaptativos de resposta imunitária (MCCARTHY et al., 2001; RISDAHL et al., 1998) por meio da modificação da atividade dos principais tipos de células imunes, incluindo as células natural killer (NK), os linfócitos T e B, os macrófagos e os leucócitos polimorfonucleares (PMN). Tem sido demonstrado que as células imunitárias, predominantemente as células T, expressam vários receptores opioides originalmente descritos em tecidos neuronais, o que pode explicar como compostos opioides atuam como imunomoduladores capazes de modificar a resposta imune celular e humoral (VALLEJO et al., 2004; SHARP, 2003).

### 2.6.3 Amitriptilina

A amitriptilina é um conhecido fármaco da classe dos antidepressivos. Sua classificação como antidepressivo tricíclico (ADT) provém de sua farmacodinâmica e também de sua fórmula estrutural bioquímica (amina terciária). Seu mecanismo de ação consiste em inibir a receptação de serotonina (5-HT) na fenda sináptica, mecanismo que aumenta a disponibilidade sináptica dessa monoamina em certas áreas do encéfalo. Tem rápida absorção após a administração oral, praticamente completa em geral após um período de 4 horas e liga-se a proteínas plasmáticas (75-97%) (SILVA, 2010). A limitada biodisponibilidade por via oral e a extensa biotransformação hepática são características farmacocinéticas dos ADTs. A principal enzima envolvida no metabolismo de primeira passagem é a CYP2D6, que faz parte do complexo microssomal citocromo P450 (VERDU et al., 2008). Sua meia vida plasmática é da ordem de 20 a 30 horas, com eliminação via renal da droga.

Nos transtornos de humor, o principal mecanismo de ação é o bloqueio da receptação de serotonina e de noradrenalinana na fenda sináptica. Até o momento, porém, não há comprovação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos quando usada nas condições da dor neuropática. No entanto, acredita-se que sua ação sobre as monoaminas (serotonina e noradrenalina) permite a interação das mesmas sobre os seus respectivos receptores localizados nos interneurônios inibitórios do corno dorsal da medula espinal, intensificando o número de sinapses, o que leva ao consequente aumento do limiar de ativação dos neurônios secundários da via

nociceptiva. A condução do estímulo doloroso ao tálamo torna-se prejudicada e o resultado disso é uma resposta menor a essa condição. Há relatos que demonstram a ligação dos ADTs aos receptores opioides, embora alguns autores afirmem que a afinidade é muito baixa em doses terapêuticas (VERDU et al., 2008).

Outra ação da amitriptilina é o antagonismo de receptores NMDA, canais de sódio e canais de Ca<sup>++</sup> voltagem-dependentes (SINDRUP et al., 2005). Tal ação representa mais um aspecto que pode estar relacionado ao papel desses agentes na analgesia da dor neuropática (VERDU et al., 2008), já que a inibição destes canais pode diminuir impulsos nervosos, levar à hiperpolarização dos neurônios envolvidos na dor, inibir a exocitose de substâncias estimulatórias da resposta à dor (como glutamato e substância P), dentre outras ações indiretas a esse bloqueio.

Como já é conhecido, a noradrenalina e a serotonina, apesar de atuarem como substâncias inibitórias da via nociceptiva em nível central, por meio da sua modulação pelo *locus coeruleus* e núcleo magno da rafe, respectivamente, em nível periférico apresentam ação algica. Como a amitriptilina é capaz de bloquear os receptores noradrenérgicos e serotoninérgicos nesse nível, esses fármacos podem contribuir também para analgesia periférica (MEDAWAR e MATHEUS, 2012).

Em estudo com infusão intratecal de amitriptilina e morfina, não foi observado qualquer efeito antinociceptivo mediante utilização diária de amitriptilina durante cinco dias. Com relação à morfina, o efeito máximo antinociceptivo foi de um dia, com tolerância observada do segundo ao quinto dia. Em contraste, o efeito antinociceptivo da morfina foi mantido durante os cinco dias quando administrada concomitantemente com a amitriptilina (HUANG et al., 2012).

A infusão de amitriptilina com morfina atenuou a tolerância antinociceptiva da morfina e a ativação de astrócitos em ratos tolerantes à morfina (SHARP, 2006; LIN et al., 2010). Esse mecanismo pode ser explicado, pois a amitriptilina inibe a sinalização intracelular induzida pelo receptor NMDA, agindo como um antagonista do receptor NMDA ou funcionalmente interagindo com o mesmo (TAI et al., 2006). A ativação da densidade pós-sináptica da PSD-95 (proteína 95) mediada pela corrente do receptor NMDA sinaliza uma cascata, incluindo a óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) e a proteína gama cinase (PKC-γ), que possivelmente estão envolvidas com a tolerância à morfina (TAI et al., 2006). Esses resultados reforçam a sugestão de que a amitriptilina preserva o efeito antinociceptivo da morfina pela baixa expressão

na regulação sináptica da subunidade NR1, inibindo a transdução de sinal mediada pelo receptor NMDA (HUANG et al., 2012; EISENACH e GEBHART, 1995).

Há claras evidências de que existem interações entre o SNC e o sistema imune periférico. Logo, a ativação do sistema imune influencia a função nervosa, assim como o SNC modula as respostas imunes. A ligação mais importante encontrada entre o sistema imune e o SNC ocorre por meio da rede de citocinas. As citocinas pró-inflamatórias têm efeitos profundos no SNC e na função endócrina. A aumento no metabolismo central de monoaminas e são potentes ativadores do eixo hipotálamo hipofisário adrenal. Pesquisas com humanos, ratos e *in vitro* indicam que antidepressivos modulam a produção de citocinas, no entanto os métodos utilizados para investigar essas mudanças na homeostase de citocinas diferem entre os estudos reportados, gerando resultados divergentes e contraditórios (KENIS e MAES, 2012). Esse aumento de citocinas pró-inflamatórias ocorre na depressão maior em humanos e está correlacionado com a severidade das desordens psiquiátricas (MAES, 1995). Como a depressão pode ser considerada uma doença genética e os genes do sistema imune em relação à depressão maior estão sendo investigados, tem sido sugerido que determinados polimorfismos dos genes que codificam as citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1, gerando diminuição na resposta imune (ROSA et al., 2004).

#### **2.6.4 Gabapentina**

A gabapentina é um composto estruturalmente relacionado ao aminoácido GABA. A inibição da função dos canais de sódio e cálcio afeta a excitabilidade da membrana celular por meio do bloqueio de canais de sódio voltagem-dependentes. A gabapentina também age sobre os canais de cálcio tipo L, que inibe a liberação de glutamato aumentando assim o limiar para a excitação neuronal (MANCUF, LUO e LEE, 2006). É absorvida oralmente, com biodisponibilidade em torno de 59%. As concentrações plasmáticas máximas são obtidas 2-3 horas após a administração. A meia-vida da droga é de 5-6 horas, não sendo metabolizada e não se ligando a proteínas plasmáticas. Também não é inibidor nem indutora enzimática, não interferindo com a biotransformação de drogas antiepilepticas comumente usadas (SILVA, 2010).

A utilização dos anticonvulsivantes na dor neuropática é justificada pelas semelhanças entre os mecanismos fisiopatológicos dessa condição e da epilepsia, devido especialmente à hiperexcitabilidade neuronal presente em ambas (SANTOS et al., 2011). Os efeitos analgésicos da gabapentina não são afetados pelos antagonistas opioides e administrações repetidas de gabapentina não desenvolvem tolerância analgésica (FIELD et al., 1997). No entanto, os mecanismos subjacentes dos efeitos analgésicos da gabapentina não estão completamente elucidados (Lee et al., 2013). Os gabapentinoides (isto é, gabapentina e pregabalina) são os agentes farmacológicos com maior número de evidências científicas dentre os demais anticonvulsivantes nas condições de dor neuropática (PARK et al., 2010).

Foi demonstrado efeito supressor da expressão de receptores  $\alpha2\delta1$ , receptores estes que regulam as sinapses excitatórias e estão relacionados com a supressão da resposta reativa microglial (ROSENBERG et al., 1997). Em estudo com modelo experimental, o tratamento com a gabapentina foi capaz de reduzir a degeneração neuronal induzida pelo estado epilético. A inibição parcial da degeneração neuronal foi identificada via técnica padrão de imunoperoxidase e fluorescência, utilizando anticorpos, especialmente no hipocampo. Além disso, o tratamento com a gabapentina reduziu a intensidade da gliose reativa, tanto em células microgliais como nas astrogliais. Esse resultado está de acordo com o efeito descrito em modelos experimentais de dor e a ação parcialmente protetora em neurônios pode estar relacionada com a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células gliais (YANG et al., 2012).

Lee e colaboradores (2013), após administração intratecal de gabapentina, obtiveram efeito anti-alodiníaco em um modelo de dor neuropática, efeito que pode ser explicado, em parte, por uma redução induzida pela gabapentina na expressão de citocinas pró-inflamatórias na medula espinhal, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Foi observado também o aumento da expressão de IL-10. Tais observações tomadas em conjunto, sugerem que a administração intratecal de gabapentina promoveu um vantajoso controle sobre a neuroinflamação.

### **3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

#### **3.1 O presente artigo será enviado para publicação para a revista Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**

##### **Astrocytic expression of GFAP and plasma levels of IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ in rats treated with different pain relievers**

Gisele Ferreira Amaral<sup>1</sup>, Pietro Domingues Dossa<sup>1</sup>, Lígia Bocamino Viebig<sup>1</sup>, Fabiana Toshie Camargo Konno<sup>1</sup>, Amanda Consoli<sup>2</sup> Maria de Fátima Monteiro Martins<sup>1,3</sup>, Flávio Cesar Viani<sup>3</sup>, Eduardo Fernandes Bondan<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental and Experimental Pathology, Universidade Paulista, São Paulo, SP, Brazil; <sup>2</sup>Departament of Psychobiology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; <sup>3</sup>Department of Veterinary Medicine, Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, SP, Brazil

\*Correspondence: E. Bondan. Departamento de Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista. Rua Conde, 125/51, 01425-011, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: bondan@uol.com.br

Pro-inflammatory cytokines and glial cells, especially microglial cells, have been implicated in persistent pain sensitization. Less is known about the role of astrocytes in its regulation. The aim of this study was to measure, after the administration of short-term therapeutic doses of some commonly used neuropathic pain relievers in healthy rats, the plasma levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and the expression of the astrocytic biomarker GFAP. Male Wistar rats were divided into 5 groups, receiving for 9 days- (1) amitriptyline (Amt- 10 mg/kg/day, by gavage); (2) gabapentin (Gb - 60 mg/kg/day, by gavage); (3) methadone (Me- 4,5 mg/kg/day, intraperitoneal route- IP); (4) morphine (Mo- 10 mg/kg/day, IP); or (5) 0.9% saline solution, IP. Brain samples were collected for immunohistochemical study for GFAP expression in the brainstem and nucleus accumbens (NAc). The area of GFAP-positive cells was calculated using Metamorph software and plasma levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were measured by ELISA. Plasma TNF- $\alpha$  levels were decreased in the groups treated with Mo, Me and Gb, but not in the Amt-treated group. IL-1 $\beta$  decreased only in rats treated with Me. The astrocytic expression of GFAP was decreased in the brainstem with all drugs, while it was increased in the NAc with Amt, Me and Mo.

**Uniterms:** astrocytes, cytokines, analgesics, neuropathic pain.

## **Expressão astrocitária da proteína fibrilar glial ácida (GFAP) e concentrações plasmáticas de TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ em ratos tratados com amitriptilina, gabapentina, metadona e morfina**

Citocinas pró-inflamatórias e células gliais, principalmente micróglia, têm sido implicadas na sensibilização da dor persistente. Pouco é conhecido sobre o papel dos astrócitos nessa regulação. O objetivo do estudo foi o de medir, após administração em ratos saudáveis de doses terapêuticas de curta duração de algumas drogas comumente utilizadas no tratamento da dor neuropática, os níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e a expressão do marcador astrocitário GFAP. Ratos Wistar machos foram divididos em 5 grupos, recebendo por 9 dias- (1) amitriptilina (Amt- 10 mg/kg/dia, por gavagem solução); (2) gabapentina (Gb- 60 mg/kg/dia, por gavagem); (3) metadona (Me- 4,5 mg/kg/dia, via intraperitoneal - IP); (4) morfina (Mo- 10 mg/kg/dia, IP); ou (5) salina a 0.9%, IP). Amostras do encéfalo foram coletadas para estudo imuno-histoquímico da expressão astrocitária de GFAP no tronco encefálico e núcleo accumbens (NAc). A área das células GFAP-positivas foi calculada com uso do programa Metamorph e os níveis plasmáticos de citocinas foram determinados por ELISA. Enquanto os níveis de TNF- $\alpha$  diminuíram nos grupos tratados com Mo, Me and Gb, a IL-1 $\beta$  diminuiu apenas com a Me. A expressão astrocitária de GFAP diminuiu no tronco encefálico com todas as drogas, enquanto aumentou no NAc com Amt, Me e Mo.

**Unitermos:** astrócitos, citocinas, analgésicos, dor neuropática.

### **3.2 Introduction**

A wide range of drugs such as antidepressants, anticonvulsants, local anesthetics and opioid analgesics, among others, are frequently used in situations of acute, chronic and neuropathic pain (Lynch and Watson, 2006). Although pain is considered traditionally as neuronally mediated, recent research shows an important role of glial cells in persistent pain sensitization. There is abundant evidence that certain pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are involved in the process of pathological pain (Watkins et al., 2003; Hutchinson et al., 2007; Ji et al., 2013) and many pain relievers are known to diminish central and peripheral cytokine production (De Waal et al., 1998; Kenis and Maes, 2002; Hutchinson and Somogyi, 2004; Vallejo et al., 2004; Sacerdote, 2006; Bao et al., 2014). Moreover, blood-borne cytokines have shown to cross the blood-brain barrier despite their large size and low lipid solubility, by using bidirectional and saturable transport systems (Banks et al.,

1995), thus permitting the existence of a cross-talk between the immune and neuroendocrine systems in the so called neuroimmune-endocrine axis.

Pain modulation exists in the form of a descending modulatory circuit with inputs that arise in multiple sites, including the hypothalamus, the amygdala and the rostral anterior cingulate cortex, feeding to the midbrain periaqueductal gray matter (PAG) and with outputs from the PAG to the medulla oblongata. Neurons within the nucleus raphe magnus and nucleus reticularis gigantocellularis, which are included within the rostral ventromedial medulla, have been shown to project to the spinal dorsal horns to, directly or indirectly, enhance or diminish nociceptive traffic, thus changing the experience of pain (Ossipov et al., 2010). These “top-down” modulatory pathways are opioid-sensitive and the actions of exogenous or endogenous opiates, cannabinoids, serotonin/norepinephrine reuptake blockers, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, among others, mimic, in part, the actions of opiates.

Although microglial cells have been widely implicated in the development of chronic pain, less is known about the role of astrocytes in its regulation. Due to the complexity of the central circuitry for pain modulation, the precise mechanisms by which distinct pain relievers act remain unknown, as well as the effects of such drugs on central nervous system (CNS) cells - neurons and glial cells, specially astrocytes. Thus, the aim of this study was to determine, after the administration of short-term therapeutic doses of amitriptyline (Amt), gabapentin (Gb), methadone (Me) or morphine (Mo) in healthy rats, the plasma levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and to observe the consequent astrocyte response in the brainstem and nucleus accumbens (NAc) through the expression of the astrocytic biomarker GFAP (glial fibrillary acidic protein).

### 3.3 Material and Methods

The animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources and Brazilian Institutional Ethics Committee guidelines, Universidade Paulista (protocol no. 235/14, CEUA/ICS/UNIP, 16/04/2014). The experiments were performed in accordance with good laboratory practice protocols and all efforts were made to minimize the suffering of the animals.

Male Wistar rats were divided into 5 groups of 6 individuals, receiving for 9 days – (1) 0.9% saline solution by intraperitoneal route (IP); (2) Mo (10 mg/kg/day, IP); (3) Me (4.5 mg/kg/day, IP); (4) Gb (60 mg/kg/day, by gavage); or (5) Amt (10 mg/kg/day, by gavage). At the 10<sup>th</sup> day the rats were anaesthetized with xylazine combined with

ketamine (10 mg/kg and 90 mg/kg, respectively, IP) and tiopenthal (30 mg/kg, IP) for thoracotomy and blood was collected by cardiac puncture. The samples were put in 5 mL conical tubes, centrifuged at 1500g for 15 minutes and serum was stored at -80° C. Immediately rats were submitted to intracardiac perfusion with buffered 10% formaldehyde solution. Their brains were then removed and kept for at least 48 hours in the same fixative for immunohistochemical study for GFAP expression in the mesencephalon and nucleus accumbens. Coronal sections were made to collect the nucleus accumbens and the mesencephalon and the tissue was embedded in paraffin for processing according to conventional histological procedures. The nucleus accumbens area was chosen due to its role in processing rewarding and/or reinforcing stimuli and the mesencephalon, for its participation in the pain desensitization pathway (midbrain periaqueductal gray matter - PAG). The expression of the astrocyte marker GFAP (glial fibrillary acidic protein) was analyzed using immunohistochemical staining in sections of the mesencephalon and nucleus accumbens from all groups. Coronal sections were mounted on silanized slides and submitted to GFAP immunostaining using the avidin-biotin peroxidase complex (ABC) method. Briefly, the sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a crescent graded series of ethanol solutions. Antigen retrieval was done by transferring the slides to 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) at 95° C for 20 minutes. Endogenous peroxidase was blocked by 3% hydrogen peroxide for 10 minutes at room temperature. Two washes with Tris/HCl buffer pH 6.0 (Wash buffer 10x, S3006, Dako, Glostrup, Denmark) were done between incubations. Polyclonal rabbit anti-GFAP immunoglobulin (Z0334, Dako), at a dilution of 1:1000, was used as primary antibody, for 16 hours, followed by the application of biotinylated secondary antibody (Dako Universal LSAB™ 2 System - HRP, K0690), according to the manufacturer's instructions. Immunoreactivity was visualized by incubating the sections in a solution containing 0.1% diaminobenzidine (DAB, K3467, Dako). Sections were then counterstained by Harris' modified hematoxylin solution, dehydrated and mounted in Entellan (Merck, Germany). Negative controls for immunostaining (sections lacking primary antibody application) were done.

Ten photomicrographs of each brainstem section and four of each nucleus accumbens section were randomly taken with the same microscope using a 40x objective. The area of astrocyte processes, marked in brown, was automatically calculated in pixels using Metamorph software that was calibrated with digital color filters that regulated red, green, and blue bits, in such a manner that only positive cells were included and background staining was excluded from the measurement.

Data were analyzed by one-way ANOVA and unpaired t test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

Plasma levels of IL-1 $\beta$ b and TNF- $\alpha$  were determined in triplicate using an enzyme-linked immunosorbent assay (ready-to-use sandwich ELISA) according to the manufacturer's instructions (rat IL-1 $\beta$  Platinum ELISA kit, BMS630, and rat TNF- $\alpha$  Platinum ELISA kit, BMS622, eBioscience, San Diego, California, USA). Cytokine results were analyzed using one-way ANOVA and Tukey-Kramer multiple comparisons test, with statistical significance set at  $p < 0.05$ .

### 3.4 Results

No mortality was found in rats treated with the doses and drugs used in this experiment. The plasmatic levels (in pg/dL) of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  from the experimental groups are presented, respectively, in figures 1 and 2. It was observed that, at the 10<sup>th</sup> day of treatment, TNF- $\alpha$  decreased compared to control rats ( $968.31 \pm 88.66$  pg/dL) in the groups receiving Gb ( $484.53 \pm 70.28$  pg/dL), Mo ( $388.53 \pm 17.37$  pg/dL) and Me ( $451.87 \pm 22.47$  pg/dL), but not in the Amt-group ( $867.87 \pm 61.57$  pg/dL). Highly significant differences ( $p < 0.001$ ) were seen between groups Amt vs. Gb, Amt vs. Mo and Amt vs. Me. A significant difference ( $p < 0.05$ ) was found between Gb vs. Mo groups.

As for IL-1 $\beta$ , plasma levels decreased only in the group treated with Me ( $261.56 \pm 41.79$  pg/dL) compared to control rats ( $404.52 \pm 95$  pg/dL) and no differences were seen between groups that received the drugs for pain relief.

The expression of the astrocytic marker GFAP (represented in total pixel counts) in the brainstem (mesencephalon) and in the nucleus accumbens can be seen, respectively, in Figures 3 and 4. In the brainstem, GFAP immunoreactivity was found decreased in the groups treated with Amt ( $24,031.48 \pm 20,235.34$  pixels), Gb ( $31,033.12 \pm 15,923.32$  pixels), Me ( $14,713.75 \pm 13,744.54$  pixels) and Mo ( $11,004.82 \pm 6,593.14$  pixels) in relation to controls ( $42,243 \pm 14,916.46$  pixels). Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between Mo vs. Amt, Mo vs. Gb, Me vs. Amt, Me vs. Gb and Gb vs. Amt, but not in Mo vs. Me. As for the nucleus accumbens, GFAP increased in the groups treated with Amt ( $20,382.75 \pm 14,830.65$  pixels), Me ( $24,075.04 \pm 21,023.05$  pixels) and Mo ( $37,232.63 \pm 21,888.26$  pixels), compared to controls ( $5,602.0 \pm 4,797.88$  pixels), but not in the Gb-group ( $3,827.58 \pm 3,579.64$  pixels). Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between Mo vs. Amt, Mo vs. Gb, Mo vs. Me, Me vs. Gb, Me vs. Gb and Gb vs. Amt, but not in Me vs. Amt.

Astrocytic GFAP immunoreactivity in the brainstem and nucleus accumbens of the different experimental groups are, respectively, presented in Figures 5 and 6.

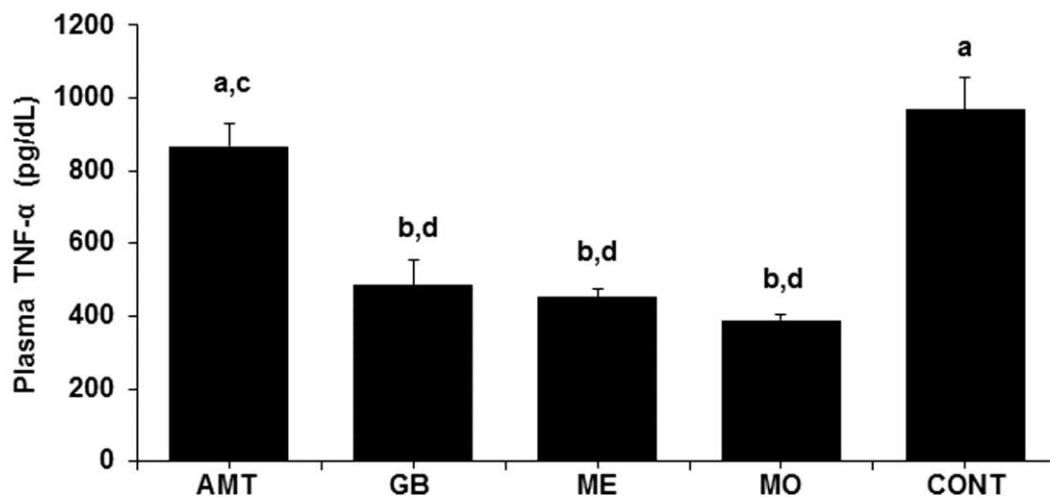


Fig. 1 Plasma concentrations (represented as mean  $\pm$  standard deviation) of TNF- $\alpha$  (pg/dL) in the different experimental groups. AMT - amitriptyline; GB - gabapentin; ME - methadone; MO - morphine; CONT - control group. Different letters indicate significant results ( $p < 0.05$ ). Letters a and b refer to comparisons between drug group vs. control group; c and d refer to comparisons between drug groups.

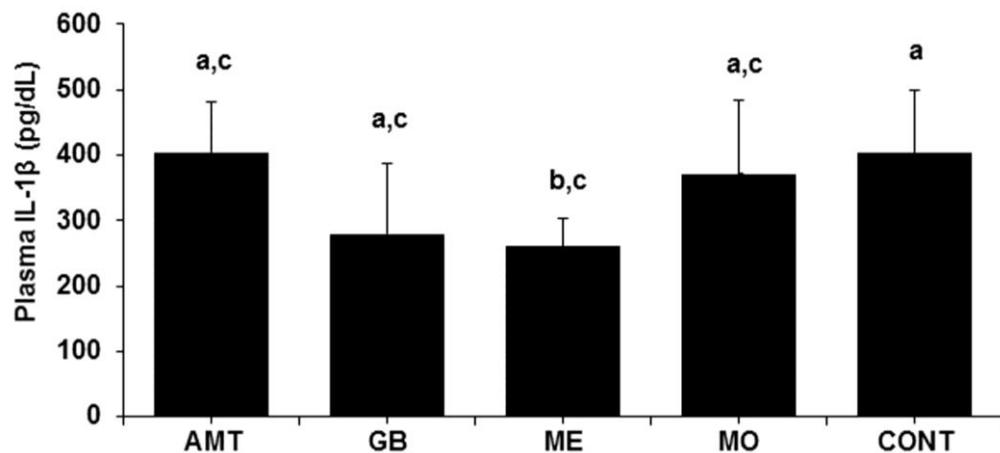


Fig. 2 Plasma concentrations (represented as mean  $\pm$  standard deviation) of IL-1 $\beta$  (pg/dL) in the different experimental groups. AMT - amitriptyline; GB - gabapentin; ME - methadone; MO - morphine; CONT - control group. Different letters indicate significant results ( $p < 0.05$ ). Letters a and b refer to comparisons between drug group vs. control group; c refers to comparisons between drug groups. No differences were found between AMT, GB, ME e MO groups.

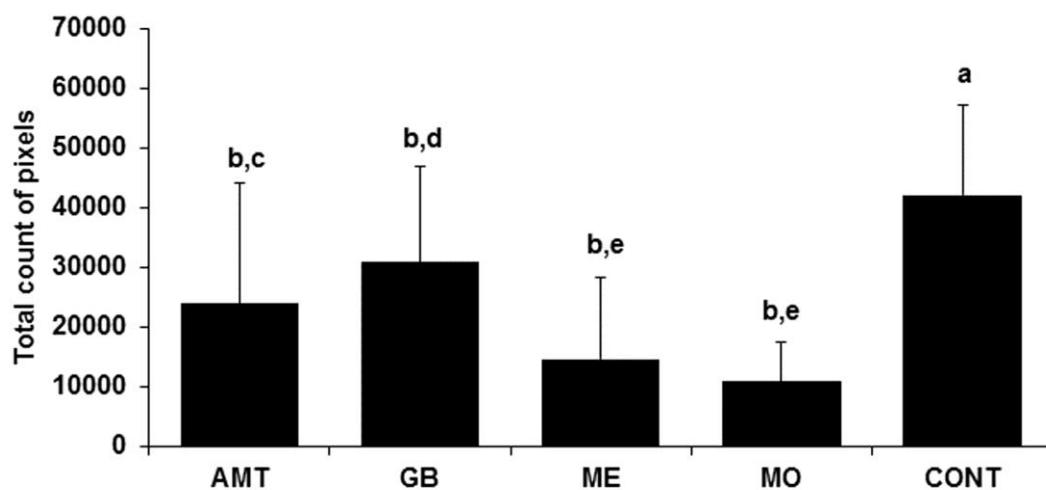


Fig. 3 Total count in pixels of GFAP immunoreactive astrocytes (represented as mean  $\pm$  standard deviation) in the brainstem from the different experimental groups. AMT - amitriptyline; GB - gabapentin; ME - methadone; MO - morphine; CONT - control group. Different letters indicate significant results ( $p < 0.05$ ). Letters a and b refer to comparisons between drug group vs. control group; c, d and e refer to comparisons between drug groups.

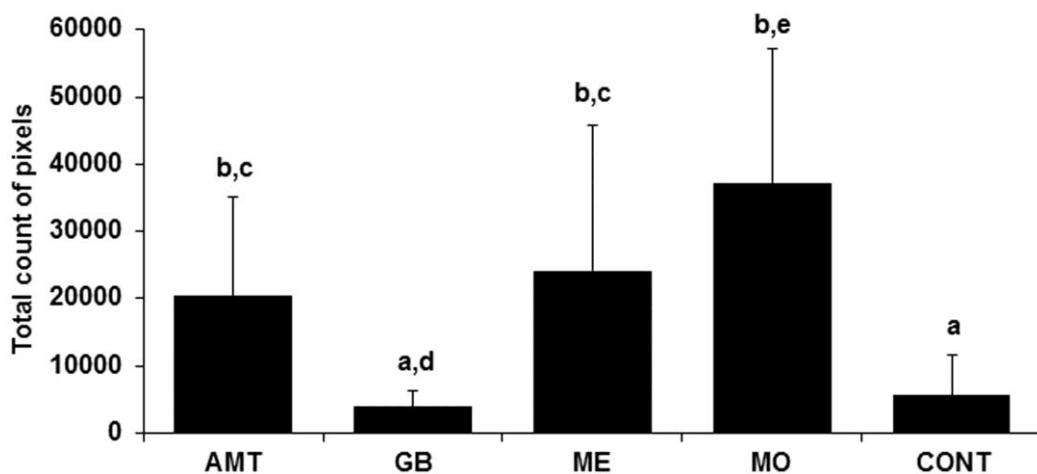


Fig. 4 Total count in pixels of GFAP immunoreactive astrocytes (represented as mean  $\pm$  standard deviation) in the nucleus accumbens from the different experimental groups. AMT - amitriptyline; GB - gabapentin; ME - methadone; MO - morphine; CONT - control group. Different letters indicate significant results ( $p < 0.05$ ). Letters a and b refer to comparisons between drug group vs. control group; c, d and e refer to comparisons between drug groups.

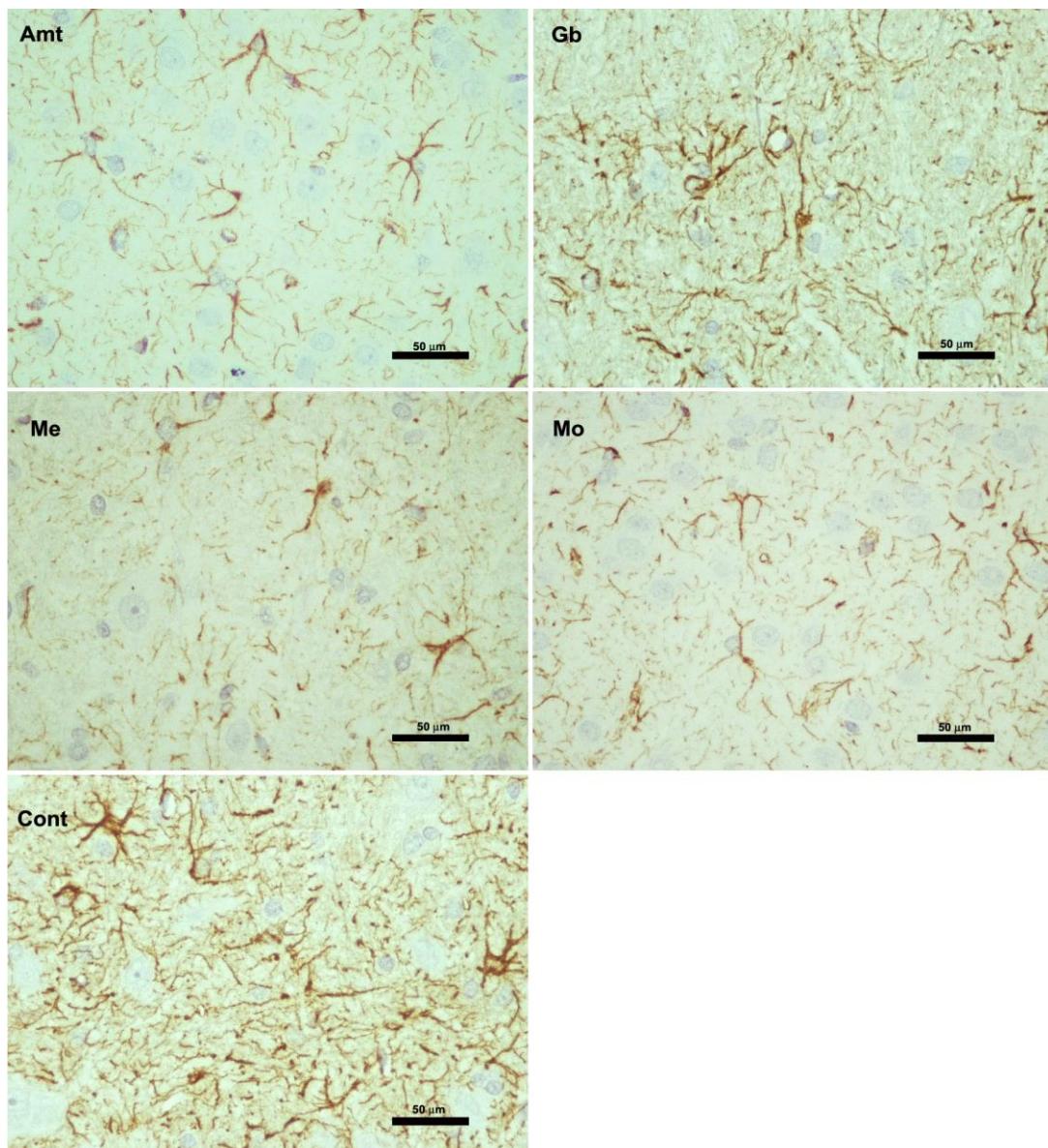


Fig. 5 Astrocytic immunostaining for GFAP in the brainstem (mesencephalon) of the different experimental groups. Amt - amitriptyline; Gb - gabapentin; Me - methadone; Mo - morphine; Cont - control group. Bar = 50  $\mu$ m.

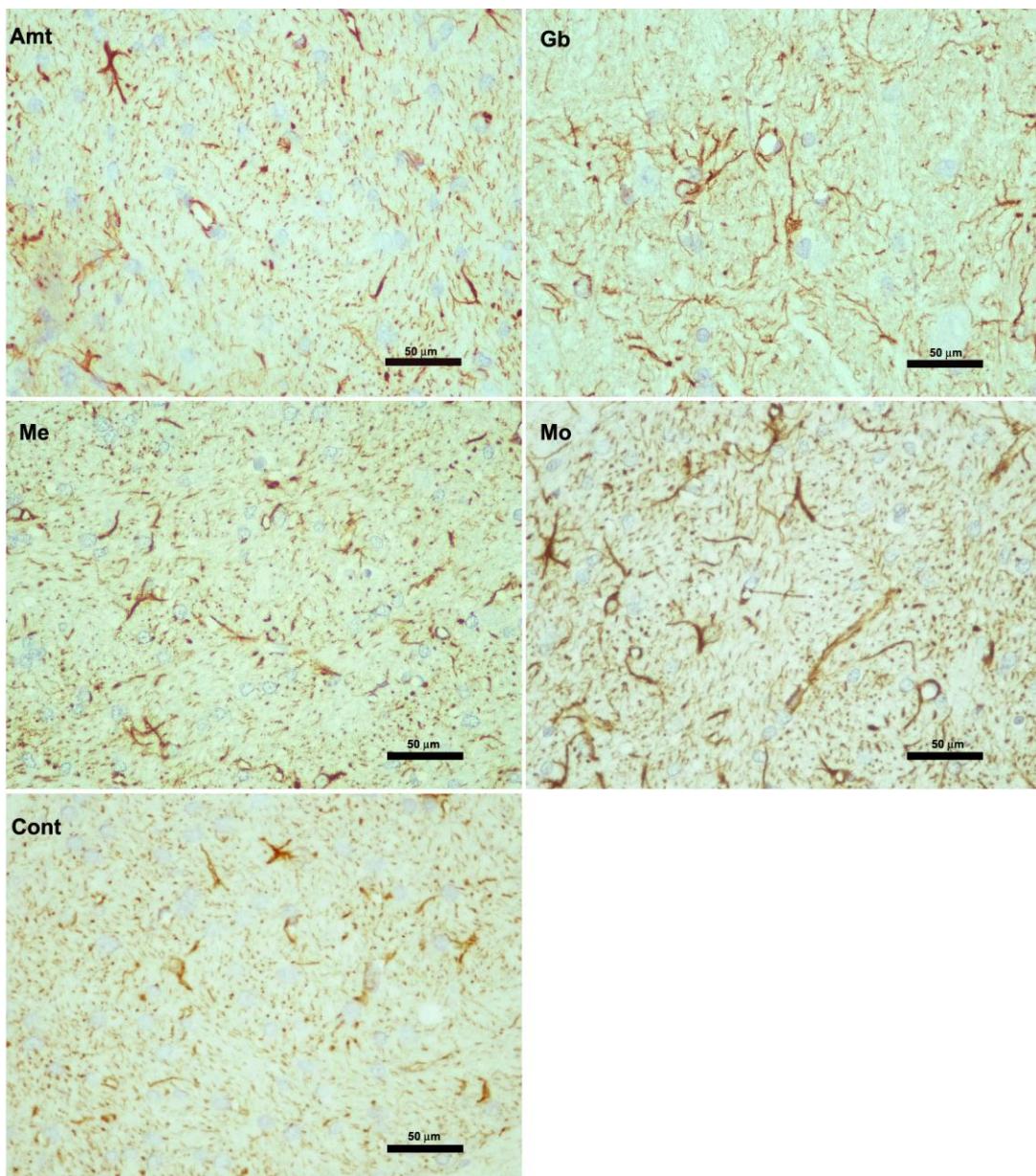


Fig. 6 Astrocytic immunostaining for GFAP in the nucleus accumbens (NAc) of the different experimental groups. Amt - amitriptyline; Gb - gabapentin; Me - methadone; Mo - morphine; Cont - control group. Bar = 50 μm

### 3.5 Discussion

Activation of glial cells and neuro-glial interactions are emerging as key mechanisms underlying chronic pain (Watkins et al., 2003). Accumulating evidence has implicated 3 types of glial cells in the development and maintenance of chronic pain - microglia and astrocytes of the CNS, satellite glial cells of the dorsal root and trigeminal ganglia (Ji et al., 2013).

A number of events, including CNS injury, infection and pain states, lead to hypertrophy of both microglia and astroglia, with a concomitant increased production of a variety of proinflammatory cytokines and other potentially pain-enhancing substances. Increased numbers of such cells and expression of markers such as OX-42 (for microglia) and GFAP (for astrocytes) can be used to identify glial cell activation (McMahon et al., 2005). Microglia appear to be more important in the initial phases of neuropathic pain, while astrocytes are more relevant for later phases (Raghavendra et al., 2003). Although glial activation has been strongly studied in the spinal cord (Scholz and Woolf, 2007), less is known about the microglial and astrocyte responses in brain areas when a noxious stimulus is applied in the periphery.

Current therapeutic strategies for neuropathic pain aim to reduce the excitability of neurons in the peripheral nervous system (PNS) or the CNS by modulating the activity of ion channels ( gabapentin, pregabalin, carbamazepine, lidocaine and capsaicin) or by mimicking and enhancing endogenous inhibitory mechanisms (tricyclic antidepressants, duloxetine and opioids). Preclinical studies have explored other routes for neuropathic pain relief by modulating immune and glial responses. For example, global inhibitors of glial metabolism, such as fluorocitrate, propentofylline, minocycline and teriflunomide, reduce cytokine release and attenuate pain-responsive behavior in several animal models of neuropathic pain (Scholz and Woolf, 2007).

When astrocytes and microglia are not in their activated state, they do not appear to be important regulators of pain transmission. However, when glia become activated, pain is now affected. Peripheral immune activated signaling to the CNS induces sickness responses, including enhanced pain responsivity, fever, increase in sleep, decreases in food and water intake and generalized suppression of behavior (Watkins et al., 2007).

Opioids such as morphine and methadone are known to have profound suppressive effects on the immune system (Van der Laan et al., 1995; de Waal et al., 1998; Hutchinson and Somogyi, 2004). Three distinct opioid receptor classes have been identified and cloned, and are designated  $\mu$ -,  $\kappa$ - and  $\delta$ , and all of them are widely distributed in the CNS and PNS. The expression of opioid receptors on cells of the immune system was first implicated by the ability of opioids to alter immune functions (Rittner et al., 2005). Different opioids have been reported to exert immunosuppressive and modulatory effects on a variety of immune cells, including T and B cells, macrophages and NK cells. Moreover, they have been shown to diminish the levels of inflammatory cytokines, including IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , while enhancing the levels of anti-inflammatory cytokines like IL-4 during immune / inflammatory processes (Suo and Weber, 1998; Sacerdote, 2006; Kafami et al., 2013). Methadone (Me), for instance, a potent  $\mu$ -opioid receptor agonist, has been shown to diminish neuroinflammation and severity of symptoms in experimental autoimmune encephalomyelitis (Kafami et al., 2013). On the other hand, Monibi et al. (2015) did not find any alteration on leucocyte TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 production, on early leucocyte apoptosis and on neutrophil phagocytic function after a 24-hour infusion of morphine (Mo) or buprenorphine in healthy dogs.

An inflammatory response is invariably amplified by migration of leukocytes into the injured tissue, by the production of proinflammatory mediators from migrating cells, including the cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , both implicated in the hyperalgesia of inflammatory pain (Rittner et al., 2005).

Our results show that healthy rats treated for 9 days with the opiate agonists Mo and Me presented decreased plasma levels of TNF- $\alpha$ , although only Me decreased IL-1 $\beta$ . Gb-treated rats also exhibited decreased plasma levels of TNF- $\alpha$ . It is worth of mentioning that the rats used in this investigation were apparently healthy and were not submitted to any noxious stimuli, inflammation or damage to the PNS / CNS or at peripheral sites. Despite this, acute opioid administration is known to have inhibitory effects on humoral and cellular peripheral immune responses including antibody production, NK cell activity, cytokine expression, and phagocytic activity. Opiates behave like cytokines, modulating the immune response by interacting with their receptors in the CNS and in the periphery (Vallejo et al., 2004).

The periaqueductal gray matter (PAG) of the mesencephalon has been reported to be one of the primary neural foci for the action of centrally administered Mo in

eliciting the suppression of splenic NK cell activity. This immunosuppression has been hypothesized to be due to the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis or of the sympathetic nervous system or both. Although PAG is involved in regulation of many physiological functions including pain, fear and anxiety, autonomic regulation, vocalization and lordosis, aggressive and reproductive behavior, the relationship between PAG and immunity remains obscure (Suo and Weber, 1998; Vallejo et al., 2004).

GABAergic medications, such as gabapentin, appear to reduce the reinforcing effects of cocaine by attenuating cocaine-induced dopamine release in the nucleus accumbens and corpus striatum (Gerasimov et al., 2001; González et al., 2007). Gabapentin (Gb) also enhances the antinociceptive effect of Mo and attenuates Mo tolerance probably through up-regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and inhibition of proinflammatory cytokines in the rat spinal cord (Lee et al., 2013; Bao; et al., 2014), effects that may explain the decreased TNF- $\alpha$  levels in the Gb-treated rats from our investigation. Gb also reduced reactive gliosis and dendritic loss caused by glutamate excitotoxicity after pilocarpine-induced status epilepticus (Rossi et al., 2013).

It is described that administration of amitriptyline (Amt, a tricyclic antidepressant that acts primarily as a serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor) in association with Mo not only has preserved the antinociceptive effect of Mo, but also attenuated astrocyte activation in the rat spinal cord dorsal horn (Huang et al., 2012). It also up-regulated glutamate transporters in Mo-tolerant rats, attenuating Mo tolerance, and suppressed neuroinflammation in this site by inhibiting pro-inflammatory cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) expression (Tai et al., 2006). In vitro studies with human whole blood have also reported that tricyclic antidepressants (TCAs, e.g. imipramine and clomipramine) and selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs, e.g. citalopram and sertraline) were able to inhibit the production of the proinflammatory cytokines IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , while stimulating the negative immunoregulatory cytokine IL-10 (Kenis and Maes, 2002; Schiepers et al., 2005). Our results showed that Amt did not affect TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in plasma. Although there are many conflicting results in literature, the lack of effects of antidepressants on cytokine release in humans was also found by Anisman et al. (1999) and Rothermundt et al. (2001), in relation to IL-1 $\beta$  production, and by Landmann et al. (1997) for TNF- $\alpha$ .

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is the main intermediate filament protein in mature astrocytes and up regulation of its expression is one of the main characteristics of the astrocyte reaction commonly observed after CNS injury (Middeldorp and Hol, 2011). Modulators of GFAP expression include several hormones such as T3 and T4, glucocorticoids and several growth factors such as fibroblast growth factor (FGF), ciliary neurotrophic factor (CNTF) and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), among many others (Gomes et al., 1999). The exact function of GFAP remains obscure, despite the huge number of studies using it as a marker for astrocytes. It probably helps astrocytes to maintain mechanical strength, as well their shape (Middeldorp and Hol, 2011). TNF- $\alpha$ , a pluripotent cytokine that is reportedly mitogenic to astrocytes, is associated to the overexpression of GFAP, probably via activation of the mitogen activated protein kinase (MAPK) Erk2 (extracellular signal-regulated protein kinase) (Zhang et al., 2000). IL-1 $\beta$  is also identified as a potent inducer of several members of the TNF superfamily (TNFSF), as well as chemokines, growth factors, extracellular matrix proteins and matrix metalloproteinases, although repressing genes of the TGF family and cytoskeleton proteins (John et al., 2005). Human fetal astrocyte cultures showed after hours of stimulation with IL-1 $\beta$  a morphological conversion from flat, polygonal cells to small, contracted, highly branched cells. Complete dissolution of filamentous actin occurred simultaneously with the change in cell shape and these activated astrocytes displayed intense GFAP and vimentin immunoreactivity in the small perikarya and processes. A transient, marked decrease in steady-state levels of mRNA for GFAP was evident and a significant decrease in both GFAP and vimentin protein content was observed after IL-1 $\beta$  stimulation (Liu et al., 1994). These observations are consistent with the notion that increases in immunoreactivity were related to factors such as redistribution of epitope, rather than increases in total protein content. It is hypothesized that, in IL-1 $\beta$ -stimulated astrocytes, synthesis of other protein, e.g., inflammatory cytokines, occur at the expense of structural proteins (Liu et al., 1994). The periaqueductal gray (PAG) matter of the midbrain plays a key role in the central analgesic system (for review, see Ossipov et al., 2010). In our study, GFAP immunoreactivity in the brainstem (mesencephalon) tended to diminish in rats treated with Amt, Gb, Me and Mo compared to the control group. Lazriev et al. (2001) showed that high doses of Mo appeared to decrease the total length of astrocyte processes and branching of individual astrocytes in the caudate nucleus. However, it

induced hyperplasia and elongation of astrocytic processes in the nucleus accumbens and lateral septal nucleus.

In contrast, Song and Zhao (2001) have demonstrated that chronic Mo administration caused glial activation in the spinal cord and brain, and co-administration of Mo with a glial activation inhibitor resulted in maintenance of analgesic efficacy and a corresponding reduction of glial activation. They linked for the first time opioid-induced glial activation with the development of tolerance. A dose of 50 mg/kg/day (a dose 5 times greater than the dose used in our investigation) by IP route was used for 9 days to induce systemic tolerance and on the 10<sup>th</sup> day its analgesic effect disappeared as detected by behavioral test. Mo was also delivered intrathecally once daily for 5 consecutive days to induce spinal tolerance 4 days after the implantation of catheters into the lumbar spinal cord. In these systemically Mo-tolerant rats, GFAP immunostaining was increased significantly in the spinal cord, posterior cingulate cortex and hippocampus, but not in the thalamus and this increase was attributed primarily to hypertrophy of astrocytes rather than their proliferation or migration since counts of astroglial cells profiles demonstrated no significant difference compared with the control group. It is important to notice that, differently from the investigation performed by Song and Zhao (2001) with Mo, our investigation has used (for all drugs) doses that are equivalent to the therapeutic ones and no noxious stimulus was applied to produce pain.

The most characterized change in brain neurochemistry caused by drugs of abuse is an increase in extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens (NAc) of the basal forebrain, and many evidences suggest that this plays a pivotal role in the rewarding and positive reinforcing effects of  $\mu$ -agonists, like Mo (Olds, 1982; Pontieri et al., 1995) and Me (Di Chiara and Imperato, 1988). Di Matteo et al. (2000) have showed that administration of Amt also increased dopamine release in the rat NAc, suggesting the possible involvement of serotonin 5HT<sub>2C</sub> receptors. Peng et al. (2008), in turn, failed to demonstrate any alteration on the dopamine level of the NAc using Gb or even after cocaine self-administration, cocaine-triggered relapse and cocaine-enhanced NAc dopamine in rats. Our results suggest that drugs which, according to previous studies, exhibit the capacity of increasing dopamine concentrations in the NAc, such as Amt, Me and Mo, also induced an increased GFAP immunoreactivity in this region, probably by enhancing astrocyte activity of clearing the excess of dopamine. It is recognized that this neurotransmitter may be

actively and specifically removed from the extracellular space by astrocytes and neurons through (1) dopamine transporters and, afterwards, either recycled into vesicles or (2) metabolized by the glial/neuronal enzymes monoamino oxidase B (MAO B) and cathecol-O-methyl transferase (COMT) (Kakaya et al., 2007). Excess of dopamine can cause auto-oxidation to ortho-quinone and consequently oxidative damage and schizophrenia-like symptoms (Whitehead et al., 2001).

### **3.6 Conclusion**

Plasma TNF- $\alpha$  levels decreased in the groups that received short-term doses of Mo, Me and Gb, but not in the Amt-treated group. On the other hand, IL-1 $\beta$  has decreased only in rats treated with Me. As for GFAP expression, all drugs decreased astrocyte immunostaining in the brainstem, although Amt, Me and Mo caused an increased GFAP reactivity the NAc. Thus, it can be assumed that the pain relievers Gb, Me and Mo (even with the therapeutic doses that were employed in this study) impaired IL-1 $\beta$  and/or TNF- $\alpha$  release in the plasma. On the other hand, all drugs seemed to modify astrocytic expression of GFAP, but the effect varied according to the region observed (Amt, Gb, Me and Mo decreased this expression in the brainstem, while Amt, Me and Mo increased it in the NAc, probably due to the augmented activity of astrocytes in removing the excess of dopamine). Further studies must be done in order to make clear the effects of these pain relievers on astrocytes from other CNS regions involved with pain modulation, both in the absence and in the presence of noxious stimuli.

### **3.7 References**

- ANISMAN, H.; RAVINDRAN, A.V.; GRIFFITHS, J.; MERALI, Z. Interleukin-1 beta production in dysthymia before and after pharmacotherapy. *Biol. Psychiatry*, v.46, p.1649-1655, 1999.
- BANKS, W.A.; KASTIN, A.J.; BROADWELL, R.D. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation*, v.2, p.241-248, 1995.
- BAO, Y.H.; ZHOU, Q.H.; CHEN, R.; XU, H.; ZENG, L.; ZHANG, X.; JIANG, W.; DU, D. Gabapentin attenuates morphine tolerance through interleukin-10. *NeuroReport*, v.25, p.71-76, 2014.
- DE WAAL, E.J.; VAN DER LAAN, J.W.; VAN LOVEREN, H. Effects of prolonged exposure to morphine and methadone on in vivo parameters of immune function in rats. *Toxicology*, v.129, p.201-210, 1998.

DI CHIARA, G.; IMPERATO, A. Opposite effects of um and kappa agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.244, p.1067-1080, 1988.

DI MATTEO, V.; DI MASCIO, M.; DI GIOVANI, G.; Esposito, E. Acute administration of amitriptyline and mianserin increases dopamine release in the rat nucleus accumbens: possible involvement of serotonin 2C receptor. *Psychopharmacology*, v.150, p.45-51, 2000.

GERASIMOV, M.R.; SCHIFFER, W.K.; GARDNER, E.L.; MARSTELLER, D.A.; LENNON, I.C.; TAYLOR, S.J.; BRODIE, J.D.; ASHBY JR, C.R.; DEWEY, S.L. GABAergic blockade of cocaine-associated cue-induced increases in nucleus accumbens dopamine. *Eur. J. Pharmacol.*, v.414, p.205-209, 2001.

GOMES, F.C.; PAULIN, D.; MOURA NETO, V. Glial fibrillar acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *J Braz. Med. Biol. Res.*, v.32, p.619-631, 1999.

GONZALEZ, G.; DESAI, R.; SOUFUOGLU, M.; POLING, J.; OLIVETO, A.; GONSAI, K.; KOSTEN, T.R. Clinical efficacy of gabapentin versus tiagebine for reducing cocaine use among cocaine dependent methadone-treated patients. *Drug Alcohol Depend.*, v.87, p.1-9, 2007.

HUANG, Y.N.; TSAI, R.Y.; LIN, S.L.; CHIEN, C.C.; CHERNG, C.H.; WU, C.T.; YEH, C.C.; WONG, C.S. Amitriptyline attenuates astrocyte activation and morphine tolerance in rats: role of PSD-95/ NR1/ nNOS/ PKCy signaling pathway. *Behav. Brain Res.*, v.229, p.401-411, 2012.

HUTCHINSON, M.R.; BLAND, S.T.; JOHNSON, K.W.; RICE, K.C.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Opioid-induced glial activation and implication for opioid analgesia, dependence, and reward. *SCI. World J.*, v.7, p.98-111, 2007.

HUTCHINSON, M.R.; SOMOGYI, A.A. (S)-(+)-methadone is more immunosuppressive than the potent analgesic (R)-(-)-methadone. *Int. Immunopharmacol.*, v.4, p.1525-1530, 2004.

JI, R.R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain*, v.154, p.10-28, 2013.

JOHN, G.R.; LEE, S.C.; SONG, X.; RIVIECCIO, M.; BROSNAN, C.F. IL-1 regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia*, v.49, p.161-176, 2005.

KAFAMI, L.; ETESAMI, I.; ENAYATI, N.; GHIAGHI, R.; AMINIAN, A.; DAHPOUR, A. Methadone diminishes and disease severity in EAE through modulating T cell function. *J. Neuroimmunol.*, v.255, p.39-44, 2013.

- KAKAYA, S.; KIPP, M.; BEYER, C. Oestrogen regulates the expression and function of dopamine transporter in astrocytes of the nigrostriatal system. *J. Neuroendocrinol.*, v.19, p.682-690, 2007.
- KENIS, G.K.; MAES, M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, v.5, p.401-412, 2002.
- LANDMANN, R.; SCHURAUB, B.; LINK, S.; WACKER, H.R. Unaltered monocyte function in patients with major depression before and after three months of antidepressive therapy. *Biol Psychiatry*, v.41, p.675-681, 1997.
- LEE, B.S.; JUN, I.G.; KIM, S.H.; PARK, J.Y. Intrathecal gabapentin increases interleukin-10 expression and inhibits pro-inflammatory cytokine in a rat model of neuropathic pain. *J. Korean Med. Sci.*, v.28, p.308-314, 2013.
- LYNCH, M.E.; WATSON, P.N. The pharmacotherapy of chronic pain: A review. *Pain Res. Manag.*, v.11, p.11-38, 2006.
- MCMAHON, S.B.; CAFFERTY, W.B.J.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp. Neurol.*, v.192, p.444-462, 2005.
- LAZRIEV, I.L; KIKNADZE, G.I.; KUTATELADZE, I.I.; NEBIERIDZE, M.I. Effect of morphin on the number and branching of astrocytes in vrious regions of rat brain. *Bull. Exp. Biol. Med.*, v.131, p.248-250, 2001.
- LIU, W.; SHAFIT-ZAGARDO, B.; AQUINO, D.A.; ZHAO, M.L.; DICKSON, D.W.; BROSNAN, C.F.; LEE, S.C. Cytoskeletal alterations in human fetal astrocytes induced by interleukin-1beta. *J. Neurochem.*, v.63, p.1625-1634, 1994.
- MODDELDORP, J.; HOL, E.M. GFAP in health and disease. *Progr. Neurobiol.*, v.93, p.421-443, 2011.
- MONIBI, F.A.; DODAM, J.R.; AXIAK-BECHTEL, S.M.; AMORIM, J.; ZHANG, y.; TSURUTA, K.; MANN, F.A.; DE CLUE, A.E. Morphine and buprenorphine do not alter leucocyte production capacity, early apoptosis, or neutrophil phagocytic function in healthy dogs. *Res. Vet. Sci.*, v.99, p.70-76, 2015.
- OLDS, M.E. Reinforcing effects of morphine in the nucleus accumbens. *Brain Res.*, v.237, p.429-440, 1982.
- OSSIPOV, M.H.; DUSSOR, G.O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. *J. Clin. Invest.*, v.120, p.37-87, 2010.
- PENG, X.Q.; LI, X.; LI, J.; RAMACHANDRAN, P.V.; GAGARE, P.D.; PRATILHAR, D.; ASHBY JR, C.R.; GARDNER, E.L.; XI, Z.X. Effects of gabapentin on cocaine self-administration, cocaine-triggered relapse and cocaine-enhanced nucleus accumbens dopamine in rats. *Drug. Alcohol Dep.*, v.97, p.207-215, 2008.

PONTIERI, F.E.; TANDA, G.; DI CHIARA, G. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.92, p.12304-12308, 1995.

RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F.Y.; DELEO, J.A. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Europ. J. Neurosci.*, v.20, p.467-470, 2004.

RITTNER, H.L.; MACHELSKA, H.; STEIN, C. Leucocytes in the regulation of pain and analgesia. *J. Leukoc. Biol.*, v.78, p.1215-1222, 2005.

ROSSI, A.R.; ANGELO, M.F.; VILLAREAL, A.; LUKIN, J.; RAMOS, A.J. Gabapentin administration reduces reactive gliosis and neurodegeneration after pilocarpine-induced status epilepticus. *PlosOne*, v.8, p.1-13, 2013.

ROTHERMUNDT, M.; AROLT, V.; PETERS, M.; GUTBRODT, H.; FENKER, J.; KERSTING, A.; KIRCHNER, H. Inflammatory markers in major depression and melancholia. *J. Affect. Disord.*, v.63, p.93-102, 2001.

SACERDOTE, P. Opioid and the immune system. *Palliat. Med.*, v.20, p.9-15, 2006.

SCHIEPERS, O.J.G.; WICHERS, M.C.; MAES, M. Cytokines and major depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v.29, p.201-217, 2005.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glial *Nat. Neurosc.*, v.10, p.1361-1368, 2007.

SONG, P.; ZHAO, Z.Q. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neurosc. Res.*, v.39, p.281-286, 2001.

SUO, J.L.; WEBER, R.J. Immunomodulation mediated by microinjection of morphine into the periaqueductal gray matter of the mesencephalon. In: Friedman, H.; Madden, J.J.; Klein, T.W. Drugs of abuse, immunomodulation, and AIDS. Heidelberg: Springer, 1998. v.437, p.177-182.

TAI, Y.H.; WANG, Y.H.; WANG, J.J.; TAO, P.L.; TUNA, C.S.; WONG, C.S. Amitriptyline suppresses neuroinflammation and up-regulates glutamate transporters in morphine-tolerant rats. *Pain*, v.124, p.77-86, 2006.

VAN DER LAAN, J.W.; KRAJNC, E.I.; KRAJNC-FRANKEN, M.A.M.; VAN LOVEREN, H. Immunotoxicological screening of morphine and methadone in an extended 28 day study in rats. *Int. J. Immunopharmac.*, v.17, p.535-543. 1995.

WATKINS, L.R.; MILLIGAN, E.D.; MAIER, S.F. Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.521, p.1-21, 2003.

WATKINS, L.R.; HUTCHINSON, M.R.; LEDEBOER, A.; WIESELER-FRANK, J.; MILLIGAN, E.D.; MAIER, S.F. Glia as the “bad guys”: implication for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain, Behav. Immun.*, v.21, p.131-146, 2007.

WHITEHEAD, R.E.; FERRER, J.V.; JAVITCH, J.A.; JUSTICE, J.B. Reaction of oxidized dopamine with endogenous cysteine residues in the human dopamine transporter. *J. Neurochem.*, v.76, p.1242-1251, 2001.

VALLEJO, R.; LEON-CASASOLA, O.; RAMSUN, B. Opioid therapy and immunosuppression: a review. *Am. J. Therap.*, v.11, p.354-365, 2004.

ZHANG, L.; ZHAO, W.; ALKON, D.L.; BARKER, J.L.; CHANG, Y.H.; WU, M.; RUBINOW, D.R. TNF-alpha induced over-expression of GFAP is associated with MAPKs. *Neuroreport*, v.11, p.409-412, 2000.

ZHANG, J.-M.; An, J. Cytokines, inflammation and pain. *Anesthesiol. Clin.*, v.45, p.27-37, 2007.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDSKOGIUS, H.; KOZLOVA, E.N. Central neuron-glial and glial-glial interactions following axon injury. **Progress in Neurobiology**, v.55, p.1-26, 1998.
- ARORA, P.K.; FRIDE, E.; PETITTO, J.; et al. Morphine –induced immune alterations in vivo. **Cellular Immunology**, v. 126, p. 343-353, 1990.
- BENVENISTE, E.N. Cytokines: influence on glial gene expression. And function. In: BLALOCK, J.E. **Neuroimmunoendocrinology**. 2. ed. Basel, Karger, 1992. p.106-53.
- BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; STANTON, B.A. et al. **Fisiología**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- BERTA, T.; LIU, Y.C.; XU, Z.Z.; JI, R.R. Acute morphine activates satellite glial cells and u-regulates IL-1beta in dorsal root ganglia in mice via matrix metalloprotease-9. **Molecular Pain**, v.8, p.18, 2012.
- BIGNAMI, A.; DAHL, D. **Glial cells in the central nervous system and the irreaction to injury**. Austin, R.G. Landes, 1984. p.108.
- BUDD, K.; Pain management: is opioid immunosuppression a clinical problem? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.60, p.310-317, 2006.
- CHONG, M.S; BAJWA, Z.H. Diagnosis and treatment of neuropathic pain. **Journal Pain Sympton Manage**, v.25, p.S4-S11, 2003.
- CURFS, JH.; MEIS, JF.; HOOGKAMP-KORSTANJE, JA.; et al. Cytokines for surgeons: sources, receptors, effects, and induces. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p.742-780, 1997.
- DEADWYLER, S.A.; HAMPSON, R.E. The significance of neural ensemble codes during behavior and cognition. **Annual Review of Neuroscience**, v.20, p.217-244, 1997.
- DEL REY, A.; APKARIAN, A.V.; MARTIMA , M.; BESEDOVSKY, H.O.; et al. Chronic neuropathic pain-like behavior and brain-borne IL-1 $\beta$ . **Annals of the New York Academy of Science**, v.1262, p. 101-107, 2012.
- DI CHIARA, G.; A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. **Journal of Psychopharmacol**, v.12, p.54-67, 1998.
- DICKENSON, A.H.; SUZUKI, R. Function and dysfunction of opioids receptors in the spinal cord. In: Kalso, E.; McQuay, H.J., Weisenfeld-Hallin, editors. **Progress in Pain Research And Management**, c.2, v.14, p.1-96, 1999.

- EDDLESTON, M.; MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes – implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience**, v.54, p.15-36, 1993.
- EISENACH, J.C.; GEBHART, G.F. Intrathecal amitriptyline acts as an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in the presence of inflammatory hyperalgesia in rats. **Anesthesiology**, v.83, p.1046-1054, 1995.
- FERNAUD-ESPINOSA, I.; NIETO-SAMPEDRO, M.; BOVOLENTA, P. Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. **Glia**, v.8, p.277-291, 1993.
- FIELD, M.I.; OLES, R.I.; LEWIS, A.S.; MCCLEARY, S.; et al. Gabapentin (neurotin) and S-(+)-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agentes. **Journal of Pharmacology**, v.17, p.1513-1522, 1997.
- FINLEY, M.J.; HAPPEL, C.M.; KAMINSKY, D.E.; ROGERS, T.J. Opioid and nociceptin receptors regulate cytokine receptor expression. **Cellular Immunology**, v.252, p.146-154, 2008.
- GILLMAN, A.F. **Bases Farmacológicas da Terapêutica: Analgésicos e antagonistas opioides**. 9. Ed. New York: Mc Graw, 1996.
- HAMMED, H.; HAMMED, M.; CHRISTO, P.J. The effect of morphine on glial cells as a potential therapeutic target for pharmacological development of analgesic drugs. **Current Pain and Headache Reports**, v.14, p.96-104 2010.
- HAYDON, P.G; CARMIGNOTO, G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. **Physiological Reviews**, v.86, p. 1009-1031, 2006.
- HERTZ, A. Opioids and their reception in the modulation of pain. **Acta Neurochirurgia**, v.38, p.36-40, 1987.
- HUANG, Y.N.; TSAI, R.Y.; LIN, S.L.; CHIEN, C.C.; et al. Amitriptyline attenuates astrocyte activation and morphine tolerance in rats: Role of the PSD-95/NR1/nNOS/PKC $\gamma$  signaling pathway. **Behavioural Brain Research**, v.229, p.401-411, 2012.
- HYMAN, SE.; MALENKA, RC.; NESTLER, E.J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. **Annual Review of Neuroscience**, v.29, p.565-598, 2006.
- INOUC, K.; TSUDA, M. Microglia and neuropathic pain. **Glia**, v.57, p.1469-1479, 2009.
- JOHNSON, S.M.; FLEMING, W.W. Mechanisms of cellular adaptative sensitivity changes: applications to opioid tolerance and dependence. **Pharmacological Reviews**, v.41, p.435-488, 1989.

JOHNSON, SW.; NORTH, RA. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. **Journal of Neuroscience**, v.12, p.483-488, 1992.

JOHNSTON, D.; MAGEE, J.C.; COLBERT, C.M.; CHRISTIE, B.R. Active properties of neuronal dendrites. **Annual Review of Neuroscience**, v.19, p.165-186, 1996.

JOHNSTON, I.N.; MILLIGAN, E.D.; WIESELER-FRANK, J.; FRANK, M.G; et al. A role for pro-inflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intratecal morphine. **The Journal of Neuroscience**, v.24, p.7353-7365, 2004.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 6.Ed. Barueri: Manole, 2000.

KANDEL, R.E. et al. **Princípios de Neurociências**. 5.ed. Porto Alegre: Mc Graw Hill e Artmed, 2014.

KAO, S.C.; ZHAO, X.; LEE, C.Y.; ATIANJOH, F.E.; et al. Absence of mu opioid receptor mRNA expression in astrocytes and microglia of rat spinal cord. **Neuroreport**, v.23, p.378-384, 2012.

KOSTETERLITZ, H.W. Opioids peptides and their receptors. **Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences**, v.225, p.27-40, 1985.

LACROIX, S. Functional recovery after peripheral nerve injury is dependent on the pro-inflammatory cytokines IL-1beta and TNF, implications for neuropathic pain. **The Journal of Neuroscience**, v.31, p.12533-12542, 2011.

LARSSON, M.; BROMAN, J. Synaptic plasticity and pain, role of ionotropic glutamate receptors. **Neuroscientist**, v.17, p.256-273, 2011.

LEE, B.S.; iN-GU, J.; SUNG, H.K.; JONG,Y.P. Intratecal gabapentin increases interleukin-10 expression and inhibits pro-inflammatory cytokine in a rat model of neuropathic pain. **Anesthesiology and Pain**, v.28, p.308-314, 2013.

LEE, J.C.; MAYER-PROSCHEL, M.; RAO, M.S. Gliogenesis in the central nervous system. **Glia**, v.30, p.105-121, 2000.

LEVIER, D.G.; MCCAY, J.A.; STERN, M.L.; et al. Immuno toxicological profile of morphine sulfate in B6C3F1 female mice. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.22, p.525-542, 1994.

LIN, E.; CALVANO, SE.; LOWRY, SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v.127, p.117-126, 2000.

LIN, S.L.; TSAI, R.Y.; SHEN, C.H.; LIN, F.H.; et al. Co-administration of ultra-low dose naloxone attenuates morphine tolerance in rats via attenuation of NMDA receptor neurotransmission and suppression of neuroinflammation in the spinal cords. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.96, p.236-245, 2010.

MACEY, T.A.; BOBECK, E.N.; HEGARTY, D.M.; AICHER, S.A.; et al. Extracellular signal-regulated kinase  $\frac{1}{2}$  activation counteracts morphine tolerance in the periaqueductal Gray of the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic**, v.331, p.412-418, 2009.

MAES, M. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. **Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatric Journal**, v.19, p.11-38, 1995.

MANCUF, Y.P.; LUO, Z.D.; LEE, K. A2 $\delta$  and the mechanism of action of gabapentin in the treatment of pain. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.17, p.565-570, 2006.

MARQUET, P.; DEGUELDRÉ, C.; AERTS, J.; PETERS, M.J.; et al. Functional neuroanatomy of human slow wave sleep. **Journal of Neuroscience**, v.17, p.2807-2812, 1997.

MCCARTHY, L.; WETZEL, M.; SLIKER, J.K.; EISENSTEIN, T.K.; et al. Opioids, opioid receptors, and the immune response. **Drug Alcohol Dependence**, v.62, p.11-123, 2001.

MEDAWAR, C.V.; MATHEUS, M.E. Tricyclic Antidepressants and Gabapentinoids: an analysis of the pharmacological profile in the treatment of neuropathic pain. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v.93, p.290-297, 2012.

MIKA, J.; WAWRZCZAK-BARGIELA, A.; OSIKOWICZ, M.; MAKUCH, W.; et al. Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifyline in naive and neuropathic mice. **Brain, Behavior and Immunity**, v.23, p.75-84, 2009.

MOLLOY, A.R.; Implanted drug delivery systems: optimizing outcomes. **Pain**, p.225-233, 2002.

MONTEGOMERY, D.L. Astrocytes: form, function and roles in disease. **Veterinary Pathology**, v.31, p.145-167, 1994.

NAKAMOTO, K.; KAWASAKI, S.; KOBORI, T.; FUJITA-HAMABE, W.; et al. Involvement of matrix metalloproteinase-9 in the development of morphine tolerance. **European Journal of Pharmacology**, v.683, p.86-92, 2012.

PARK, H.K.; MOON, D.E. Pharmacologic Management of Chronic Pain. **The Korean Journal of Pain**, v.2, p.99-108, 2010.

PASTERNAK, G.W. Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. **Clinical Neuropharmacology**, v.16, p.1-18, 1993.

PERRY, V.H.; HUME, D.A.; GORDON, S. Immunohistochemical localisation of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. **Neuroscience**, v.15, p.313-326, 1985.

PETERS, A.; PALAY, S.L.; WEBSTER, H. de F. **The fine structure of the nervous system.** 3.Ed. New York, Oxford University Press, 1991. p.212-272: The cellulars heaths of neurons. PRINEAS, J.W.; PARRATT, J.D.E. Oligodendrocytes and the early multiple sclerosis lesion. **Annals of Neurology**, v.72, p.18-31, 2012.

RAEBUM, C.D.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K.A.; et al. Cytokines for surgeons. **The Americam Journal of Surgery**, v.183, p.268-273, 2002.

RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F.Y.; DELEO, J.A. Attenuation of morphine tolerance, withdrawal-induced hypealgesia, and associated spinal inflammatory immune responses by propentofylline in rats. **Neuropsychopharmacology**, v.29, p.327-334, 2004.

RAIVICH, A.; Like cops on the beat: the active role of resting microglia. **Trends in Neuroscience**, v.28, p.571-573, 2005.

RISDAHL, J.M.; KHANNA, K.V.; PETERSON, P.K; MOLITOR, T.W. Opiates and infection. **Journal of Neuroimmunology**, v.83, p.4-18, 1998.

ROBINSON, TE.; BERRIDGE, KC. The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. **Addiction**, v.95, p.91-117, 2000.

ROSA, A.; PERALTA, V.; PAPIO, S.; CUESTA, M.J.; et al. Interleukin-1 beta gene and increased risk for the depressive symptom-dimension in schizophrema speetrum disorders. **Journal of Medical Genetics**, v.1, p. 10-14, 2004.

ROSENBERG, J.M.; HARRELL, C.; RISTIC, H.; WERNER, R.A.; et al. The effect of gabapentin on neuropathic pain. **The Clinical Journal of Pain**, v.13, p.251-255, 1997.

SHARP, B.M. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. **Brain, Behavior and Immunity**, v.20, p.9-14, 2006.

SHARP, B.M. Opioid receptor expression and intracellular signaling by cells involved in host defense and immunity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.521, p.98-105, 2003.

SHAVIT, Y.; GOSHEN, I.; LIVSHITS, D.; YIRMIYA, R. Interleukin-1 antagonizes morphine analgesia and underlies morphine tolerance. **Pain**, v.115, p.50-59, 2005.

SHAVIT, Y.; LEWIS, J.W.; TERMAN, G.W.; et al. Opioid peptides mediate the supressive effect of stress on natural killer cell cytotoxicity. **Science**, v.223, p. 188-190, 1984.

SHINICHI, H.; KAZUO, N.; SHOGO, T. The involvement of midbrain astrocyte in the development of morphine tolerance. **Life Sciences**, v.93, p.573-578, 2013.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SINDRUP, S.H.; OTTO, M.; FINNERUO, N.B.; JENSEN, T.S. Antidepressants in the Treatment of Neuropathic Pain. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.96, p.399-409, 2005.

SINDRUP, S.H.; OTTO, M.; FINNERUP, N.B.; JENSEN, T.S. Antidepressants in the Treatment of Neuropathic Pain. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.96, p.399-409, 2005.

SONG, P.; ZHAO, Z. The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. **Neuroscience Research**, v.39, p.281-286, 2001.

STERIADE, M.; MCCORMICK, DA.; SEJNOWSKI, TJ. Thalamocortical oscillations in the slweeping and aroused brain. **Journal of Science**, v.262, p.679-685, 1993.

SUNG, B.; JI, R.R., LIM,G. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: evidence for an opioid -induced neurotoxic mechanism. **The Journal of Neuroscience**, v.22, p.7650-7661, 2002.

TAI, Y.H.; WANG, Y.H; WANG, J.J.; TAO, P.L.; et al. Amitriptyline suppresses neuroinflammation and regulates glutamate transporters in morphine tolerance rats. **Pain**, v.124, p.77-86, 2006.

TEIXEIRA, M.G.; YENG, L.T.; KAZIYAMA, H.H.S. **Dor: Síndrome dolorosa miofasciale dor músculo-esquelética**. 1.Ed. São Paulo: Roca, 2006.

TRANQUILLI, J.W.; THURMON, J.C.; GRIMM. Anestesiologia e Analgesia Veterinária. In: HELLYER, P.W.; ROBERTSON, S.A.; FAILS, A.D. (Org.) **Tópicos Gerais: Dor: conceitos e manejo**. São Paulo: Ed. Roca, 2013. p.55-56.

TREEDE, R.D.; JENSEN, T.S.; CAMPBELL, J.N.; CRUCCU, G.; et al. Neuropathic pain. Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v.70, p.1630-1635, 2008.

TRESCOT, A.M.; DATTA, S.; LEE, M.; HANS HANSEN, H. Opioid pharmacology. **Pain Physician**, v.11, p.S133-S153, 2008.

TSAI, R.Y.; JANG, F.L.; TAI, Y.H.; LIN, S.L.; et al. Ultra-low-dose naloxone restores the antinociceptive effect of morphine and suppresses spinal neuroinflammation in PTX-treated rats. **Neuropsychopharmacology**, v.33, p. 2772-2782, 2008.

TSUDA, M.; KOHRO, Y.; TSUJIKAWA, T.; KITANO, J.; et al. JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. **Brain**, v.134, p.1127-1139, 2011.

TUBARO, E.; AVICO, U.; SANTIANGELI, C.; et al. Morphine and methadone impacto n human phagocytic physiology. **International Journal of Immunopharmacology**, v.7, p. 865-874, 1985.

VALLEJO, R.; DE LEON-CASASOLA, O.; BENYAMIN, R. Opioid therapy and immunosuppression: a review. **American Journal of Therapeutics**, v.11, p.354-365, 2004.

VALLEJO, R.; TILLEY, D.M.; VOGEL, L.; BENYAMIN, R. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. **Pain Practice**, v.10, p.167-184, 2010.

VAN DER LANN, J.W.; KRAJNE, E.I.; KRAJNE-FRANKEN, M.A. M. et al. Immunotoxicological screening of morphine and methadone in an extended 28-day study in rats. **International Journal of Immunopharmacology**, v.17, p.535-543, 1995.

VERDU, B. DECOSTERED I; BUCLIN, T.; STIEFEL, F.; BERNEY, A. Antideressants for the treatment of chronic pain. **Drugs**, v.68, p.2611-2632, 2008.

WATKINS, L.R.; HUTCHINSON, M.R.; LEDEBOER, A.; WIESELER-FRANK, J.; MILLIGAN, E.D.; MAIER, S.F. Glia as the "bad guys": Implications for improving clinical pain control utility of opioids. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.21, p.131-146, 2007.

WOLF, G.; LIVSHITS, D.; BEILIN, B.; et al. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. **Brain Behavior and Immunity**, v.22, p.1072-1077, 2008.

WONG, C.S.; CHERNG, C.H.; LUK, H.N.; HO, S.T.; et al. Effects of NMDA receptor antagonists on inhibition of morphine tolerance in rats: bind in gat mu-opioid receptors. **European Journal of Pharmacology**, v.297, p. 27-33, 1996.

WOOLF, C.J.; SHORTLAND, P.; REYNOLDS, M.; RIDINGS, J.; et al. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. **The Journal of Comparative Neurology**, v.360, p.121-134, 1995.

YANG, J.L.; XU, B.; LI, S.S.; ZHANG, W.S.; et al. Gabapentin reduces CX3CLI signaling and blocks spinal microglial activation in monoarthritic rats. **Molecular Brain**, v.5, p. 18, 2012.

ZHANG, JM.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, p. 27-37, 2007.

ZHOU, D.; CHEN, M.L.; ZHANG, Y.Q.; ZHAO, Z.Q. Involvement of spinal microglial P2X7 receptor in generation of tolerance to morphine analgesia in rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, p. 8042-8047, 2010.

ZHUO, M.; WU, G.; WU, L.J. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. **Molecular Brain**, v.4, p.31-64, 2011.

ZHUO, Z.P.; BADISA, R.B.; GOODMAN, C.B. Regulation of rat MOR-1 gene expression after chronic intracerebroventricular administration of morphine. **Molecular Medicine Reports**, v. 5, p. 513-516, 2012.