

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

Vanessa Meinertz Kaiser

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA MELATONINÉRGICO NA MODULAÇÃO
ENDÓGENA DA DOR INFLAMATÓRIA E SUA PARTICIPAÇÃO NA ANALGESIA
PERIFÉRICA POR AGONISTAS OPIOIDES E CANABINOIDES**

**Belo Horizonte
2021**

Vanessa Meinertz Kaiser

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA MELATONINÉRGICO NA MODULAÇÃO
ENDÓGENA DA DOR INFLAMATÓRIA E SUA PARTICIPAÇÃO NA ANALGESIA
PERIFÉRICA POR AGONISTAS OPIOIDES E CANABINOIDES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Biológicas, com área de concentração em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero

Belo Horizonte
2021

043

Kaiser, Vanessa Meinertz.

Envolvimento do sistema melatoninérgico na modulação endógena da dor inflamatória e sua participação na analgesia periférica por agonistas opioides e canabinoides [manuscrito] / Vanessa Meinertz Kaiser. - 2021.

62 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Melatonina. 3. Analgésicos Opioides. 4. Endocanabinoides. I. Romero, Thiago Roberto Lima. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO N° 551 DE VANESSA MEINERTZ KAISER

"Envolvimento do Sistema Melatoninérgico na Modulação Endógena da Dor Inflamatória e Sua Participação na Analgesia Periférica por Agonistas Opióides e Canabinóides"

VANESSA MEINERTZ KAISER

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **16 de dezembro de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Luciana Souza Guzzo Costa, UFJF
Profa. Dra. Adriana Cristina Soares de Souza, CCO/UFJF
Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero, ICB/UFMG - Orientador

Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Souza Guzzo Costa, Usuário Externo**, em 20/12/2021, às 11:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Cristina Soares de Souza, Usuário Externo**, em 20/12/2021, às 12:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Roberto Lima Romero, Professor do Magistério Superior**, em 21/12/2021, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0

, informando o código verificador **1142367** e o código CRC **1322D0FD**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero, pela oportunidade e confiança.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela competência em ensinar.

Aos meus colegas de laboratório, em especial ao Douglas Lamounier de Almeida, pela paciência e tempo. À Renata Mendes, Marla Calazans e Daniel Portela por toda ajuda. À Bárbara Formiga Gonçalves de Querioz, Flávia Fonseca, Danielle Diniz, Amanda Cristina Gonzaga, Raquel Rodrigues, Wallace Barra Pinto e Wiliam Valadares pelos bons momentos vividos.

À minha filha, Lara Kaiser, por tão gentilmente ceder nosso tão precioso tempo juntas.

Ao meu marido, Daniel Kaiser, meu grande amor, pela paciência, companheirismo e por sempre acreditar em mim.

À família que eu escolhi Marília Rezende, Magnus Brugnara e Natália Macedo Abdala, pela amizade e por cuidar tão bem do meu maior tesouro, minha filha.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

E, finalmente, **aos próprios animais de experimentação**, por doarem suas vidas em prol da Ciência.

RESUMO

São muitos os estudos que demonstram a participação de moduladores endógenos no controle da dor periférica e central, dentre esses encontram-se os peptídeos opioides endógenos e endocanabinóides. A melatonina é um importante neuro hormônio envolvido em vários processos fisiológicos como regulação do ciclo sono, propriedade ansiolítica, antioxidante, e recentemente tem ganhado visibilidade na área do estudo da dor e analgesia. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o possível envolvimento do sistema melatoninérgico na modulação endógena da dor inflamatória e sua participação na analgesia periférica por agonistas opioides e canabinóides. Utilizou-se o método de compressão de pata, para avaliar o limiar nociceptivo de camundongos Swiss machos. Todas as drogas foram administradas num volume de 20 μ L, em uma injeção intraplantar subcutânea na pata posterior direita dos animais, sendo a hiperalgesia induzida por carragenina (200 μ g/pata). Após a administração do antagonista melatoninérgico luzindole na dose de 200 μ g/pata, houve um aumento da nocicepção periférica causada pela carragenina em diferentes doses. A administração dos agonistas μ -opioide DAMGO (1 μ g/pata), δ -opioide SNC80 (20 μ g/pata) e k-opioide Bremazocina (1 μ g/pata), bem como dos agonistas dos receptores CB₁ canabinóides anandamida (AEA 50 ng/pata) e CB₂ PEA (20 μ g/pata) foram capazes de induzir antinocicepção; a administração do antagonista melatoninérgico luzindole (100 e 200 μ g/pata) reverteu parcialmente a antinocicepção induzida por esses agonistas. O presente trabalho demonstrou que os receptores melatoninérgicos podem estar envolvidos no mecanismo analgésico periférico de controle da dor inflamatória além de participar da antinocicepção periférica tanto de substâncias opioides quanto canabinóides, o que mostra a possibilidade de um sinergismo entre esses sistemas durante o evento de controle endógeno da eferência nociceptiva.

Palavras-chave: Melatonina, opioides, endocanabinóides, antinocicepção periférica.

ABSTRAT

Currently, several studies demonstrate the participation of endogenous modulators in the control of peripheral and central pain, including endogenous and endocannabinoid opioid peptides. Melatonin is an important neurohormone involved in several physiological processes such as regulation of the sleep cycle, anxiolytic property, antioxidant, and has recently gained attained visibility in the area of pain and analgesia. In this context, the aim of this study was to evaluate the possible involvement of the melatonin system in the endogenous modulation of inflammatory pain and its participation in peripheral analgesia by opioid and cannabinoid agonists. The paw compression method was used to assess the nociceptive threshold of male Swiss mice. All drugs were administered in a volume of 20 μ L, in a subcutaneous intraplantar injection in the right hind paw of the animals, with hyperalgesia being induced by carrageenan (200 μ g/paw). After administration of the melatonin antagonist luzindole at a dose of 200 μ g/paw, there was an increase in peripheral nociception caused by carrageenan at different doses. Administration of μ -opioid agonists DAMGO (1 μ g/paw), δ -opioid SNC80 (20 μ g/paw) and κ -opioid Bremazocin (1 μ g/paw), as well as the cannabinoid CB1 receptor agonists anandamide (AEA 50 ng/paw) and CB2 PEA (20 μ g/paw) were able to induce antinociception. Furthermore, the administration of the melatonergic antagonist luzindole (100 and 200 μ g/paw) partially reversed the antinociception induced by these agonists. Overall, this study provide that melatonin receptors may be involved in the peripheral analgesic mechanism of inflammatory pain control,. In addition, to participating in peripheral antinociception of both opioid and cannabinoid substances, which shows the possibility of a synergism between these systems during the endogenous control event of the nociceptive effect.

Keywords: Melatonin, opioids, endocannabinoids, peripheral antinociception.

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG - 2-araquidonoil glicerol

AANAT- Serotonina N-acetiltransferase

AEA - Araquidonil etanolamina (anandamida)

AMPc – Adenosina monofosfato cíclica

ANOVA - Análise de variância (do inglês *analysis of variance*)

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CB₁ - Receptor canabinoide do tipo 1

CB₂ - Receptor canabinoide do tipo 2

BRE - Bremazocina

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CG – Carragenina

DMSO - Dimetilsulfóxido

DRG – Gânglio da raiz dorsal

EPM - Erro padrão da média

et al. - e outros (do latim *et alli*)

GC – Guanilato ciclase

GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina

GPCR - Receptores acoplados a proteína G (do inglês *G protein coupled receptors*)

i.p. - Intraperitoneal

i.pl. - Intraplantar

IASP - Associação internacional para o estudo da dor (do inglês *International Association for the Study of Pain*)

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

LZD – Luzindole

MT – Melatonina

n - Número de animais experimentais

nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

PEA - Palmitoiletanolamida

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PKC- Proteína quinase C

PKG- proteína quinase G

SPC- Substância cinzenta periaquedutal

THC - Δ^9 -tetrahydrocannabinol

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

µg – Micrograma

µL – Microlitros

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Classificação dos tipos de dor..... | 13 |
| Figura 2 - Axônios aferentes primários, fibras A α , A β , A δ e C..... | 15 |
| Figura 3 - Representação esquemática da via ascendente da dor..... | 16 |
| Figura 4 - Administração intraplantar subcutânea na pata posterior direita de camundongo..... | 32 |
| Figura 5 - Teste algesimétrico para mensuração do limiar nociceptivo..... | 33 |
| Figura 6 - Envolvimento do sistema melatoninérgico no controle endógeno da dor inflamatória..... | 36 |
| Figura 7 - Efeito do antagonista luzindole na antinocicepção periférica causada pelo agonista μ -opioide DAMGO 1 μ g/pata..... | 37 |
| Figura 8 - Efeito do antagonista luzindole na antinocicepção periférica causada pelo agonista δ -opioide SNC80 20 μ g/pata..... | 38 |
| Figura 9 - Efeito do antagonista luzindole na antinocicepção periférica causada pelo agonista K-opioide Bremazocina 1 μ g/pata..... | 39 |
| Figura 10 - Efeito do antagonista luzindole na antinocicepção periférica do agonista CB ₁ anandamida 50 ng/pata..... | 40 |
| Figura 11 - Efeito do antagonista luzindole na antinocicepção periférica do agonista CB ₂ palmitoiletanolamida PEA 20 g/pata..... | 41 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO | 12 |
| Considerações sobre o estudo da dor | 12 |
| Fisiologia da dor..... | 14 |
| Modulação endógena da dor | 17 |
| Sistema opioide | 18 |
| Sistema Endocanabinoide | 20 |
| Melatonina, síntese e regulação | 22 |
| Receptores melatoninérgicos..... | 23 |
| JUSTIFICATIVA | 27 |
| OBJETIVOS | 28 |
| Objetivo Geral | 28 |
| Objetivos Específicos..... | 28 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| Animais de experimentação..... | 29 |
| Cálculo do n amostral | 29 |
| Drogas e Diluentes..... | 30 |
| Agente hiperalgésico..... | 30 |
| Sistema opioide | 31 |
| Sistema Canabinoide | 31 |
| Sistema Melatoninérgico..... | 31 |
| Administração das drogas..... | 32 |
| Análise estatística | 34 |
| RESULTADOS | 35 |
| Envolvimento do Sistema melatoninérgico no controle endógeno da dor inflamatória | 35 |
| Estudo da participação do sistema melatoninérgico no evento antinociceptivo periférico induzido por agonistas opioides | 37 |
| Estudo sobre a participação do sistema melatoninérgico no evento analgésico de endocanabinoides | 40 |
| DISCUSSÃO | 42 |
| REFERÊNCIAS | 50 |

INTRODUÇÃO

Considerações sobre o estudo da dor

De acordo com a definição mais atualizada de dor pela International Association for the Study of Pain (IASP), a dor pode ser considerada como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou assemelhando-se àquela associada, a dano real ou potencial ao tecido (Raja et al., 2020).

A dor é um reflexo protetor do organismo, ao indicar que alguma injúria ou dano tecidual está ocorrendo, ela impulsiona o indivíduo a não só procurar ajuda, mas também reagir por si próprio a fim de tentar interromper sua aparente causa, evitando, com isso, traumas e lesões mais graves, tornando-a assim, essencial para a sobrevivência e o bem-estar dos indivíduos (Basbaum et al., 2009).

A dor pode ser classificada em quatro tipos: nociceptiva, inflamatória e patológica sendo que essa engloba a dor neuropática e dor disfuncional. A dor nociceptiva tem função protetiva e adaptativa, sendo um alerta fisiológico do organismo, essencial para minimizar o contato com o estímulo nocivo e danoso. É desencadeada quando estímulos térmicos, mecânicos ou químicos têm intensidade grande suficiente para provocar lesão tecidual e, conseqüentemente, iniciar a resposta nociceptiva. A dor inflamatória envolve a participação de mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas e as cininas, produzidas por células no local de uma lesão, causam a sensibilização do terminal sensorial nociceptivo, e conseqüentemente, sinalizam o estímulo doloroso para o sistema nervoso central. A dor neuropática ocorre devido a uma lesão causada no nervo periférico ou central que, por diversos mecanismos teciduais e moleculares, provoca um aumento na aferência nociceptiva para o SNC. E por último, na denominada dor disfuncional, aparentemente não ha lesão tecidual associada, e sim um mau funcionamento no processamento das informações sensoriais, o que acaba por produzir a sensação de dor (Woolf, 2010). (Figura 1)

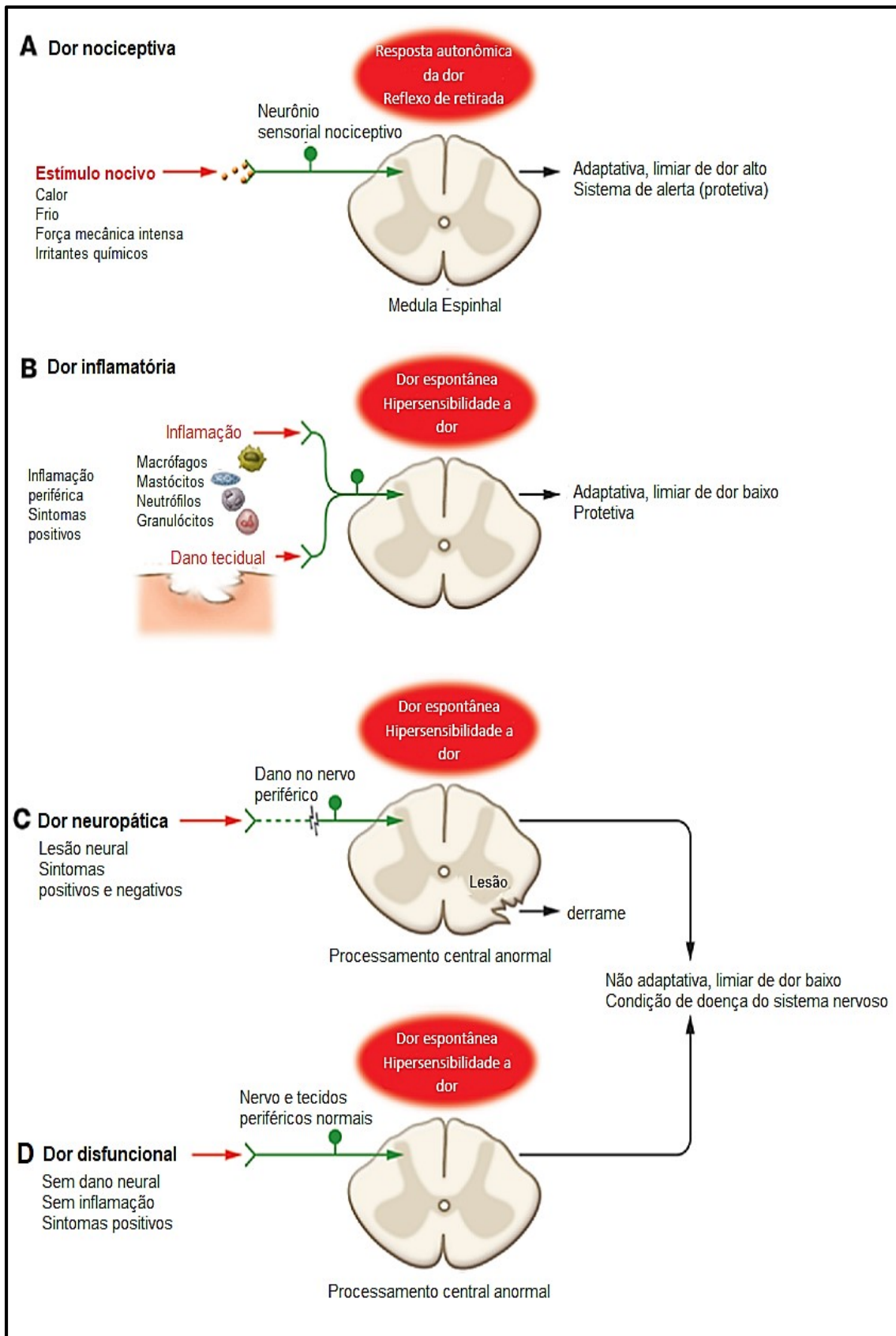


Figura 1: Classificação dos tipos de dor. (Retirado e adaptado de Woolf, 2001).

Por ser uma sensação complexa, o termo “dor” abrange não somente componentes fisiológicos, como todo o processo cognitivo, emocional e social envolvidos nessa sensação (Stamford, 1995; Julius & Basbaum, 2001).

Quando pensamos em animais de experimentação, é de conhecimento que estes também carregam consigo os fatores emocionais e cognitivos inerentes à dor. Porém, em laboratório, por não termos como mensurar tais fatores, avaliamos apenas o fator nocicepção, que é o processo neural que codifica e interpreta os estímulos nocivos detectados pelos nociceptores e envia para o sistema nervoso central. Dessa forma, para os animais de experimentação usamos os termos “nocicepção” e “antinocicepção” para nos referir à dor (Julius & Basbaum, 2001; Klaumann et al., 2008).

Fisiologia da dor

O nociceptor é a unidade sensorial responsável pela nocicepção, formado a partir de terminações nervosas livres presentes em tecidos periféricos, tem a função de perceber o estímulo responsável pela lesão tecidual e transforma-lo em impulsos nervosos, os quais serão transmitidos para o SNC com o objetivo de produzir uma resposta do organismo ao estímulo percebido (Pinho-Ribeiro et al., 2017). O nociceptor localiza-se principalmente em tecidos periféricos, e faz sinapse diretamente com o neurônio secundário na via aferente nociceptiva, presente no corno dorsal da medula espinhal (Kandel et al., 2000; McMahon et al., 2013).

O primeiro passo na sequência dos eventos que originam o fenômeno da dor é a transformação dos estímulos agressivos em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o SNC. Os receptores específicos para a dor estão localizados nas terminações de fibras nervosas A δ e C e, quando ativados, sofrem alterações na sua membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação (Rocha, 2007).

Os receptores sensoriais podem ser classificados em três tipos principais com base no diâmetro, estrutura e velocidade de condução, sendo: a) fibras $A\alpha$ e $A\beta$ mielinizadas, de largo diâmetro e rápida velocidade de condução do estímulo; b) $A\delta$ pouco mielinizadas, diâmetro médio e condução média; c) fibras C amielinizadas, finas e de condução lenta. Em sua maioria, os estímulos nocivos são percebidos pelas fibras $A\delta$ e C. Já as fibras $A\beta$ estão envolvidas na transmissão de impulsos não nocivos (Revisado por Millan, 1999; Fein, 2012). A figura 2 ilustra as diferentes fibras sensoriais.

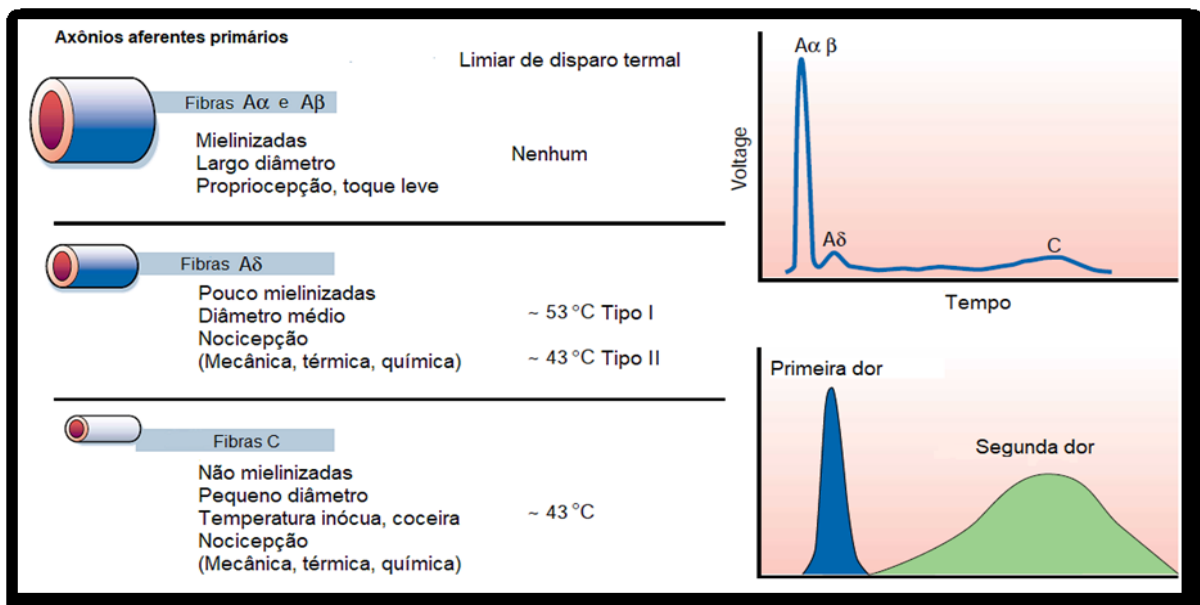


Figura 2 - Axônios aferentes primários. Fibras $A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$ e C. Velocidade de condução do estímulo e relação com a primeira e segunda dor. (retirado e adaptado de Julius e Basbaum, 2001).

As fibras $A\delta$ são capazes de responder a estímulos nocivos térmicos e/ou mecânicos, e ao serem ativadas, geram uma sensação dolorosa bem localizada e específica (Meyer et al., 2006). As fibras do tipo C são responsivas a estímulos de origem mecânica, térmica e/ou química, e devido a este comportamento são denominados receptores polimodais. Ao serem ativadas induzem uma sensação dolorosa mais difusa e inespecífica (revisado por Vanderah, 2007).

Algumas fibras do tipo C são denominadas nociceptores silenciosos, pois não respondem ao estímulo nocivo em condições normais, sendo responsivas apenas após a ocorrência de uma sensibilização, a qual se dá por meio de uma lesão persistente ou na presença de mediadores inflamatórios específicos (Schmidt et al., 1995).

No processo de transmissão ascendente da dor, neurônios aferentes de primeira ordem projetam-se da periferia até o corno dorsal da medula espinhal, onde realizam sinapses com os neurônios de segunda ordem, os quais cruzam para o lado contralateral da medula e ascendem até o tálamo, onde realizam sinapses com os neurônios aferentes de terceira ordem, os quais, por sua vez, projetam-se para o córtex cerebral onde os estímulos nociceptivos são processados e interpretados ao nível da consciência (Furst, 1999; revisto por Vanderah, 2007). (Fig 3).

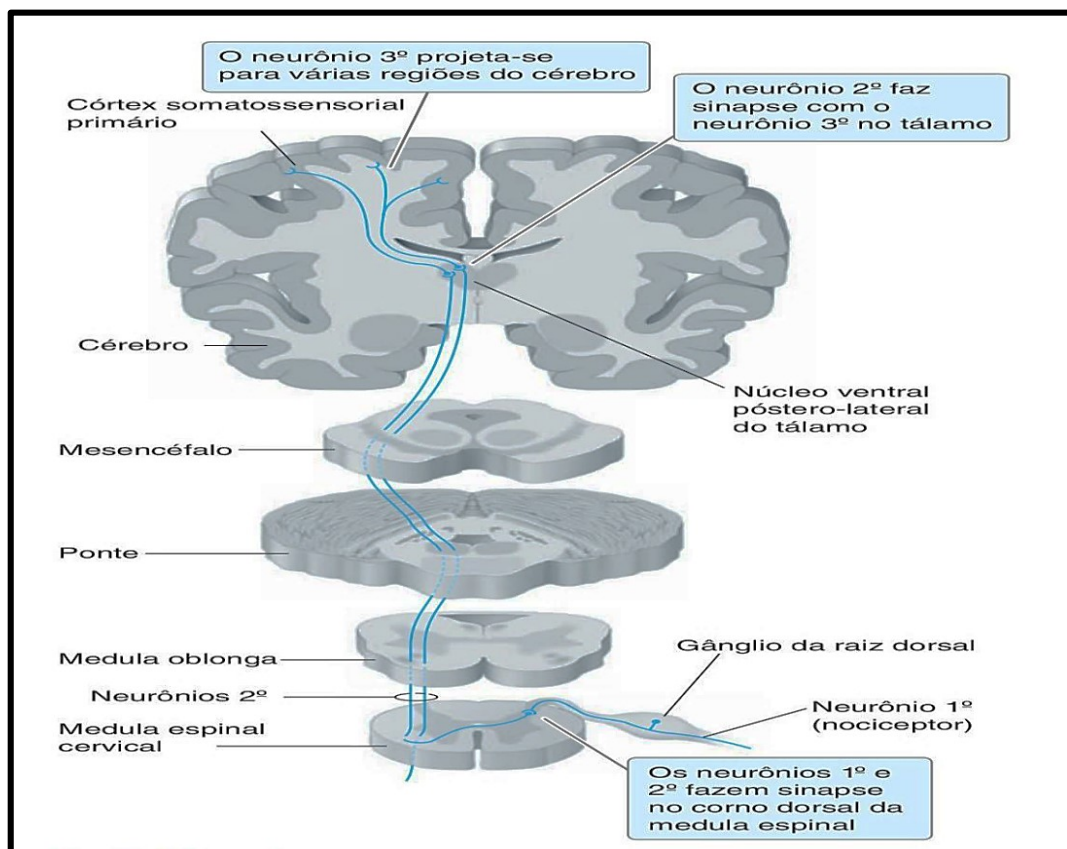


Figura 3 - Representação esquemática da via ascendente da dor. (retirado e adaptado de Golan et al., 2014).

Modulação endógena da dor

Head & Holmes (1911), propuseram que o tálamo seria o centro para a percepção da dor e que o córtex cerebral atuaria continuamente modulando as respostas do tálamo a estímulos nocivos. Contudo, a existência de um sistema específico para modulação da dor foi proposta somente em 1965, por Melzack & Wall com a “teoria do portão espinhal da dor” segundo a qual as fibras de maior diâmetro ($A\alpha$ e $A\beta$) e as fibras de menor diâmetro ($A\delta$ e C) projetam-se para o corno dorsal da medula espinhal e interferem mutuamente na transmissão dos impulsos nervosos. As fibras táteis ($A\alpha$ e $A\beta$), uma vez estimuladas, ativariam interneurônios inibitórios na região que inibiriam a transmissão nociceptiva, de modo a “fechar um portão” para a passagem do impulso nervoso. Em contrapartida, o estímulo das fibras nociceptivas inibiria estes interneurônios inibitórios, abrindo o “portão” para a passagem do impulso (Melzack & Wall, 1965).

Reynolds, em 1969, demonstrou experimentalmente que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (SCP) induzia uma marcante antinocicepção, capaz de inibir respostas reflexas a estímulos nocivos sem alterar respostas reflexas a estímulos ambientais em ratos. Desde então, vários outros sítios antinociceptivos supra espinhais foram identificados, como o hipotálamo, o locus coeruleus, o núcleo do trato solitário, entre outros (Hosobuchil et al., 1977; Sandkuhler, 1996; Millan, 2002).

A partir da descoberta de Reynolds, mecanismos antinociceptivos endógenos começaram a ser extensivamente investigados e descritos, dentre eles o noradrenérgico (Catens et al., 1987; Proudfit, 1988; Haws et al., 1990), serotoninérgico (Chitour et al., 1982) e opioidérgico (Watkins & Mayer, 1982; Carstens et al., 1997; Fürst, 1999).

Sistema opioide

O ópio, extraído da papoula *Papaver somniferum*, tem sido utilizado desde tempos remotos, por diversas culturas, para fins recreativos ou medicinais. Na baixa Mesopotâmia, os registros do cultivo da papoula datam de 3.400 a.C. A extração do ópio é feita por pequenas escarificações em seus frutos ainda verdes, dos quais exuda (Macht, 1915; Baraka, 1982; Brownstein, 1993).

Em 1803, Friedrich Sertürner, foi o primeiro a obter o principal composto ativo do ópio, o alcaloide principium somniferum ou morfina. Anos mais tarde, identificou-se que o sumo extraído da papoula apresentava uma variedade de componentes, onde cerca de 25% correspondiam a alcaloides medicinais, em especial, a morfina (10%), além de outras substâncias como a tebaína, a codeína, a papaverina e a noscapina (Schiff Jr., 2002; Frick et al., 2005).

Os opioides, como a morfina e a codeína, são moléculas analgésicas eficazes na analgesia. Por convenção, denomina-se opiáceo toda a substância de origem natural, presente no ópio da papoula, enquanto que, os opioides seriam todas as moléculas, naturais ou sintéticas, que tenham ação em seus receptores específicos (Brownstein, 1993).

O sistema opioidérgico é composto por três classes de receptores: μ (mu), κ (kappa) e δ (delta), todos pertencentes à classe de receptores acoplados à proteína G (subfamília G_i/o), depois de ativados, eles têm a capacidade de inibir a enzima adenilato ciclase e por consequência, reduzir o conteúdo intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (Dhawan et al., 1996). Dessa forma, não ocorre a ativação da proteína cinase A (PKA), enzima responsável por fosforilar e ativar canais iônicos que modulam a excitabilidade neuronal. Com isso, os opioides promovem a abertura dos canais para potássio e inibem a abertura dos canais para cálcio regulados por voltagem, reduzindo assim tanto a excitabilidade neuronal quanto à liberação de neurotransmissores excitatórios (North, 1986).

O receptor μ é o receptor opioide com distribuição mais ampla no cérebro, principalmente nas estruturas relacionadas ao controle nociceptivo, respostas motoras e motivação, enquanto os receptores κ e δ apresentam distribuição mais restrita. Na medula espinhal, aproximadamente 60% dos receptores opioides são receptores μ , enquanto 19% são receptores κ e 21% são receptores δ (Mansour et al., 1995).

De acordo com Stein, os receptores opioides também são expressos em tecidos periféricos, onde são capazes de modular várias funções fisiológicas (Stein, 1993).

Após a descoberta e caracterização dos receptores opioides, as pesquisas seguiram em direção à busca por moléculas endógenas capazes de se ligarem e ativarem estes receptores. Os primeiros peptídeos opioides descobertos foram as encefalinas e as β -endorfinas (Hughes et al., 1975). Anos mais tarde foi identificada a dinorfina, um peptídeo cerca de 200 vezes mais potente que a morfina (Goldstein et al., 1979) e as endorfinas (Zadina et al., 1997).

Durante o processo inflamatório, há liberação de uma série de mediadores inflamatórios responsáveis pela hiperalgesia, esses mediadores promovem o recrutamento de células imunes (Stein e cols., 1990), principalmente leucócitos polimorfonucleares que secretam peptídeos opioides os quais ativam receptores específicos nos terminais sensoriais para induzir antinocicepção periférica (Stein et al., 2003). Em um estudo realizado por Rittner e colaboradores, (2001) foi demonstrado que durante a inflamação ocorre um progressivo aumento de leucócitos contendo opioides, do conteúdo de peptídeos opioides e da intensidade da analgesia periférica sinalizada por receptores opioides (Rittner et al., 2001).

De acordo com Zöllner, (2003) o processo inflamatório seria capaz regular o aumento do número de receptores μ opioides no gânglio da raiz dorsal (Zöllner et al., 2003).

No ano de 1982, Watkins e Mayer demonstraram que as vias endógenas analgésicas poderiam ser manipuladas seletivamente com ferramentas farmacológicas, podendo a partir de então, inibir ou estimular processos analgésicos evocados pela estimulação elétrica na medula (Reynolds, 1969; Watkins e Mayer, 1982).

Sistema Endocanabinoide

Formulações a base de *Cannabis sativa* são utilizadas como analgésicos há séculos, porém somente na década de 1960 seu princípio ativo majoritário, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) foi isolado. Além de suas ações psicoativas, o THC também apresenta diversas outras ações, dentre elas, analgésica, anti-inflamatória, imunossupressora, anticonvulsivante e antiemética (Munro, Thomas, 1993, Rang et al., 2012).

O sistema canabinoide é composto por dois receptores principais, CB₁ e CB₂, ambos acoplados a proteínas G_i/G_o, cujo mecanismo de sinalização intracelular leva a inibição de adenilato ciclase solúvel e, conseqüentemente, redução das concentrações do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclica (AMPc), PKa e outras vias canabinoidérgicas levando a redução da atividade da célula como um todo (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993).

O receptor CB₁ é um receptor pré-sináptico, atua modulando a liberação de neurotransmissores e inibindo a transmissão sináptica, também tem ações na regulação da dor, processamento de memória e controle motor. É encontrado no cérebro nas regiões do córtex cerebral, hipocampo, amígdala, cerebelo (Herkenham, 1995; Howett, 2002) e também na periferia nos neurônios aferentes primários, no gânglio da raiz dorsal (DRG), no corno dorsal da medula espinal e na substância cinzenta periaqueductal, bem como em células do sistema imune, como macrófagos, mastócitos e queratinócitos (Hill et al., 2017).

Os receptores CB₂ são encontrados em tecidos e células do sistema imune, células hematopoiéticas, terminações nervosas periféricas, queratinócitos, fígado e nas micróglias (Abrams e Guzman, 2015). Quando ativados, colaboram no controle de processos inflamatórios e na modulação da dor crônica (Kano, 2014; Niu et al., 2017).

Evidências indicam que outros receptores, que não CB₁ e CB₂ podem também ser alvo de canabinoides. Dentre esses se encontra o chamado receptor órfão GPR₅₅, que tem como agonistas alguns canabinoides como a virodamida e palmitoiletanolamida (PEA) (Ryberg et al., 2007).

Após a descoberta dos receptores canabinoides, levou-se em consideração a possibilidade da existência de ligantes endógenos capazes de se ligar a esses receptores. O primeiro endocanabinoide identificado foi a araquidonoiletanolamida (AEA), ou anandamida, seguido do 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Outros canabinoides endógenos foram descritos, como a noladina (2-araquidonilgliceril), o PEA, porém, os mais estudados atualmente ainda são o AEA e o 2-AG. A anandamida tem maior afinidade por receptores CB₁, enquanto 2-AG se liga em ambos receptores CB₁ e CB₂ (Marzo e Bisogno, 2001; revisado por Howlett, 2002).

Os endocanabinóides não se armazenam em vesículas, sendo sintetizados de acordo com a demanda a partir de fosfolípidos de membrana (Chevalleyre, 2006), agem como mensageiros retrógrados. Diferentemente da sequência usual, o estímulo começa no neurônio pós-sináptico e a excitação neuronal leva à despolarização e ao influxo de íons e cálcio que estimulam várias fosfolipases, iniciando assim, a síntese dos endocanabinóides. Esses são liberados na fenda sináptica e difundem livremente para estimular os receptores CB₁ nos terminais pré-sinápticos (Schier, 2011).

Diversos estudos têm demonstrado que os endocanabinóides promovem uma série de efeitos, entre os quais: envolvimento na diminuição da sensibilidade aos estímulos dolorosos, controle do movimento e inibição da memória de curto prazo (Lutz, 2002), efeitos ansiolíticos (Navarro, 1997); modulação da resposta imune e inflamatória (Petrocelli, 2000).

Trabalhos do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado nos últimos anos, que a ativação do sistema endocanabinoide leva a antinocicepção periférica (Romero et al., 2012a; Romero Ferreira et al., 2013; Oliveira et al., 2019; Noronha, 2021).

Melatonina, síntese e regulação

Em 1969, Morris e Lutsch postularam que os animais são menos sensíveis a dor durante a noite, quando os níveis de melatonina no plasma estão muito mais elevados o que acabou tornando-se o primeiro relato sobre os efeitos antinociceptivos da melatonina. Poucos anos depois, estudos realizados por Lutsch e Morris (1971) e Rosenfield e Rice (1979), ratificaram essa descoberta.

Desde então, a atividade antinociceptiva da melatonina tem ganhado destaque no meio científico. Seus efeitos antinociceptivos foram observados usando vários modelos experimentais de dor inflamatória e neuropática em camundongos e ratos, porém, o mecanismo fisiológico pelo qual ela exerce sua ação analgésica ainda não está totalmente elucidado.

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um importante neuro-hormônio sintetizado principalmente pela glândula pineal nos seres humanos, bem como em outros animais, podendo também ser sintetizada por diversos órgãos e tecidos, como os olhos, medula óssea, pele, trato gastrointestinal, timo, útero, linfócitos (Cardinali e Rosner, 1971; Bubenik et al., 2002; Carrillo-Vico et al., 2004; Slominiski et al., 2005; Naranjo et al., 2007).

No início, a melatonina foi associada apenas à reorganização do sistema circadiano endógeno, promoção do sono e regulação dos ciclos reprodutivos sazonais. Porém, com o avançar dos estudos, muitas outras funções foram relacionadas a ela, como ação neuroprotetora, antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, antienvhecimento, na agregação plaquetária, na composição do sangue, como uma possível ferramenta no tratamento de infecções causadas por bactérias, vírus e parasitas e efeito antinociceptivo (Srinivasan et al., 2012; Rodrigues et al., 2014; Vielma et al., 2014).

Sua síntese inicia a partir do aminoácido precursor, L-triptofano. A enzima triptofano hidroxilase transforma o L-triptofano em 5-hidroxitriptofano, em seguida sofre a ação

da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT), transformando-se em N-acetil-5-hidroxitriptamina. Na sequência é metilada para formar N-acetil-5-metoxitriptamina ou melatonina pela enzima hidroxilindol-O-metil transferase (HIOMT) (Axelrod e Wurtman, 1968; Arendt, 2009).

O mecanismo fisiológico de produção de melatonina inicia à noite, com a ausência de luz, esse processo é regulado por um circuito neural complexo com fibras originadas na retina, passando pelo trato retino-hipotalâmico, núcleo supraquiasmático, hipotálamo lateral e fibras pré-ganglionares da medula espinhal que se comunicam com o gânglio cervical superior o qual deflagra o sinal até a glândula pineal (Moore, 1996; Cipolla-Neto, 2018).

Uma vez formada, a melatonina não é armazenada dentro da glândula pineal, mas difundida pelo sangue onde seu tempo de meia vida varia de 20 a 30 minutos. A metabolização ocorre principalmente no fígado, onde é hidroxilada na posição C6 pelas mono-oxigenases do citocromo P450 (CYPA2 e CYP1A), sendo então conjugada com sulfato para formar 6-sulfatoximelatonina, seu principal metabólito encontrado na urina (Hirata et al., 1974; Srinivasan et al., 2012).

Receptores melatoninérgicos

Os efeitos mediados pela melatonina ocorrem por meio de vias dependentes e independentes de receptor. No mecanismo dependente, os receptores de melatonina são divididos em receptores de membrana celular e receptores nucleares órfãos da superfamília RZR/ROR (Zlotos et al., 2014).

Os receptores de membrana MT₁ e MT₂ pertencem à família de receptores acoplados à proteína G (GPCR), sendo que ambos se acoplam à proteína G_{i/o} e MT₁ acopla-se também à proteína G_q (Zlotos et al., 2014; Jockers et al., 2016).

Um terceiro receptor de melatonina denominado MT₃ foi posteriormente identificado como a enzima quinona redutase 2 (QR₂), enzima pertencente a um grupo de redutases que participam de mecanismos antioxidantes, porém a função da interação

entre a melatonina e a QR₂ ainda não está completamente elucidada (Nosjean et al., 2000).

O receptor nuclear órfão GPR₅₀, também conhecido como receptor relacionado à melatonina tem alta homologia de sequência com os receptores de membrana, no entanto, nem a melatonina ou qualquer outro ligante conhecido é capaz de ligar-se a ele (Batailler, Mullier, Sidibe, et al., 2012).

Os receptores melatoninérgicos podem ser encontrados em diversos tecidos e órgãos, como hipocampo, cerebelo e estruturas formadoras das vias centrais dopaminérgicas (Srinivasan et al., 2010).

No sistema nervoso central e periférico, os receptores MT₁ e MT₂ estão localizados na membrana neuronal, porém, raramente coexistem na mesma célula. Quando isso ocorre, um deles domina a membrana celular (Lacoste, Angeloni, Dominguez-Lopez, et al., 2015). O receptor MT₁ pode desempenhar um papel importante na transdução de sinal no sistema nervoso. Pesquisas recentes indicam que ele está envolvido nas vias neurais que modulam a depressão e ritmos diurnos (Klosen, Lapmanees, Schuster, et al., 2019; Xie et al., 2020).

Na periferia, os receptores MT₁ e MT₂ foram identificados no corno dorsal da medula espinhal, especificamente na lâmina I-V e X, regiões envolvidas nos mecanismos reguladores da dor, também foram identificados na retina, rim, vesícula biliar, fígado, glândula mamaria, aorta e em diferentes células da pele (Ambriz-Tututi et al., 2009; Srinivasan et al., 2012).

Estudos recentes sugerem que a melatonina pode exercer seus efeitos antinociceptivos agindo diretamente, por meio de receptores melatoninérgicos MT₁/MT₂ ou indiretamente por uma série de sistemas e seus receptores, incluindo benzodiazepinérgico (receptor BZD), opioidérgico (receptores $\delta/\kappa/\mu$), serotoninérgico (receptor 5HT_{2A}), dopaminérgico (receptor D₂), adrenérgico (receptor α_2), glutamatérgico (receptor NMDA), além da via do óxido nítrico (Y. Kuthati et al., 2018).

Posa e colaboradores (2018), apresentaram, em um estudo de revisão, as propriedades analgésicas da melatonina em estudos pré-clínicos e clínicos, com ênfase nos efeitos mediados pelos receptores MT₂, bem como investigações recentes

que também demonstram os efeitos analgésicos dos agonistas parciais do receptor MT₂ em condições de dor crônica e aguda.

Sabendo que a melatonina exibe propriedades analgésicas em vários modelos de dor, verificou-se que esses efeitos são mediados por receptores MT₂, uma vez que são bloqueados por antagonistas seletivos MT₂. Em diferentes modelos de dor, os agonistas parciais MT₂, UCM924 e UCM765, apresentaram efeitos analgésicos mais fortes que a melatonina, confirmando o envolvimento desses receptores no controle da dor (Posa et al., 2018).

De forma semelhante, López-Canul e colaboradores (2015), examinaram as propriedades antinociceptivas dos agonistas parciais do receptor seletivo de melatonina MT₂, UCM765 e UCM924 em dois modelos animais de dor aguda e inflamatória. Os resultados demonstraram as propriedades antinociceptivas de UCM765 e UCM924 em modelos de dor aguda e inflamatória e corroboram a teoria de que o receptor de melatonina MT₂ pode ser um importante alvo para o desenvolvimento de novos analgésicos.

Em 2008, utilizando o teste da formalina, Hernández-Pacheco e colaboradores propuseram um possível mecanismo de ação da melatonina. Os dados do estudo, sugerem que a antinocicepção periférica induzida pela melatonina durante a segunda fase do teste da formalina, pode ser devida à ativação da via de canais de K⁺ sensível a NO-GMP-PKG-ATPc e Ca²⁺ (Hernández-Pacheco et al., 2008).

Pesquisadores avaliaram o efeito de uma única administração de melatonina em um modelo de dor neuropática com monitoramento do comportamento e das alterações do sistema nitrérgico nos gânglios da raiz dorsal e na pele, ao final, esse trabalho demonstrou que o aumento da produção de NO e da expressão de NOS foram inibidas pela administração de melatonina (Borsani et al., 2017). Curiosamente, a adição de luzindole, antagonista MT₁ e MT₂, não teve influência na expressão de nNOS, o que sugere, que o efeito antinociceptivo da melatonina nesta via não é mediado por receptores melatoninérgicos (Xie et al., 2020).

Evidências sustentam que a melatonina é capaz de reduzir a ciclooxigenase-2 e a expressão de iNOS, inibindo assim a produção de PGE₂ e NO, respectivamente, proporcionando alívio da hiperalgesia inflamatória (Xie et al., 2020).

Em outro estudo, utilizando um modelo de estimulação mecânica e térmica na pata traseira de ratos, observou-se que a coadministração de melatonina e morfina, foi capaz de inibir a hiperalgesia e atenuar a tolerância induzida por morfina. Tais efeitos foram associados à atividade da proteína quinase C (PKC) e a um subtipo de receptor NMDA, o NR₁ (Song; Wu; Zuo, 2015). Raghavendra e Kulkarni (1999), também investigaram a participação da melatonina em uma possível reversão da tolerância e dependência induzida por morfina. De acordo com os autores, essa ação possivelmente envolve receptores benzodiazepínicos periféricos.

Outro estudo investigou o efeito da melatonina na ação antinociceptiva induzida por agonistas opioides, os resultados demonstraram que a melatonina aumentou a antinocicepção induzida pelo agonista do receptor δ -opioide, porém não do agonista μ -opioide (Shi-Rong Li et al., 2005).

Um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa avaliou a participação do sistema melatoninérgico, sistema canabinoide, e da PI3K frente à antinocicepção periférica induzida por melatonina, nossos resultados sugerem que a melatonina induz efeito antinociceptivo periférico pela a ativação dos receptores MT₁ e MT₂, bem como uma possível liberação de endocanabinóides com consequente ativação do receptor canabinoide CB₁, e posterior ativação da via intracelular iniciada pela PI3K γ (Noronha, 2021).

Finalmente, outros estudos também demonstraram que a antinocicepção promovida pela melatonina pode ser mediada pelos receptores adrenérgicos (α_1 e α_2), muscarínicos e nicotínicos na medula espinhal (Shin DJ et al., 2011).

JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a dor está diretamente relacionada a alterações na qualidade de vida, como prejuízo do sono, alterações de humor, diminuição da capacidade de concentração, dificuldade de relacionamento familiar, atividade sexual e depressão, sendo então um problema de saúde pública (Kempen et al., 1997; Gureje, et al., 1998; Baune et al., 2008; Edwards et al., 2016).

O manejo da dor é um componente importantíssimo da assistência ao paciente, tanto que levou ao desenvolvimento de inúmeros fármacos cujo objetivo principal é amenizar ou acabar com a mesma. Contudo, esses medicamentos muito frequentemente levam ao desenvolvimento de importantes efeitos adversos, como gastrointestinais, toxicidade hepática e renal, cardiovasculares, depressão respiratória, tolerância e dependência (Rigotti; Ferreira, 2005).

Com base no exposto, um maior entendimento e a busca por novas alternativas para o manejo e controle da dor se fazem extremamente necessários.

A melatonina, por apresentar propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e sedativas (Burchakov e Uspenskaya 2017), vem recebendo uma importante visibilidade em estudos relacionados a dor. Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa verificou o efeito antinociceptivo periférico da melatonina, e demonstrou a participação do sistema canabinoide no efeito antinociceptivo periférico da mesma (Noronha, 2021).

Sabendo que peptídeos opioides e canabinoides participam do controle endógeno da dor e que vários estudos relacionaram o envolvimento dessas vias na ação analgésica da melatonina, seria importante verificar a participação do sistema melatoninérgico em eventos analgésicos via agonistas opioides e canabinoides, fato esse que se comprovado, tornaria o uso da melatonina uma alternativa interessante na busca por um tratamento eficaz, seguro e com menos efeitos adversos no controle da dor.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o possível envolvimento do sistema melatoninérgico na modulação endógena da dor inflamatória e sua participação na analgesia periférica por agonistas opioides e canabinoides.

Objetivos Específicos

1. Estudar a participação do sistema melatoninérgico no controle endógeno da dor inflamatória.
2. Estudar a participação do sistema melatoninérgico no evento antinociceptivo periférico induzido por agonistas opioides.
3. Estudar a participação do sistema melatoninérgico na antinocicepção periférica induzido por agonistas canabinoides.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais de experimentação

Para a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (machos), pesando entre 30 e 40 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da UFMG (Cebio/UFMG). Os animais ficaram acondicionados em gaiolas de dimensões 40 x 33 x 10 cm (comprimento x largura x altura), com forragem de maravalha; temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ \text{C}$); ciclo claro-escuro (06:00 – 18:00h); livre acesso a alimento e água. Dois dias antes da realização do experimento, os animais foram colocados em sala termicamente controlada ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) com ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas para ambientalização.

Após a realização dos experimentos, os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de dose letal de uma mistura de ketamina (300 mg/Kg) e xilazina (25 mg/kg). Todos os experimentos foram conduzidos segundo preceitos bioéticos de experimentação animal, e aprovados no Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA-ICB/UFMG), com registro de protocolo nº 368/2019.

Foi utilizado um n amostral de 5 animais ($n = 5$) em todos os experimentos conforme descrito no cálculo do n amostral.

Cálculo do n amostral

Para o cálculo estatístico do N amostral foi utilizada a seguinte fórmula:

$$n = \frac{2 \cdot \sigma^2 \cdot (Z_\beta + Z_\alpha)^2}{E^2}$$

n = número amostral

σ = desvio padrão

Z_β = poder de teste de 80%

Z_α = nível de significância alfa = 0,05

E = erro absoluto

Logo, a distribuição é unicaudal à direita. Assumindo um poder de teste de 80% ($Z_{\beta} = 0,84$) e nível de significância alfa = 0,05 ($Z_{\alpha} = 1,64$), derivamos os tamanhos amostrais para os grupos, considerando grupos de mesmo tamanho, porém amostras não pareadas (razão = 1). A margem de erro absoluto foi assumida como sendo 12 g, um consenso entre experimentadores experientes que realizam a técnica rotineiramente. A partir de estudos pilotos prévios, o desvio padrão das médias foi calculado como sendo igual a 7,026 g.

É importante ressaltar que os valores de confiabilidade e de erro absoluto foram selecionados de modo a atender os parâmetros estatísticos, sem, entretanto, permitir que o valor do n amostral se apresentasse elevado, inviabilizando a realização do projeto.

$$n = \frac{2 \cdot (7,026)^2 \cdot (0,84 + 1,64)^2}{12^2}$$

n = 4,2168 (arredondamento para n = 5)

$\sigma = 7.026$

$Z_{\beta} = 0,84$

$Z_{\alpha} = 1,64$

$E = 12$

Drogas e Diluentes

Agente hiperalgésico

O agente hiperalgésico carragenina- λ (Sigma, EUA) foi administrado na pata posterior direita dos animais nas doses de 200, 100, 50 e 25 μg diluídos em 20 μL de solução salina estéril (NaCl 0,9% m.V⁻¹).

Sistema opioide

- DAMGO (Sigma, St. Louis, MO) – Agonista μ - opioide - Mantido em freezer (-20 °C), em solução estoque.
- SNC80 - (4-[(R)-[(2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethylpiperazin-1-yl](3 ethoxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide- Tocris - Agonista δ -opioide – Mantido em freezer (-20 °C), em solução estoque, dissolvido em DMSO 10%.
- Bremazocina (RBI, Nattick, MA) – Agonista K-opioide – Mantido em freezer (-20 °C), em solução estoque, dissolvida em salina.

Sistema Canabinoide

- Anandamida - AEA (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN), agonista dos receptores canabinoides CB₁ – Mantida em freezer (-20 °C), em solução estoque, dissolvida em Tocrisolve 10%.
- N-palmitoyl-ethanolamine – PEA (Sigma St Louis, Mo) – agonista dos receptores canabinoides CB₂ – Mantida em freezer (-20 °C), em solução estoque, dissolvida em DMSO 5% em salina.

Sistema Melatoninérgico

- Luzindole (Cayman Chemical, EUA), antagonista não seletivo de receptores melatoninérgicos - Mantido em freezer (-20 °C), em solução estoque, dissolvido em DMSO 100%. Antes das injeções, a solução foi diluída em salina, obtendo-se a concentração de DMSO 10%.

Administração das drogas

Todas as drogas utilizadas foram administradas por meio de injeção subcutânea na superfície plantar da pata posterior direita do camundongo, via intraplantar (i.pl.), em um volume de 20 μ L (Figura 5).



Figura 4 - Administração intraplantar subcutânea na pata posterior direita de camundongo.

Em todos os experimentos o limiar basal de cada animal foi determinado antes da administração do agente hiperalgésico e três horas após. Os limiares, sempre foram aferidos três vezes, observando um intervalo mínimo de 10 segundos entre cada medida, sendo o resultado a média dessas medições.

A carragenina foi injetada na hora zero sendo que as medidas foram feitas 3 horas após sua injeção (momento de pico da hiperalgesia) (Oliveira et al., 2019).

O antagonista luzindole ou seu veículo foram administrados 25 minutos antes da terceira hora - pico de hiperalgesia (Noronha, 2021).

Os agonistas opioides DAMGO, SNC80 e BRE (Romero et al., 2012), bem como os agonistas canabinoides AEA e PEA (Romero et al., 2013), foram administrados 5 minutos antes da terceira hora.

Para a mensuração do limiar nociceptivo mecânico foi utilizado o método de retirada da pata submetida à compressão.

Descrito originalmente em ratos por Randall & Selito (1957) e posteriormente adaptado para camundongos por Kawabata e colaboradores (1992). Esses autores desenvolveram uma técnica para medir a atividade antinociceptiva, baseada no princípio de que a inflamação aumenta a sensibilidade ao estímulo doloroso (hiperalgesia) e que essa sensibilidade aumentada é susceptível de ser modificada por fármacos.

No teste, o animal é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a superfície plantar da pata a ser testada é colocada sob a parte compressora do aparelho algosimétrico (Ugo Basile, Itália).

A parte compressora do aparelho consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual é colocada a pata do animal, e outra cônica, com uma área de 1,75 mm² na extremidade, por meio da qual é aplicado uma pressão na superfície plantar da pata do camundongo. A intensidade da pressão aplicada aumenta a uma taxa constante de 16 g/s, mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador.

Ao observar a resposta nociceptiva do animal, padronizada como retirada da pata, o experimentador desaciona o pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta à pata, sendo que o último valor, correspondente ao limiar nociceptivo, fica indicado na escala do aparelho e expresso em gramas (g). O valor de 160 g foi usado como valor de corte para reduzir a possibilidade de lesão na pata dos camundongos.

Dois dias antes do teste, os animais foram ambientalizados ao aparelho a fim de mimetizar a mesma situação vivenciada no dia do experimento e reduzir o estresse ao animal.



Figura 5- Teste algesimétrico para mensuração do limiar nociceptivo

Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 8.0.2. Os resultados obtidos foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e foram submetidos ao teste de análise de variância One-Way ou Two-Way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Valores considerados estatisticamente significativos foram de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Envolvimento do Sistema melatoninérgico no controle endógeno da dor inflamatória

A carragenina foi capaz de produzir hiperalgesia de forma dose dependente, apresentando pico de ação 3 horas após a injeção intraplantar.

Após a administração do antagonista melatoninérgico luzindole, houve um aumento da nocicepção periférica causada pela carragenina na dose 50 e 100 µg/pata. Observamos com isso, que o antagonismo do receptor melatoninérgico piora a nocicepção de doses intermediárias de carragenina. (Figura 6).

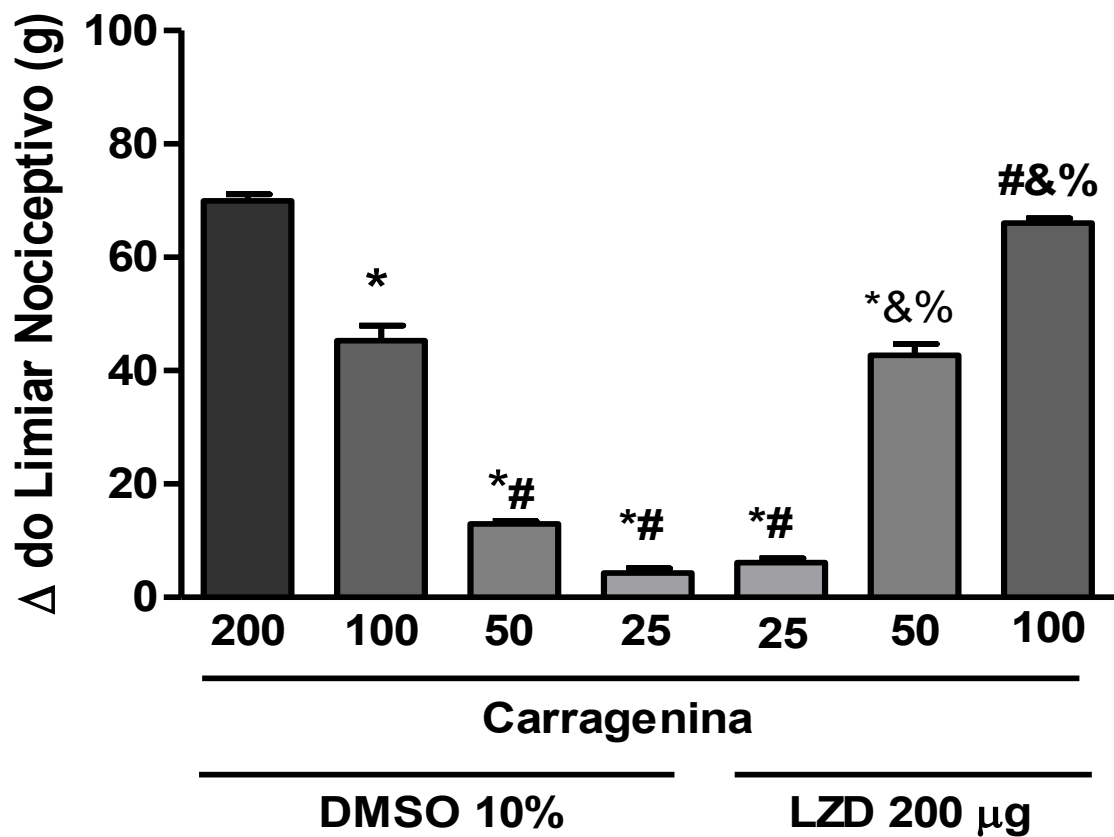


Figura 6- Envolvimento do sistema melatoninérgico no controle endógeno da dor inflamatória. Os animais foram divididos em dois grandes grupos, no primeiro grupo, diferentes doses de carragenina (CG) foram administradas no tempo 0. No segundo grupo, além da CG, foi administrado o antagonista melatoninérgico luzindole (200 μg/pata), 25 minutos antes do pico de ação da CG. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N = 5 animais. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Carragenina 200 μG + DMSO 10% e # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo (Carragenina 100 μG + DMSO 10%), & indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo (Carragenina 50 μG + DMSO 10%), % indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Carragenina 25 μG + DMSO 10%).

Estudo da participação do sistema melatoninérgico no evento antinociceptivo periférico induzido por agonistas opioides

A fim de avaliar o envolvimento do sistema melatoninérgico na analgesia provocada por opioides endógenos utilizamos os agonistas μ -opioide: DAMGO, δ -opioide: SNC80 e κ -opioide BRE juntamente com o antagonista melatoninérgico luzindole nas doses 200, 100, 50 $\mu\text{g/pata}$.

A administração do agonista μ -opioide DAMGO (1 $\mu\text{g/pata}$) foi capaz de induzir antinocicepção, a administração do antagonista melatoninérgico luzindole reverteu parcialmente a antinocicepção induzida por DAMGO (Figura 7).

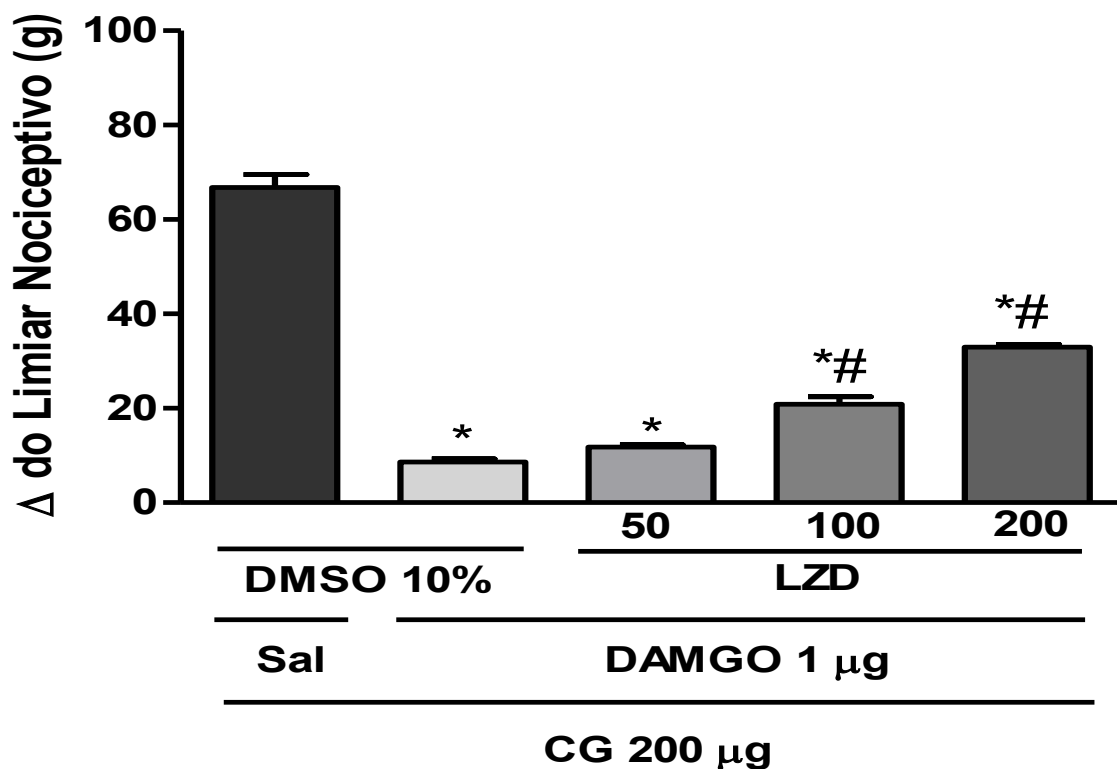


Figura 7- Efeito do antagonista luzindole na antinocicepção periférica causada pelo agonista μ -opioide DAMGO 1 $\mu\text{g/pata}$. A carragenina (CG) foi administrada no tempo 0. O antagonista luzindole foi administrado 25 minutos antes do pico de ação da CG. DAMGO foi administrado 5 minutos antes do pico de ação da CG. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente na N = 5 animais. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo (CG 200 μg + DMSO 10% + sal) e # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo (CG 200 μg + DMSO 10% + DAMGO 1 $\mu\text{g/pata}$).

Ao administrarmos o agonista δ -opioide SNC80 (20 $\mu\text{g/pata}$), e posteriormente o agonista K-opioide BRE (1 $\mu\text{g/pata}$), também observamos a reversão da hiperalgesia provocada pela carragenina, à administração do antagonista melatoninérgico luzindole na dose máxima de 200 $\mu\text{g/pata}$, reverteu de forma parcial da analgesia provocada pelos agonistas opioides SNC80 (Figura 8) e BRE (Figura 9).

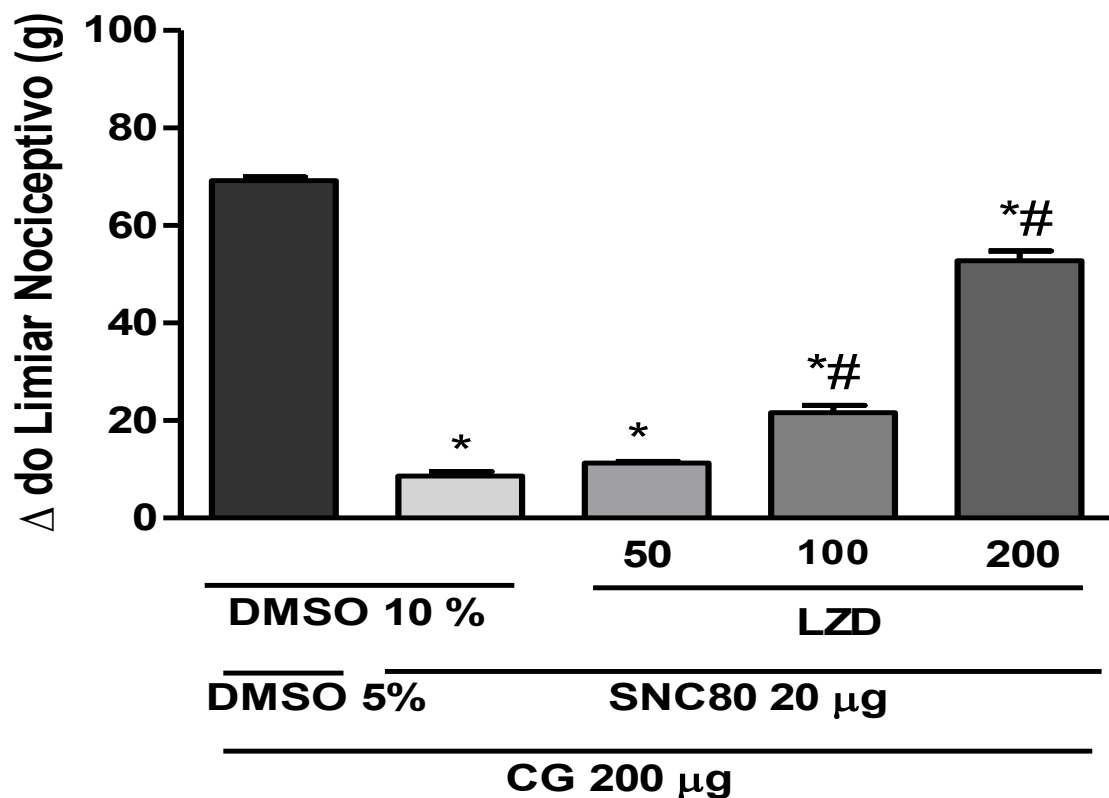


Figura 8- Efeito do antagonista luzindole na antinocicepção periférica causada pelo agonista δ -opioide SNC80 20 $\mu\text{g/pata}$. A carragenina (CG) foi administrada no tempo 0. O antagonista luzindole foi administrado 25 minutos antes do pico de ação da CG. SNC80 foi administrado 5 minutos antes do pico de ação da CG. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente na N = 5 animais. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo (CG 200 μg + DMSO 10% + DMSO 5%) e # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo (CG 200 μg + DMSO 10% + SNC80 20 $\mu\text{g/pata}$).

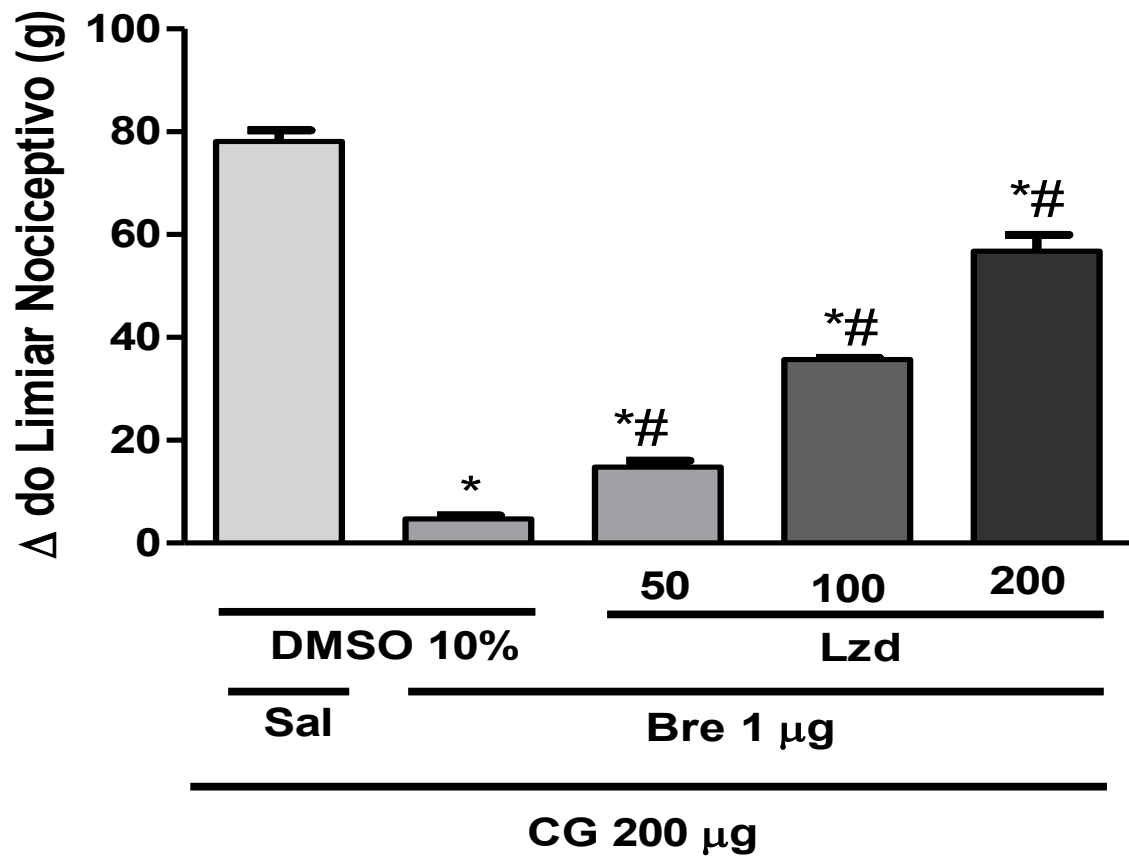


Figura 4- Efeito do antagonista luzindole na antinocicepção periférica causada pelo agonista K-opioide BRE 1 µg/pata. A carragenina (CG) foi administrada no tempo 0. O antagonista luzindole foi administrado 25 minutos antes do pico de ação da CG. BRE foi administrada 5 minutos antes do pico de ação da CG. Cada barra representa a média \pm E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente a N = 5 animais. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo (CG 200 µG + DMSO 10% + DMSO 5%) e # indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo (CG 200 µG + DMSO 10% + BRE 1 µg/pata).

Estudo sobre a participação do sistema melatoninérgico no evento analgésico de endocanabinoides

Observamos que o agonista dos receptores CB₁ canabinoides anandamida (AEA) induziu antinocicepção na dose de 50 ng, porém a mesma foi revertida de forma dose dependente pelo antagonista melatoninérgico luzindole (LZD) (Figura 10).

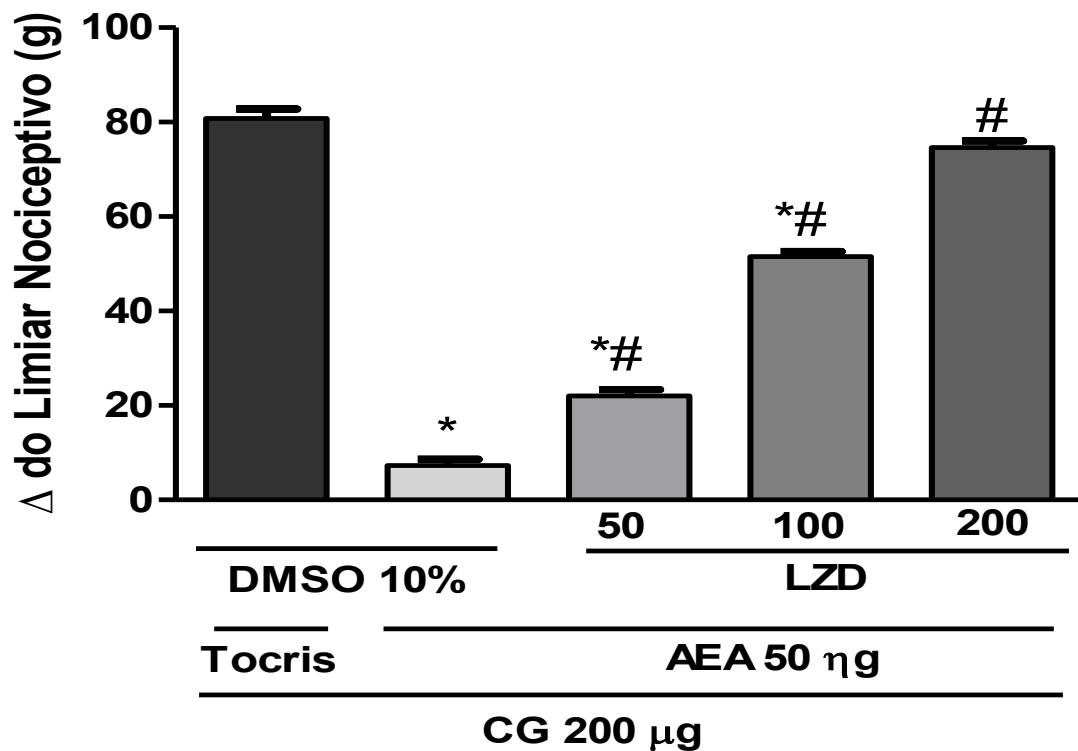


Figura 10 - Efeito do antagonista luzindole na antinocicepção periférica do agonista CB₁ anandamida 50 ng/pata. A carragenina (CG) foi administrada no tempo 0. O antagonista luzindole foi administrado 25 minutos antes do pico de ação da CG. A anandamida foi administrada 5 minutos antes do pico de ação da CG. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente na N = 5 animais. * indica significância estatística (p < 0,05) em relação ao grupo (CG 200 μG + DMSO 10% Tocrissolve 10%) e # indica significância estatística (p < 0,05) em relação ao grupo (CG 200 μG + DMSO 10% + AEA 50 ng).

Com relação ao agonista CB₂ canabinoide palmitoiletanolamida (PEA), observamos um comportamento semelhante. A PEA induziu antinocicepção na dose de 20 µg, porém a mesma foi revertida de forma dose dependente pelo antagonista melatoninérgico luzindole (Figura 11).

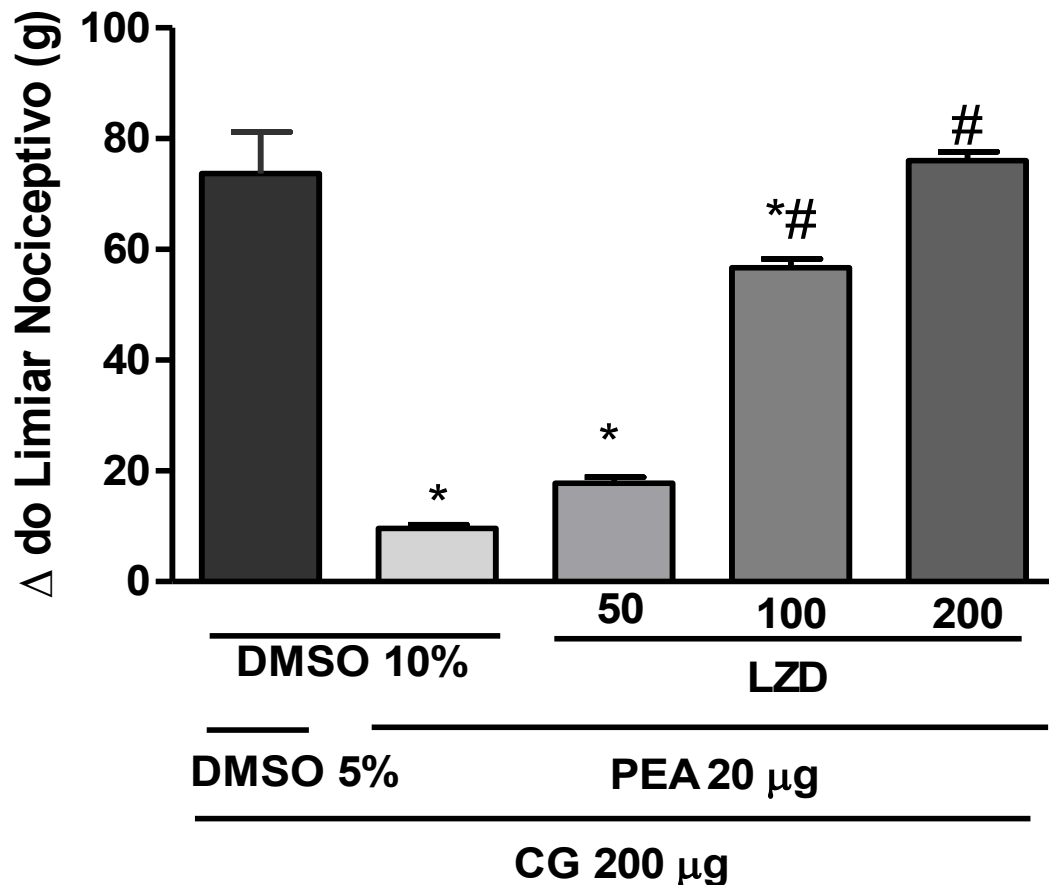


Figura 11- Efeito do antagonista luzindole na antinocicepção periférica do agonista CB₂ palmitoiletanolamida (PEA 20 µg/pata). A carragenina (CG) foi administrada no tempo 0. O antagonista luzindole foi administrado 25 minutos antes do pico de ação da CG. A PEA foi administrada 5 minutos antes do pico de ação da CG. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente na N = 5 animais. * indica significância estatística (p < 0,05) em relação ao grupo (CG 200 µg + DMSO 10% + DMSO 5%) e # indica significância estatística (p < 0,05) em relação ao grupo (CG 200 µg + DMSO 10% + PEA 20 µg/pata).

DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar um possível envolvimento do sistema melatoninérgico na modulação endógena periférica da dor inflamatória, utilizamos o modelo de hiperalgesia induzido pela carragenina (CG) em camundongos. A CG utilizada é extraída da alga *Chondrus crispus*, e seu princípio utilizado, a fração lambda, é capaz de induzir um processo inflamatório (Di Rosa, 1972), e conseqüentemente uma hiperalgesia, sendo esta observada por meio de variadas respostas físicas e comportamentais em camundongos (Nantel et al., 1999).

A indução de nocicepção inflamatória pela carragenina mimetiza de forma fiel o processo natural de sensibilização do sistema nociceptivo, podendo ser utilizado tanto em ratos como em camundongos, além de promover uma resposta sustentada por várias horas (Barrot, 2012).

Diversos trabalhos realizados utilizando o modelo de hiperalgesia induzido por carragenina demonstraram que o seu efeito tem início 1 hora após sua administração, atingindo seu pico máximo de ação em 3 horas, com decaimento do efeito a partir da 6ª hora (Cunha et al., 2005; Lauro et al., 2016; Oliveira et al., 2019). Dados esses que corroboram com nossos achados, onde a carragenina atingiu seu pico de ação máxima em 3h após sua administração e manteve sua ação estável por todo período de observação.

A CG vem sendo usada para verificar o mecanismo de ação analgésico de várias substâncias como, NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Duarte e Ferreira, 2000), celecoxibe (Rezende et al., 2009), óxido Nítrico (Alves et al., 2013), angiotensina 1 (Costa et al., 2014), peltatoside (Oliveira et al., 2017), resveratrol (Oliveira et al., 2019), serotonina (Nascimento et al., 2021) e melatonina (Noronha, 2021).

Apesar de a melatonina ter sido identificada há mais de 50 anos, estudos demonstrando suas ações na periferia são relativamente recentes. Seus receptores foram encontrados em diversos tecidos, como na retina onde favorece a diminuição da liberação de dopamina; sistema imunológico promovendo a proliferação de células imunológicas e estimulando a produção de IL2 e IL6; sistema reprodutivo, diminuindo a liberação de GnRH, LH, FSH, pele, regulando o crescimento do cabelo e as funções da epiderme, rins, onde atua na proteção da inflamação, e regulação da filtração glomerular, entre outros (Slominski et al., 2012).

Além das ações descritas acima, estudos demonstraram que a melatonina exerce um importante potencial analgésico central e periférico, sendo que durante o processo inflamatório induzido pela carragenina a melatonina exerce também efeitos anti-inflamatórios (Bilici et al., 2002). Estas ações da melatonina podem ser mediadas diretamente por meio da interação com seus receptores MT₁ e MT₂, ou, indiretamente, com receptores nucleares órfãos da família ROR α /RZR, e também por meio da ligação com a enzima quinona redutase II, também definida como o receptor MT₃ (Slominski et al., 2012).

Diversos estudos experimentais em camundongos e ratos têm demonstrado a participação da melatonina como agente antinociceptivo (Hernández-Pacheco et al., 2008; Esposito et al., 2010; Laste et al., 2012; Noronha, 2021), contudo o mecanismo pelo qual isso ocorre, ainda não está completamente elucidado. O que se sabe até o momento, é que além de ativar seus próprios receptores, a melatonina atua reduzindo a neurotransmissão excitatória por meio de vários mecanismos, dentre eles, inibição de correntes de cálcio ativadas por voltagem e ativação de receptores opioides (Hernández-Pacheco et al., 2008). Dentro deste contexto, o nosso trabalho é o primeiro estudo a demonstrar o envolvimento do sistema melatoninérgico no controle endógeno periférico da dor inflamatória.

Pensando o mecanismo analgésico da melatonina de forma multifatorial, Mantovani e colaboradores (2006), avaliaram seu efeito antinociceptivo em diferentes modelos químicos comportamentais. Quando administrada por via intraperitoneal, intraplantar ou intracerebroventricular, a melatonina foi capaz de prevenir a nocicepção induzida por glutamato. Além disso, a administração intraperitoneal de melatonina foi eficaz contra a dor induzida por capsaicina em camundongos. Esses resultados sugerem que a melatonina pode estar agindo por meio dos receptores ligados à membrana plasmática, induzindo uma antinocicepção dependente da dose por um mecanismo que parece ser mediado principalmente por uma interação com receptores adrenérgicos (α_2 -adrenoceptores), dopaminérgicos (receptores D₂), serotoninérgicos (receptores 5-HT_{2A}) e sistema opioide, bem como pela via l- arginina-óxido nítrico.

No presente trabalho, os animais que receberam as doses de CG e que tiveram a inibição do sistema melatoninérgico pelo antagonista luzindole, demonstraram uma diferença estatística em relação as doses onde esse sistema não estava antagonizado. O que indica que o sistema melatoninérgico está ativo durante o processo inflamatório, por mecanismos que ainda precisam ser estabelecidos. Sugerimos que este sistema é importante para o controle da dor inflamatória mediante a diminuição dos impulsos da aferência nociceptiva ao corno dorsal da medula espinhal e conseqüentemente ao SNC superior, uma vez que sem esse sistema analgésico ativado, temos uma piora da dor demonstrada pelos animais.

Nossos achados se mostram relevantes, uma vez que indica que o sistema melatoninérgico não tem importância só ao nível central no ciclo claro escuro ou imunológico, mas também ao nível periférico, modulando informações nociceptivas semelhantes a outros sistemas mais conhecidos, como o nitrérgico (Alves, et al., 2013), canabinoide (Ferreira, et al., 2019) e opioide (Dias Quintão et al., 2021).

A hipótese de o processo inflamatório ser capaz de liberar melatonina endógena para controlar a dor vai ao encontro do estudo realizado por Shavali e colaboradores (2004), onde foi observado um aumento na concentração dos níveis de melatonina salivar após dor aguda. Diferentes trabalhos científicos também demonstram outros agentes, como por exemplo, opioides (Gonçalves et al, 2021), canabinoides (Romero et al., 2020), noradrenalina (Romero et al., 2018) e serotonina (Diniz et al, 2017), sendo liberados durante o processo inflamatório periférico, controlando a dor já ao nível periférico. Então, na busca por um melhor entendimento sobre a participação do sistema melatoninérgico no controle da dor inflamatória periférica, e sabendo que os receptores melatoninérgicos fazem interações com outros sistemas endógenos de controle da dor, resolvemos verificar o envolvimento desse sistema na analgesia provocada por agonistas opioides e canabinoides.

Em nosso modelo experimental os agonistas opioides DAMGO, SNC80 e Bremazocina, foram capazes de induzir antinocicepção frente à hiperalgesia induzida por carragenina. Resultados semelhantes ao nosso são relatados em vários outros estudos na literatura (Ji et al., 1995; Catheline et al., 1999; Bileviciute-Ljungar & Spetea 2001; Le Guen et al., 2003; Whiteside et al., 2005; Romero et al., 2005; Bileviciute-Ljungar et al., 2006). Vale ressaltar que os agonistas opioides demonstram vários outros mecanismos de ação além do bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem, ativação de canais de potássio e consequente inibição da adenilato ciclase (Sarne, et al., 1996). Recentemente foi demonstrado que a morfina desempenha seu efeito analgésico em tecidos periféricos, por meio da ativação da via $PI_3K/\text{Akt}/\text{NOSn}/\text{NO}/\text{KATP}$ (Cunha et al., 2010), bem como pela liberação de noradrenalina endógena (Romero et al., 2012) e serotonina (Diniz et al., 2018). Um estudo realizado por Da Fonseca Pacheco e colaboradores (2008), forneceu evidências do envolvimento dos endocannabinoides, na antinocicepção periférica induzida pelo agonista do receptor μ -opioide, morfina.

O sinergismo entre opioides e o sistema melatoninérgico já foi descrito em diferentes trabalhos, Onal e colaboradores (2004), verificaram que a naloxona, um antagonista de receptores opioides foi capaz de inibir a ação da melatonina, demonstrando que essa precisa do sistema opioide para exercer seus efeitos analgésicos. Outros estudos em epilepsia (Yahyavi-Firouz-Abadi et al., 2007), dor neuropática (Liu et al., 2014), dor abdominal (Chen et al., 2014), também relatam a possibilidade de sinergismo entre o sistema opioide e a melatonina.

Em nossa pesquisa, também observamos que a dose máxima de LZD teve efeitos diferentes sobre a analgesia dos agonistas opioides, o que sugere que para a o sistema melatoninérgico, provavelmente, os receptores δ e K tem uma maior participação no mecanismo analgésico do que os receptores μ , uma vez que a antinocicepção foi mais significativa para o SNC80 e BRE em comparação com DAMGO.

Em parte esses dados podem ser corroborados pelo estudo realizado por Shi-Rong Li e colaboradores (2005), onde os autores examinaram o efeito antinociceptivo sinérgico entre melatonina e agonistas opioides usando o teste de retirada da cauda. Nesse estudo, a melatonina injetada via intraperitoneal ou por via intracerebroventricular, aumentou significativamente a antinocicepção induzida pelo agonista δ -opioide deltorfina I, mas não do agonista μ -opioide endomorfina-1. Além disso, a administração i.c.v. de luzindole antagonizou o efeito antinociceptivo intensificado pela injeção i.c.v. de melatonina, demonstrando que a mesma pode aumentar especificamente a antinocicepção induzida pelo agonista do receptor δ -opioide, mas não para o agonista μ -opioides usado neste modelo.

Além do sistema opioide, o sistema canabinoide também está envolvido em eventos de controle endógeno da dor (Marzo e Bisogno, 2001; Ferreira, 2018).

Em nosso estudo, foi observado que o LZD é capaz de reverter de forma dose dependente a antinocicepção induzida pelos agonistas canabinoides AEA e PEA. Isso mostra que, de forma semelhante aos agonistas opioides, os agonistas canabinoides também dependem, em parte, da maquinaria do sistema melatoninérgico para exercer seus efeitos antinociceptivos.

Diversos modelos experimentais já demonstraram os efeitos antinociceptivos periféricos dos canabinoides (Hohmann, 2002). No ano de 1998, Calignano e colaboradores observaram que a anandamida foi capaz de inibir a hiperalgesia induzida pela formalina por ativar os receptores periféricos do subtipo CB₁. Wang e Ueda (2009), em um estudo das afinidades dos endocanabinoides também relataram que a AEA se liga preferencialmente ao receptor canabinoide CB₁. Já o agonista PEA, parece não apresentar seletividade por esses receptores, apesar disso, estudos sugerem que o GPR₅₅ seria um novo receptor canabinoide sendo esse o provável alvo molecular do agonista PEA (Ryberg et al., 2007).

A participação do receptor canabinoide CB₂ na antinocicepção periférica foi analisada em um estudo realizado por Starowicz e Finn (2017), no qual se observou uma hipotalgesia térmica após a administração do agonista seletivo de receptores CB₂, (AM124). Porém, com a administração concomitante do antagonista seletivo deste receptor (AM630), a ação antinociceptiva foi revertida, o que indica o envolvimento do receptor CB₂ no evento antinociceptivo.

Romero e colaboradores (2013), também demonstraram que os agonistas canabinoides, AEA e PEA, induziram um efeito antinociceptivo periférico ativando receptores canabinóides CB₁ e CB₂, respectivamente. Por outro lado, foi demonstrado que a PEA induz efeitos antialodínicos e anti-hiperalgésicos em um modelo murino de dor neuropática por meio da ativação de receptores canabinoides CB₁, receptor potencial transitório vaniloide 1 (TRPV-1) e receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Costa, et al., 2008).

O envolvimento dos receptores CB₁ na ação antinociceptiva da melatonina poderia, em partes, ser explicada pela localização anatômica desses receptores (lâmina superficial do corno dorsal, gânglio da raiz dorsal e nos neurônios aferentes primários) (Sañudo-Peã et al., 1999; Gaffal et al., 2014).

Em 2008, Koch e colaboradores apresentaram um estudo evidenciando a presença de um sistema endocanabinoide funcional em pinealócitos de mamíferos, indicando que os endocanabinóides podem desempenhar um papel importante no controle da glândula pineal. Além disso, a co-localização de proteínas e enzimas do receptor CB envolvido no metabolismo de AEA em pinealócitos de rato e fibras nervosas simpáticas intrapineais sugerem que AEA funciona como mensageiro parácrino ou autócrino dentro da glândula pineal.

Também foi observado que o endocanabinoide AEA seria em parte responsável pelo controle rítmico de endocanabinóides na glândula pineal de ratos. Reforçando assim, a teoria da existência de endocanabinóides ativos na glândula pineal, e que esses poderiam modular a biossíntese de melatonina, o que reforça a noção da existência de um sinergismo entre o sistema canabinoide e melatoninérgico no controle do ritmo circadiano (Koch e cols., 2015), o que poderia ser um bom indicativo também no controle endógeno da dor.

Interessantemente, um estudo pioneiro realizado pelo nosso grupo de trabalho buscou investigar a participação do sistema canabinoidérgico no evento antinociceptivo periférico induzido por melatonina; os resultados sugerem que a melatonina quando administrada na pata do camundongo é capaz de liberar endocanabinóides pela transdução de sinal via Gq com a participação das células locais induzindo assim antinocicepção (Noronha, 2021).

Com isso, sabendo que opioides podem exercer seus efeitos por meio de diferentes mecanismos, como por exemplo, via PI3K γ /Akt/NOS α /NO/KATP (Cunha et al., 2010), liberação de noradrenalina endógena (Romero et al., 2012) e serotonina (Diniz, D. A. et al., 2018). E de modo semelhante, canabinoides interagem com sistemas opioidérgico, noradrenérgico (Martim e Lichtman, 1998), bem como pela via NO/GMPc/KATP, (dados de nosso grupo de pesquisa). E ainda, que a melatonina exerce seus efeitos mediante sua interação com sistemas, como o opioide, nitrérgico, receptores N-metil-D-aspartato, ativação da via NO-GC-GMPC-PKG (Hernández-Pacheco et al., 2008; Andersen et al., 2016; Shin et al., 2011) e recentemente por meio da liberação de canabinoides na periferia (Noronha, 2021).

O presente trabalho demonstrou que os receptores melatoninérgicos podem estar envolvidos no mecanismo analgésico tanto de substâncias opioides quanto canabinoides, o que evidencia a possibilidade de um sinergismo entre esses sistemas durante o evento de controle endógeno da eferência nociceptiva. Desta feita temos um sistema melatoninérgico que parece ter importância no controle da dor semelhante aos sistemas opioide e canabinoide, ao modular os impulsos da dor já ao nível periférico, além de participar do mecanismo antinociceptivo periférico de agonistas tanto opioides quanto canabinoides.

Este presente estudo esclarece que um sistema que antes tinha seu foco de estudo direcionado ao ciclo circadiano, hoje vem sendo apontado como importante para o controle do fluxo de informações nociceptivas já na periferia, provavelmente de forma sinérgica com outros sistemas analgésicos bem conhecidos, consolidando-se cada vez mais como importante alvo farmacológico para o controle da dor.

REFERÊNCIAS

- ALVES, D. P., da MOTTA, P. G., ROMERO, T. R., KLEIN, A., & DUARTE, I. D. (2013). NO/cGMP production is important for the endogenous peripheral control of hyperalgesia during inflammation. *Nitric oxide: biology and chemistry*, 28, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.09.001>
- ALVES, D. P., DA MOTTA, P. G., ROMERO, T. R., KLEIN, A., & DUARTE, I. D. (2013). NO/cGMP production is important for the endogenous peripheral control of hyperalgesia during inflammation. *Nitric oxide: biology and chemistry*, 28, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.09.001>
- AMBRIZ-TUTUTI I, M., ROCHA-GONZÁLEZ, H. I., CRUZ, S. L., & GRANADOS-SOTO. Melatonin: A hormone that modulates pain. *Life Sciences*, [S. l.], v. 84, n. 15–16, p. 489–498, 2009.
- AMBRIZ-TUTUTI, MÓNICA, AND VINICIO GRANADOS-SOTO. “Oral and spinal melatonin reduces tactile allodynia in rats via activation of MT2 and opioid receptors.” *Pain* vol. 132,3 (2007): 273-280. doi:10.1016/j.pain.2007.01.025
- ANDRERSEN, L. P., WERNER, M. U., ROSENKILDE, M. M., HARPSOE, N. G., FUGLSANG, H., ROSENBERG, J., & GOGENUR, I. Pharmacokinetics of oral and intravenous melatonin in healthy volunteers. *BMC Pharmacology and Toxicology* [S. l.], v.17, n.1, p.1–5, 2016.
- ARREOLA-ESPINO R, URQUIZA-MARIN H, AMBRIZ-TUTUTI M, et al. Melatonin reduces formalin-induced nociception and tactile allodynia in diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2007; 577(1–3): 203–210. doi:10.1016/j.ejphar.2007.09.006
- AXELROD J. AND WURTMAN R.J. Photic and neural control of indoleamine metabolism in the rat pineal gland. *Adv. Pharmacol.*, 6: 157-166, 1968
- BARAKA, A. Historical aspects of opium. *Middle East Journal of Anaesthesiology*, v.6(5), p.289-302, 1982.
- BATAILLER M, MULLIER A, SIDIBE A, et al. Neuroanatomical distribution of the orphan GPR50 receptor in adult sheep and rodent brains. *J Neuroendocrinol.* 2012;24(5):798–808. doi:10.1111/jne.2012.24
- BAUNE, B. T. et al. (2008) ‘Combined effects of major depression, pain and somatic disorders on general functioning in the general adult population’, *Pain*, 138(2), pp. 310–317.
- BILEVICIUTE-LJUNGAR, I., & SPETEA, M. (2001). Contralateral but not systemic administration of the kappa-opioid agonist U-50,488H induces anti-nociception in acute

hindpaw inflammation in rats. **British journal of pharmacology**, 132(1), 252–258. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703782>

BILICI, D., AKPINAR, E., & KIZILTUNÇ, A. (2002). Protective effect of melatonin in carrageenan-induced acute local inflammation. **Pharmacological research**, 46(2), 133–139. [https://doi.org/10.1016/s1043-6618\(02\)00089-0](https://doi.org/10.1016/s1043-6618(02)00089-0)

BORSANI E, BUFFOLI B, BONAZZA V, REITER RJ, REZZANI R, RODELLA LF. Single administration of melatonin modulates the nitroxidergic system at the peripheral level and reduces thermal nociceptive hypersensitivity in neuropathic rats. **Int J Mol Sci**. 2017;18(10):2143. doi:10.3390/ijms18102143

BROWNSTEIN MJ. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993;15;90(12):5391-3

BUBENIK G.A. Gastrointestinal melatonin: localization, function and clinical relevance. **Dig. Dis. Sci.**, 47: 2336-2348, 2002

BURCHAKOV, D. I., & USPENSKAYA, Y. B. Antioxidant, anti-inflammatory and sedative effects of melatonin: results of clinical trials. **Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova, [S. I.]**, v. 117, n. 4. Vyp. 2, p. 67, 2017.

CALIGNANO, A., LA RANA, G., GIUFFRIDA, A., & PIOMELLI, D. (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. **Nature**, 394(6690), 277–281. <https://doi.org/10.1038/28393>

CARRILLO-VICO, J.R. CALVO, P. ABREU, P.J. LARDONE, S. GARCIA-MAURINO, R.J. REITER, J.M. Guerrero, Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance, **FASEB J**. 18 (2004) 537-539.

CARTENS, E.; GILLY, H.; SCHREIBER, H.; ZIMMERMANN, M. Effects of midbrain stimulation and iontophoretic application of serotonin, noradrenaline, morphine and GABA on electrical thresholds of afferent C- and A-fibre terminals in cat spinal cord. **Neuroscience**.395-406. 1987. Cochrane Database Syst Rev, 9 (2015).

CATHELINE, G., LE GUEN, S., & BESSON, J. M. (1999). Effects of U-69,593, a kappa-opioid receptor agonist, on carrageenin-induced peripheral oedema and Fos expression in the rat spinal cord. **European journal of pharmacology**, 370(3), 287–296. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(99\)00153-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(99)00153-3)

CHEN, C., FICHNA, J., LAUDON, M., & STORR, M. (2014). Antinociceptive effects of novel melatonin receptor agonists in mouse models of abdominal pain. **World journal of gastroenterology**, 20(5), 1298–1304. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i5.1298>

CHEVALEYRE, V.; TAKAHASHI, K.A.; CASTILLO, P.E. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. **Annu Rev Neurosci**, v.29, p. 37-76, 2006.

COSTA, A. C., ROMERO, T. R., PACHECO, D. F., PEREZ, A. C., SAVERNINI, A., SANTOS, R. R., & DUARTE, I. D. (2014). Participation of AT1 and Mas receptors in the modulation of inflammatory pain. *Peptides*, 61, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.08.010>

COSTA, B., COMELLI, F., BETTONI, I., COLLEONI, M., & GIAGNONI, G. (2008). The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB(1), TRPV1 and PPARgamma receptors and neurotrophic factors. *Pain*, 139(3), 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.06.003>

CUNHA, T. M., ROMAN-CAMPOS, D., LOTUFO, C. M., DUARTE, H. L., SOUZA, G. R., VERRI, W. A., JR, FUNEZ, M. I., DIAS, Q. M., SCHIVO, I. R., DOMINGUES, A. C., SACHS, D., CHIAVEGATTO, S., TEIXEIRA, M. M., HOTHERSALL, J. S., CRUZ, J. S., CUNHA, F. Q., & FERREIRA, S. H. (2010). Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4442–4447. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914733107>.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 1755-60, 2005.

CUNHA, T.M., VERRI, W.A., SCHIVO, I.R., NAPIMOGA, M.H., PARADA, A., POOLE, S., et al. (2008). Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J. Leukoc. Biol.* 83: 824–32.

DA FONSECA PACHECO, D., KLEIN, A., DE CASTRO PEREZ, A., DA FONSECA PACHECO, C. M., DE FRANCISCHI, J. N., & DUARTE, I. D. G. The μ -opioid receptor agonist morphine, but not agonists at δ - or κ -opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*. 2008;154(5):1143-1149. doi:10.1038/bjp.2008.175

DASGUPTA, S., LI, X. M., JANSSON, A., FINNMAN, U. B., MATSUI, T., RINKEN, A., et al. (1996). Regulation of dopamine D2 receptor affinity by cholecystokinin octapeptide in fibroblast cells cotransfected with human CCKB and D2L receptor cDNAs. *Mol. Brain Res.* 36, 292–299.

DHAWAN, B. N.; CESSSELIN, F.; RAGHUBIR, R.; REISINE, T.; BRADLEY, P. B.; PORTOGHESE, P S.; HAMON, M. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioide receptors. *Pharmacological Reviews*, v.48(4), p.567-92, 1996.

DIAS QUINTÃO JL, REIS GONZAGA AC, GALDINO G, et al. TNF- α , CXCL-1 and IL-1 β as activators of the opioid system involved in peripheral analgesic control in mice. *Eur J Pharmacol*. 2021; 896:173900. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.173900

DINIZ, D. A., PETROCCHI, J. A., NAVARRO, L. C., SOUZA, T. C., CASTOR, M., DUARTE, I., & ROMERO, T. (2018). Serotonin induces peripheral antinociception via

the opioidergic system. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 97, 1434–1437. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.048>

DUARTE ID, FERREIRA SH. L-NAME causes antinociception by stimulation of the arginine-NO-cGMP pathway. *Mediators Inflamm.* 2000;9(1):25-30. doi:10.1080/09629350050024348

EDWARDS, R. R. et al. (2016) 'The Role of Psychosocial Processes in the Development and Maintenance of Chronic Pain', *Journal of Pain*. Elsevier Inc, 17(9), pp. T70–T92.

ESPOSITO, E., PATERNITI, I., MAZZON, E., BRAMANTI, P., & CUZZOCREA, S. (2010). Melatonin reduces hyperalgesia associated with inflammation. *Journal of pineal research*, 49(4), 321–331. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00796.x>

FERREIRA, R., ALMEIDA-SANTOS, A. F., DUARTE, I., AGUIAR, D. C., MOREIRA, F. A., & ROMERO, T. (2019). Role of Endocannabinoid System in the Peripheral Antinociceptive Action of Aripiprazole. *Anesthesia and analgesia*, 129(1), 263–268. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000003723>

FERREIRA, RENATA. Envolvimento do sistema endocanabinoide na dor inflamatória periférica induzida por diferentes agentes inflamatórios (Não publicado, 2018).

FRICK, S.; KRAMELL, R.; SCHMIDT, J.; FIST, A. J.; KUTCHAN, T. M. Comparative qualitative and quantitative determination of alkaloids in narcotic and condiment *Papaver somniferum* cultivars. *Journal of Natural Products*, v.68(5), p.666-673, 2005.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res. Bull.*, v.48, p.129-41, 1999.

GAFFAL, E., GLODDE, N., JAKOBS, M., BALD, T., & TÜTING, T. Cannabinoid 1 receptors in keratinocytes attenuate fluorescein isothiocyanate-induced mouse atopic-like dermatitis. *Experimental Dermatology*, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 401–406, 2014.

GOLAN, D. E. et al. (2014) **Princípios de farmacologia**: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 3a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

GOLDSTEIN, A.; TACHIBANA, S.; LOWNY, L. I.; HUNKAPILLER, M.; HOOD, L. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.76(12), p.6666–6670, 1979.

GONÇALVES, W. A., FERREIRA, R., REZENDE, B. M., MAHECHA, G., GUALDRON, M., DE MACEDO, F., DUARTE, I., PEREZ, A. C., MACHADO, F. S., CRUZ, J. S., & ROMERO, T. (2021). Endogenous opioid and cannabinoid systems modulate the muscle pain: A pharmacological study into the peripheral site. *European journal of pharmacology*, 901, 174089. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174089>

HERNÁNDEZ-PACHECO, A., ARAIZA-SALDAÑA, C. I., GRANADOS-SOTO, V., & MIXCOATLZECUATL, T. Possible participation of the nitric oxide-cyclic GMP-protein kinase G-K⁺ channels pathway in the peripheral antinociception of melatonin. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 596, n. 1–3, p. 70–76, 2008.

HOHMANN, A. G. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: Behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. **Chemistry and Physics of Lipids**, [S. l.], v. 121, n. 1–2, p. 173–190, 2002.

HOSOBUCHI, Y.; ADAMS, J. E.; LINCHITZ, R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. **Science**. 1977.

HUGHES, J.; SMITH, T. W.; KOSTERLITZ, H. W. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. **Nature**, v.258, p.577-579, 1975.

JI, R. R., ZHANG, Q., LAW, P. Y., LOW, H. H., ELDE, R., & HOKFELT, T. (1995). Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, 15(12), 8156–8166. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-12-08156.1995>

JOCCKERS, R., DELAGRANGE, P., DUBOCOVICH, M. L., MARKUS, R. P., RENAULT, N., TOSINI, G. & ZLOTOS, D. P. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], p. 2702–2725, 2016. DOI: 10.1111/bph.13536

JOSEPH, T. D., ROBERT, L. T., GARY, C. Y., GARY, R. M., BARBARA, G. W., MICHAEL, POSEY. (2010) Pharmacotherapy: **A Pathophysiologic Approach**, 10^o edição. Jourdan.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. 413, 2001. KEMPEN, G. I. J. M. et al. (1997) 'Adaptive responses among Dutch elderly: The impact of eight chronic medical conditions on health-related quality of life', **American Journal of Public Health**, 87(1), pp. 38–44.

KEMPF, T.; ZARBOCK, A.; WIDERA, C.; BUTZ, S.; STADTMANN, A.; ROSSAINT, J.; BOLOMINI-VITTORI, M.; KORF-KLINGEBIEL, M.; NAPP, L. C.; HANSEN, B.; KANWISCHER, A.; BAVENDIEK, U.; BEUTEL, G.; HAPKE, M.; SAUER, M. G.; LAUDANNA, C.; HOGG, N.; VESTWEBER, D.; WOLLERT, K. C. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. **Nature Medicine**. 17 (5): 581-8, 2011.

KLAUMANN, P. R., WOUK, A. F. P. F. and Sillas, T. (2008) 'Patofisiologia da dor', **Archives of Veterinary Science**, 13(1), pp. 1–12.

KLOSEN P, LAPMANEE S, SCHUSTER C, ET AL. MT1 and MT2 melatonin receptors are expressed in nonoverlapping neuronal populations. **J Pineal Res**. 2019;e12575. doi: 10.1111/jpi.12575

KOCH, M., FERREIRÓS, N., GEISLINGER, G., DEHGhani, F., & KORF, H. W. (2015). Rhythmic control of endocannabinoids in the rat pineal gland. **Chronobiology international**, 32(6), 869–874. <https://doi.org/10.3109/07420528.2015.1041596>

KRUEGER-BECK, EDDY et al. **Potencial de ação**: do estímulo à adaptação neural. *Fisioter. mov.* (Impr.), Curitiba, v. 24, n. 3, p. 535-547, Sept. 2011 Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-51502011000300018&lng=en&nrm=iso>.access 31 Mar. 2021. <https://doi.org/10.1590/S0103-51502011000300018>.

KUTHATI Y, LIN SH, CHEN IJ, WONG CS. Melatonin and their analogs as a potential use in the management of Neuropathic pain. **J Formos Med Assoc.** 2019 Aug;118(8):1177-1186. doi: 10.1016/j.jfma.2018.09.017. Epub 2018 Oct 10. PMID: 30316678.

LACOSTE B, ANGELONI D, DOMINGUEZ-LOPEZ S, et al. Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain. **J Pineal Res.** 2015;58(4):397–417. doi: 10.1111/jpi.2015.58. issue-4

LAGO-FERNANDEZ, ANA *et al.* New Methods for the Synthesis of Cannabidiol Derivatives. *Methods In Enzymology*, [s.l.], p.237-257, 2017. **Elsevier**. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mie.2017.05.006>.

LASTE, G., DE MACEDO, I. C., RIPOLL ROZISKY, J., RIBEIRO DA SILVA, F., CAUMO, W., & TORRES, I. L. (2012). Melatonin administration reduces inflammatory pain in rats. **Journal of pain research**, 5, 359–362. <https://doi.org/10.2147/JPR.S34019>

LAURO, F., ILARI, S., GIANCOTTI, L. A., VENTURA, C. A., MORABITO, C., GLIOZZI, M., & MUSCOLI, C. Pharmacological effect of a new idebenone formulation in a model of carrageenan-induced inflammatory pain. **Pharmacological Research**, [S. l.], v.111, p. 763–767, 2016.

LE GUEN, S., CATHELINE, G., FOURNIÉ-ZALUSKI, M. C., ROQUES, B. P., BESSON, J. M., & BURITOVA, J. (2003). Further evidence for the interaction of mu- and delta-opioid receptors in the antinociceptive effects of the dual inhibitor of enkephalin catabolism, RB101(S). A spinal c-Fos protein study in the rat under carrageenin inflammation. **Brain research**, 967(1-2), 106–112. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)04231-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)04231-2)

LIN, J. J., LIN, Y., ZHAO, T. Z., ZHANG, C. K., ZHANG, T., CHEN, X. L.,... & LI, J. L.. Melatonin suppresses neuropathic pain via MT2-dependent and - independent pathways in dorsal root ganglia neurons of mice. **Theranostics**, [S. l.], V. 7, N. 7, P.2015–2032, 2017.

LIU, Y. Y., YIN, D., CHEN, L., QU, W. M., CHEN, C. R., LAUDON, M., CHENG, N. N., URADE, Y., & HUANG, Z. L. (2014). Piromelatine exerts antinociceptive effect via melatonin, opioid, and 5HT1A receptors and hypnotic effect via melatonin receptors in a mouse model of neuropathic pain. **Psychopharmacology**, 231(20), 3973–3985. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3530-5>

LOPEZ-CANUL M, COMAI S, DOMINGUEZ-LOPEZ S, GRANADOS-SOTO V, GOBBI G. Antinociceptive properties of selective MT(2) melatonina receptor partial agonists. **Eur J Pharmacol.** 2015; 764:(424–432. doi:10.1016/j.ejphar.2015.07.010

LUTZ, B. **Molecular biology of cannabinoid receptors.** Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, v.66, p.123-142, 2002.

MACHT, D. I. The history of opium and some of its preparations and alkaloids. **Journal of the American Medical Association**, v.6, p.477, 1915.

MANSOUR, A., FOX, C.A., BURKE, S., AKIL, H., WATSON, S.J., 1995. Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. **J. Chem. Neuroanat.** 8, 283–305.

MANTOVANI M, KASTER MP, PERTILE R, CALIXTO JB, RODRIGUES AL, SANTOS AR. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. **J Pineal Res.** 2006; 41(4): 382–389. doi: 10.1111/ j.1600-079X.2006.00380.x

MARTIN, B. R., & LICHTMAN, A. H. (1998). Cannabinoid transmission and pain perception. **Neurobiology of disease**, 5(6 Pt B), 447–461. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1998.0218>

MARZO, V., BIFULCO, M. & PETROCELLIS, L. O sistema endocanabinoide e sua exploração terapêutica. **Nat Rev Drug Discov** 3, 771–784 (2004). <https://doi.org/10.1038/nrd1495>

MECHOULAM, R., BEN-SHABAT, S., HANUS, L., LIGUMSKY, M., KAMINSKI, N. E., SCHATZ, A. R., ... & VOGEL, Z. V. I. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, presente incanine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, [S.l.], v. 50, n. 1, p. 83–90, 1995.

MELZACK, R. Melatonina para ansiedade pré e pós-operatória em adultos The puzzle of pain. **New York: Basic Books.** 1973.

MEYER, R. A.; MATTHIAS, R.; CAMPBELL, J. N.; RAJA, N. S. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: Wall, P. D, Melzack, R. editors. Millan, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology.** 66: 355-474, 2002

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

MOORE R.Y. Neural control of the pineal gland. **Behav. Brain Res.**, 73: 125-130, 1996.

NARANJO M.C., GUERRERO J.M., RUBIO A., LARDONE P.J., CARRILLO-VICO A., CARRASCOSCA-SALMORAL.P., JIMENEZ-JORGE S., ARELLANO M.V., LEAL-NOVEL S.R., LEAL M., LISSEN E., MOLINERO P. Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. **Cell Mol. Life Sci.**, 64: 781-790, 2007.

NASCIMENTO, E. B., JR, ROMERO, T., DUTRA, M., FIEBICH, B. L., DUARTE, I., & COELHO, M. M. (2021). Role of peripheral 5-HT_{1D}, 5-HT₃ and 5-HT₇ receptors in the mechanical allodynia induced by serotonin in mice. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 135, 111210. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111210>

NAVARRO, M.; et al. Acute administration of the CB₁ cannabinoid receptor antagonist SR141716A induces anxiety-like responses in the rat. *Neuroreport*, v.8, p. 491-496, 1997.

NORONHA, THAIS DE MENEZES. **Efeito antinociceptivo periférico da Melatonina via ativação dos receptores MT₁/MT₂, CB₁ canabinoides e de PI3Ky** [não publicado] – 2021.

NOSJEAN O., FERRO M., COGE F., BEAUVERGER P., HENLIN J.M., LEFOULON F., FAUCHERE J.L., DELAGRANGE P., CANET E., BOUTIN J.A. Identification of the melatonin binding site MT₃ as quinine reductase 2. *J.Biol. Chem.*, 275: 31311-31317, 2000.

OLIVEIRA CD, CASTOR MGME, CASTOR CGME, et al. Evidence for the involvement of opioid and cannabinoid systems in the peripheral antinociception mediated by resveratrol. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019; 369:30-38. doi:10.1016/j.taap.2019.02.004

OLIVEIRA CD, VELOSO CC, FERREIRA RC, et al. Peltatoside Isolated from *Annona crassiflora* Induces Peripheral Antinociception by Activation of the Cannabinoid System. *Planta Med.* 2017;83(3-04):261-267. doi: 10.1055/s-0042-113386

PANG CS, TSANG SF, YANG JC. Effects of melatonin, morphine and diazepam on formalin-induced nociception in mice. *Life Sci.* 2001 Jan 12; 68(8):943-51. doi: 10.1016/s0024-3205(00)00996-6. PMID: 11213364.

POSA L, DE GREGORIO D, GOBBI G, COMAI S. **Targeting Melatonin Mt₂ Receptors**: A Novel Pharmacological Avenue for Inflammatory and Neuropathic Pain. *Curr Med Chem.* 2018;25(32):3866-3882. doi: 10.2174/0929867324666170209104926.

RAGHAVENDRA V, KULKARNI SK. Reversal of morphine tolerance and dependence by melatonin: possible role of central and peripheral benzodiazepine receptors. *Brain Res.* 1999 Jul 10; 834(1-2): 178-81. doi: 10.1016/s0006-8993(99)01520-6. PMID: 10407111.

REZENDE RM, DOS REIS WG, DUARTE ID, LIMA PP, BAKHLE YS, DE FRANCISCHI JN. The analgesic actions of centrally administered celecoxib are mediated by endogenous opioids. *Pain.* 2009; 142(1-2):94-100. doi: 10.1016/j.pain.2008.12.005.

RIGOTTI, M. A., & FERREIRA, A. M. Intervenções de enfermagem ao paciente com dor. *Arq Ciênc Saúde, [S. l.]*, v. 12, n. 1, p. 50–4, 2005.

RITTNER HL, BRACK A, MACHELSKA H, et al. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology*. 2001; 95(2):500-508. doi: 10.1097/00000542-200108000-00036.

ROCHA APC, KRAYCHETE DC, LEMONICA L, CARVALHO LR, BARROS GAM, GARCIA JBS, SAKATA RK — Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. *Revista Brasileira de Anestesiologia* Vol. 57, No 1, Janeiro-Fevereiro, 2007

RODRIGUES P., DANIELE, R., CRISTINA, R., FERNANDO L., SANTOS, R., CHADA, E., & SOARES, M. (2014). Ação da melatonina no tecido cartilaginoso. *Reproducao & Climaterio*, 8(1), 24–29.

ROMERO TR, RESENDE LC, GUZZO LS, DUARTE ID. CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonists induce peripheral antinociception by activation of the endogenous noradrenergic system. *Anesth Analg*. 2013; 116(2):463-472. doi:10.1213/ANE.0b013e3182707859.

ROMERO, A., PLANAS, E., POVEDA, R., SÁNCHEZ, S., POL, O., & PUIG, M. M. (2005). Anti-exudative effects of opioid receptor agonists in a rat model of carrageenan-induced acute inflammation of the paw. *European journal of pharmacology*, 511(2-3), 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.02.004>

ROMERO, T. R., GUZZO, L. S., & DUARTE, I. D. (2012). Mu, delta, and kappa opioid receptor agonists induce peripheral antinociception by activation of endogenous noradrenergic system. *Journal of neuroscience research*, 90(8), 1654–1661. <https://doi.org/10.1002/jnr.23050>

ROMERO, T., MIRANDA E CASTOR, M. G., PARRELLA, C., PISCITELLI, F., DI MARZO, V., & DUARTE, I. (2020). α_2 -Adrenoceptor agonist induces peripheral antinociception via the endocannabinoid system. *Pharmacological reports: PR*, 72(1), 96–103. <https://doi.org/10.1007/s43440-019-00053-6>

ROMERO, T., SOARES SANTOS, R. R., CASTOR, M., PETROCCHI, J. A., GUZZO, L. S., KLEIN, A., & DUARTE, I. (2018). Noradrenaline induces peripheral antinociception by endogenous opioid release. *Pharmacological reports: PR*, 70(4), 784–788. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.02.020>

ROQUES, M.C. FOURNIÉ-ZALUSKI, M. WURM Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain *Nat. Rev. Drug Discov.*, 11 (2012), pp. 292-310, [10.1038/nrd3673](https://doi.org/10.1038/nrd3673).

RUSHTON, ARA, ROBERT SNEYD, J. Opioid analgesics *Br. J. Hosp. Med.*, 57 (1997), pp.105-106.

RUSSO, E.B., BURNETT, A., HALL, B., AND PARKER, K.K. (2005). Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem. Res.* 30: 1037–1043.

SANDKÜHLER, J. The organization and function of endogenous antinociceptive systems. **Progress in Neurobiology**. 50: 49-81, 1996.

SANUDO-PENA, M. C., STRANGMAN, N. M., MACKIE, K., WALKER, J. M., & TSOU, K. CB₁ receptor localization in rat spinal cord and roots, dorsal root ganglion, and peripheral nerve. **Acta Pharmacologica Sinica**, 1999.

SARNE, Y., FIELDS, A., KEREN, O., & GAFNI, M. (1996). Stimulatory effects of opioids on transmitter release and possible cellular mechanisms: overview and original results. **Neurochemical research**, 21(11), 1353–1361.
<https://doi.org/10.1007/BF02532376>.

SCHIER, M.R.A. Canabidiol, um componente da Cannabis sativa, como um ansiolítico, **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 1, 2011.

SCHIFF PL JR. Opium and Its Alkaloids. **Am J Pharm Educ** 2002;66(2):186-94

SCHMIDT, R.; SCHMELZ, M.; FORSTER, C.; RINGKAMP, M.; TOREBJÖRK, E.; HANDWERKER, H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. **Journal of Neuroscience**. 15: 333-341, 1995.

SHIN DJ, JEONG CW, LEE SH, YOON MH. Receptors involved in the antinociception of intrathecal melatonin in formalin test of rats. **Neurosci Lett**. 2011;494(3):207–210. doi:10.1016/j.neulet.2011.03.014.

SHI-RONG LI, Ting Wang, Rui Wang, Xu Dai, Qiang Chen, Ren-de Li, Melatonin enhances antinociceptive effects of δ -, but not μ -opioid agonist in mice, **Brain Research**, Volume 1043, Issues 1–2, 2005, Pages 132-138, ISSN 0006-8993.

SLOMINSKI A., FISCHER T.W., ZMIJEWSKI M.A., WORTSMAN J., SEMAK I., ZBYTEK R.M., SLOMINISKI R.M., TOBIN D.J. On the role of melatonin in skin physiology and Song, L., Wu, C., & Zuo, Y. Melatonin prevents morphine-induced hyperalgesia and tolerance in rats: Role of protein kinase C and N-methyl-D-aspartate receptors. **BMC Anesthesiology**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–8, 2015.

SOUZA, JULIANA BARCELLOS DE; BARROS, CARLOS MARCELO DE. **Considerações sobre o novo conceito de dor**. BrJP, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 294, Sept. 2020 Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2595-31922020000300294&lng=en&nrm=iso>.access 29 Mar. 2021. Epub Sep 21, 2020. <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20200190>.

SRINIVASAN V, PANDI-PERUMAL SR, MOSCOVITCH A, et al. Potential use of melatonergic drugs in analgesia: mechanisms of action. **Brain Res Bull.** 2010; 81. doi: 10.1016/j.brainresbull.2009.12.001

SRINIVASAN V., EDWARD C. LAUTERBACH, KHEK YU HO, DARIO ACUÑA-CASTROVIEJO, RAHIMAH ZAKARIA AND AMMON BRZEZINSKI. Melatonin in Antinociception: Its Therapeutic Applications. **Current Neuropharmacology**, 2012,10, 167-178.

STAROWICZ, K., & FINN, D. P. **Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action.** 1. ed. [s.l.] In *Advances in Pharmacology* (Vol. 80, pp. 437-475, 2017).

STEIN, CHRISTOPH & SCHAEFER, MICHAEL & MACHELSKA, HALINA. (2003). Stein C, Schafer M, Machelska H Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 9: 1003-1008. **Nature medicine.** 9. 1003-8. 10.1038/nm908. pathology. *Endocrine*, 27, 137-148, 2005.

STEIN, et al. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local receptors and beta-endorphin. **J. neurosci.**, v. 10, n4, p. 1292-1298, 1990

TAVINTHARAN, S.; LIM, S. C.; SUM, C. F. **Effects of niacin on cell adhesion and early atherogenesis: biochemical and functional findings in endothelial cells**, 2007.

TAVINTHARAN, S.; SIVAKUMAR, M.; LIM, S. C.; SUM, C. F. Niacin affects cell adhesion molecules and plasminogen activator inhibitor-1 in HepG2 cells. *Textbook of pain.* 5th edition. Edinburgh, UK: **Elsevier Churchill Livingstone**; 334 p., 2009.

VANDERAH, T. W. Pathophysiology of pain. *Medical Clinics of North America*, 2007. VASCONCELOS, F. H., & ARAÚJO, G. C. D. Prevalence of chronic pain in Brazil: a descriptive study. **Brazilian Journal Of Pain**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 176–179, 2018.

VIELMA, J. R., BONILLA, E., CHACÍN-BONILLA, L., MORA, M., MEDINA-LEENDERTZ, S., & BRAVO, Y. (2014). Effects of melatonin on oxidative stress, and resistance to bacterial, parasitic, and viral infections: a review. **Acta Tropica**, 137, 31–38. doi:10.1016/j.actatropica.2014.04.

WANG, J., & UEDA, N. **Biology of endocannabinoid synthesis system.** Prostaglandins and Other Lipid Mediators, [S. l.], v. 89, n. 3–4, p. 112–119, 2009.

WATKINS, L. R.; MAYER, D. J. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. **Science** 216: 1185-1192. 1982.

WHITESIDE, G. T., BOULET, J. M., & WALKER, K. (2005). The role of central and peripheral mu opioid receptors in inflammatory pain and edema: a study using morphine and DiPOA ([8-(3,3-diphenyl-propyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]dec-3-yl]-acetic acid). **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, 314(3), 1234–1240. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.088351>

WOOLF, C. J. (2010) 'What is this thing called pain?', **Journal of Clinical Investigation**, 120(11), pp. 3742–3744.

WU ZS, WU SH, LEE SS, et al. Dose-dependent effect of hyperbaric oxygen treatment on burn-induced neuropathic pain in rats. **Int J Mol Sci**. 2019; 20(8):1951.

XIE, SHANSHAN et al. "Papel da melatonina na regulação da dor" **Journal of pain research** vol. 13 331-343. 7 de fevereiro de 2020, doi: 10.2147 / JPR.S228577.

YAHYAVI-FIROUZ-ABADI, N., TAHSILI-FAHADAN, P., RIAZI, K., GHAHREMANI, M. H., & DEHPOUR, A. R. (2007). **Melatonin enhances the anticonvulsant and proconvulsant effects of morphine in mice: role for nitric oxide signaling pathway.** *Epilepsy research*, 75(2-3), 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.05.002>

YANG, X. D.; CORVALAN, J. R.; WANG, P.; ROY, C. M.; DAVIS, C. G. Fully human anti-interleukin-8 monoclonal antibodies: potential therapeutics for the treatment of inflammatory disease states. **Journal of Leukocyte Biology**. 66 (3): 401-10, 1999.

YU CX, ZHU CB, XU SF, CAO XD, WU GC. Selective MT₂ melatonin receptor antagonist blocks melatonin-induced antinociception in rats. **Neurosci Lett** 2000; 282:161e4.

ZADINA, J. E.; HACKLER, L.; GE, L.-J.; KASTIN, A. J. A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. **Nature**, v.386(6624), p.499–502, 1997.

ZLOTOS DP, JOCKERS R, CECON E, RIVARA S, WITT-ENDERBY PA. MT1 and MT2 melatonin receptors: ligands, models, oligomers, and therapeutic potential. **J Med Chem**. 2014; 57(8): 3161–3185. doi:10.1021/jm401343c

ZOLLNER, C. ET AL. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. **Mol. Pharmacol.**, v.64, n. 2, p. 202-210, 2003