

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

Aécio da Costa Fagundes

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DO INIBIDOR DA XANTINA OXIDASE  
ALOPURINOL:  
ESTUDOS EXPERIMENTAIS E CLÍNICOS.**

Porto Alegre

2021

Aécio da Costa Fagundes

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DO INIBIDOR DA XANTINA OXIDASE**

**ALOPURINOL:**

**ESTUDOS EXPERIMENTAIS E CLÍNICOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. André Prato Schmidt

Porto Alegre

2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Fagundes, Aécio da Costa  
Efeitos antinociceptivos do inibidor da Xantina  
Oxidase Alopurinol: estudos experimentais e clínicos.  
/ Aécio da Costa Fagundes. -- 2021.  
111 f.  
Orientador: André Prato Schmidt.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Dor. 2. Efeito Antinociceptivo. 3. Alopurinol.  
I. Schmidt, André Prato, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família, em especial aos meus pais Elaine e Valdir, por todo esforço realizado para que minha formação fosse possível, proporcionando a continuidade dos estudos até a chegada a este doutorado; ao meu tio Olíbio pelo apoio e incentivo na busca dos meus objetivos. A todos vocês, minha gratidão eterna. A minha amada esposa Cheyenne, obrigado pela paciência, amor, carinho e intensa participação durante toda a elaboração deste trabalho. Foste, sem dúvidas, fundamental na realização de todo esse processo.

Ao meu orientador André, pela confiança em mim depositada, pelos conselhos, questionamentos e discussões que ajudaram na construção e execução desta tese, e por toda sua amizade durante estes anos. Um exemplo profissional e de ser humano para seguir.

Ao Professor Diogo Onofre pela oportunidade de iniciar no mundo científico logo no começo da graduação, propiciando esse trabalho e atuando como coorientador desta tese, pela paciência e viabilidade do trabalho. Ao professor Eduardo Zimmer, pela orientação na prática de ensino e pelo convívio e amizade nesses anos de formação.

Ao meu amigo Enderson pela iniciativa de me inserir no meio científico, com quem trabalhei e aprendi muito nos anos de iniciação científica. Obrigado pelo apoio de sempre.

Ao meu bolsista Leonardo, pela amizade, dedicação e companheirismo na realização dos trabalhos desta tese. A todos meus amigos da bioquímica, em especial Gabriel, Débora, Adriano, Luciana, Roberto, Bruna, Luciele, Aline e Eduardo que de alguma forma contribuíram com este trabalho. A Cléia, ao Giordano e aos demais integrantes da secretaria de pós-graduação, pelas inúmeras ajudas solicitadas por mim nestes anos, e que foram sempre eficazmente atendidas.

Aos membros da banca, pela leitura e exame da presente tese. À Capes pela concessão de bolsa para execução do estudo. Agradeço, enfim, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade.

## RESUMO

(FAGUNDES AC – EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS DO INIBIDOR DA XANTINA OXIDASE ALOPURINOL: ESTUDOS EXPERIMENTAIS E CLÍNICOS)

O alopurinol é um potente inibidor da enzima xantina oxidase, usado principalmente no tratamento de hiperuricemia e gota. Os efeitos antinociceptivos do alopurinol têm sido demonstrados em modelos de dor em roedores. O objetivo da presente tese de doutorado foi investigar os efeitos do alopurinol nos níveis de dor e ansiedade através de estudos experimentais e clínicos. Os resultados estão apresentados sob forma de artigos científicos. O primeiro artigo descreve um estudo experimental onde alopurinol, administrado via intraperitoneal, produziu efeitos antinociceptivos contra a hiperalgesia térmica e mecânica em um modelo tradicional de dor neuropática em camundongos. Neste trabalho, demonstramos que o antagonista seletivo do receptor de adenosina A1 DPCPX preveniu parcialmente a antinocicepção induzida por alopurinol. O alopurinol também causou um aumento nos níveis de algumas purinas no líquido cefalorraquidiano (LCR) de camundongos, incluindo os nucleosídeos inosina e guanosina, e diminuiu a concentração líquórica de ácido úrico. Em estudo clínico em humanos (artigo 2), a administração pré-operatória de alopurinol foi eficaz na redução nos escores de dor 2 horas após a cirurgia de histerectomia abdominal total quando comparados ao grupo placebo. Houve uma mudança significativa nas concentrações de xantina e ácido úrico no líquido cefalorraquidiano antes da cirurgia ( $p < 0,01$ ), sem diferença observada nos níveis de outras purinas. Também foi investigado os efeitos do alopurinol na dor e ansiedade em mulheres com fibromialgia refratária à terapia convencional. Inicialmente, foi feito um estudo piloto (artigo 3) onde uma série de casos com 12 mulheres portadoras de fibromialgia receberam alopurinol oral 300 mg duas vezes ao dia por 30 dias. Como resultado deste estudo, a administração oral de alopurinol causou uma redução significativa da dor até 30 dias de tratamento. Nenhum efeito foi observado em relação aos escores de ansiedade. A seguir, frente ao resultado promissor deste estudo piloto, foi feito o ensaio clínico (artigo 4) com uma amostra de 60 mulheres, comparando a eficácia analgésica do alopurinol oral versus placebo como terapia adjuvante em pacientes com fibromialgia. Neste estudo, a administração oral de alopurinol 300 mg duas vezes ao dia foi ineficaz em melhorar os escores de dor medidos por várias ferramentas até 30 dias de tratamento. Além disso, não foi observado outro benefício da administração de alopurinol sobre a ansiedade, sintomas depressivos e estado funcional nestes pacientes. Nenhum efeito adverso significativo foi observado nos estudos clínicos (artigos 2, 3 e 4). Embora este estudo não tenha apresentado benefício do uso do alopurinol como tratamento adjuvante em paciente com fibromialgia, é válida a realização de novos ensaios clínicos, abrangendo amostras maiores com acompanhamento em longo prazo para esclarecer o seu papel em diferentes condições dolorosas agudas e crônicas, visto o seu conhecido perfil de segurança e os resultados promissores em estudos prévios.

## ABSTRACT

(FAGUNDES AC – ANTINOCICEPTIVE EFFECTS OF THE XANTHINE OXIDASE INHIBITOR ALLOPURINOL: EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDIES)

Allopurinol is a potent inhibitor of the enzyme xanthine oxidase, used mainly in the treatment of hyperuricemia and gout. The antinociceptive effects of allopurinol have been demonstrated in rodent pain models. The aim of this doctoral thesis was to investigate the effects of allopurinol on pain and anxiety scores through experimental and clinical studies. The results are presented in the form of scientific manuscripts. The first article describes an experimental study in which allopurinol, administered intraperitoneally, produced antinociceptive effects against thermal and mechanical hyperalgesia in a traditional model of neuropathic pain in mice. In this work, we demonstrated that the selective adenosine A1 receptor antagonist DPCPX partially prevented allopurinol-induced antinociception. Allopurinol also caused an increase in the levels of some purines in the cerebrospinal fluid (CSF) of mice, including the nucleosides inosine and guanosine, and decreased the CSF concentration of uric acid. In a clinical study in humans (article 2), the preoperative administration of allopurinol was effective in reducing pain scores 2 hours after total abdominal hysterectomy surgery when compared to the placebo group. There was a significant change in the concentrations of xanthine and uric acid in the cerebrospinal fluid before surgery ( $p < 0.01$ ), with no difference observed in the levels of other purines. The effects of allopurinol on pain and anxiety in women with fibromyalgia refractory to conventional therapy were also investigated. Initially, a pilot study (article 3) was carried out in which a series of cases with 12 women with fibromyalgia received oral allopurinol 300 mg twice daily for 30 days. As a result of this study, oral administration of allopurinol caused a significant reduction in pain up to 30 days of treatment. No effect was observed in relation to anxiety scores. Next, in view of the promising result of this pilot study, a clinical trial (article 4) was carried out with a sample of 60 women, comparing the analgesic efficacy of oral allopurinol versus placebo as an adjunctive therapy in patients with fibromyalgia. In this study, oral administration of allopurinol 300 mg twice daily was ineffective in improving pain scores measured by various tools up to 30 days of treatment. In addition, there was no other benefit of allopurinol administration on anxiety, depressive symptoms and functional status in these patients. No significant adverse effects were observed in clinical studies (articles 2, 3 and 4). Although this study has not shown the benefit of using allopurinol as an adjuvant treatment in a patient with fibromyalgia, new clinical trials are valid, covering larger samples with long-term follow-up to clarify their role in different acute and chronic painful conditions, as its well-known safety profile and the promising results in previous studies.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA – ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato

ADP – adenosina-5'-difosfato

AMP – adenosina-5'-monofosfato

AMPc – adenosina-3',5'-monofosfato-cíclico

ATP – adenosina-5'-trifosfato

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

GABA – ácido gama-aminobutírico

GMP – guanosina-5'-monofosfato

GMPc – guanosina 3',5'-monofosfato-cíclico

GDP – guanosina-5'-difosfato

GTP – guanosina-5'-trifosfato

i.c.v. – intracerebroventricular

i.p. – intraperitoneal

i.t. – intratecal

LCR – líquido cefalorraquidiano

MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno

NMDA – N-metil-D-aspartato

NGF – fator de crescimento neural

PAF – fator de ativação plaquetário

PKA – proteína cinase A

PKC – proteína cinase C

SNA – sistema nervoso autônomo

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

## APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está organizada em três partes: parte I (introdução e objetivos), parte II (quatro artigos científicos) e parte III (discussão, considerações finais e perspectivas). A introdução apresenta o embasamento teórico que motivou a formulação da proposta do trabalho. A seguir, estão dispostos o objetivo geral e os objetivos específicos da tese.

Na parte II encontram-se os resultados obtidos através de quatro artigos científicos. Os tópicos Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas são descritas de forma detalhada em cada artigo científico.

A parte III contém a Discussão, Considerações Finais e Perspectivas que representam um compilado geral acerca dos resultados obtidos nos diferentes trabalhos.

Por fim, as Referências Bibliográficas referem-se somente às citações correspondentes à Introdução e Discussão desta tese.



## SUMÁRIO

### PARTE I

<b>I.1. INTRODUÇÃO</b>	09
<b>I.1.a. Dor</b>	09
<b>I.1.b. Mecanismo de transmissão dolorosa</b>	11
<b>I.1.c. Transmissão da dor – Mecanismos periféricos</b>	12
<b>I.1.d. Processamento central da dor</b>	13
<b>I.1.e. Mecanismos de sensibilização central</b>	14
<b>I.1.f. Mediadores químicos envolvidos na dor</b>	16
<b>I.1.g. Dor patológica: dor crônica neuropática</b>	17
<b>I.1.h. O sistema purinérgico e seu papel na transmissão dolorosa.</b>	18
<b>I.2. OBJETIVOS</b>	21
<b>I.2.a. Trabalho experimental com modelo animal</b>	21
<b>I.2.b. Trabalhos experimentais com modelos humanos</b>	21

### PARTE II

<b>II.1. ARTIGO 1 - The xanthine oxidase inhibitor allopurinol prevents thermal and mechanical hyperalgesia in a mouse model of peripheral mononeuropathy</b>	23
<b>II.2. ARTIGO 2 - Clinical effects of allopurinol on perioperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy: a randomized clinical trial</b>	43
<b>II.3. ARTIGO 3 - Effects of allopurinol on pain and anxiety in fibromyalgia patients: a pilot study</b>	64
<b>II.4. ARTIGO 4 - Allopurinol for fibromyalgia pain in adults: a randomized clinical trial</b>	73

### PARTE III

<b>III.1. DISCUSSÃO</b>	97
<b>III.2. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b>	103
<b>REFERÊNCIAS</b>	104

# **PARTE I**

Introdução e Objetivos

## **I.1. INTRODUÇÃO**

### **I.1.a. Dor**

Dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano (IASP, 1986). Apesar de representar uma sensação incômoda, a dor é um componente fundamental da homeostase e essencial para a sobrevivência visto que tem o propósito de indicar a presença de estímulos nocivos ou potencialmente nocivos que podem apresentar riscos de dano tecidual. Assim, a dor funciona como um “sinal de alerta” permitindo que mecanismos de defesa sejam adotados pelo organismo [Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001]. Entretanto, a dor pode perder seu propósito inicial de alerta e tornar-se persistente ou crônica. Este processo ocorre quando o organismo não consegue corrigir a lesão ou quando são estabelecidos mecanismos adaptativos inadequados [D’Mello e Dickenson, 2008]. Nestes casos, ocorrem alterações no processamento sensorial e o quadro de dor é frequentemente associado à hiperalgesia - percepção exagerada de estímulos dolorosos - e alodinia - estímulos inócuos gerando resposta dolorosa [Millan, 1999]. Este tipo de dor é de difícil tratamento e ocasiona intenso sofrimento, diminuição da capacidade funcional e queda da qualidade de vida [Zimmermann, 2001].

A dor pode ser classificada quanto ao tipo (eventual, aguda e crônica) e à origem (nociceptiva, neurogênica, neuropática e psicogênica). A dor eventual ou transitória não está relacionada a um estímulo nocivo ou lesão significativa (exemplo: vacina). Por outro lado, a dor aguda está relacionada a um estímulo nocivo com lesão tecidual (exemplo: queimadura) e envolve, além de nociceptores periféricos, o sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo (SNA). A dor crônica trata-se da dor persistente após processo de reparo do organismo ou, em muitos casos, nem se relaciona a processo nocivo detectado, como é o exemplo da fibromialgia [Millan, 1999]. Em relação à origem, a dor pode ser desencadeada por: estimulação excessiva de nociceptores (dor nociceptiva), dano do tecido neuronal na periferia ou no SNC (dor neurogênica), disfunção ou lesão nervosa (dor neuropática) ou, até mesmo, não ser causada por uma fonte somática detectável (dor psicogênica) [Millan, 1999]. Não é apenas a duração que caracteriza o tipo de dor, mas também a capacidade de reparo da lesão pelo organismo e o processamento neural responsável pela transmissão dolorosa [Hill, 2001].

Algumas evidências indicam que nem sempre há associação direta entre dor e lesão tecidual, uma vez que diversas síndromes dolorosas não são detectáveis por métodos de diagnóstico na clínica atual. Esse fato favorece a hipótese de que alterações neurofuncionais podem ser restritas ao âmbito biomolecular [Millan, 1999]. A dor tem caráter multifatorial e sua etiologia pode ser complexa, envolvendo componentes sensoriais, cognitivos e emocionais [Julius e Basbaum, 2001]. A transmissão dolorosa envolve diversos eventos, desde a sensibilização periférica pelo estímulo nocivo até alterações neuroplásticas adaptativas, tais como sensibilização central, alterações na capacidade modulatória de neurônios inibitórios na medula espinhal, entre outras. [Millan, 1999; Hill, 2001; Zimmermann, 2001]. Todos esses processos envolvidos na transmissão de dor geram quadros dolorosos manifestados das mais diversas formas [Apkarian et al., 2008]. Nesse sentido, modelos experimentais de dor têm sido utilizados a fim de aprofundar o entendimento a respeito dos mecanismos de transmissão de dor e para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. A avaliação da dor em modelos animais é feita indiretamente por meio de respostas comportamentais, constituindo-se em modelos de nocicepção [Millan, 1999]. A dor abrange a percepção e interpretação de estímulos nocivos. Em contrapartida, a nocicepção é a sensação determinada pela estimulação de receptores presentes nas fibras aferentes primárias, ou seja, é o componente sensorial da dor e corresponde às manifestações neurofisiológicas e neuroquímicas geradas pelo estímulo nocivo [Millan, 1999].

A ocorrência de dor é crescente, sendo que 10% a 50% dos indivíduos no Brasil e em outros países procuram clínicas médicas devido ao sintoma dor [Rocha et al., 2007; Nampiaparampil, 2008; Tunks et al., 2008]. De acordo com estudo realizado pela Sociedade Brasileira para Estudo da Dor em 2017, aproximadamente 37% da população brasileira convive com algum quadro de dor crônica. A dor persistente está constantemente associada com depressão, o que afeta a qualidade de vida [WHO, 2006]. Além disso, vários destes quadros dolorosos são refratários aos tratamentos disponíveis na atualidade. Neste contexto, o entendimento de neurofarmacologia e fisiopatologia da dor, assim como o estudo dos mecanismos centrais e periféricos envolvidos na sua transmissão, tornam-se necessários para a busca incessante de novas terapêuticas adjuvantes.

### **I.1.b. Mecanismos de transmissão dolorosa**

A dor é desencadeada a partir da transformação de estímulos nocivos em potenciais de ação que são transferidos das fibras nervosas periféricas para o sistema nervoso central através da medula espinhal [Zhang e Bao, 2006]. A detecção destes estímulos e sua respectiva transmissão, sob a forma de impulso elétrico, ocorre por intermédio de receptores específicos para a dor (nociceptores), presentes nas terminações de fibras nervosas do tipo A $\delta$  e C [Fitzgerald, 2005]. A presença da bainha de mielina nas fibras nervosas reflete na velocidade de condução dos potenciais de ação: as fibras A $\delta$  (2 a 6 mm de diâmetro), envoltas por bainha de mielina, são responsáveis pela transmissão rápida da dor, enquanto as fibras C (0,4 a 1,2 mm de diâmetro) são amielínicas e transmitem o estímulo doloroso de forma mais lenta (0,5 a 2 m.s<sup>-1</sup>). Outro tipo de fibra, as fibras A $\beta$  (30 a 100 m.s<sup>-1</sup>), são de condução rápida e respondem predominantemente a estímulos inócuos, como propriocepção e tato. Contudo, na presença de alterações neuroplásticas, estas fibras podem participar da amplificação da dor em nível medular [Schaible, 2007; Millan, 1999; D’Mello e Dickenson, 2008].

A sensibilização dos nociceptores ocorre por diferentes estímulos como, por exemplo, lesão tecidual, mudança de temperatura, hipóxia e isquemia. No entanto, há nociceptores “silenciosos” que não são sensibilizados a estímulos de menor intensidade, sendo ativados somente em situações específicas, como na presença de mediadores inflamatórios, resultando na amplificação da resposta à dor [Julius e Basbaum, 2001]. A grande maioria das fibras do tipo C são consideradas polimodais, ou seja, respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Essas fibras são classificadas, por critérios morfológicos, em peptidérgicas e não peptidérgicas. As fibras C peptidérgicas produzem e liberam peptídeos, como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e expressam receptores para o fator de crescimento neural (NGF), apresentando terminais sinápticos em regiões mais externas no corno dorsal da medula espinhal (lâmina I) [Millan, 1999]. As fibras C não – peptidérgicas expressam receptores para o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e o receptor purinérgico do tipo P<sub>2</sub>X<sub>3</sub> e apresentam seus terminais sinápticos mais internamente na substância gelatinosa da medula espinhal (lâmina II). Já as fibras Ad respondem a estímulos mecânicos e térmicos e são subdivididas conforme o limiar de temperatura para a transmissão do estímulo [Millan, 1999].

### **I.1.c. Transmissão da dor - Mecanismos periféricos**

Quando o estímulo nocivo provoca lesão tecidual, inicia-se um processo inflamatório seguido de reparação, que desencadeia uma cascata de sensibilização periférica. A liberação local e difusa de substâncias químicas, denominadas algogênicas, são responsáveis pela sensibilização dos nociceptores. Dentre as substâncias algogênicas destacam-se a acetilcolina, prostaglandinas, histamina, bradicinina, serotonina, leucotrieno, substância P, fator de ativação plaquetário (PAF), íons potássio e hidrogênio, tromboxanos, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento neural (NGF) e monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) [Wood, 2004]. As enzimas liberadas do interior de células lesadas degradam ácidos graxos e formam cininas, como a bradicinina, responsável por promover dilatação arteriolar e aumento da permeabilidade capilar, o que favorece a propagação do processo inflamatório [Millan, 1999; Huang et al., 2006]. A ação da enzima fosfolipase A na membrana celular desencadeia a liberação de ácido araquidônico. Este é metabolizado por 3 sistemas enzimáticos principais - cicloxigenase, lipoxigenase e citocromo P-450- e produz, respectivamente: prostaglandinas, tromboxanos, e prostaciclina; leucotrienos e lipoxinas; produtos da via da epoxigenase. Todas essas substâncias causam a redução global dos limiares de excitabilidade dos nociceptores [Huang et al., 2006]. A substância P e a neurocinina A facilitam a geração e manutenção do processo inflamatório visto que provocam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular.

A bradicinina, a prostaglandina E<sub>2</sub>, o NGF e as interleucinas também apresentam papel importante no processo de sensibilização periférica à dor. A bradicinina e a prostaglandina provocam alterações em receptores específicos (TRPV<sub>1</sub>) acoplados a canais iônicos ligante-dependente via ativação do AMPC, e das proteínas cinases A (PKA) e C (PKC), o que reduz o tempo pós-hiperpolarização da membrana neural, e conseqüentemente, reduz o limiar para disparo da fibra nervosa. O NGF e outras neurotrofinas provocam aumento da síntese, do transporte axonal anterógrado e da quantidade de substância P e CGRP nas fibras C, além de reduzirem a atividade do ácido gama-aminobutírico (GABA) em terminações periféricas e centrais [Hill, 2001; Julius e Basbaum, 2001].

A agressão persistente provoca sensibilização de fibras nervosas e alterações no sistema nervoso periférico, promovendo a ativação de nociceptores silentes, hiperalgesia e aumento dos níveis de AMPC e cálcio nos nociceptores [Huang et al., 2006]. Dessa maneira, os nociceptores

passam a desenvolver descargas espontâneas, tornando-se capazes de responder de maneira intensa a estímulos nociceptivos e não-nociceptivos [Huang et al., 2006].

Em suma, a agressão tecidual resulta na liberação de mediadores químicos que provocam alterações no fluxo sanguíneo local, na permeabilidade vascular e produção de sinais inflamatórios como, dor, calor, rubor, tumor e impotência funcional. Inicia-se o processo de sensibilização periférica que vai exacerbar a resposta ao estímulo doloroso. Ocorre também o aumento da condutividade dos canais de cálcio e sódio e redução do influxo de potássio e cloro para o meio intracelular devido à despolarização da membrana neural por tempo prolongado pela ação dos mediadores periféricos. Neste momento, caso este processo seja prolongado, podem ocorrer alterações neuroplásticas em nível central e, conseqüentemente, o desencadeamento de mecanismos de sensibilização central [Apkarian, 2008].

#### **I.1.d. Processamento central da dor**

A liberação das substâncias algogênicas na lesão tecidual periférica desencadeia o processo de transmissão dos estímulos nocivos até os níveis mais centrais através da medula espinhal [Millan, 1999]. Essa transmissão não ocorre de forma passiva visto que os circuitos intramedulares possuem a capacidade de alterar o estímulo e, conseqüentemente, determinarão de que forma a resposta dolorosa chegará ao córtex cerebral [Zhang e Bao, 2006].

Os estímulos nocivos persistentes nos nociceptores provocam a dor espontânea, redução do limiar de sensibilidade, hiperalgesia – resposta realçada ao estímulo doloroso - e alodinia - dor resultante de um estímulo normalmente inócuo. A hiperalgesia pode ocorrer no local da lesão (hiperalgesia primária) ou se estender para áreas adjacentes (hiperalgesia secundária). A presença destes elementos sugere que, além da sensibilização de nociceptores periféricos, o SNC também tem envolvimento nestas mudanças [Zhuo, 2007].

As fibras aferentes conduzem impulsos nociceptivos até o corno dorsal da medula, área primária de recebimento da maioria das informações sensoriais, que se divide em seis lâminas, caracterizadas pelo recebimento de diferentes tipos de informações [Millan, 1999]. As fibras aferentes do tipo A $\delta$  e C realizam suas sinapses primárias nas lâminas mais superficiais (lâmina I e lâmina II). Após a integração dos impulsos nociceptivos no corno dorsal da medula, ocorrem

projeções através de vias ascendentes para centros superiores, como estruturas subcorticais e corticais [Fitzgerald, 2005]. As vias ascendentes de condução de dor até o cérebro podem ser monossinápticas e polissinápticas [Millan, 1999]. As vias monossinápticas projetam-se diretamente a estruturas superiores e incluem feixes, como o espinotalâmico e espinorreticular. Em contrapartida, as vias polissinápticas tem uma estação de retransmissão a neurônios de segunda ordem até atingirem estruturas superiores, formando feixes como o paleoespinotalâmico e o espinocervical. Diversas dessas vias apresentam conexões com neurônios de terceira ordem em nível talâmico, projetando-se até estruturas corticais [Fitzgerald, 2005].

Além das vias ascendentes, a percepção de dor pode ser modulada pelas vias descendentes, provenientes de estruturas do SNC, como tálamo, tronco cerebral, hipotálamo, córtex, núcleo magno da rafe e substância cinzenta periaquedutal [Zhang e Bao, 2006; Yoshimura e Furue, 2006].

A modulação da dor pelas vias descendentes é caracterizada por ações diretas sobre as vias aferentes primárias e por inibição ou estimulação de interneurônios, sendo predominantemente de caráter noradrenérgico e serotoninérgico [Yoshimura e Furue, 2006]. Algumas características inibitórias das vias noradrenérgicas e serotoninérgicas foram demonstradas em estudos eletrofisiológicos, como: hiperpolarização direta dos neurônios situados no corno dorsal da medula; inibição da liberação de glutamato de fibras aferentes A $\delta$  e C; aumento da liberação de GABA e glicina proveniente de interneurônios inibitórios na medula espinhal. Apesar de efeitos excitatórios serem descritos, o papel fundamental destas vias é o controle endógeno da dor, ou seja, seu efeito predominante é antinociceptivo [Yoshimura e Furue, 2006].

Porém, caso ocorra uma disfunção intrínseca das vias de transmissão dolorosa ou o estímulo periférico seja sustentado ou intenso, fenômenos neuroplásticos podem ocorrer em nível central [Zhuo, 2007]. A partir disso, os mecanismos de sensibilização central podem desencadear síndromes dolorosas crônicas altamente refratárias [Tunks et al., 2008].

### **I.1.e. Mecanismos de sensibilização central**

Na sensibilização central ocorrem mudanças nos impulsos periféricos (com adaptações positivas ou negativas), redução do limiar ou aumento da resposta aos impulsos aferentes, descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação dos campos receptivos de neurônios



do corno dorsal [Zhuo, 2007]. A liberação de neurotransmissores, como substância P, somatostatina, CGRP, neurocinina A, glutamato e aspartato após agressão tecidual estão relacionados com a ativação de potenciais pós-sinápticos excitatórios [Millan, 1999]. Ocorre a soma dos potenciais de ação e despolarização pós-sináptica cumulativa. Por sua vez, o aumento do cálcio promove a ativação da enzima óxido nítrico sintase e a estimulação da transcrição de proto-oncogenes, genes localizados no SNC e envolvidos na formação de encefalinas e dinorfinas.

As encefalinas apresentam ação antinociceptiva e são relacionadas com a redução da neuroplasticidade e hiperalgesia. Já as dinorfinas tem ação algogênica e antinociceptiva, dependendo da situação. [Delander et al., 1997; Jongen et al., 2005]. As neurotrofinas tem como receptores as tirosinases tipo A e B (trkA, trkB), enquanto que a substância P e o CGRP ligam-se aos receptores para neurocininas do tipo NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> [Hill e Oliver, 2007]. Com a liberação de aminoácidos excitatórios, peptídeos e neurotrofinas e a interação com receptores específicos, ocorre a ativação de segundos mensageiros (do tipo AMPc, PKA, PKC, fosfatidilinositol, fosfolipase C, fosfolipase A<sub>2</sub>). A ativação de receptores NMDA ocorre após uma ativação intensa e persistente dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA. Conseqüentemente, ocorre a abertura de canais de cálcio, o que contribui para o aumento do influxo de íons cálcio e a produção de prostaglandinas e óxido nítrico. Estes migram em direção à fenda sináptica e estimulam a liberação de glutamato, aspartato, substância P e CGRP, favorecendo a ampliação do processo algico [Birklein e Schmelz, 2008].

Os mecanismos que favorecem o aumento da eficácia da transmissão sináptica podem ser decorrentes da formação e do transporte de substâncias excitatórias do interior da célula para a fenda sináptica ou da fosforilação dos receptores de membrana e das alterações no tempo de abertura dos canais iônicos. Além disso, as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) modulam a fosforilação dos receptores NMDA e AMPA, amplificando a resposta nociceptiva.

Durante o estabelecimento da sensibilização central na dor neuropática ocorre morte de neurônios inibitórios por meio da excitotoxicidade - toxicidade mediada pelo glutamato - processo que vai contribuir significativamente para a manutenção do quadro doloroso a longo prazo [Zhuo, 2007]. Estudos têm demonstrado o papel das células gliais nos mecanismos de transmissão e manutenção da dor, principalmente quando trata-se de dor crônica de origem neuropática [Gao e Ji, 2010; Gosselin et al., 2010]. As células gliais, predominantemente os astrócitos espinhais, estão

relacionadas ao estímulo doloroso prolongado devido a sua associação com os sistemas purinérgico e glutamatérgico [Ohara et al., 2009; Sweitzer e De Leo, 2011].

### **I.1.f. Mediadores químicos envolvidos na dor**

Os principais mediadores químicos envolvidos nos eventos que ocorrem durante a transmissão da dor periférica e central são: prostaglandinas, leucotrienos, aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), purinas (ATP), noradrenalina, serotonina, dopamina, óxido nítrico, cininas, taquicininas, substância P, CGRP, galanina, colecistocinina, peptídeo vasoativo intestinal, citocinas, fatores tróficos neurais, entre outros [Fürst, 1999; Millan, 1999]. Dentre estes mediadores químicos, serão abordados apenas os mais envolvidos diretamente com a presente tese: glutamato e purinas (em item à parte).

O glutamato é conhecido como o principal neurotransmissor excitatório no SNC de humanos e mamíferos em geral [McLennan e Liu, 1982]. Desde o início da década de 1960, seu efeito excitatório vem sendo descrito, onde é relacionado em processo de excitação neural rápida, em plasticidade neural, em processos de aprendizado e memória e em processos de neurotoxicidade (excitotoxicidade) [Danbolt, 2001; Carozzi et al., 2008].

Além disso, o glutamato tem papel importante na transmissão de estímulos dolorosos [Bleakman et al., 2006]. A hipótese de que os receptores glutamatérgicos têm papel fundamental nas vias de dor e que estão criticamente envolvidos na transmissão nociceptiva aferente primária, tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da nocicepção, tem sido embasada por estudos farmacológicos, eletrofisiológicos e comportamentais. Os receptores glutamatérgicos são classificados em dois grupos: ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores chamados ionotrópicos são canais iônicos modulados por agonistas (NMDA, AMPA, cainato) e os metabotrópicos são acoplados a sistemas de segundos mensageiros através de proteínas G [Danbolt, 2001; Bleakman et al., 2006]. A ativação destes receptores - por glutamato, aspartato ou agonistas dos receptores - modulam a atividade de enzimas (adenilato ciclase, guanilato ciclase, fosfolipase C) e fluxos iônicos transmembrana.

Nesse sentido, a modulação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos pode ser uma terapêutica efetiva para tratamento de quadros dolorosos crônicos [Coggeshall e

Carlton, 1997; Bleakman et al., 2006]. Algumas substâncias capazes de bloquear estes receptores apresentam importante efeito antinociceptivo em diferentes espécies de mamíferos, inclusive em humanos [Wiech et al., 2004]. Antagonistas dos receptores de glutamato, como cetamina e MK-801, podem atenuar quadros dolorosos relacionados à reação inflamatória, dano tecidual agudo, isquemia ou dano nervoso [Wiech et al., 2004].

Contudo, o glutamato também pode ser um agente neurotóxico, promovendo graves alterações estruturais, neuroquímicas e comportamentais, quando liberado de forma não modulada para o espaço extracelular, principalmente em algumas condições de insultos agudos ao SNC ou doenças crônicas neurodegenerativas [Parsons et al., 2005]. Este fato representa uma grande limitação clínica, visto que seu uso pode acarretar em efeitos adversos intoleráveis como sedação, disforia, alucinações, distúrbios motores, entre outros [Gardoni e Di Luca, 2006]. Neste contexto, torna-se constante a busca por novos fármacos que sejam capazes de modular a atividade glutamatérgica anormal e apresentem um maior perfil de segurança.

### **I.1.g. Dor patológica: dor crônica neuropática**

Dor neuropática é definida como a dor resultante de uma disfunção ou lesão do nervo devido à doença ou lesão do sistema somestésico [Zimmermann, 2001]. Esse tipo de dor apresenta etiologia heterogênea, com envolvimento de diversos mediadores químicos e imunes [Campbell e Meyer, 2006]. O tratamento da dor neuropática ainda é um desafio clínico uma vez que se trata de uma síndrome complexa, com mecanismos desencadeadores pouco esclarecidos. No entanto, sabe-se que alterações medulares, tais como excitabilidade aumentada, vias inibitórias com atividade reduzida e neuroplasticidade, promovem o desenvolvimento da dor crônica após uma lesão nervosa. É necessária a participação de diversos mediadores químicos para o desencadeamento de uma cascata de eventos que promovem a manutenção do potencial de ação, de forma semelhante ao que ocorre na dor inflamatória. Por tratar-se de um processo crônico, uma das principais características desta patologia é um cenário de eventos neuroplásticos relacionados a alterações gênicas de receptores, canais iônicos, neurotransmissores e neuromoduladores, dentre outros [Woolf e Thompson, 1999; Willis, 2001; Binns et al., 2005; Zhuo, 2007].

Após a ativação intensa e persistente de receptores AMPA, a ativação de receptores NMDA é iniciada com aumento do influxo de íons cálcio. Quando se inicia o processo de sensibilização central, com a liberação dos neurotransmissores GABA e glicina, os interneurônios inibitórios ainda ficam ativos e modulam negativamente a dor. No entanto, durante a excitotoxicidade - toxicidade mediada pelo glutamato – ocorre a morte desses neurônios, o que contribui para a manutenção do quadro doloroso a longo prazo. Juntamente a este processo, sinapses aberrantes na medula vão desencadear a amplificação do processo doloroso que se torna, muitas vezes, espontânea [Gold, 2000; Zhuo, 2007]. Dessa forma, a dor resultante é de difícil manejo e muitos casos tornam-se refratários aos tratamentos. A maioria dos modelos animais de dor neuropática foi desenvolvida em ratos a partir de lesões periféricas traumáticas, metabólicas ou tóxicas como, por exemplo, ligadura parcial do nervo ciático, ligadura do nervo espinhal, lesão constrictiva crônica do nervo ciático, dentre outros métodos. [Le Bars et al., 2001]. Estes modelos visam provocar hiperalgesia mecânica e térmica, apresentando correlação com as alterações fenotípicas desenvolvidas em humanos [Le Bars et al., 2001; Campbell e Meyer, 2006]. Estudos que promovam uma melhor compreensão da neurobiologia da dor neuropática contribuem para a elaboração de novos fármacos que atuem de maneira mais eficaz neste tipo de dor.

### **I.1.h. O sistema purinérgico e seu papel na transmissão dolorosa**

O sistema purinérgico é composto por bases purínicas - como adenina e guanina - e seus derivados nucleotídeos e nucleosídeos. Estas moléculas são distribuídas dentro e fora das células de organismos vivos e estão envolvidas em diversas funções biológicas, como: construção do DNA e RNA (adenina e guanina), nas vias bioquímicas envolvidas no metabolismo energético celular (ATP) ou como mensageiros secundários nos mecanismos intracelulares de transdução de sinal (AMPC e GMPc) [Bourne et al., 1990; Barnstable et al, 2004]. Diversos estudos demonstraram o papel destas moléculas sobre a homeostase [Burnstock, 2007]. As purinas são classificadas em: derivados da adenina (ATP, ADP, AMP, adenosina, adenina) e derivados da guanina (GTP, GDP, GMP, guanosina e guanina). Também compõem as purinas os metabólitos diretos destes derivados, como a inosina, xantina, hipoxantina e ácido úrico. O ATP e a adenosina são considerados como principais efetores do sistema purinérgico em nível extracelular [Ralevic e Burnstock, 1998].

O ATP é um neurotransmissor clássico em nível central e periférico, armazenado e liberado de terminais pré-sinápticos, mas também é liberado por células não-neuronais e tecido lesado [Ralevic e Burnstock, 1998; Burnstock, 2007]. A adenosina e seus substratos apresentam efeitos neuromodulatórios [Brundege e Dunwiddie, 1997]. Além da ação como neurotransmissores e neuromoduladores, ambos derivados de adenina também agem como fatores tróficos em processos plásticos desenvolvidos no SNP e SNC [Rathbone et al., 1999; Ciccarelli et al., 2001]. As purinas, principalmente a adenosina, apresentam papel importante na modulação da atividade sináptica no SNC, interagindo com sistemas, como glutamatérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e colinérgico [Schmidt et al., 2007; Rathbone et al., 2008].

Na transmissão de dor, o ATP e a adenosina exercem influências em sítios periféricos e centrais [Sawynok, 1998; Sawynok et al., 1999; Sawynok e Liu, 2003]. A adenosina tem efeitos antinociceptivos relacionados à inibição pré-sináptica dos terminais nervosos sensoriais (com a diminuição da liberação de substância P e glutamato) e à inibição intrínseca de neurônios pelo aumento da condutância ao  $K^+$  [Sawynok e Liu, 2003]. Por meio da sua ação agonista em receptores  $A_1$ , também diminui a produção de óxido nítrico (mediado pelo receptor NMDA) e está relacionada diretamente a analgesia opioide [Sawynok e Liu, 2003].

O ATP interage com receptores purinérgicos específicos do tipo  $P_2$ . Estes receptores podem ser subdivididos em  $P_2X$  e  $P_2Y$  que são acoplados, respectivamente, aos canais iônicos e à proteína G [Burnstock, 2007]. Estudos com modelos experimentais de dor neuropática demonstraram redução ou aumento de receptores  $P_2X_3$ . Entretanto, há aumento da sensibilidade desses receptores mesmo na redução [Jarvis et al., 2002].

O bloqueio de receptores  $P_2X_3$  atenua a alodinia mecânica e térmica em ratos [Jarvis et al., 2002]. Os receptores  $P_2X_4$  aumentam sua expressão na microglia após lesão do nervo e o bloqueio farmacológico do  $P_2X_4$  reverte a alodinia [Tsuda et al., 2003]. Ratos que não expressam os receptores  $P_2X_7$ , presentes nas células T e macrófagos, são resistentes ao desenvolvimento de dor neuropática [Chessell et al., 2005]. Em contrapartida, receptores  $P_2Y_1$  aumentam em 70% após lesão do nervo ciático em ratos, e também podem estar relacionados ao desenvolvimento de quadros dolorosos [Xiao et al., 2002]. Entretanto, ainda não estão disponíveis para uso clínico fármacos que tenham ação direta sobre os receptores purinérgicos. Uma opção interessante é o uso de fármacos que modulam a atividade da adenosina e que já se encontram disponíveis para uso clínico, como o alopurinol.

O mecanismo de ação do alopurinol é a inibição da xantina oxidase, enzima responsável pela conversão de xantina em ácido úrico, passo final na degradação de purinas [Day et al., 2007]. Dessa forma, a hipoxantina e xantina e seus substratos (adenosina e guanosina, respectivamente) podem ficar acumulados e, conseqüentemente, há redução do produto final ácido úrico [Day et al., 2007]. O alopurinol é um fármaco amplamente utilizado em humanos para tratamento de hiperuricemia e gota e, além de ter comprovado perfil de segurança, pode ser um novo alvo de tratamento adjuvante de dor crônica, visto que provoca aumento nos níveis plasmáticos e liquóricos de guanosina e adenosina, ambos neuromoduladores com potencial antinociceptivo [Marro et al., 2006]. Em vista disso, o alopurinol foi o fármaco de escolha para avaliar o potencial do sistema purinérgico na modulação da dor através de estudos experimentais e clínicos na presente tese.

## **I.2. OBJETIVOS**

### **I.2.a. Trabalho experimental com modelo animal**

**Objetivo geral:** investigar os potenciais efeitos antinociceptivos do alopurinol em modelos animais de dor.

**Objetivos específicos:**

- Avaliar o efeito antinociceptivo do alopurinol em um modelo de dor neuropática em camundongos.
- Investigar o mecanismo de ação antinociceptiva do alopurinol em um modelo de dor neuropática em camundongos.
- Mensurar os níveis liquóricos de purinas em camundongos submetidos à administração intraperitoneal de alopurinol em um modelo de dor neuropática.
- Avaliar potenciais efeitos adversos e alterações locomotoras induzidas pela administração intraperitoneal de alopurinol em camundongos.

### **I.2.b. Trabalhos experimentais com modelos humanos**

**Objetivo geral:** investigar os efeitos do alopurinol, inibidor da xantina oxidase, em pacientes do sexo feminino, submetidas à histerectomia abdominal total ou em pacientes portadoras de fibromialgia.

**Objetivos específicos:**

- Avaliar o efeito analgésico do alopurinol em pacientes submetidas a histerectomia abdominal através de escalas de dor.
- Avaliar o efeito ansiolítico do alopurinol em pacientes submetidas ao procedimento cirúrgico.
- Avaliar o efeito analgésico do alopurinol em pacientes portadoras de fibromialgia refratárias à terapia convencional através de escala de dor.
- Avaliar o efeito ansiolítico do alopurinol em pacientes portadoras de fibromialgia refratárias à terapia convencional.

## **PARTE II**

Metodologia e Resultados apresentados na forma de artigos científicos