

Stefânia Forner

DOR NEUROPÁTICA APÓS LESÃO MEDULAR TRAUMÁTICA: O  
PAPEL DOS RECEPTORES ENDOTELINÉRGICOS ET<sub>A</sub> E ET<sub>B</sub>.

Tese submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Doutor em  
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Forner, Stefânia

Dor neuropática após lesão medular traumática: o papel dos receptores endotelinérgicos ETA e ETB. / Stefânia Forner ; orientador, Giles Alexander Rae - Florianópolis, SC, 2015.  
131 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. dor neuropática; lesão medular traumática; endotelinas. I. Rae, Giles Alexander. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

**"Dor neuropática após lesão medular traumática: o papel dos receptores endotelinérgicos ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>"**

Por

**Stefânia Forner**

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (010/FMC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:

  
\_\_\_\_\_  
Dr(a) Giles Alexander Rae (FMC/CCB/UFSC)

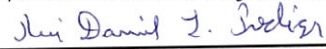
Banca examinadora:

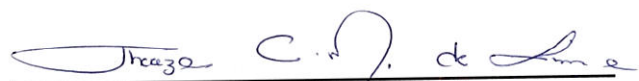
  
\_\_\_\_\_  
Dr(a) Robson da Costa (Farmácia/UFRJ)

  
\_\_\_\_\_  
Dr(a) Ricardo Antonio Tanhoffer (Fisiologia/UFPR)

  
\_\_\_\_\_  
Dr(a) Juliano Ferreira (FMC/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Dr(a) Thereza Christina Monteiro de Lima (FMC/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Dr(a) Rui Daniel Schröder Prediger (FMC/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima  
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 20 de março de 2015.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais – Damir e Valério – pelo incentivo e apoio durante meus anos de formação acadêmica. Obrigada por terem acreditado em mim. Amo vocês.

Ao meu irmão Marcos e sua família - Mariane, Felipe e Amanda - pelos bons momentos e apoio durante todos esses anos. Amo vocês.

À Alessandra Martini, companheira de vida e de bancada, obrigada pelas discussões científicas, pela amizade e amor. Nos momentos mais desesperadores você sempre conseguiu me fazer rir e nos momentos de alegria sempre pude compartilhá-los com você. A vida acadêmica teve outro valor com você ao meu lado. Obrigada, sempre.

Ao Prof. Giles A. Rae por ter permitido a realização desse trabalho e pelo conhecimento compartilhado ao longo desses anos. Obrigada.

Ao Prof. Michael G. Fehlings por ter me recebido no seu laboratório na Universidade de Toronto e ter fornecido a oportunidade de poder aprender com os melhores da área.

Ao Prof. João B. Calixto por ter sido um exemplo de dedicação à ciência durante todos esses anos e quem me ensinou muito.

Ao Prof. Reinaldo Takahashi que mesmo sem saber me ensinou muito de ciência e da vida.

Aos demais professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC que foram essenciais para a minha formação acadêmica ao longo de todos esses anos. Muito obrigada.

À Dra. Janice Koepp por ter me incentivado e apoiado desde o início da minha jornada científica. Obrigada por acreditar em mim.

Ao Dr. Rodrigo Medeiros que foi um mentor desde os anos de iniciação científica, aprendi e continuo aprendendo muito com você.

À Prof. Cláudia Figueiredo por auxiliar nas análises histológicas e pelas tantas conversas científicas ou aleatórias que mantivemos ao longo desses anos da minha jornada. Obrigada por sempre me fazer rir.

À Dra. Edinéia Lemos de Andrade e Mariane Manjavachi por terem auxiliado nos experimentos e pela amizade nestes anos de ciência.

À Prof. Soraia D. Schoeller e todos os acadêmicos e profissionais que estão hoje ou já fizeram parte do grupo de estudos (Re)Habilitar do Departamento de Enfermagem da UFSC, o qual tenho o prazer de dividir a coordenação. Todos vocês foram essenciais para meu aprimoramento acadêmico. Obrigada.

Aos meus eternos e amados amigos: Alini, Ricardo, Carolina, Janaína, Fidelis, Elza, Rui e Bruna. A vida sempre foi mais linda por ter amigos ao meu lado. Obrigada por sempre estarem presentes.

À Juliana Fabris pela amizade ao longo de todos esses anos! Adoro você!

Ao Ronald Paiva, Mariana Maioral e Naiandra Dittirch obrigada pela amizade e por terem nos ajudado tanto durante o período de doutorado sanduíche. Adoro vocês!

À Lígia e Ramiro pela amizade e apoio em Buenos Aires! Adoro vocês!

As minhas amigas e colegas de laboratório Lenyta Gomes, Ana Paula Luiz, Giselle Guginski, Samilla Schroeder e também à Lara C. Assis que foi “adotada” por nós no laboratório, obrigada pelas risadas e conversas científicas.

Aos meus amigos e colegas do laboratório de Toronto: Apostolia Tzekou, Antígona UIndreaj, Pía M. Vidal, Anna Badner, Crystal Ruff, James Hong, Ahad Siddiqui, Narihito Nagoshi, Nicole Forgione e Reaz Vadwa, pelos momentos memoráveis dentro e fora do laboratório, por terem tornado meu período de doutorado-sanduíche inesquecível pessoal e academicamente.

À Charmaine Mak por todos os jantares em *korea e chinatown*, cafés e conversas e por estar presente nos mais diversos momentos em Toronto. Obrigada.

À Julianna Gomes que me auxiliou a ultrapassar limites músculo-esqueléticos jamais imagináveis e me manteve de pé, literalmente, ao longo de todos esses anos. Obrigada.

À Dra. Maria Guadalupe N. Martins por me ajudar a tentar manter tranquilidade e serenidade durante a jornada final.

À Nica, que mesmo no silêncio canino sempre esteve presente ao meu lado me trazendo razões para sorrir mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, Pedro e Sheila, e aos funcionários do biotério central da UFSC, Joanesia e Aline Venâncio, por sempre starem dispostos a auxiliar.

À *International Brain Organization (IBRO)* *International Association for the Study of Pain (IASP)* pelas oportunidades oferecidas. Às fontes de fomento CNPq, CAPES, FAPESC e PRONEX.





*"Meu filho, os caminhos estão muito mais abertos do que você imagina.  
Só que eles parecem tortos. Mas é por esses caminhos que  
parecem tortos que você tem que caminhar, e as coisas vêm ao seu  
encontro. Você só tem que escutar os caminhos e seguir por eles.*

*Caio Fernando Abreu*

*“Somos assim: sonhamos o voo, mas tememos a altura. Para voar é  
preciso ter coragem para enfrentar o terror do vazio. Porque é só no  
vazio que o voo acontece. O vazio é o espaço da liberdade, a ausência  
de certezas. Mas é isso o que tememos: o não ter certezas. Por isso  
trocamos o voo por gaiolas. As gaiolas são o lugar onde as certezas  
moram.”*

*Fiódor Dostoiévski*



## RESUMO

Lesões medulares traumáticas resultam em um dano neurológico que, geralmente, resulta em dor neuropática, a qual impacta negativamente a qualidade de vida dos lesados medulares. As endotelinas são peptídeos que exercem seus efeitos através dos receptores  $ET_A$  ( $ET_{AR}$ ) e  $ET_B$  ( $ET_{BR}$ ) e, contribuem para alterações sensoriais associadas aos processos inflamatórios e dores neuropáticas. No entanto, o envolvimento desses receptores na dor neuropática após trauma medular precisa ser elucidado. Ratos Wistar machos foram submetidos a lesão medular traumática no nível torácico T10 por compressão através de catéter Fogarty-2F. As avaliações comportamentais e coletas de amostras foram realizadas em 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico. Os níveis de expressão dos receptores  $ET_A$  e  $ET_B$  foram mensurados através de western blot e imunohistoquímica, e seus correspondentes níveis de RNAm avaliados por PCR-em tempo real. Além de avaliações funcionais pela escala BBB e comportamentais através de filamentos de von Frey e avaliação de sensibilidade térmica por aparato de Hargreave's nas patas anteriores e posteriores. No dia 28 o escore BBB destes animais foi de 4 pontos, que se caracteriza por movimento discreto das três articulações – quadril, joelho e tornozelo. No entanto, os animais lesados medulares tiveram um aumento significativo em comparação ao grupo falso-operado nas respostas ao estímulo mecânico das patas posteriores, tanto com o filamento de 4 gramas quanto com o de 15 gramas. Essas alterações de sensibilidade foram significantes entre os dia 14 e 28 após o procedimento cirúrgico. O dano medular resultou no desenvolvimento de hiperalgesia nos membros posteriores a partir do 14<sup>o</sup> dia após a lesão medular, redução na sensibilidade térmica a partir do 7<sup>o</sup> dia, um aumento nos níveis de RNAm para  $ET_{AR}$  e  $ET_{BR}$ , além de um aumento na expressão da proteína do receptor  $ET_A$  na medula espinhal. Observou-se, também, um aumento da expressão de  $ET_{AR}$  na substância cinzenta da medula espinhal de animais lesados medulares no 14 dias após o trauma. O tratamento no 21<sup>o</sup> dia após a lesão medular com antagonista peptídico de  $ET_{AR}$ , BQ-123 (40 e 90 pmol, i.t.) e tratamento com o antagonista dual para  $ET_{AR}$  e  $ET_{BR}$ , bosentan (30 and 100 mg/kg, oralmente) foram capazes de reduzir significativamente a hiperalgesia por algumas horas após o tratamento, no entanto o tratamento com o antagonista seletivo para  $ET_{BR}$ , BQ-788 (20 e 90 pmol, i.t), foi ineficaz na redução da

hiperalgesia. Assim, esse estudo demonstra que há uma participação de  $ET_A R$  e  $ET_B R$ , na dor neuropática decorrente do trauma medular, em especial do  $ET_A R$  e estes resultados podem contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento desta importante comorbidade dos lesados medulares.

**Palavras-chave:** lesão medular traumática; dor neuropática; receptores endotelinérgicos;  $ET_A R$ ;  $ET_B R$ .

## ABSTRACT

Traumatic spinal cord injury (SCI) is a devastating neurologic disorder that often inflicts neuropathic pain, which further impacts negatively on the patient's quality of life. Endothelin peptides, which exert their effects via endothelin A (ET<sub>A</sub>R) and endothelin B (ET<sub>B</sub>R) receptors, can contribute to sensory changes associated with inflammatory and neuropathic pain, but their role in nociception following SCI is unknown. At different time points (2, 7, 14, 21 and 28 d) after subjecting male Wistar rats to surgery for compression-induced T10 level SCI, the spinal cord levels of ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R were assessed by Western blot and immunohistochemistry, and the corresponding mRNAs by real-time PCR, alongside recordings of locomotor behaviour by BBB scale and behavioral responses to mechanical and thermal stimulation of the forepaws and hind paws with von Frey hairs. Animal subjected to SCI ended the 28th time-period with a score of 4 within the BBB scale, which represents slight movements of the hip, knee and ankle. SCI was associated with development of hind paw mechanical hyperalgesia from day 14 onwards and heat hyperalgesia from day 7 to day 21, and up-regulation of ET<sub>A</sub>R and ET<sub>B</sub>R mRNA in the spinal cord and of ET<sub>A</sub>R protein in the spinal cord. SCI increased ET<sub>A</sub>R protein expression in spinal grey matter on the 14<sup>th</sup> day after injury. Treatment on day 21 after surgery with the ET<sub>A</sub>R selective antagonist BQ-123 (40 and 90 pmol, i.t.) or the dual ET<sub>A</sub>R/ET<sub>B</sub>R antagonist bosentan (30 and 100 mg/kg, orally) transiently reduced SCI-induced mechanical hyperalgesia, but the ET<sub>B</sub>R antagonist BQ-788 (20 and 90 pmol, i.t.) was ineffective. **Conclusions.** Altogether, these data show that SCI upregulates ET<sub>A</sub>R expression in the spinal cord, which appears to contribute to the hind paw mechanical hyperalgesia associated with this condition. Therapies directed towards blockade of spinal ET<sub>A</sub>R may hold potential to limit SCI-induced neuropathic pain.

**Keywords:** spinal cord injury; neuropathic pain; endothelin receptors; ET<sub>A</sub>R; ET<sub>B</sub>R



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Eventos fisiopatológicos após a lesão medular traumática.....	31
<b>Figura 2.</b> Figura representativa do corno dorsal da medula espinhal, região em que ocorre a primeira sinapse nociceptiva.....	36
<b>Figura 3.</b> Desenho representativo do orifício para exposição da medula e da posição do cateter Fogarty 2F. ....	54
<b>Figura 4.</b> Avaliação da atividade locomotora de animais submetidos à lesão da medula espinhal, através da escala BBB. ....	66
<b>Figura 5.</b> Alterações histopatológicas da medula espinhal após a lesão medular.....	67
<b>Figura 6.</b> Efeito da lesão medular traumática frente as respostas de retirada das patas anteriores e posteriores sobre à estimulação mecânica repetida com por filamentos de von Frey....	69
<b>Figura 7.</b> Efeito da lesão medular frente ao estímulo térmico por aparato de Hargreave's nas patas anteriores e posteriores. ....	70
<b>Figura 8.</b> Efeito da lesão medular sobre os níveis de RNAm para receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> e ET-1 na medula espinhal.....	72
<b>Figura 9.</b> Efeito da lesão medular sobre a expressão dos receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> na medula espinhal. ....	74
<b>Figura 10.</b> Expressão dos receptores ET <sub>A</sub> na medula espinhal após o trauma medular.....	76
<b>Figura 11.</b> Expressão dos receptores ET <sub>B</sub> na medula espinhal após o trauma medular.....	77
<b>Figura 12.</b> Efeito do tratamento intratecal de antagonistas seletivos para os receptores ET <sub>A</sub> (BQ-123) e ET <sub>B</sub> (BQ-788) frente ao estímulo mecânico por filamento de von Frey nas patas posteriores no 21 <sup>o</sup> dia após o trauma medular.....	78
<b>Figura 13.</b> Efeito do tratamento por via oral do antagonista dual para os receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> (bosentan) e pregabalina sobre a frequência de respostas comportamentais frente à estimulação mecânica repetida das patas posteriores com filamento de von Frey no 21 <sup>o</sup> dia após o trauma medular. ....	80
<b>Figura 14.</b> Efeito do tratamento diária, entre o primeiro e o sétimo dia após o trauma medular, por via oral do antagonista dual para os receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> (Bosentan) frente ao estímulo mecânico por filamento de von Frey nas patas posteriores no 21 <sup>o</sup> dia após o trauma medular.....	81

<b>Figura 15.</b> Avaliação da atividade locomotora de animais submetidos à lesão da medula espinhal e tratamento oral diário com Bosentan, através da escala BBB. ....	82
<b>Figura 16.</b> Efeito da injeção intratecal do agonista ET <sub>A</sub> /ET <sub>B</sub> , endotelina-1, na hiperalgesia mecânica 21 dias após a lesão medular.....	83
<b>Figura 17.</b> Diagrama esquemático das alterações do sistema endotelinérgico promovidos pela lesão medular traumática. ....	97
<b>Figura 18.</b> Mecanismos propostos para a participação dos receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> na dor neuropática decorrente da lesão medular.....	99



## **LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1.</b> Tipos de dores após a lesão medular. ....	39
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANOVA** - Análise de variância  
**BBB** – Basso, Beattie e Bresnahan  
**CEUA** – Comitê de Ética no Uso dos Animais  
**DAB** - 3,3',4,4' -tetraaminobefeniltetrahydroclorídrico  
**DNA** - Ácido desoxirribonucléico  
**DNAc** - Ácido desoxirribonucléico complementar  
**dNTPs** - Deoxinucleotídeos  
**DTT** - Ditioneitol  
**ECE** - Enzima conversora de endotelina  
**EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético  
**E.P.M** – Erro padrão da média  
**ERK** - Proteína quinase regulada por sinal extracelular  
**ET-1** - Endotelina-1  
**ET-2** - Endotelina-2  
**e.v.** – Endovenoso  
**JNK** - Proteína quinase c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal  
**H&E** - Hematoxilina e eosina  
**i.c.v.** - Intracerebroventricular  
**i.t.** - Intratecal  
**IL** – Interleucina  
**MAPK** – Proteína quinase ativada por mitógeno  
**MPO** – Mieloperoxidase  
**PBS** - Salina tamponada com fosfato  
**PMSF** - Fluoreto de fenilmetilsulfonila  
**RNA** - Ácido ribonucléico  
**RNA<sub>m</sub>** - Ácido ribonucléico mensageiro  
**RNasin** - Inibidor de RNase  
**RT-PCR** - Reação em cadeia da polimerase em tempo real  
**SNC** – Sistema Nervoso Central  
**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral- $\alpha$   
**TM** – Trauma medular  
**UFSC** - Universidade Federal de Santa Catarina  
**v.o.** – Via oral



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1 Lesão medular traumática.....	23
1.2 Histórico da lesão medular.....	24
1.3 Fisiopatologia da lesão medular traumática .....	26
1.3.1 Lesão primária .....	26
1.3.2 Lesão secundária.....	26
1.4 Intervenção clínica.....	32
1.5 Dor.....	33
1.7 Dor neuropática.....	40
1.8 Tratamento das dores neuropáticas .....	43
1.9 Endotelinas na dor.....	45
1.10 Endotelinas na lesão medular .....	49
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
2.1 Objetivo geral .....	51
2.2. Objetivos específicos .....	51
<b>3.MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
3.1 Animais.....	53
3.2 Lesão Medular Traumática - Procedimento Cirúrgico .....	53
3.3 Avaliação da Atividade Locomotora .....	55
3.4 Análise histopatológica da medula espinhal .....	55
3.5 Extração do RNA total .....	56
3.6 Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real) .....	56
3.7 Expressão protéica pelo imunoenensaio molecular de Western blot.....	57
3.8 Localização dos receptores endotelinérgicos.....	59
3.9 Avaliação da hiperalgesia mecânica .....	60
3.10 Avaliação da hiperalgesia térmica.....	61
3.11 Efeito dos antagonistas peptidérgicos dos receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> na hiperalgesia mecânica induzida por lesão medular .....	61
3.12 Efeito de bosentan, antagonista não-peptidérgico dual dos receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> e pregabalina na locomoção e hiperalgesia mecânica após o trauma medular.....	61
3.13 Efeito do tratamento diário com bosentan na prevenção de dor neuropática e melhora na locomoção após trauma medular .....	62

3.14 Efeito da administração central do agonista ET-1 na resposta hiperalgésica após lesão medular traumática.....	62
3.15 Reagentes e Drogas.....	62
3.16 Análise estatística.....	63
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
4.1 Análise da atividade locomotora dos animais após a lesão medular .....	65
4.2 Alterações histopatológicas decorrentes da lesão medular.....	66
4.3 Lesão medular traumática altera sensibilidade mecânica..	68
4.4 Lesão medular traumática altera sensibilidade térmica.....	69
4.5 Efeito da lesão medular sobre os níveis de RNAm para os receptores ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub> e para ET-1 .....	70
4.6 Análise da expressão dos receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> na medula espinhal após a lesão medular .....	73
4.7 Análise da expressão dos receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> nas substâncias cinzenta e branca da medula espinhal após a lesão medular .....	75
4.8 Efeito do tratamento intratecal de antagonistas seletivos para os receptores ET <sub>A</sub> (BQ-123) e ET <sub>B</sub> (BQ-788) sobre a hiperalgesia mecânica das patas posteriores após trauma medular .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.9 Efeito do tratamento por via oral com o antagonista dual para os receptores ET <sub>A</sub> e ET <sub>B</sub> – bosentan e a pregabalina sobre a hiperalgesia mecânica das patas posteriores após o trauma medular .....	78
4.10 Efeito do tratamento diário do antagonista seletivo-dual para os receptores ET <sub>A</sub> /ET <sub>B</sub> na prevenção de sensibilidade mecânica após trauma medular.....	79
4.11 Efeito do tratamento com antagonista dual para os receptores ET <sub>A</sub> /ET <sub>B</sub> na locomoção após trauma medular. ....	80
4.12 Efeito da injeção intratecal de Endotelina-1 na sensibilidade mecânica após lesão medular traumática.....	81
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>6.CONCLUSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>7.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>123</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Lesão medular traumática

A lesão medular traumática, ou traumatismo raquimedular - TRM (colunavertebral e medula espinhal), é uma lesão frequente que resulta em uma síndrome neurológica altamente incapacitante que compromete as principais funções motoras, autonômicas e reflexas levando a inabilidade permanente. A causa mais frequente é o traumatismo, mas também pode ser resultante de tumores, infecção, lesão vascular ou iatrogenicamente. A lesão medular afeta física e psicologicamente não apenas o indivíduo acometido, como também impacta fortemente sua família e a sociedade.

O National Spinal Cord Injury Statistical Center dos Estados Unidos (Nscisc, 2013) estima que 273.000 pessoas vivem com lesões medulares apenas nos Estados Unidos, aos quais se somam 12.000 novos casos/ano. Numa perspectiva semelhante, porém com dados epidemiológicos escassos, em 2003 o Brasil apresentava 250.000 lesados medulares com 9.000 novos casos/ano, de acordo com Meyer e colaboradores (2003). A prevalência mundial da condição é de 236 a 1.298/por milhão de habitantes e é mais frequente no sexo masculino, na faixa etária entre 30 e 40 anos de idade, no entanto, a proporção de mulheres afetadas por lesões medulares vem crescendo (Furlan *et al.*, 2013). As lesões medulares traumáticas são resultantes, na sua maioria, de acidentes automobilísticos, quedas de alturas, seguido de eventos violentos e traumatismos esportivos. Por conta disso, 55% dos casos de lesão medular acometem o nível cervical (C1 a C7-T1), resultando em uma mortalidade de 15% após o primeiro ano da lesão. Por outro lado, as regiões torácica (T1-T11), torácica-lombar (T11-T12 até L1-L2) e lombosacral (L2-S5) são responsáveis por 15% cada das lesões medulares, respectivamente (Sekhon e Fehlings, 2001; Nscisc, 2013).

O custo anual dos cuidados de um lesado medular são muito elevados. De acordo com a NSCISC (2013), a média de custo no primeiro ano de vida de um tetraplégico (C1-C4) é de aproximadamente 1 milhão de dólares americanos e o de um paraplégico é de 508.904 dólares. Além disso, cada ano subsequente à lesão medular tem um custo de 181.328 e 67.415 dólares, respectivamente. Assim, a lesão medular é considerada um problema de saúde pública de profundo impacto socioeconômico.

A localização anatômica mais comum de lesão medular, na região cervical, está associada também ao maior índice de complicações, seqüelas e mortalidade em comparação aos demais segmentos cervicais (Nscisc, 2013). Assim, tetraplegia incompleta representa 40,6% dos casos nos EUA, seguida por paraplegia incompleta (18,7%), paraplegia completa (18%) e tetraplegia completa (11,6%), sendo que menos de 1% dos pacientes tem recuperação neurológica completa até o momento de alta hospitalar (Nscisc, 2013).

Há uma variedade de aspectos que dependem do segmento medular afetado pelo traumatismo e da severidade da lesão, que precisam ser compreendidos. Por exemplo, em pacientes paraplégicos com perda total ou parcial dos movimentos das pernas, a falta de coordenação motora das pernas é uma prioridade menos importante a ser considerada do que as disfunções autonômicas gastrintestinais, da bexiga urinária (atonía e/ou hiperatividade da bexiga), funções sexuais e disreflexias cardiovasculares, uma vez que estas levam a maioria dos pacientes a óbito. Para pacientes tetraplégicos com perda total ou parcial dos movimentos das pernas e braços, as habilidades de manipulação dos braços e mãos são as mais importantes a considerar, bem como a possibilidade de ventilação pulmonar natural, sem uso de ventiladores mecânicos. Apesar destas distinções, dores e espasticidade muscular são aspectos relevantes em praticamente todos os pacientes com trauma raquimedular (Krassioukov *et al.*, 2003; Myers *et al.*, 2007; Horn *et al.*, 2013).

Apesar dos cuidados médicos e de reabilitação, muitos lesados medulares apresentam déficits neurológicos e motores permanentes. Assim, o estudo acerca dos acontecimentos oriundos do trauma medular é relevante para um melhor entendimento tanto do aspecto locomotor dos lesados, quanto das comorbidades que afetam essas pessoas, como a dor, por exemplo.

## **1.2 Histórico da lesão medular**

O primeiro registro documentado de lesão medular é de um papiro de 2500 a.C. adquirido pelo egiptologista Edwin Smith em 1862 e traduzido por James Henry Breasted em 1930, no qual relata-se que a lesão medular é “um mal a não ser tratado” (Van Middendorp *et al.*, 2010). Esse dogma, infelizmente, persistiu até o final do século XIX quando tiveram início os primeiros experimentos em animais para compreender os eventos fisiopatológicos envolvidos após um trauma da



medula espinhal.

O primeiro relato experimental foi de Schmaus, em 1890, que observou degeneração e cavitação nas medulas espinhais de coelhos após lesões medulares, eventos esses confirmados por Bikeles em 1900. Kirchgasses e Scagliosi relataram em 1897 e 1898, respectivamente, que danos à medula espinhal causavam degeneração da mielina, hemorragia intra-parenquimal e morte celular no dorso anterior da medula espinhal (Yeo, 1976).

Em 1907, Stcherbak desenvolveu um método de lesão medular em coelhos por vibração intensiva e descreveu a presença de necrose na substância cinzenta após o trauma. Em 1919, Ayer desenvolveu um método de paraplegia por injeção de parafina diretamente na medula espinhal de gatos e não observou danos histológicos, porém tanto pelos experimentos de Roussy, em 1920, quanto McVeigh e Thompson, em 1923 demonstraram hemorragia extensa rostro-caudal na substância cinzenta a partir do sítio da lesão medular e edema da substância branca. Ao final da década de 1920, Ferraro observou em coelhos que o trauma medular acarretava um edema acentuado dos axônios na primeira hora do trauma, alterações da mielina dentre as primeiras 12 horas e degeneração da substância branca com início de um processo de gliose já em 4 dias após a lesão inicial (Yeo, 1976).

Ao longo do último século houve um esforço intenso da comunidade científica que estuda lesão medular, em padronizar modelos para melhor compreender os processos fisiopatológicos deflagrados pelo trauma da medula. Assim, em 1911, Allen desenvolveu o primeiro aparato de contusão da medula que permitia com um peso específico e calibrado impactar a medula espinhal da região torácica de cachorros. Atualmente, há vários modelos de contusão, entre os quais destacam-se o *Ohio State University (OSU) impactor*, o *Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study (MASCIS) Impactor* e o *NYU Weight-Drop Device* (Dunham e Floyd, 2011). Em 1971, Tator desenvolveu o modelo de clipe vascular para estudar lesões medulares em macacos e roedores através da compressão medular. Apesar de também existirem modelos de transecção total da medula, esses são pouco utilizados por não mimetizarem o que geralmente ocorre em humanos e, dessa forma, não possibilitam a translacionalidade dos estudos. Por outro lado, a hemiseção da medula espinhal tem sido um modelo utilizado para facilitar a compreensão de eventos moleculares, principalmente regeneração axonal, que ocorrem após o trauma (Willis, 2002). Em 2001, Vanicky desenvolveu um modelo de compressão medular por

catéter de embolectomia Fogarty 2-F. Esse foi o modelo que utilizamos na presente tese com algumas modificações (Vanicky *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2011).

É importante ressaltar que o desenvolvimento de modelos experimentais em animais e de técnicas de estudo para a compreensão de eventos que ocorrem após o trauma resultou em uma ampla literatura acerca do assunto, além de facilitar a translacionalidade para estudos clínicos de fármacos e técnicas cirúrgicas.

### **1.3 Fisiopatologia da lesão medular traumática**

O trauma medular desencadeia uma sequência de eventos fisiopatológicos que gera danos neurológicos. Esses danos são resultados de dois eventos distintos: a lesão mecânica primária e a lesão endógena secundária.

#### **1.3.1 Lesão primária**

A lesão mecânica primária é o resultado direto do impacto sobre a medula espinhal, somado a sua compressão, que resulta em dano axonal. Essa lesão pode ocorrer por fraturas de deslocamento que resultam em fragmentos ósseos, que por sua vez comprimem a medula por uma hiperextensão e/ou cisalhamento da medula espinhal e/ou do seu suprimento sanguíneo. A lesão mecânica primária ainda pode ser resultado de uma transecção ou laceração da medula espinhal, seja por deslocamento severo ou por feridas penetrantes, levando a sua secção parcial ou total (Tator e Fehlings, 1991; Dumont *et al.*, 2001; Baptiste e Fehlings, 2006; Siddiqui *et al.*, 2015).

#### **1.3.2 Lesão secundária**

Após o trauma inicial, inicia-se um processo endógeno de desenvolvimento mais lento chamado de lesão endógena secundária, descrito pela primeira vez por Allen, em 1911. Esse processo ocorre como resultado da ruptura tecidual, com uma hemorragia na substância cinzenta que, por conseguinte, provoca um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, apoptose glial e neuronal, além de uma complexa resposta neuroinflamatória que persiste por meses ou anos após o trauma inicial (Dumont *et al.*, 2001; Schwartz e Fehlings, 2002; Profyris *et al.*, 2004; Fleming *et al.*, 2006; Donnelly e Popovich, 2008).

Os eventos envolvidos durante essa fase fazem com que a sobrevivência neuronal seja escassa e a recuperação funcional prejudicada. Ademais, é durante esse momento da lesão que o ambiente celular torna-se inóspito para a regeneração e remielinização (McDonald e Sadowsky, 2002; Vawda e Fehlings, 2013; Dasari *et al.*, 2014). O processo da lesão secundária é dividido em diversas fases: imediata, aguda, subaguda, intermediária e crônica. As características principais de cada fase são comentadas a seguir e são enumeradas na figura 1.

- **Fase imediata**

A fase imediata se refere, aproximadamente, as primeiras duas horas após o trauma e resulta em uma morte neuronal e glial acompanhada de choque medular e consequente perda funcional motora no nível da lesão e abaixo (Ditunno *et al.*, 2004; Norenberg *et al.*, 2004; Boland *et al.*, 2011). O trauma medular está associado ainda à liberação excessiva de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC, que, especialmente no ambiente hipóxico da medula lesionada, leva à ativação exagerada dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, resultando na morte celular por excitotoxicidade. As células da glia também são atingidas, sendo os oligodendrócitos os mais prejudicados, uma vez que apresentam maior permeabilidade ao cálcio e sofrem sensibilização por produtos da ciclooxigenase-2, resultando em morte excitotóxica (Profyris *et al.*, 2004; Carlson *et al.*, 2010; Gerardo-Nava *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Ainda nesta sub-fase surgem pontos hemorrágicos distantes do sítio da lesão original, como resultado da perda de integridade estrutural dos capilares sanguíneos, e há o aumento da expressão do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e da interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Donnelly e Popovich, 2008; David e Kroner, 2011).

- **Fase aguda**

O primeiro momento da fase aguda que ocorre entre 2 e 48 horas após o trauma medular inicial, caracteriza-se pelo surgimento de petéquias que aumentam em número e se unem formando uma volumosa área hemorrágica, resultando em uma isquemia (Tator e Fehlings, 1991). Este fenômeno é particularmente importante uma vez que a hemoglobina liberada é tóxica às células do SNC, expandindo o volume de tecido neural destruído (Regan e Guo, 1998; Gerzanich *et al.*, 2009). Relacionado a estes eventos, ocorre o infarto tecidual que

propaga a necrose do tecido nervoso e é intensificado por mecanismos como a trombose e o choque neurogênico.

A isquemia e o processo hemorrágico estão relacionados ao aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica/hematoespinal, uma vez que a lesão medular compromete a integridade dessas barreiras, sendo este efeito máximo 2 horas após o trauma, com o retorno a níveis fisiológicos 2 semanas depois do trauma inicial (Figley *et al.*, 2014).

Dentre as primeiras 24 horas após o trauma inicial, ocorre um processo chamado choque medular, ou seja, a ausência de reflexos espinhais caudais. O choque medular é diferente do choque neurogênico, já que o choque neurogênico representa uma condição em que o paciente apresenta hipotensão e bradicardia devido a perda da resistência vascular periférica, enquanto o choque medular está relacionado a interrupção das funções neurais distal à lesão, incluindo reflexos, sensibilidade a estímulos sensoriais e força motora (Ditunno *et al.*, 2004).

Além disso, o comprometimento das barreiras hematoencefálicas e hematoespinal permite a infiltração de células do sistema imune para o SNC, tais como linfócitos T, neutrófilos e monócitos. As micróglia residentes continuam a proliferar e se ativam durante a fase aguda, resultando na liberação acentuada de quimiocinas e citocinas (Donnelly e Popovich, 2008; Tzekou e Fehlings, 2014). Dessa forma, durante as primeiras 24 horas após o trauma medular, os neutrófilos chegam ao sítio da lesão e há liberação de citocinas, metaloproteinases, mieloperoxidase e espécies reativas de oxigênio (Taoka *et al.*, 1997; Guth *et al.*, 1999; Noble *et al.*, 2002; Fleming *et al.*, 2006; Donnelly e Popovich, 2008). Assim, em 48 horas ocorre uma migração de monócitos e os neutrófilos já não são mais recrutados. Já em 72 horas, ocorre uma expansão da lesão secundária, uma vez que os monócitos iniciam sua diferenciação para macrófagos e há liberação de glutamato, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e prostanoídes (Leskovar *et al.*, 2000; Schwab *et al.*, 2000).

Depois da primeira semana após a lesão medular inicial, ocorre uma redução do número de macrófagos no tecido afetado, porém a ativação de microglia persiste por semanas (Donnelly e Popovich, 2008). O resultado final dos eventos da fase aguda é a morte celular por apoptose e a desmielinização (Keane *et al.*, 2001; Beattie *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2009).

Entre os primeiros dois dias e duas semanas da lesão medular traumática os astrócitos tornam-se hipertróficos e proliferativos, e inicia-se a formação da chamada “cicatriz glial”, a qual constitui uma barreira física e química efetiva para a regeneração da medula espinhal (Reier e Houle, 1988; Fawcett e Asher, 1999; Hagg e Oudega, 2006; Rowland *et al.*, 2008; Karimi-Abdolrezaee *et al.*, 2010; Karimi-Abdolrezaee *et al.*, 2012; Young, 2014).

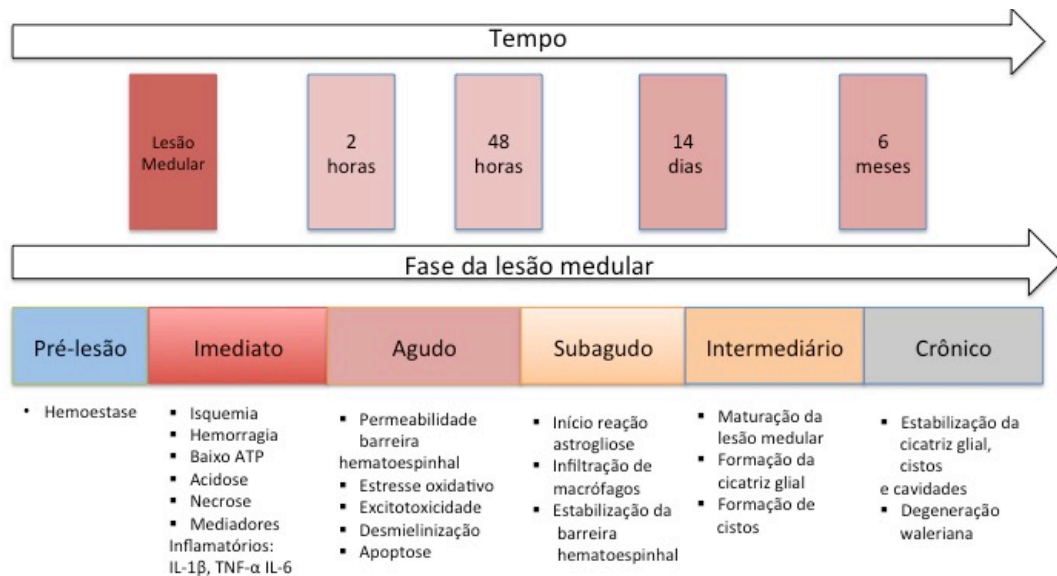
#### ▪ **Fase intermediária**

A fase intermediária inicia entre a segunda e terceira semanas após o trauma e tem duração aproximada de 6 meses. Durante esse momento, a reação de gliose continua até a cicatriz glial se formar por completo (Siddiqui *et al.*, 2015). A cicatrização glial é um fator crucial na recuperação de lesões no SNC, pois a eliminação do contingente de astrócitos reativos leva ao aumento do tamanho da lesão e a uma perda exagerada de macromoléculas através da barreira hematoencefálica, que se encontra comprometida (Faulkner *et al.*, 2004; Myer *et al.*, 2006). Por conta disso, as falhas na regeneração axonal devem-se à produção de moléculas inibitórias pelos astrócitos a partir da cicatriz glial (Fitch e Silver, 2008). A contribuição dos astrócitos à ausência de regeneração no SNC deve-se especialmente a: (1) falha em proporcionar um substrato celular apropriado para o crescimento axonal; (2) ausência de fatores apropriados que suportem o crescimento axonal e (3) produção de moléculas que inibem o alongamento axonal, como os proteoglicanos (Jones, Margolis, *et al.*, 2003; Jones, Sajed, *et al.*, 2003). Além dos astrócitos, a mielina do SNC também produz a glicoproteína associada à mielina (MAG), a Nogo-A e a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (Omgp), substâncias capazes de inibir o crescimento de axônios, pois estão localizadas na porção interna da bainha de mielina, fazendo contato direto com os axônios (Wang *et al.*, 2002; Schweigreiter e Bandtlow, 2006; Fitch e Silver, 2008).

#### ▪ **Fase crônica**

Uma lesão medular é considerada crônica a partir do sexto mês do trauma inicial. Nesta fase a cicatriz glial e os cistos/cavidades na medula espinhal já estão desenvolvidos e estabelecidos. Os cistos são resultado dos restos de tecido neural e representam uma barreira física que impede a regeneração axonal. Nesse momento a degeneração walleriana (retração axonal) continua e pode levar anos até que os

corpos celulares e os restos de axônios degenerados sejam totalmente removidos do sítio da lesão (Basso *et al.*, 1996; Beattie *et al.*, 2002; Ehlers, 2004; Norenberg *et al.*, 2004; Fleming *et al.*, 2006; Kramer *et al.*, 2013).



**Figura 1. Eventos fisiopatológicos após a lesão medular traumática.** Os eventos estão divididos em fase imediata (2 horas), aguda (2 a 48 horas), subaguda (48 horas a 14 dias), intermediária (14 dias a 6 meses) e crônica (a partir de 6 meses). (Adaptado de Siddiqui et al, 2015.)

## 1.4 Intervenção clínica

Antigamente quando ocorria um trauma na medula o paciente era apenas imobilizado no hospital até poder receber alta. No entanto, desde então os avanços da medicina melhoraram significativamente o tratamento dos pacientes com lesão medular e resultaram em uma melhora na qualidade de vida.

Assim, quando ocorre o trauma na medula espinal, a avaliação e cuidado iniciam no local onde ocorre o trauma. A fase inicial do atendimento é crítica e primordial para o resultado final. (Van Der Velden *et al.*, 2008). A adesão aos protocolos do ATLS (*Advanced Trauma Life Support*) é importante para otimizar o resultado do atendimento dos pacientes traumatizados, porém desvios destes protocolos costumam ocorrer (Schmidt *et al.*, 2009).

A intervenção clínica atual se restringe, essencialmente, à estabilização da coluna vertebral, restauração do alinhamento, descompressão da medula espinal e no uso de doses elevadas de fármacos da classe dos glicocorticóides, tais como metilprednisolona, administrados até oito horas após o trauma (Thuret *et al.*, 2006; Abul-Kasim *et al.*, 2010). A metilprednisolona tem a capacidade de atenuar a resposta neuroinflamatória que se instala imediatamente após a lesão, reduzir a peroxidação lipídica e preservar a integridade das estruturas neuronais. Porém, alguns estudos clínicos questionam a eficácia do tratamento com o corticóide, intensificando desta forma, a busca por abordagens terapêuticas mais eficazes (Hall e Springer, 2004; Wilson e Fehlings, 2011; Fehlings *et al.*, 2014). Há, ainda, abordagens que buscam restituir ou substituir funções perdidas por meio de transplantes celulares variados (Giszter, 2008; Vawda e Fehlings, 2013).

No entanto, os avanços no entendimento da fisiopatologia do trauma raquimedular têm conduzido a diversos estudos clínicos de fase I e II nas últimas décadas, entre eles, estuda-se a eficácia do tratamento com metilprednisolona, aminoesteróides (mesilato de tirilazade; antioxidante desenvolvido para prevenir a peroxidação lipídica sem ativar receptores glicocorticóides), gangliosídeo GM1 (Sygen), hormônio liberador de tireotropina, gaciclidina (GK-11, um antagonista de receptores NMDA), naloxona (antagonista de receptores opióide), nimodipina (bloqueador de canais de cálcio do tipo L). Entretanto, estes estudos clínicos não obtiveram resultados significativos em relação à melhora da lesão medular. Vários outros estudos básicos e clínicos estão



explorando intervenções tais como a descompressão cirúrgica precoce, aplicação de estimulação elétrica de campo, estratégias de neuroproteção como riluzole e minociclina, inativação de inibição de mielina, bloqueio da expressão/atividade de Nogo e Rho, e o transplante de vários substratos celulares na medula espinhal lesada (Giszter, 2008; Hawryluk *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014). Neste sentido, as pesquisas dedicadas à lesão medular traumática têm se voltado a estratégias que visam o controle da excitotoxicidade e da inflamação, a inibição de apoptose celular, o reparo da desmielinização, a regeneração axonal e restauração da sua condutibilidade e conectividade, a minimização das disfunções autonômicas, além da restauração de coordenação motora ou o alívio de comorbidades que afetam os lesados medulares (Thuret *et al.*, 2006; Samadikuchaksaraei, 2007).

## 1.5 Dor

A dor é considerada um mistério pelos pacientes leigos que não compreendem sua origem e sua razão, uma vez que há dores sem causas definidas. O Instituto de Medicina do Comitê de Pesquisa de Dor (Dzau e Pizzo, 2014) estima que, apenas nos Estados Unidos, 100 milhões de indivíduos são afetados por dores crônicas e a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2014) avalia que uma média de 30% da população mundial é acometida por dores crônicas ao longo de suas vidas. No Brasil, os dados são escassos.

A capacidade de sentir dor e, assim, detectar estímulos nocivos, no entanto, tem um papel fisiológico essencial ao constituir um sinal de alerta contra ameaças à integridade física do organismo. Dessa forma, quando transitória, a dor pode ser considerada um sintoma clínico importante de prevenção e limitação de danos. Porém, quando esta condição passa a ser persistente, a dor deixa de desempenhar sua função primária, passando a ser crônica e debilitante (Hunt e Mantyh, 2001; Julius e Basbaum, 2001; Basbaum *et al.*, 2009).

Segundo a IASP, a dor é “*uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão*”, sendo sempre subjetiva, ou seja, a doença muda a pessoa, sendo que o paciente interpreta a dor dentro do seu contexto de vida social, pessoal e cultural (Loeser e Treede, 2008). Os romanos já diziam *Dolor dictat*, ou seja, “*a dor domina e comanda*”.

A transmissão da sensação dolorosa envolve a ativação de receptores presentes nas terminações nervosas livres de fibras aferentes primárias, os nociceptores, que repassam a informação dolorosa proveniente de estímulos térmicos, químicos, de pressão ou traumas a neurônios do SNC (Basbaum *et al.*, 2009; Woolf, 2010). Por outro lado, o processamento da dor pelo sistema nervoso central depende, também, de um componente emocional do paciente o qual agrega componentes afetivo-emocionais à sensação dolorosa. Assim, os mecanismos envolvidos na transmissão da dor e a subjetividade da percepção individual da intensidade do estímulo doloroso dificultam a compreensão e o tratamento clínico da dor (Russo e Brose, 1998; Loeser e Melzack, 1999; Basbaum e Jessel, 2000; Julius e Basbaum, 2001).

A dor é o resultado da ativação periférica de terminações nervosas livres, as quais estão associadas às fibras aferentes primárias. Assim, na pele, nos músculos e órgãos há uma ampla distribuição do sistema sensorial especializado, o qual transmite a informação nociceptiva da periferia para neurônios de segunda ordem do corno dorsal da medula espinhal através da liberação de neurotransmissores. Em seguida, a informação nociceptiva é transmitida para áreas supra-espinhais, tais como tálamo e córtex cerebral (Julius e Basbaum, 2001; Almeida *et al.*, 2004; Basbaum *et al.*, 2009; Bingham *et al.*, 2009; Ossipov *et al.*, 2010).

Os neurônios sensoriais periféricos, que são classificados de acordo com a estrutura da fibra, diâmetro e velocidade de condução, são responsáveis pela propagação dos impulsos gerados nas terminações nervosas. As fibras sensoriais são divididas em A e C. Sendo que as fibras do tipo A são mielinizadas e subdivididas em  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . As fibras do tipo A $\alpha$  e A $\beta$  apresentam grande diâmetro axonal, alta velocidade de condução (30 a 100 m/s), sendo normalmente responsáveis pela transmissão das informações proprioceptivas, como toque leve e pressão, ou seja, conduzem as informações fisiológicas táteis. Diferentemente, a informação nociceptiva é transmitida através da ativação de fibras A $\delta$  e C. As fibras A $\delta$  possuem diâmetro médio, fina bainha de mielina e média velocidade de condução do estímulo nociceptivo, entre 5 e 30 m/s. Essas fibras respondem a estímulos mecânicos intensos, entre outros. As fibras A $\gamma$  são fibras eferetes e intrafusais e possuem velocidade de condução do estímulo entre 15 e 40 m/s. Por outro lado, as fibras C são de pequeno diâmetro, amielinizadas e de baixa velocidade de condução do impulso nervoso, aproximadamente 0,5 a 2 m/s. A estimulação de fibras A $\delta$  promove

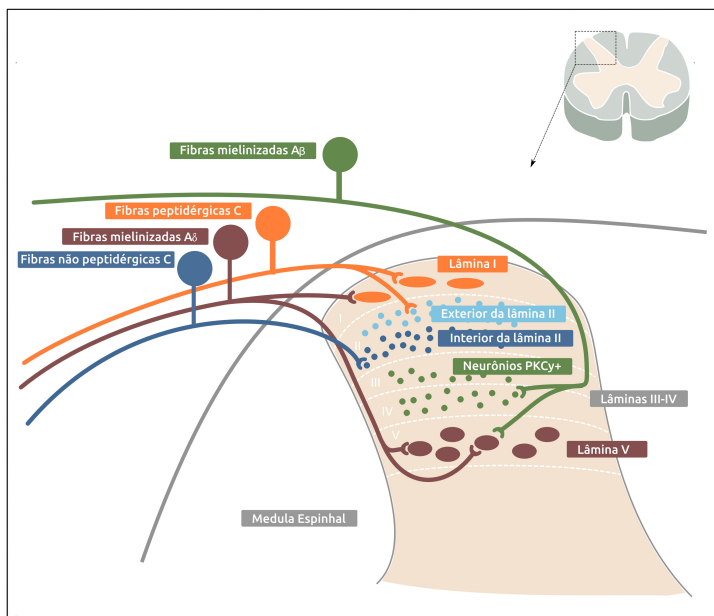
resposta rápida, resultando em dor aguda, ou dor primária, que frequentemente desencadeia o reflexo de retirada, enquanto que a ativação de fibras C leva a uma resposta duradoura, responsável por dor difusa, geralmente secundária à dor aguda (Julius e Basbaum, 2001; Almeida *et al.*, 2004; Costigan *et al.*, 2009; Smith e Lewin, 2009; Dubin e Patapoutian, 2010; Haggard *et al.*, 2013; Cohen e Mao, 2014; Prescott *et al.*, 2014).

As fibras do tipo C são denominadas fibras polimodais, ou seja, a maioria delas responde a estímulos nocivos de natureza diversa – mecânicos, químicos ou térmicos. Essas fibras possuem receptores que são ativados por estímulos térmicos, mecanorreceptores de baixo limiar e receptores específicos para substâncias algogênicas, bradicinina (BK), serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina), prostaglandinas (PGs), proteases e histamina, entre outras (Julius e Basbaum, 2001; Almeida *et al.*, 2004; Basbaum *et al.*, 2009; Cohen e Mao, 2014).

Os corpos celulares das fibras aferentes primárias encontram-se localizados nos gânglios trigeminais (nervos cranianos) e gânglios da raiz dorsal (nervos espinhais). Estes neurônios são denominados pseudo-unipolares, pois seus axônios se bifurcam, tendo um ramo que se projeta para a região periférica, o ramo distal, e outro que se estende para a medula espinhal e tronco encefálico, o ramo proximal. Todos os neurônios aferentes primários convergem e efetuam sinapses excitatórias com neurônios noceptivos de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal e no corno dorsal trigeminal bulbar. No entanto, os aferentes nociceptivos projetados no corno dorsal da medula espinhal são provenientes do tronco e dos membros enquanto os que se projetam para o corno dorsal bulbar são provenientes da região da cabeça (Kandel, 2013).

Como o foco desta tese é a medula espinhal, será abordado aqui somente o que ocorre com o processamento da informação nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal. O corno da medula espinhal é dividido em camadas distintas, chamadas de lâminas de Rexed, sendo que os neurônios nociceptivos de segunda ordem encontram-se nas lâminas I, II, V, VI e X. A lâmina I possui uma elevada proporção de neurônios nociceptivos específicos. A lâmina II, denominada de substâncias gelatinosa, possui muitos interneurônios excitatórios e inibitórios responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva. As fibras A $\delta$  tem suas projeções proximais (centrais) nas lâminas I e V do corno da raiz dorsal, enquanto as fibras A $\beta$  que respondem a estímulos táteis não-nocivos se projetam profundamente nas lâminas III, IV e V.

Por outro lado, as projeções centrais das fibras C encontram-se mais superficialmente, nas lâminas I e II (Basbaum *et al.*, 2009) (Figura 2).



**Figura 2.** Figura representativa do corno dorsal da medula espinal, região em que ocorre a primeira sinapse nociceptiva. As fibras nociceptivas Aδ penetram nas lâminas I e V, enquanto as fibras C penetram mais superficialmente nas lâminas I e II apenas. (Adaptado de Basbaum, 2009)

Há muitas maneiras de classificar a dor. Com relação à duração da dor, elas podem ser classificadas em 3 categorias: a transitória, aguda e crônica. Na primeira, a ativação dos nociceptores acontece na ausência de qualquer dano tecidual, provavelmente com a função de proteger o organismo de lesões físicas pelo ambiente ou estresse dos tecidos. A dor aguda frequentemente tem causa definida e curso temporal delimitado, desaparecendo, na maioria das vezes, quando o estímulo nocivo é removido ou o reparo tecidual ocorre. Entretanto, a dor crônica é uma doença *per se*, uma vez que não é classificada como tal pela sua duração, mas sim pela incapacidade do organismo de restaurar seu funcionamento normal (Skott, 2003; Costigan *et al.*, 2009).

Ademais, a dor aguda e crônica estão, geralmente, associadas a

processos inflamatórios, como resultado da lesão tecidual, lesão nervosa ou reatividade imune atípica (Stein *et al.*, 2003). Durante o processo inflamatório ocorre uma sensibilização dos nociceptores pela liberação de mediadores químicos ou ativação do sistema imune em resposta à lesão tecidual (Basbaum *et al.*, 2009). Este processo de sensibilização dos nociceptores é caracterizada pela diminuição do limiar de excitabilidade necessário para ativá-los, pelo aumento da atividade espontânea da célula nervosa e pelo aumento na frequência de disparo em resposta a estímulos supralimiáres (Costigan *et al.*, 2009). O processo de sensibilização não ocorre somente nas terminações periféricas, mas pode afetar toda a via da transmissão do sinal doloroso. Assim, surgem como consequências do processo de sensibilização a hiperalgesia, que consiste em resposta exacerbada a estímulos dolorosos, e alodinia, na qual se observa o surgimento da dor em resposta a um estímulo normalmente inócuo (Loeser e Treede, 2008).

No contexto desta tese, é importante ressaltar que os lesados medulares são afetados por diversas comorbidades, dentre as quais, a dor crônica resulta em baixa qualidade de vida e alto grau de desconforto aos pacientes, além de provocar alterações emocionais e dificultar a socialização e a vida diária. Apesar de parecer contraditória a relação *cadeirante-dor*, a prevalência da dor no lesado medular é em torno de 69%, sendo que em um terço dessas pessoas a dor é caracterizada como severa (Siddall e Finnerup, 2006)

Há diversas classificações para os diferentes tipos de dores que acometem os lesados medulares, o que resulta em uma difícil padronização entre os profissionais que atendem o paciente. Siddall e colaboradores (2002) definiram três regiões de dor decorrentes da lesão medular: 1) dor acima do nível da lesão; 2) dor na região da lesão – ocorre próximo da região lesada, desenvolvendo logo após a lesão, na qual a dor é aguda ou independente de estímulo e acompanhada por alodinia; e 3) dor abaixo do nível da lesão, que se desenvolve mais lentamente e é descrita como uma dor constante em queimação e independente de estímulo

A IASP, também, qualifica a dor após a lesão medular da seguinte forma:



**Quadro 1.** Tipos de dores após a lesão medular. (Adaptado de (IASP, 2002)

<b>Tipo</b>	<b>Sistema</b>	<b>Origem</b>
<b>Nociceptiva</b>	Músculo-esquelético	Ossos, articulações, trauma muscular ou inflamação; instabilidade mecânica; espasmos musculares.
	Visceral	Cálculos renais, disfunções esfinterianas, intestino e cefaleia disreflexa.
<b>Neuropática</b>	Acima do nível	Localizada em regiões de sensibilidade preservada
	Ao nível	Localizada em faixa no nível da lesão.
	Abaixo do nível	Localizada difusamente abaixo do nível da lesão.

Desse modo, a dor após a lesão medular pode levar a prejuízos drásticos na rotina diária e qualidade de vida dos pacientes em graus até maiores do que a perda de atividade motora, sendo refratária aos tratamentos clínicos. A dor neuropática é a que mais afeta os lesados medulares como será discutido no item a seguir.

## 1.7 Dor neuropática

A dor neuropática, dentre todos os tipos de dores, é a que mais afeta os lesados medulares. De acordo com a IASP (2014), a dor neuropática é definida como “*uma dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção do sistema nervoso somatossensorial*”, sendo normalmente manifestada por dor intensa e persistente, podendo ser espontânea, associada a sensações de queimação e alfinetadas, hiperalgesia e/ou alodinia.

O surgimento da lesão nervosa pode ocorrer devido a um trauma mecânico, doenças metabólicas (diabetes), uso crônico de medicamentos neurotóxicos (quimioterápicos), infecções (AIDS) ou até mesmo invasão tumoral (Devor, 2006; Costigan *et al.*, 2009; Cohen e Mao, 2014).

A dor neuropática resulta em uma neuroplasticidade central e periférica que inclui alterações na expressão e função dos canais de sódio, aumento do influxo celular de cálcio, alteração das respostas ao glutamato, reestruturação organizacional celular, entre outros fatores que serão discutidos a seguir (Devor, 2006; Basbaum *et al.*, 2009; Costigan *et al.*, 2009; Woolf, 2010; Cohen e Mao, 2014).

Todo o processo neuroplástico associado à neuropatia gera atividade ectópica neuronal e hiperexcitabilidade dos neurônios de segunda ordem no corno da raiz dorsal para a transmissão sensorial e, conseqüentemente, ocorre o aumento da percepção dolorosa por estruturas supra-espinhais como o tálamo, uma vez que há um desequilíbrio da atividade das vias ascendentes e descendentes (inibitórias) da dor (Basbaum *et al.*, 2009; Costigan *et al.*, 2009).

Um dos fatores responsáveis pela alodinia mecânica desenvolvida após lesões centrais é a reorganização dos circuitos neurais. As fibras aferentes primárias do tipo A $\beta$ , que respondem a estímulos não nocivos e normalmente tem suas projeções na lâmina III do corno dorsal da medula espinhal, iniciam um processo de “brotamento” para as lâminas mais superficiais da medula em resposta à



lesão medular, ocupando os espaços das fibras C. Assim, essas fibras nociceptivas iniciam sinapses com neurônios de segunda ordem que passam a responder a estímulos inócuos como nocivos que normalmente não são (Basbaum *et al.*, 2009; Costigan *et al.*, 2009; Cohen e Mao, 2014).

Por outro lado, a geração de potenciais de ação ectópicos após a lesão pode ser gerada pela alteração na expressão de canais de potássio, cálcio e de sódio (Waxman *et al.*, 1999; Liu e Wood, 2011). A expressão dos canais de sódio em fibras C é alterada após axotomia ou lesão de nervos (Quasthoff *et al.*, 1995; Woolf, 2004; Sheets *et al.*, 2008). Assim, essa alteração contribui para a sensibilização de neurônios periféricos e centrais que colaboram para a dor espontânea (Costigan *et al.*, 2009; Cohen e Mao, 2014).

Uma das características marcantes da dor neuropática é a sensibilização central, descrita primeiramente por Woolf, em 1983, a qual é caracterizada pelo estado de hiperexcitabilidade que se estabelece no SNC e que resulta no processamento acentuado das respostas nociceptivas. A sensibilização central é mantida em razão da liberação de inúmeros neurotransmissores no corno dorsal da medula espinhal, tais como glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), os quais se ligam aos seus respectivos receptores no corno dorsal da medula espinhal e causam a ativação de cascatas de sinalização intracelulares, incluindo a ativação da proteína quinase C, proteínas quinases ativadas por mitógenos, fatores de transcrição, que irão contribuir para a manutenção do quadro de excitabilidade neuronal (Latremoliere e Woolf, 2009; Woolf, 2010). Ademais, há liberação de mediadores a partir células inflamatórias infiltrantes, tais como macrófagos, mastócitos e neutrófilos, que migram para o local da lesão (Gold e Gebhart, 2010; Ren e Dubner, 2010). Estes mediadores se ligam a receptores específicos presentes nos neurônios sensoriais resultando na sensibilização dessas fibras e ocasionando aumento na sua responsividade a estímulos mecânicos e térmicos no local da lesão (Gao e Ji, 2008; Kiguchi *et al.*, 2009; Gold e Gebhart, 2010).

Uma importante fonte de citocinas inflamatórias são as células gliais. Nesse aspecto, tem sido demonstrado que a microglia contribui para o desenvolvimento da dor neuropática, enquanto que os astrócitos são mais importantes para a manutenção desta condição (Raghavendra *et al.*, 2003; Cunha e Dias, 2009). A lesão de nervos periféricos leva à ativação da microglia e esta precede a ativação dos astrócitos (Colburn e Deleo, 1999; Cunha e Dias, 2009; O'callaghan e Miller, 2010).

Ocorre, além disso, uma redução da resposta inibitória endógena da nociceção. Lesões de nervos periféricos e centrais induzem apoptose de interneurônios inibitórios do corno dorsal da medula espinhal, que liberam o neurotransmissor inibitório GABA (ácido  $\gamma$ -amino butírico) (Baba *et al.*, 2003; Schomberg *et al.*, 2012). Ainda, há uma redução de expressão dos receptores opióides (em especial receptores  $\mu$ ) presentes nas terminações de fibras aferentes primárias e um aumento da expressão de colecistocinina e dinorfina, resultando em uma redução da eficácia do sistema opióide no corno medular dorsal (Vanderah *et al.*, 2000; Kohno *et al.*, 2005).

Algumas dessas mudanças podem ocorrer na fase inicial após a lesão no sistema nervoso central, quanto numa fase mais tardia e, juntamente com outras alterações resultam na manutenção da dor.

Na lesão medular, foco desta tese, cerca de 40-50% das pessoas apresentam dor neuropática nos primeiros doze meses depois do trauma. Atualmente há diversas escalas para o diagnóstico clínico e caracterização da dor neuropática do lesado medular. No entanto, há alguns critérios comuns que devem ser considerados, sendo eles (Finnerup, 2013):

1. Dor dentre os primeiros 12 meses após a lesão medular traumática;
2. Dor sem relação com movimento, inflamação ou qualquer lesão tecidual;
3. Relato de, ao menos, um entre os seguintes sintomas de dor: queimação, formigamento, pinçamento, espasmos, congelamento, cócegas;
4. Alodinia ou hiperalgesia na área da dor.

Além disso, lesados medulares geralmente apresentam parestesia e/ou disestesia na região da lesão medular ou abaixo, que constitui uma sensação cutânea anormal na ausência de estímulos nocivos ou alteração da sensibilidade ao tato, respectivamente. Finnerup (2013) ainda classifica a dor neuropática nos lesados medulares em 5 tipos:

1. Difusa no nível ou abaixo da lesão como “queimação e aperto”;
2. Difusa no nível ou abaixo como “persistente” ou somente uma dor pontual no nível da lesão;
3. Uma pressão e aperto na região da lesão;
4. No nível ou abaixo da lesão evocada por toque suave ou

- frio;
5. No nível da lesão como “raios” e/ou espasmos, geralmente descrita nas lesões da cauda equina.

Nesse contexto é importante ressaltar que a dor neuropática transforma a vida do lesado medular e a de seus familiares uma vez que gera tanto estresse físico quanto emocional e, muitas vezes, causa incapacidade de trabalhar, gerando ônus financeiro.

### **1.8 Tratamento das dores neuropáticas**

A descrição da fisiopatologia e da dor resultante do trauma medular feita acima nos leva a um ponto crucial – seu tratamento. Tchekhov já dizia que “Se para alguma doença se propõem muitos remédios diferentes, isso significa que a doença é incurável” (Tchekhov, 1904). Infelizmente, o tratamento da dor neuropática insere-se nessa categoria.

Atualmente, anticonvulsivantes e antidepressivos ainda representam as classes de fármacos mais utilizadas no tratamento das dores neuropáticas. Esses fármacos, no entanto, promovem uma variedade muito grande de efeitos adversos, os quais limitam a sua prescrição e adesão do paciente ao tratamento (McCleane, 2004; Vranken, 2009). Tanto os anticonvulsivantes quanto os antidepressivos tricíclicos são também usados para tratar condições psiquiátricas, o que auxilia no humor do paciente com dor neuropática e minimiza a percepção à dor. Ademais, apesar do seu caráter crônico e muitas vezes inflamatório, as dores neuropáticas envolvem mecanismos específicos, como descrito anteriormente e, portanto, são pouco sensíveis aos antiinflamatórios não-esteroidais e aos opióides, fármacos de escolha para o tratamento de dores inflamatórias e dores crônicas de maior intensidade, respectivamente.

Outra classe farmacológica bastante utilizada são os anticonvulsivantes. O efeito analgésico dos anticonvulsivantes foi descrito pela primeira vez em 1942, a partir da observação de que a fenitoína era capaz de reduzir a dor em pacientes com neuralgia do trigêmeo (Bergouignan, 1970). A gabapentina tem sido o anticonvulsivante mais utilizado para a dor neuropática de pacientes com lesão medular nas últimas décadas. A gabapentina foi desenvolvida como um análogo do GABA, no entanto estudos demonstram que ela não interage com nenhum dos receptores gabaérgicos, nem com os

transportadores de alta afinidade para o GABA (Schwab *et al.*, 2000; Marais *et al.*, 2001; Cheng e Chiou, 2006; Vranken, 2009). O efeito analgésico da gabapentina deve-se a sua ligação de alta afinidade às subunidades  $\alpha_2$  de canais de cálcio, as quais têm sua expressão aumentada no GRD e na medula espinhal após lesão neuropática, o que resulta no bloqueio desses canais e na redução da neurotransmissão excitatória no sistema nervoso central (Cheng e Chiou, 2006; Sills, 2006).

Atualmente, entretanto, a droga de escolha para o tratamento de dor neuropática após lesão medular é a pregabalina, que tem um mecanismo de ação similar ao da gabapentina, porém com resultados muito mais satisfatórios na condição dos pacientes (Siddall *et al.*, 2006; Tzellos *et al.*, 2008; Vranken *et al.*, 2008).

Apesar dos antidepressivos tricíclicos clássicos como amitriptilina, imipramina e clomipramina, terem demonstrado sua eficácia no tratamento de dores neuropáticas originárias de diferentes patologias, os dados na lesão medular, no entanto, são controversos. Esses fármacos foram primeiramente sintetizados na década de 40 e usados exclusivamente para depressão. No entanto, ao longo dos anos, demonstrou-se suas propriedades analgésicas em pacientes com dor crônica. Os efeitos dos tricíclicos na dor ocorrem através da dessensibilização dos receptores dopaminérgicos do tipo D2, enquanto os antidepressivos tricíclicos clássicos causam, também, uma inibição balanceada da recaptação de serotonina e noradrenalina e atuam bloqueando canais de cálcio e de sódio (McCleane, 2008).

É importante ressaltar que o tratamento da dor após a lesão medular requer uma abordagem multiprofissional e abrangente, a fim de apresentar maior eficácia. Atualmente, tem sido empregadas técnicas de neuroestimulação, terapias cognitivas comportamentais e medicamentos para tentar reduzir o processo doloroso do lesado medular.

A busca por tratamentos mais eficazes das dores neuropáticas que afligem pacientes com patologias diversas, tem sido constante e interminável. Neste contexto, um dos sistemas alvo que tem merecido atenção são as endotelinas, uma vez que podem estar implicadas em processos dolorosos.

## 1.9 Endotelinas na dor

As endotelinas foram descobertas por Yanagisawa e colaboradores (1988) e Inoue e colaboradores (1989) e são peptídeos que produzem diversos efeitos em diferentes tecidos e sistemas. A família das endotelinas é composta por 3 peptídeos: endotelina-1 (ET-1), a ET-2 e a ET-3. Todas elas são constituídas por 21 aminoácidos e apresentam duas pontes dissulfeto unindo pares de cisteínas. Embora as células endoteliais vasculares sejam consideradas a principal fonte de ET-1, os genes que codificam os três peptídeos são expressos por um grande número de células, incluindo miócitos cardíacos, células renais, gliais, intestinais, células da musculatura lisa vascular, além macrófagos e mastócitos (Kedzierski e Yanagisawa, 2001; Davenport e Maguire, 2006).

A síntese da ET-1 ocorre a partir de um polipeptídeo com aproximadamente 212 aminoácidos denominado pré-pro-ET-1, o qual é clivado por convertases ou peptidases, para originar a big-ET-1, um peptídeo que pode conter de 37 a 38 aminoácidos, dependendo da espécie. O segundo passo para a síntese da ET-1 é a clivagem da big-ET-1 por endopeptidases específicas, denominadas enzimas conversoras de endotelina (ECE) (Nussdorfer *et al.*, 1999; Hans *et al.*, 2009). Da mesma maneira, a síntese de ET-2 e ET-3 ocorre a partir de polipeptídeos denominados pré-pro-ET-2 e pré-pro-ET-3, os quais são clivados por convertases ou peptidases em big-ET-2 e big-ET-3, que sofrem então a ação da ECE, dando origem a ET-2 e ET-3, respectivamente (Nussdorfer *et al.*, 1999; Hans *et al.*, 2009).

As ações das endotelinas são mediadas através de dois receptores específicos, denominados ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, os quais pertencem à família de receptores acoplados a proteínas G diferentes. Os receptores ET<sub>A</sub> se acoplam principalmente a G<sub>q/11</sub> e G<sub>q12/13</sub>, enquanto os ET<sub>B</sub> em G<sub>i/o</sub> e G<sub>q/11</sub> (Rashid *et al.*, 2004). O receptor ET<sub>A</sub> apresenta uma afinidade maior (70-100 vezes) pelas isoformas ET-1 e ET-2 do que pela ET-3, enquanto o receptor ET<sub>B</sub> exibe afinidade semelhante pelas três isoformas (Arai *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1990). Ambos os receptores podem ativar múltiplas vias intracelulares de transdução de sinal (Sokolovsky, 1995). Ademais, ambos os receptores foram devidamente clonados, o ET<sub>A</sub> por Arai e colaboradores (1990) e o ET<sub>B</sub> por Sakurai e colaboradores (1990)

Receptores ET<sub>A</sub> são bloqueados seletivamente por antagonistas peptídicos, como o BQ-123, ou não peptídicos, como o atrasentan, entre

outros. Já os receptores ET<sub>B</sub> são ativados seletivamente por agonistas como a sarafotoxina S6c, a [Ala<sup>1,3,11,15</sup>] ET-1, o BQ-3020 e o IRL 1620, e seletivamente bloqueados por antagonistas peptídicos, como o BQ-788, ou não peptídicos, como o A-192621, entre outros (Masaki *et al.*, 1994; Webb e Meek, 1997). A meia vida da ET-1 no plasma é de aproximadamente 1 minuto e meio. Uma vez que ocorre a ligação da ET-1 aos seus receptores, a qual é considerada praticamente irreversível, ambos são rapidamente internalizados. Os receptores ET<sub>A</sub> são reciclados e retornam à superfície da membrana, os receptores ET<sub>B</sub> são encaminhados para os lisossomos, onde são degradados. A rápida reciclagem dos receptores ET<sub>A</sub> contribui para sua capacidade de induzir respostas contráteis de longa duração em vasos sanguíneos, enquanto que a degradação dos receptores ET<sub>B</sub> é importante para a depuração da ET-1 circulante desempenhada por este receptor (Fukuroda *et al.*, 1994; Bremnes *et al.*, 2000).

Embora as endotelinas estejam relacionadas ao controle fisiológico de algumas funções, sua maior relevância parece ser no desenvolvimento de diversos processos fisiopatológicos, por exemplo hipertensão, câncer, inflamação e dor (Remuzzi *et al.*, 2002; Herrmann *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2013). Atualmente, antagonistas duais de receptores ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> ou seletivos de receptores ET<sub>A</sub> para endotelinas estão aprovados para uso clínico no tratamento de hipertensão pulmonar e de ulcerações digitais em pacientes com Síndrome de Raynaud primária ou decorrente de esclerose múltipla. Nestes últimos, o tratamento reduz o surgimento de novas lesões e reduz a dor associada à condição (Steen *et al.*, 2009; Ichimura *et al.*, 2011; O'callaghan *et al.*, 2011).

A participação das endotelinas em processos de dor tem sido relatada em diversos estudos (para revisão ver (Hans *et al.*, 2009; Khodorova *et al.*, 2009; Barr *et al.*, 2011). Assim, Ferreira e colaboradores (1989) descreveram pela primeira vez o efeito nociceptivo das endotelinas demonstrando que a administração de ET-1 induzia contorções abdominais em camundongos, hiperalgesia mecânica em ratos, incapacitação articular em cães, e sensação de prurido e hipernocicepção mecânica cutânea em humanos. Hosoda e colaboradores (1994) produziram os primeiros camundongos nocaute para receptores ET<sub>B</sub>, e foi demonstrada a participação dos receptores ET<sub>B</sub> em respostas nociceptivas de dor visceral induzidas por fenilbenzoquinona (Griswold *et al.*, 1999).

Baamonde e colaboradores (2004) demonstraram que ambos os

receptores, ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, mediavam a resposta hipernociceptiva mecânica induzida por carragenina ou por complexo adjuvante de Freund (CFA), entretanto apenas os receptores ET<sub>A</sub> eram envolvidos com a hiperalgesia térmica. Os receptores ET<sub>A</sub> estão distribuídos tanto em neurônios e células da glia quanto em células vasculares - células musculares lisas e endoteliais (Vigne *et al.*, 1993; Stanimirovic *et al.*, 1994; De Oliveira *et al.*, 1995; Lysko *et al.*, 1995). Além disso, os receptores ET<sub>A</sub> tem sido encontrados em nociceptores de pequeno a grande calibres, enquanto os receptores ET<sub>B</sub> tem sido encontrados tanto no GRD, em células satélites gliais quanto em células de Schwann que revestem neurônios mielinizados, no entanto não são encontrados nos neurônios propriamente (Pomonis *et al.*, 2001; Berti-Mattera *et al.*, 2006; Chichorro *et al.*, 2010). Importante ressaltar que a razão de receptores ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> no GRD é de 60:40 (Plant *et al.*, 2007).

Ainda, RNAm de ET-1 foi encontrado nas lâminas IV-VI da medula espinhal e em diversas regiões do cérebro relacionadas à transmissão da informação dolorosa, como por exemplo no estriado, amígdala, hipocampo, hipotálamo, núcleo da rafe, locus coeruleus, cortex cerebral, tegmento pontino e formação reticular lateral. Ademais, a expressão de ET-1 foi demonstrada nas lâminas I-V da medula espinhal e a expressão dos receptores ET<sub>A</sub> no hipotálamo, formação reticular, tegmento pontino, *locus coeruleus* e substância negra (Yoshizawa *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1990; Giaid *et al.*, 1991; Kurokawa *et al.*, 1997; Yamada e Kurokawa, 1998).

O mecanismo pelo qual a ET-1 promove respostas nociceptivas inclui um aumento da ativação de canais de sódio dependents de voltagem e resistentes a tetrodotoxina, induzida através de receptores ET<sub>A</sub> (Zhou *et al.*, 2002). A ET-1, através dos receptores ET<sub>A</sub>, causou aumento na concentração intracelular de cálcio em neurônios sensoriais, possibilitando suas ações nociceptivas. Por outro lado, através da ativação de receptores ET<sub>B</sub>, a ET-1 induziu aumento dos níveis de AMPc e ativação de proteína quinase C, e estes mecanismos parecem estar envolvidos na hipernociceção mecânica induzida por este peptídeo em ratos (Da Cunha *et al.*, 2004). Em cultura de neurônios do GRD de camundongos também foi demonstrada a participação de proteínas quinases C no efeito potencializador da ET-1 sobre as correntes evocadas pela capsaicina (Yamamoto *et al.*, 2006). Por outro lado, altas doses de ET-1 parecem estar relacionadas a efeitos anti-nociceptivos e anti-hiperalgésicos, via ativação de receptores ET<sub>B</sub> em ratos e camundongos (Piovezan *et al.*, 2000; Khodorova *et al.*, 2002). O

efeito modulatório resultante da ativação de receptores ET<sub>B</sub> sobre respostas nociceptivas é atribuído a um mecanismo dependente de opióides, o qual envolve a liberação de beta-endorfina a partir de queratinócitos (Khodorova *et al.*, 2003).

No sistema nervoso central, no entanto, a administração, seja por via intratecal ou intracerebral, de ET-1 tem efeito antinociceptivo. Tem sido relatado um efeito analgésico central de ET-1 enquanto a injeção em *bolus* na periferia desenvolve hiperalgesia em modelos distintos de dor (Yamamoto *et al.*, 1994; Hasue *et al.*, 2004). No entanto, Tai e colaboradores (2013) demonstraram, através de um modelo de constrição do nervo ciático que injeções intratecais de BQ-123 foram capazes de aumentar o limiar nociceptivo dos animais, sugerindo que a ET-1 e os receptores ET<sub>A</sub> interagem normalmente para a sensibilização à dor neuropática, sendo que a ET-1 só exerce seus efeitos analgésicos quando há injeção em *bolus* no SNC, mas não em níveis fisiológicos em processo patológicos.

Além disso, demonstrou-se que a administração intratecal de ET-1 parece envolver a liberação de opióides endógenos, visto que seu efeito anti-nociceptivo é bloqueada por naloxona, no cérebro (Kamei *et al.*, 1993). Por outro lado, a administração de ET-1 na PAG de camundongos causou analgesia térmica mediada por ambos os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> e dependente da ativação de receptores NMDA (D'amico *et al.*, 1996; D'amico *et al.*, 1997). Já a administração intracerebroventricular de ET-1 também produz analgesia térmica dose-dependente mediada tanto por receptores ET<sub>A</sub> quanto por receptores adrenérgicos- $\alpha$ 1 (Hasue *et al.*, 2004). Esses achados, sugerem que a ação antinociceptiva de ET-1 no cérebro seja, de fato, mediada por ambos os receptores de endotelina, mas também por ativação de uma via noradrenérgica que ativa a sinalização inibitória na medula espinhal, através da liberação de opióides endógenos (Hasue *et al.*, 2004).

Assim, a participação das endotelinas em processos fisiopatológicos tem levado ao desenvolvimento de fármacos que possam ser usados na clínica para bloquear suas ações. O bosentan, antagonista dual de receptores ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> já está aprovado na clínica para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar. No entanto, os estudos relacionando dor neuropática após lesão medular traumática e endotelinas ainda são recentes e escassos.



## 1.10 Endotelinas na lesão medular

A primeira evidência da participação das endotelinas na degeneração da medula espinhal após o trauma medular foi a demonstração de um aumento na expressão de ET-1 ao longo da medula espinhal de ratos após a lesão, o qual se relacionou diretamente com a ruptura da barreira hematoencefálica, sendo que o tratamento com bosentan foi capaz de reduzir esta disfunção (Mckenzie *et al.*, 1995). Além disso, sabe-se que no processo de regeneração do sistema nervoso central o surgimento de astrócitos imaturos, que acaba por resultar em gliose, é fundamental para o processo de recuperação tecidual. Dessa forma, Uesugi e colaboradores (1996) demonstraram que a ET-1 parece ser um fator determinante no desenvolvimento cicatriz glial observado após a lesão medular.

Em relação aos receptores de endotelinas sugere-se a participação do receptor ET<sub>A</sub> na isquemia medular pós-traumática (Dawson *et al.*, 1999; Barone *et al.*, 2000) e na geração de espécies reativas de oxigênio (Kasemsri e Armstead, 1997), enquanto o receptor ET<sub>B</sub> está envolvido com o processo de gliose reativa (Ishikawa *et al.*, 1997; Koyama *et al.*, 1999). Ambos os receptores estão expressos em populações distintas de células vasculares, gliais e neuronais na medula espinhal de ratos submetidos à compressão medular, sendo que o receptor ET<sub>B</sub> tem sua expressão aumentada em células gliais, enquanto a expressão vascular, tanto de ET<sub>A</sub> quanto de ET<sub>B</sub>, parece não sofrer alterações (Peters *et al.*, 2003)

Ainda, o tratamento de ratos submetidos à transecção medular com o outro antagonista não seletivo de receptores ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>, endotelinérgicos o SB209670 levou à redução significativa do dano axonal após a lesão, demonstrando o papel desses receptores na degeneração medular (Uesugi *et al.*, 1998).

Como discutido anteriormente, a lesão medular traumática deflagra a liberação pronunciada de mediadores químicos inflamatórios. Nesse contexto, Guo e colaboradores (2014) demonstraram que o bloqueio dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, em um modelo de lesão medular traumática em camundongos, reduziu significativamente os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e a expressão de iNOS. Além disso, o bloqueio de ambos os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> resultam em uma melhora locomotora do 21<sup>o</sup> dia até o 42<sup>o</sup> dia após o trauma inicial quando comparado ao grupo tratado com veículo.

As endotelinas são peptídeos que produzem efeitos variados em múltiplos tecidos e sistemas. Embora haja poucos estudos que tratam deste tema, os mesmos apresentam indícios de que as endotelinas possam participar nas respostas fisiopatológicas desencadeadas pela lesão medular traumática, seja pelo prejuízo da barreira hematoencefálica, na degeneração axonal e nos quadros associados à dor.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar, através de estudos farmacológicos, histológicos e com o emprego de técnicas de biologia molecular, o envolvimento dos receptores endotelinérgicos ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na dor neuropática induzida pela lesão medular traumática em ratos.

### **2.2. Objetivos específicos**

Com o intuito de alcançar o objetivo geral proposto, o estudo foi desenvolvido em etapas, de modo a alcançar os objetivos específicos abaixo:

- Avaliar as alterações locomotoras dos animais e as alterações histopatológicas da medula espinhal decorrentes da lesão medular traumática;
- Determinar os níveis de RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na medula espinhal (segmentos T<sub>8</sub>-T<sub>11</sub>) antes e após a indução da lesão medular;
- Detectar o decurso temporal de expressão dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na medula espinhal de animais falso-operados ou com lesão medular ;
- Determinar a localização dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na medula espinhal de animais falso-operados ou com lesão medular;
- Avaliar o desenvolvimento da resposta hiperalgésica à estímulos mecânicos e térmicos nos animais falso-operados e lesados medulares em diferentes períodos após o trauma medular;
- Investigar se o tratamento com antagonistas seletivos dos diferentes receptores de endotelinas são eficazes em ampliar a recuperação da função motora e reduzir as alterações nociceptivas promovidas pela lesão medular traumática;
- Investigar o efeito de injeção intratecal com ET-1, agonista dos receptores ETA e ETB, no desenvolvimento da resposta hiperalgésica a estímulos mecânicos nos animais falso-operados e lesados medulares.



### **3.MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos *Rattus norvegicus*, variedade Wistar (270 – 280g) machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas). Todos os aspectos deste estudo seguiram as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health (NIH)* dos Estados Unidos da América (*Publication No. 85-23, revisado em 1996*) e está de acordo com o que estabelece a legislação brasileira vigente sobre o emprego de animais em estudos experimentais. Os protocolos experimentais utilizados em ratos para indução da lesão medular traumática e sua manutenção foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA, processo nº PP00680).

#### **3.2 Lesão Medular Traumática - Procedimento Cirúrgico**

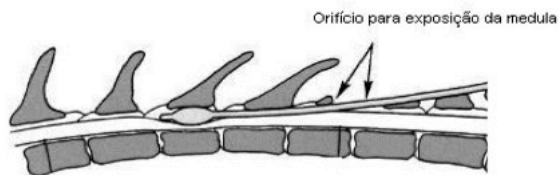
Para a indução da lesão medular traumática foi utilizado o modelo experimental previamente descrito por Vanický e colaboradores (2001) e Andrade e colaboradores (2011). Para tal, os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (70 e 10 mg/kg, respectivamente, Bayer, São Paulo, SP, Brasil) pela via intraperitoneal (i.p.). Após a indução da anestesia, os animais receberam antibiótico de amplo espectro (cloridrato de oxitetraciclina, 300 mg/kg). Em seguida, foram realizadas tricotomia e assepsia do dorso do animal, seguidas da administração subcutânea de anestésico local contendo vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% + epinefrina 1:50000 - Xylestesin<sup>®</sup>) e da incisão de aproximadamente 3 cm na linha média dorsal em sentido rostro-caudal. O tecido gorduroso da região foi removido e os músculos que se inserem no nível das vértebras torácicas 10-12 foram dissecados, seguido pela remoção dos processos espinhosos e fixação da coluna vertebral através de um fórceps.

Para expor a medula espinhal, foi realizado um pequeno orifício (1,5 mm de diâmetro) no nível da 11<sup>a</sup> vértebra torácica com o auxílio de microscópio e broca cirúrgicos. O orifício permitiu a inserção de um

cateter de embolectomia (Fogarty 2F, Lemaitre Catheters, Burlington, MA, EUA) diretamente no espaço epidural do canal medular, sem danificar a dura máter. O cateter inserido no canal medular foi então deslocado na direção rostral em aproximadamente 1 cm até repousar sobre a medula espinhal ao nível da 10<sup>a</sup> vértebra torácica, onde o mesmo foi inflado atingindo um diâmetro pré-calibrado de 4,5 mm e mantido inflado até o desaparecimento dos reflexos espinhais, o que ocorreu em aproximadamente 1 minuto (Figura 3).

Após este período, o cateter foi cuidadosamente removido e foi realizada a sutura por planos (muscular e pele). Os animais falso-operados foram submetidos ao mesmo protocolo descrito acima, porém o cateter não foi inserido no canal medular. Finalizado o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em ambiente limpo e aquecido até a recuperação anestésica e observados diariamente para evitar desconforto ou infecção. Como este procedimento cirúrgico acarreta alterações na contratilidade/relaxamento da bexiga urinária e do esfíncter uretral externo, a bexiga dos animais submetidos à lesão medular foi esvaziada, diariamente, através da compressão manual da região abdominal do animal (método de Crede), até a restauração do reflexo normal de micção, o qual geralmente ocorre 20 dias após a indução da paraplegia. Todos os cuidados pré- e pós-operatórios seguiram o protocolo de Santos-Benito e colaboradores (2006), as normas do MASCIS (*Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study*) e as do CEUA da UFSC.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: controle (nenhuma intervenção cirúrgica), falso-operados (i.e. intervenção cirúrgica sem inserção do cateter) e lesados (i.e. intervenção cirúrgica com inserção de cateter).



**Figura 3. Desenho representativo do orifício para exposição da medula e da posição do cateter Fogarty 2F.** Adaptado de Vanický et al. (2001).

### **3.3 Avaliação da Atividade Locomotora**

A atividade locomotora de cada animal foi avaliada utilizando a escala de atividade locomotora Basso Beattie e Bresnahan (BBB) para ratos (Basso *et al.*, 1995), de acordo com os anexos 1 e 2. Dois observadores treinados participaram de cada sessão de teste e foram posicionados de forma a permitir a observação de cada lado do animal através da caixa de observação. Cada animal foi avaliado a cada dois dias por até 28 dias, e as sessões individuais de cada animal duraram 5 minutos, para minimizar o risco de não observar movimentos importantes. Os animais que permaneceram imóveis por mais de 15 a 20 segundos foram estimulados por leves batidas na parte externa do campo aberto. Caso não respondesse ao estímulo, o animal era posicionado pelos avaliadores no centro da caixa de observação, cuidadosamente, para que não houvesse toque na cauda ou nos membros posteriores do animal, já que isto pode influenciar o desempenho locomotor (Basso et al., 1995). O escore diário foi atribuído pela média de pontuação obtida de cada um dos membros posteriores (esquerdo e direito).

### **3.4 Análise histopatológica da medula espinhal**

A análise histopatológica da medula espinhal (segmentos T<sub>8</sub>-T<sub>11</sub>) foi realizada em amostras de animais falso-operados e lesionados nos períodos de 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico. Para isto, os animais foram anestesiados e perfundidos com solução de PBS (solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7,2 a 7,4) e paraformaldeído 4%. Após a perfusão dos animais, as medulas espinhais entre os segmentos torácicos T<sub>8</sub>-T<sub>11</sub> foram removidas, fixadas em paraformaldeído 4% por 48 h e desidratadas em etanol 70% por 24 h, sendo ambas as etapas conduzidas em temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram emblocadas em parafina, seccionadas em cortes longitudinais de 30 µm e coradas com hematoxilina e eosina (HE), para posterior avaliação microscópica.

### **3.5 Extração do RNA total**

Para a extração do RNA total (RNAt), amostras da medula espinhal de animais não-operados, falso-operados e lesados foram coletadas nos períodos de 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico e colocadas em microtubos de plástico siliconizados (eppendorf®) contendo Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), na proporção de 1 ml do reagente para cada 100 mg de tecido. Os tecidos foram homogeneizados e ao homogenato foram adicionados 200 µl de clorofórmio, sendo este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (12.000 x g, 15 minutos, 4 °C). A fase aquosa contendo o RNAt foi transferida para um novo tubo de eppendorf e adicionados 500 µl de álcool isopropílico. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e, posteriormente, mantido em repouso em temperatura ambiente durante 10 minutos. A mistura foi centrifugada (12.000 x g, 15 minutos, 4 °C), sendo o pellet resultante re-suspenso em 1 ml de etanol 75% gelado. Após a centrifugação (7.000 x g, 5 minutos, 4 °C), o novo pellet contendo RNAt foi suspenso em água tratada com 0,1% de dietilpircarbanato (DEPC), sendo a sua concentração e pureza determinadas através de um espectrofotômetro NanoDrop 1100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). O RNA foi aliquotado e estocado a -70 °C até o momento do uso. Uma vez obtido o RNAt, foi realizado o ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real) como descrito abaixo.

### **3.6 Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real)**

Com o objetivo de determinar o efeito da lesão medular sobre os níveis de RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na medula espinhal (T<sub>8</sub>-T<sub>11</sub>) foi realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (real-time PCR). Para a reação da transcrição reversa, foi utilizada a enzima Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Amostras de medula espinhal contendo 2 µg de RNAt foram incubadas com 1 µg de oligo dT (500 µg/ml), 1 µl de deoxinucleotídeos (dNTPs) mix (10 mM) e água ultra pura para um volume final de 12 µl. Para a obtenção do DNA complementar (DNAc), as amostras foram aquecidas a 65 °C por 5 minutos, resfriadas a 4 °C por 5 minutos para a



adição de 4 µl de tampão de primeira fita [250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl e 15 mM MgCl<sub>2</sub>], 2 µl de DTT (0,1 M)] e 1 µl de inibidor de RNase. A mistura foi incubada a 37 °C por 50 minutos e a reação foi inativada a 75 °C por 15 minutos. O DNAc foi estocado a 4 °C até a realização da reação em cadeia de polimerase (PCR). A reação de PCR foi realizada para promover a amplificação do DNAc para receptor ET<sub>A</sub> ou ET<sub>B</sub> e para β-actina ACTB. Para tal, o DNAc foi amplificado em duplicata utilizando o kit Master Mix TaqMan® Universal PCR (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil), com primers específicos para ratos, com marcação 3' *quencher* (molécula que absorve fluorescência) MGB e FAM, para ET<sub>A</sub> (Rn00561137\_m1) ou ET<sub>B</sub> (Rn00569139\_m1) e 3' *quencher* MGB e VIC para o controle endógeno β-actina ACTB (Rn00667869\_m1) (Applied Biosystems). A reação de PCR foi realizada em uma placa de reação óptica de 96 poços (Applied Biosystems). Cada reação continha 1 µl de DNAc (300 ng), 5 µl de Master Mix (2x), 0,5 µl de sonda (primer Taqman) e 3,5 µl de água ultrapura, em um volume final de 10 µl. As amplificações foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus; Applied Biosystems) para 55 ciclos. Os parâmetros do termociclador foram os seguintes: 50 °C por 2 min, 95 °C por 15 s, e 60 °C por 1 minuto. A fluorescência foi coletada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para a quantificação relativa (QR). A expressão do gene alvo foi calibrada contra condições encontradas em animais controle.

### **3.7 Expressão protéica pelo imunoenensaio molecular de Western blot**

A análise por imunodeteção (ensaio de Western blot) do conteúdo protéico da medula espinhal de animais do grupo controle falso-operado ou lesados medulares consistiu em verificar o perfil temporal de expressão dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>. Nos tempos de 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados por inalação de CO<sub>2</sub> em câmara apropriada e o segmento T<sub>8</sub>-T<sub>11</sub> de medula (correspondentes ao sítio da lesão, bem como suas porções rostral e caudal) foi removido. Em seguida, as amostras foram lavadas em PBS, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até sua utilização. Os tecidos coletados foram homogeneizados em tampão contendo HEPES 50 mM pH 7,9; KCl 1 M; MgCl<sub>2</sub> 1 M; EDTA 0,1 M; NaF 0,1 M; β-glicerofosfato 1 M; ditioneitol 1 M; aprotinina 10 mg/mL;

leupeptina 10 mg/mL; fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 200 mM e água deionizada e, em seguida, mantidos em repouso por 15 minutos a 4 °C. Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 14.000 r.p.m, por 45 minutos a 4°C, o sobrenadante (correspondente ao extrato total) foi coletado e a concentração de proteínas das amostras foi dosada utilizando espectrofotômetro NanoDrop 1100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). Em seguida as amostras contendo quantidade iguais de proteína (50 µg) foram adicionadas ao tampão SDS-PAGE e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% a 100 V. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por eletroforese, utilizando-se corrente constante de 300 mA, durante 120 min. Após a transferência, as membranas foram lavadas em tampão TBS-T (Solução Tris 20mM, pH7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%) e submetidos à detecção das proteínas de interesse através do sistema automatizado SNAP i.d. (Snap i.d. Protein Detection System blot holder, Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA). Para tal as membranas foram posicionadas dentro do sistema de detecção de proteínas Snap i.d. (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) conectado a uma bomba de vácuo. As membranas foram bloqueadas com tampão TBS-T contendo 1 % de albumina sérica bovina por 20 segundos, sob vácuo. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos contra receptores de ratos ET<sub>A</sub>R ou ET<sub>B</sub>R (1:150, Alomone Labs Ltd, Jerusalem, Israel) por 10 minutos, a temperatura ambiente. O controle foi realizado através da preabsorção de anticorpos com o respectivo antígeno do peptídeo de acordo com o fabricante (Alomone Labs Ltd.). A bomba de vácuo foi novamente acionada para descartar os anticorpos livres por aspiração, através de 3 lavagens consecutivas com tampão TBS-T. Em seguida, o vácuo foi novamente desligado e as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários específicos conjugados a uma peroxidase, durante 10 minutos, e então submetidas a 3 lavagens sucessivas com tampão TBS-T. As bandas foram visualizadas por aumento da quimioluminescência, utilizando o sistema de detecção ECL (Amersham Bioscience Corp., PA, E.U.A). A quantificação da intensidade dos sinais das bandas foi determinada por densitometria, utilizando-se o programa Scion Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

### 3.8 Localização dos receptores endotelinérgicos

A expressão dos receptores endotelinérgicos ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na medula espinhal foi detectada em cortes histológicos confeccionados a partir de blocos de parafina. Os cortes teciduais de espessura de 30 µm foram mantidos em estufa a uma temperatura de 70-90 °C até a completa fusão da parafina ao redor dos cortes. Posteriormente os tecidos foram desparafinizados em xilol (xileno) e hidratados por passagens consecutivas em concentrações decrescentes de etanol (etanol absoluto, etanol 90 %, etanol 80 % e finalmente etanol 70 %). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar o desenvolvimento de reações falso-positivas inespecíficas. Para tanto, as lâminas foram imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 1,5 % em metanol absoluto (v/v) por 20 min, com posterior lavagem em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formaldeído e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 mL de ácido cítrico 0,1 M e 820 mL de citrato de sódio 0,1 M; pH 6,0. As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98°C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo de reativação antigênica através do calor, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 min à temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água destilada. Após a lavagem, as lâminas foram submersas em PBS.

Os anticorpos primários anti-ETA (1:200; Alomone Labs Ltd), e anti-ETB (1:200; Alomone Labs Ltd) foram diluídos em solução Reinascence (Biocare Medical, Concord, CA, EUA). A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8 °C, durante 12-16 horas. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS à temperatura ambiente. Após lavagem as lâminas foram incubadas com um polímero de detecção (PicTure™ MAX Polymer detection kit), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram então submetidas a uma revelação colorimétrica com kit comercial, através de uma solução cromógena contendo 0,03 % de 3,3',4,4'-tetraaminobifeniltetrahydroclorídrico (DAB). Após a revelação, foram realizadas: a contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina

de Harris; a desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70 %, etanol 80 %, 90 % e etanol absoluto); a diafanização em xilol e a montagem em ENTELLAN®. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Leica, São Paulo, SP), em aumento de 200 x, sendo analisados todos os campos da lâmina. As imagens foram registradas com auxílio de uma câmera Nikon (Sight DS-5M-L1, Melville, USA). O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos. Foram analisados três cortes histológicos da amostra de cada animal, sendo que cada grupo experimental foi constituído de, no mínimo, três animais. Os resultados destes experimentos foram expressos em unidades arbitrárias. Todos os grupos experimentais foram processados sob condições idênticas. As configurações para aquisição das imagens também foram idênticas para todos os tecidos. As imagens foram transferidas para um computador onde a intensidade da coloração dos pixels para receptores  $ET_A$  e  $ET_B$  foram calculadas para cada imagem utilizando o software NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

### **3.9 Avaliação da hiperalgesia mecânica**

Para aplicação dos estímulos mecânicos, os animais foram primeiramente habituados por pelos menos uma hora às caixas de observação. Em seguida, foi realizada uma sessão de seleção prévia dos animais baseada em suas respostas à aplicação repetitiva por 10 vezes com o filamento de Von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, Wood Dale, IL, EUA) de 4 g e 15 g. Os filamentos foram aplicados nas patas anteriores e posteriores perpendicularmente à superfície plantar e força crescente até flexão do filamento nas patas anteriores e posteriores do animal. Foi estabelecido um intervalo de no mínimo 30 segundos entre cada aplicação. Foi considerada como resposta positiva dos animais à estimulação mecânica o comportamento de retirada da pata estimulada. O percentual de retirada de cada pata após 10 aplicações do filamento foi considerado como indicativo da intensidade da nocicepção mecânica. Apenas animais que apresentaram resposta nociceptiva entre 0 e 30 % na sessão de seleção a foram incluídos nos experimentos subseqüentes.

Para análise do decurso temporal da alteração nociceptiva mecânica após a lesão medular, os animais foram estimulados com os filamentos de von Frey 2, 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia.

### **3.10 Avaliação da hiperalgesia térmica**

Os animais foram primeiramente habituados por pelo menos uma hora nas caixas de observação para aparato de Hargreaves. A latência para retirada das patas posteriores em resposta à aplicação de estímulo térmico foi determinada pela exposição da superfície plantar das patas posteriores a uma fonte de calor radiante (aparato de Hargreaves; UgoBasile, Varese, Itália).

Nos períodos de 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico e tratamento, os animais foram posicionados em compartimentos individuais sobre uma placa de vidro mantida a 30°C, e uma fonte de calor radiante foi posicionada abaixo da placa de vidro e direcionada para a pata posterior. A ativação da fonte ativou simultaneamente um cronômetro, sendo que ambos foram imediatamente desligados pelo levantamento da pata, ou após 20 segundos, quando não havia resposta do animal a fim de se evitar a lesão tecidual. Foi considerada como resposta positiva dos animais à estimulação térmica o comportamento de retirada da pata estimulada.

### **3.11 Efeito dos antagonistas peptidérgicos dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na hiperalgesia mecânica induzida por lesão medular**

Como a resposta hiperalgésica mecânica ao filamento de 15 g foi mais acentuada nas patas posteriores no vigésimo primeiro dia após o trauma medular, foi escolhido esse período para a realização do tratamento intratecal com os antagonistas seletivos para receptores ET<sub>A</sub>, BQ-123 (i.t., 40 e 90 pmol) ou ET<sub>B</sub>, BQ-788 (i.t., 20 e 90 pmol) ou veículo (salina). Os animais lesados medulares tiveram sua resposta ao estímulo mecânico avaliada antes do tratamento e entre 30 minutos e 4 h 30 minutos após o tratamento.

### **3.12 Efeito de bosentan, antagonista não-peptidérgico dual dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> e pregabalina na locomoção e hiperalgesia mecânica após o trauma medular**

Seguindo o mesmo protocolo descrito no item 3.11, utilizou-se o tratamento com o antagonista seletivo dual para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, bosentan (v.o., 30 mg/kg e 100 mg/kg), e como controle positivo

utilizou-se pregabalina (Lyrica®; v.o., 30 mg/kg). Ambos os grupos foram avaliados entre 1 e 6 horas após o tratamento.

A pregabalina (v.o., 30 mg/kg) foi avaliada acerca da sua capacidade de alterar a locomoção em animais controle através da contagem do número de quadrantes percorridos no campo aberto durante 1 minuto.

### **3.13 Efeito do tratamento diário com bosentan na prevenção de dor neuropática e melhora na locomoção após trauma medular**

Para investigar a possível prevenção do desenvolvimento de dor neuropática após trauma medular através do antagonismo dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>, tratou-se os animais com bosentan (v.o. 100 mg/kg) através de administração oral diária entre o primeiro e o sétimo dia após o procedimento cirúrgico. Em seguida, avaliou-se a hiperalgesia mecânica nos períodos de 2, 7, 14, 21 e 28 dias e, concomitantemente, avaliamos a atividade locomotora através da escala BBB a cada 2 dias durante 28 dias.

### **3.14 Efeito da administração central do agonista ET-1 na resposta hiperalgésica após lesão medular traumática**

Seguindo o mesmo protocolo de avaliação e tratamento descrito no item 3.11 e para demonstrar atividade dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> após o trauma medular, administrou-se o agonista desses receptores, a ET-1 (i.t. 3 pmol) e avaliou-se a resposta frente ao estímulo mecânico entre 30 min e 6 h 30 m após a administração.

### **3.15 Reagentes e Drogas**

Os seguintes reagentes, drogas e soluções foram utilizados:

- Anticorpos primários anti-ET<sub>A</sub> e anti-ET<sub>B</sub> (Alomone Ltd, Jerusalem, Israel)
- Bosentan (Actelion, Auschwill, Suíça), antagonista não peptídico dual de receptores ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>;
- BQ-123 (ciclo [DTrp-DAsp-Pro-Dval-Leu]) (Research Biochemicals International, Natick, EUA), antagonista

- peptídico seletivo de receptores ETA;
- BQ-788 (N-cis-2,6-dimetilpiperidino-carbonil-L- $\gamma$ -metileucil-D-1-metoxicarbonil- D-norleucina) (Research Biochemicals International, Natick, EUA), antagonista peptídico seletivo de receptors ETB;
  - Cloridrato de Cetamina (Dopalen<sup>®</sup>, Sespo Indústria e Comércio Ltda, SP, Brasil);
  - Cloridrato de lidocaína (Xylestesin<sup>®</sup>, Cristália, SP, Brasil);
  - Deoxinucleotídeos (dNTPs) (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
  - Dietiltreitol (DTT) (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
  - Endotelina-1 (Bachem, Natick, MA, EUA);
  - Enzima transcriptase reversa (Invitrogen, São Paulo, Brasil).
  - Inibidor de RNase (RNasin) (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
  - Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
  - Master Mix TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil);
  - Oligo dT 15 (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
  - Oxitetraciclina (Terramicina<sup>®</sup>, Pfizer, Guarulhos, Brasil);
  - Pregabalina (Lyrica<sup>®</sup>, Pfizer, Nova Iorque, EUA);
  - Sondas (primers) para detecção de RNA para ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> e ET-1 (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil);
  - Salina tamponada com fosfato em tabletes (phosphate-buffered saline – PBS, Sigma, St. Louis, MO, EUA);
  - Tampão de primeira fita para a reação de transcrição reversa (Invitrogen, São Paulo, Brasil)
  - Xilazina (Dopaser<sup>®</sup>, Laboratórios Calier S.A., Barcelona, Espanha).

BQ-123, BQ-788 e ET-1 foram dissolvidos diretamente em PBS, enquanto o bosentan e a pregablina foram preparados em salina.

### 3.16 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m). As percentagens de inibição ou de aumento de expressão de proteínas ou RNAm são expressos como a média  $\pm$  erro padrão da

média (e.p.m) das inibições ou dos aumentos máximos individuais obtidos em cada experimento. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi avaliada através da análise de variância (ANOVA de uma via ou ANOVA de duas vias com medidas repetidas), seguida do teste *post hoc* de Bonferroni, teste *U* de Mann-Whitney ou teste “t” de Student não pareado, conforme as características de cada situação experimental. Diferenças entre grupos com valor de  $P < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significantes. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o programa GraphPad 5<sup>®</sup> (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Todos os experimentos foram realizados duplo-cego quando pertinente.



## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Análise da atividade locomotora dos animais após a lesão medular**

Visando a reprodutibilidade do modelo experimental, no que concerne o estabelecimento de paralisia medular, avaliamos inicialmente o desempenho locomotor dos animais através da escala de atividade locomotora desenvolvida por Basso e colaboradores (1995), denominada escala BBB. Conforme ilustrado na Figura 1, os animais falso-operados apresentaram atividade locomotora normal (escore 21) durante todo o período de avaliação de 28 dias, sempre apresentaram passadas plantares consistentes, marcha coordenada, liberação dos dedos, estabilidade consistente do tronco e cauda elevada. Por outro lado, a lesão da medula espinhal induziu nos animais um déficit locomotor acentuado, caracterizado por ausência de movimento dos membros posteriores no segundo dia após a cirurgia, seguido de recuperação funcional sutil, sendo possível observar somente o movimento discreto de duas articulações. No dia 28 o escore BBB destes animais teve uma mediana de 4 (3-5), mantendo-se assim até o final do período de observação, que se caracteriza por movimento discreto das três articulações – quadril, joelho e tornozelo. Esses escores estão em conformidade com os obtidos por Vanický e colaboradores (2001) (Figura 4).

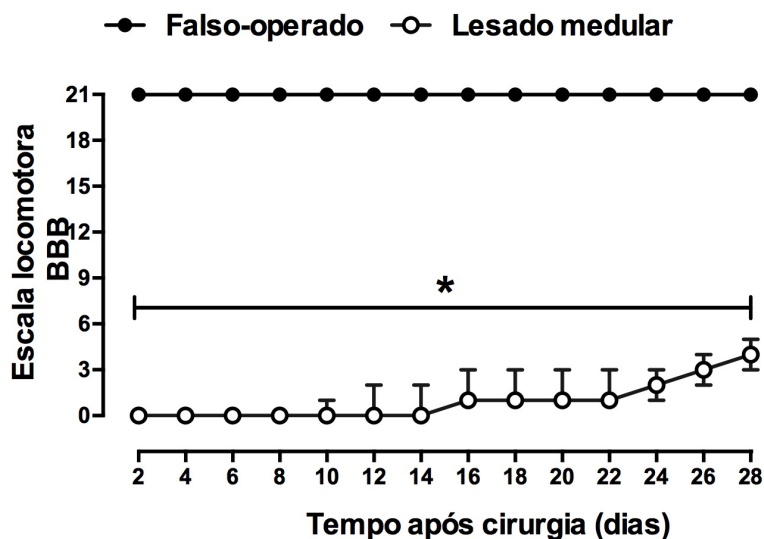


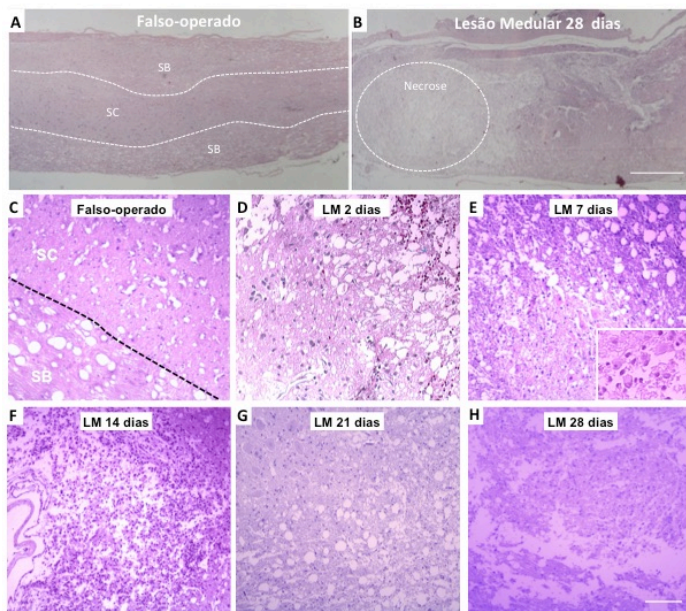
Figura 4. Avaliação da atividade locomotora de animais submetidos à lesão da medula espinal, através da escala BBB. Triângulos fechados representam o grupo de animais falso-operados. Círculos fechados representam o grupo de animais lesados. Cada grupo representa a mediana e intervalos interquartis de 8 animais. O asterisco indica um nível de significância de  $p < 0,05$  em comparação ao grupo falso-operado. (teste *U* de Mann-Whitney).

## 4.2 Alterações histopatológicas decorrentes da lesão medular

Para detectar possíveis alterações histopatológicas da medula espinal decorrentes da lesão medular, realizamos uma análise histológica qualitativa do tecido. Nos animais lesados após 2 dias do trauma medular, as medulas espinhais apresentam estrutura desorganizada, sendo a substância cinzenta parcialmente substituída por regiões de cavitação, restos celulares, além de áreas hemorrágicas caracterizadas pela presença de hemácias extravasadas. É importante ressaltar que a área composta por restos celulares corresponde à necrose de liquefação, histologicamente caracterizada por um fundo amorfo sem evidências de estruturas celulares, com áreas cavitadas imersas em fundo hemorrágico (Figura 5D).

Entre 7 e 28 dias após a lesão medular, as medulas também apresentaram alterações em sua arquitetura geral. Na região da

substância cinzenta foram observadas amplas áreas cavidadas possivelmente relacionadas com processo necrótico em fase resolutive. Neste período também é possível visualizar células balonizadas, que são compatíveis histologicamente com células neuronais degeneradas. No entanto, as medulas dos animais com 7 e 14 dias (Figura 5E e F, respectivamente) apresentam um infiltrado inflamatório mais extenso quando comparados com 21 e 28 dias (Figura 5G e H, respectivamente). Na Figura 5E, ainda é possível visualizar em detalhe, na área da lesão, as células degeneradas, denominadas células balonizadas.

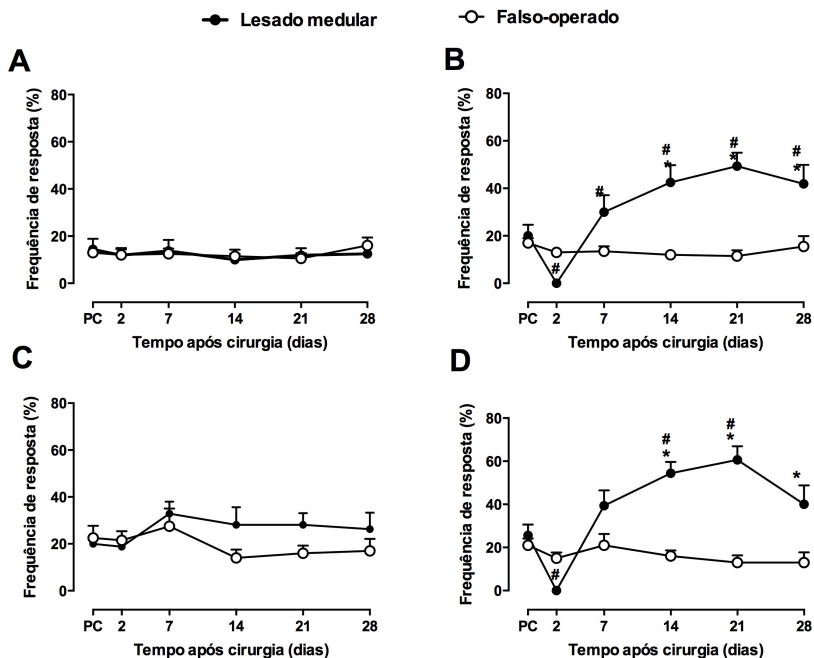


**Figura 5. Alterações histopatológicas da medula espinhal após a lesão medular.** Análise histológica realizada em cortes longitudinais de medula espinhal de animais falso-operados (painel A) e lesados medulares (painel B) (panorâmica, escala 500  $\mu$ m). Os painéis C-H mostram em detalhe a estrutura medular em amostras obtidas de animais falso-operados e lesados medulares (LM) 2, 7, 14, 21, 28 dias após a cirurgia (coloração H&E: aumento de 10x, escala 50  $\mu$ m). Pontilhado no painel C separa a substância cinzenta da branca. No painel E, em detalhe, células degeneradas, do tipo balonizadas.

### 4.3 Lesão medular traumática altera sensibilidade mecânica

Avaliamos o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica tanto em membros anteriores quanto posteriores nos períodos de 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o trauma medular, através da aplicação de filamentos de von Frey de 4 e 15 gramas de força (Detloff *et al.*, 2012).

Observamos que os animais com lesão medular não desenvolveram aumento de frequência de respostas à estimulação mecânica dos membros anteriores com qualquer dos filamentos utilizados, sugerindo a ausência de hiperalgesia acima do nível da lesão medular. No entanto, os animais lesados medulares tiveram um aumento significativo em comparação ao grupo falso-operado nas respostas ao estímulo mecânico das patas posteriores, tanto com o filamento de 4 gramas quanto com o de 15. Essas alterações de sensibilidade foram significantes desde o dia 14 até o dia 28 após o procedimento cirúrgico (filamento de 4 gramas: aumento de  $266,6 \pm 51,9\%$ ,  $329,5 \pm 49,6\%$  e  $182,7 \pm 47,0\%$ , nos dias 14, 21 e 28, respectivamente; e filamento de 15 gramas o aumento de  $239,8 \pm 33,1\%$ ;  $366,3 \pm 48,4\%$ ;  $207,37 \pm 3,2\%$  nos mesmos períodos). No entanto, a maior frequência de retirada das patas ocorreu com o filamento de 15 gramas no 21<sup>o</sup> dia quando comparado ao grupo falso-operado (Fig. 6D, aumento  $366,3 \pm 48,4\%$ ). Observa-se que no período de 2 dias os animais apresentaram uma queda significativa na frequência de respostas em comparação à avaliação realizada *a priori* da cirurgia. Isso se deve ao choque medular característico após uma lesão medular, correspondendo à suspensão transitória da função e reflexos abaixo do nível da lesão.

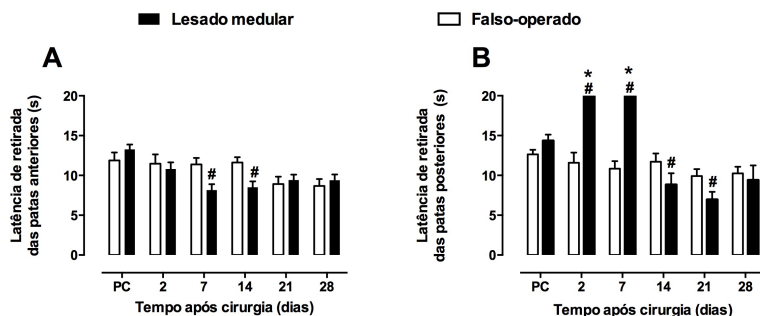


**Figura 6.** Efeito da lesão medular traumática sobre a frequência de comportamentos de retirada frente à estimulação mecânica repetida das patas anteriores e posteriores com filamentos de von Frey. Frequência de resposta de retirada (%) das patas anteriores (A e C, respectivamente) e patas posteriores (B e D, respectivamente) após 10 estimulações consecutivas com filamento de von Frey de 4 e 15 g, avaliados antes da cirurgia (PC) e em 2, 7 e 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média  $\pm$  e.p.m. de 6 - 8 animais. Os asteriscos (\*) indicam  $P < 0,05$  em comparação ao grupo falso-operado e as cerquilhas (#) indicam  $P < 0,05$  em comparação ao dia antes do procedimento cirúrgico (PC; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido com teste de Bonferroni).

#### 4.4 Lesão medular traumática altera sensibilidade térmica

Em seguida avaliamos se a lesão medular promoveria o desenvolvimento de hiperalgesia térmica tanto em membros anteriores quanto posteriores nos períodos de 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o trauma medular através do aparato de Hargreave's.

Observa-se que os animais lesados medulares apresentam uma redução na sensibilidade térmica nas patas anteriores nos dias 7 e 14 após o trauma medular ( $22,2 \pm 10,9\%$  e  $21,0 \pm 9,4\%$ , respectivamente). No entanto, devido ao choque medular e à ausência de percepção do estímulo térmico, não foi possível avaliar a latência de retirada das patas posteriores dos animais lesados nos dias 2 e 7 após o procedimento cirúrgico, ou seja, esses animais atingiram o limite de tempo estipulado sem percepção. Observa-se, porém, que no 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias seguidos da lesão medular, esses animais obtiveram uma redução de  $29,8 \pm 9,8\%$  e  $34,7 \pm 6,1\%$ , respectivamente, na latência de retiradas das patas posteriores. Em ambos os membros, anteriores e posteriores, houve um retorno ao estado basal de sensibilidade térmica no 28<sup>o</sup> dia após o trauma medular.



**Figura 7. Efeito da lesão medular sobre a reatividade comportamental frente à aplicação de um estímulo térmico nas patas anteriores e posteriores (teste de Hargreaves).** Latência de retirada (em segundos) das patas anteriores (A) e patas posteriores (B) antes da cirurgia e após 3 sessões avaliadas em 2, 7 e 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média  $\pm$  e.p.m. de 6 - 8 animais. Os asteriscos (\*) indicam  $P < 0,05$  em comparação ao grupo falso-operado e as cerquilhas (#) indicam  $P < 0,05$  em comparação ao dia antes do procedimento cirúrgico (PC; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido com teste de Bonferroni).

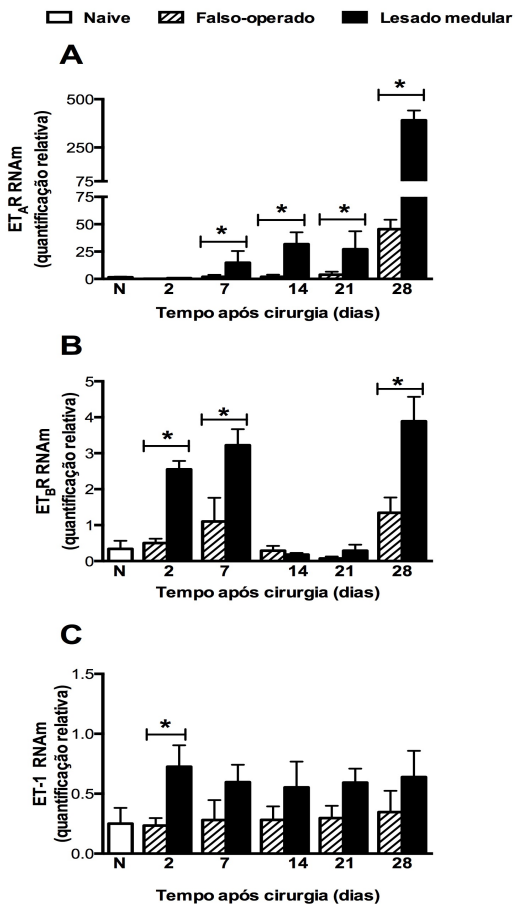
#### 4.5 Efeito da lesão medular sobre os níveis de RNAm para os receptores ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> e para ET-1.

Visando avaliar a possível participação das endotelinas e seus receptores após a lesão medular traumática, foi realizada uma análise dos níveis de RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> das endotelinas no

sítio da lesão da medula espinhal de animais não-operados, falso-operados e lesados, coletadas 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico.

Na figura 8, pode-se observar um aumento significativo nos níveis de RNAm codificador dos receptores  $ET_A$  do sétimo ao vigésimo oitavo dias após a lesão na medula espinhal (Figura 8A; dia 7, 4,40 vezes; dia 14, 15,1 vezes; dia 21, 6,4 vezes e dia 28, 13,4 vezes).

Os níveis do RNAm dos receptores  $ET_B$  aumentaram no segundo e no sétimo dia após a lesão medular e no 28<sup>o</sup> dia (4,0 vezes, 1,94 vezes e 1,9 vezes, respectivamente; Figura 8B). No entanto, é importante ressaltar que foram detectados níveis de RNAm para os receptores  $ET_A$  cerca de 100 vezes maiores do que para os receptores  $ET_B$  na medula espinhal. Em relação aos níveis de RNAm para  $ET-1$ , dois dias após o trauma houve um aumento de 2,7 vezes em comparação ao grupo falso-operado, porém não houve alterações significativas entre os grupos avaliados nos demais períodos após a lesão medular traumática (Figura 8C).

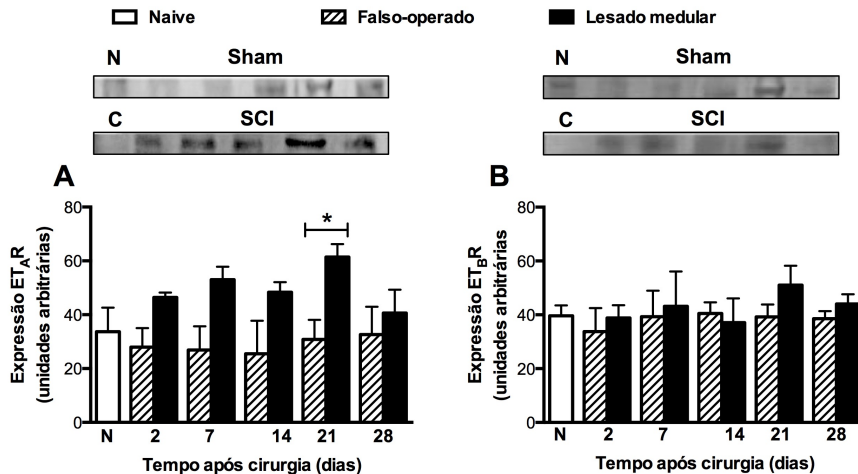


**Figura 8. Efeito da lesão medular sobre os níveis de RNA<sub>m</sub> para receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> e ET-1 na medula espinal.** Níveis de RNA<sub>m</sub> para receptores ET<sub>A</sub>, ET<sub>B</sub> e ET-1 na medula espinal (A, B, C respectivamente) coletados 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média ± e.p.m. de 4 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo falso-operado, \* $P < 0,05$  (ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni).



#### **4.6 Análise da expressão dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na medula espinhal após a lesão medular**

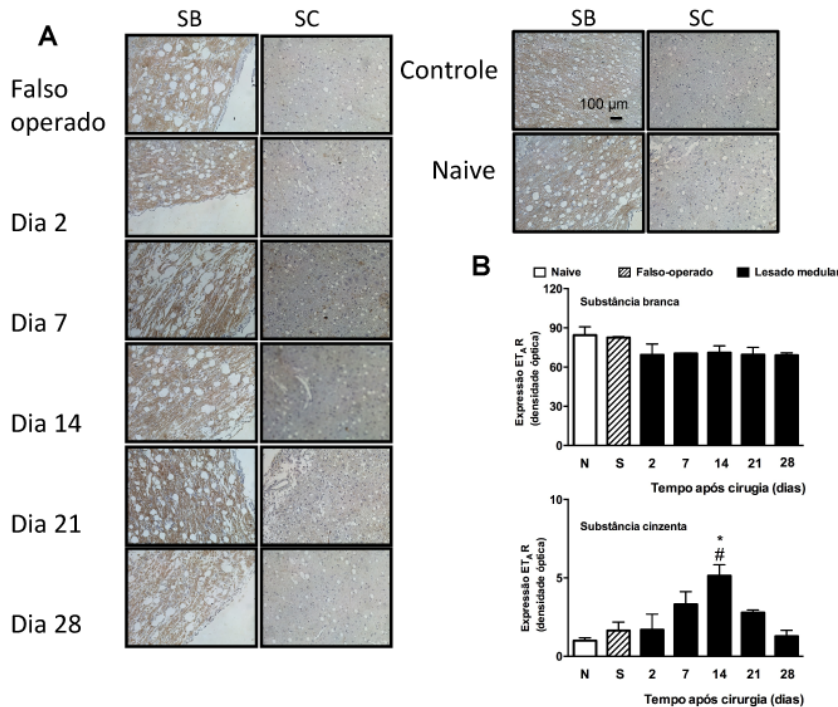
A seguir foram investigadas as possíveis alterações na expressão protéica dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> para endotelinas na medula espinhal de ratos submetidos à lesão medular traumática. Após a lesão da medula espinhal, a expressão de receptores ET<sub>A</sub> aumentou em aproximadamente  $99,4 \pm 15,6\%$  nas medulas espinhais coletadas 21 dias após o procedimento cirúrgico (Figura 9A). Não houve alteração significativa na expressão deste receptor nos demais tempos observados. Por outro lado, não observamos nenhuma alteração significativa na expressão protéica dos receptores ET<sub>B</sub> em decorrência do trauma medular em nenhum dos períodos avaliados. (Figura 9B).



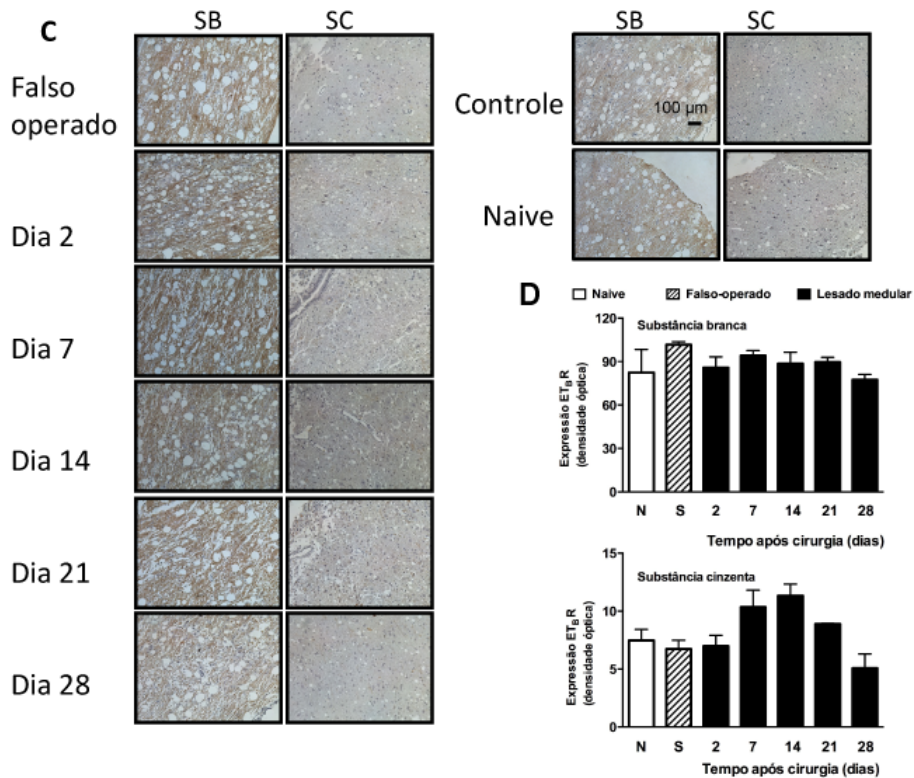
**Figura 9.** Efeito da lesão medular sobre a expressão dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na medula espinal. O gráfico indica a quantificação por densitometria óptica (D.O.) da expressão dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> (A e B, respectivamente) na medula espinal de animais não-operados, falso-operados e lesados nos períodos de 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico. Cada grupo representa a média ± e.p.m. de 4 animais e os valores estão expressos em unidades arbitrárias. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo falso-operado. C: controle endógeno; \* $P < 0,05$  (ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni).

#### **4.7 Análise da expressão dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> nas substâncias cinzenta e branca da medula espinhal após a lesão medular**

Com o objetivo de confirmar a indução do receptor ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na medula espinhal em decorrência da lesão medular, a sua expressão foi avaliada através da técnica de imuno-histoquímica. Como pode ser observado nas Figuras 10 (A e B) ambos os receptores estão distribuídos igualmente na substância branca de animais naive, falso-operados e lesados medulares. No entanto, a expressão dos receptores ET<sub>A</sub> foi aumentada significativamente em comparação ao grupo falso-operado na substância cinzenta da medula espinhal no 14<sup>o</sup> dia após o trauma medular ( $174,4 \pm 8,5\%$ ). Observa-se discreta marcação nos controles (Figura 10A e B).



**Figura 10. Expressão dos receptores ET<sub>A</sub> na medula espinhal após o trauma medular.** Expressão de receptores ET<sub>A</sub> na substância branca (SB) e cinzenta (SC) (painel A) da medula espinhal. Imagens representativas de imunomarcção dos receptores ET<sub>A</sub> na substância branca dos grupos controle e falso-operados. O painel A representa a imunomarcção dos receptores ET<sub>A</sub> na substância branca (SB) e substância cinza (SC) de animais lesados medulares nos dias 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o trauma medular, respectivamente (escala = 100 mm). Cada coluna representa a média e as linhas verticais o e.p.m. de 4 animais. #  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; \* $P < 0,05$  comparado com o respectivo grupo falso-operado (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

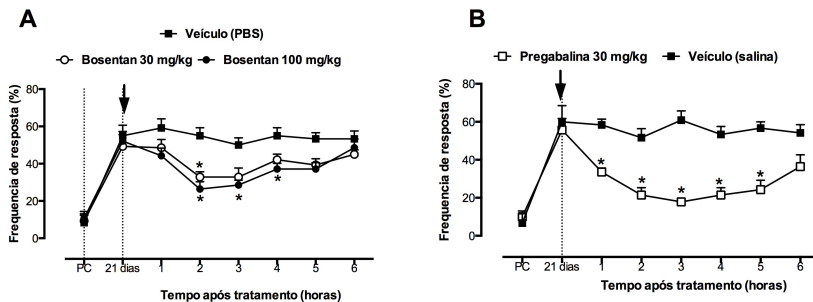


**Figura 11. Expressão dos receptores  $ET_B$  na medula espinhal após o trauma medular.**

Expressão de receptores  $ET_B$  na substância branca (SB) e cinzenta (SC) (painel C) da medula espinhal. Imagens representativas de imunomarcção dos receptores  $ET_B$  na substância branca dos grupos controle e falso-operados. O painel C representam imunomarcção dos receptores  $ET_B$  na substância branca (SB) e substância cinza (SC) de animais lesados medulares nos dias 2, 7, 14, 21 e 28 dias após o trauma medular, respectivamente (escala = 100  $\mu$ m). Cada coluna representa a média e as linhas verticais o e.p.m. de 4 animais. #  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle; \*  $P < 0,05$  comparado com o respectivo grupo falso-operado (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

#### **4.9 Efeito do tratamento por via oral com o antagonista dual para os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> – bosentan e a pregabalina sobre a hiperalgesia mecânica das patas posteriores após o trauma medular**

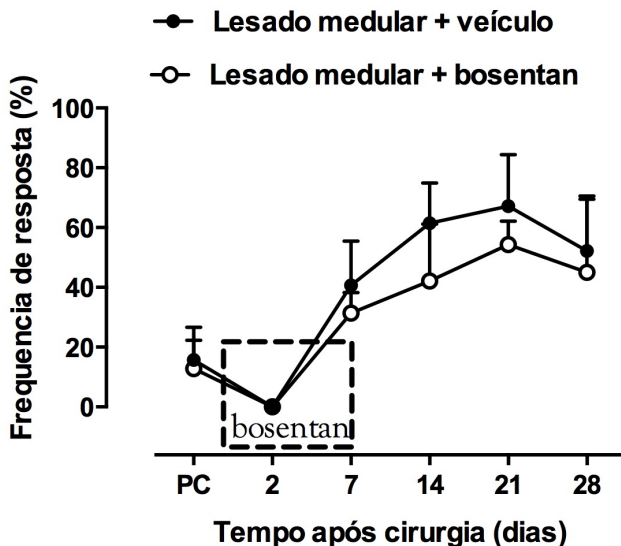
Avaliamos o tratamento dos animais lesados medulares apenas no 21<sup>o</sup> dia após a lesão medular traumática através do tratamento por via oral com bosentan (30 ou 100 mg/kg) ou pregabalina (30 mg/kg). O bosentan foi capaz de reduzir significativamente a frequência de respostas à estimulação mecânica na dose de 30 mg/kg apenas em 2 horas (Figura 12A,  $40,2 \pm 5,2$  %), enquanto que a maior dose promove reduções entre 2 e 4 horas após o tratamento (Figura 12A,  $52,0 \pm 7,0$ %,  $43,3 \pm 6,1$ % e  $31,8 \pm 6,5$ %, respectivamente). Ademais, optamos por utilizar pregabalina, a qual é, clinicamente, a droga de escolha para o tratamento de dores neuropáticas e dores espontâneas de lesados medulares (Siddall *et al.*, 2006), como um controle positivo dos nossos tratamentos e observamos que administrado oralmente esse fármaco (30 mg/kg) reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica entre 1 e 5 horas após o tratamento (Figura 12B,  $42,4 \pm 3,6$ %,  $58,5 \pm 7,5$ %,  $70,8 \pm 3,1$ %,  $59,8 \pm 7,3$ % e  $57,1 \pm 8,7$ %, respectivamente). Observamos, além disso, que a pregabalina não causou nenhum efeito sedativo nos animais lesados quando avaliamos a locomoção, em campo aberto, quando comparados com o veículo ( $21,0 \pm 1,8$  e  $18,6 \pm 1,3$  quadrantes, respectivamente; test t de Student para amostras não pareadas).



**Figura 13. Efeito do tratamento por via oral do antagonista dual para os receptores  $ET_A$  e  $ET_B$  (bosentan) e pregabalina sobre a frequência de respostas comportamentais frente à estimulação mecânica repetida das patas posteriores com filamento de von Frey no 21<sup>o</sup> dia após o trauma medular.** Resposta de frequência e retirada (%) das patas posteriores após tratamento (seta) com bosentan (30 e 100 mg/kg; A) ou pregabalina (30 mg/kg; B) após 10 sessões de estímulo por filamento de von Frey de 15 g, avaliados entre 1 e 6 horas após o tratamento. Cada grupo representa a média  $\pm$  e.p.m. de 6 - 8 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo veículo,  $*P < 0,05$  (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido com teste de Bonferroni).

#### 4.10 Efeito do tratamento diário do antagonista seletivo-dual para os receptores $ET_A/ET_B$ na prevenção de sensibilidade mecânica após trauma medular

Para avaliarmos se seria possível prevenir ou reduzir o desenvolvimento de sensibilidade mecânica nos animais lesados medulares com o tratamento com bosentan, o mesmo foi administrado por via oral entre o primeiro e o sétimo dia após o trauma medular, conforme ilustra a figura 13 (v.o. 100 mg/kg). No entanto, não observamos melhora significativa em nenhum dos períodos avaliados com o grupo veículo quando avaliamos a hiperalgesia mecânica.



**Figura 14.** Efeito do tratamento diário, entre o primeiro e o sétimo dia após o trauma medular, por via oral com o antagonista dual para os receptores  $ET_A$  e  $ET_B$  (Bosentan) frente ao estímulo mecânico por filamento de von Frey nas patas posteriores no 21º dia após o trauma medular. Resposta de frequência de retirada (%) das patas posteriores após tratamento com bosentan (100 mg/kg; v.o.), após 10 sessões de estímulo por filamento de von Frey de 15 g, avaliados entre 1 e 6 horas após o tratamento. Cada grupo representa a média  $\pm$  e.p.m. de 6 - 8 animais (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido do teste de Bonferroni).

#### 4.11 Efeito do tratamento com antagonista dual para os receptores $ET_A/ET_B$ na locomoção após trauma medular.

No intuito de avaliar se seria possível prevenir ou reduzir o desenvolvimento de sensibilidade mecânica nos animais lesados medulares com o tratamento com bosentan, o mesmo foi administrado por via oral entre o primeiro e o sétimo dia após o trauma medular, conforme ilustra a figura 14 (v.o. 100 mg/kg). No entanto, não observamos melhora significativa entre os grupos tratado e veículo em nenhum dos períodos avaliados pela escala BBB durante os 28 dias.



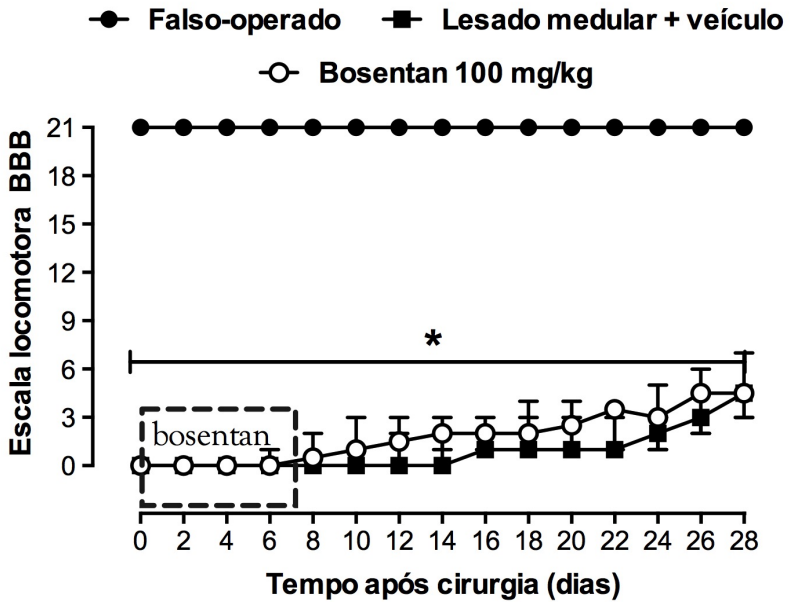
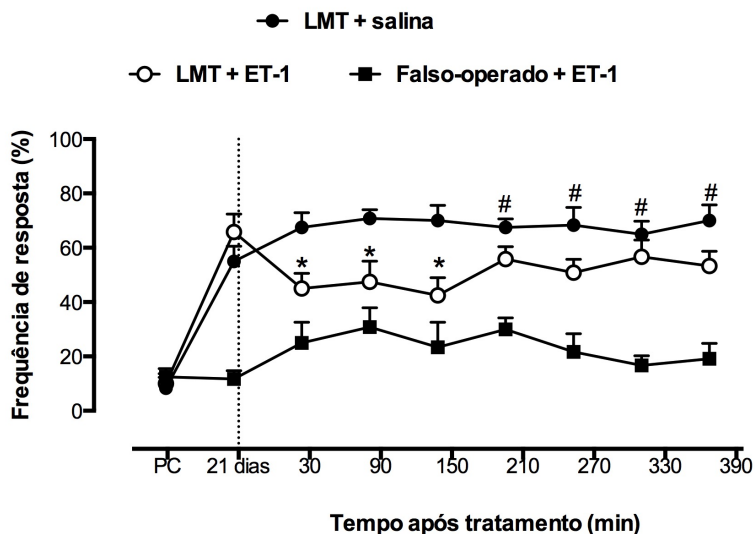


Figura 15. Avaliação da atividade locomotora de animais submetidos à lesão da medula espinhal e tratamento oral diário com bosentan, através da escala BBB. Círculos fechados em preto representam o grupo de animais falso-operados, quadrados fechados representam os animais lesados medulares e o grupo tratado é representado pelo círculo aberto. Cada grupo representa a mediana e intervalos interquartis de 6 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo falso-operado. \* $P < 0,05$  (teste *U* de Whitney).

#### 4.12 Efeito da injeção intratecal de Endotelina-1 na sensibilidade mecânica após lesão medular traumática

Observamos uma redução significativa na hiperalgesia mecânica quando administramos agonista endotelinérgico dos receptores  $ET_A/ET_B$ , Endotelina-1 (ET-1) intratecal (3  $\mu\text{mol}$ ) no 21º dia após o procedimento cirúrgico entre a 0,5h e 2,5h após a injeção quando comparados ao veículo ( $33,3 \pm 12,6\%$ ,  $32,9 \pm 10,7\%$ ,  $39,2 \pm 4,9\%$ , respectivamente). No entanto, observamos um aumento significativo na hiperalgesia mecânica quando comparado ao grupo falso-operado entre 3h 30 min e 6h 30 min após a injeção de ET-1

( $85,9 \pm 15,0\%$ ,  $135,3 \pm 22,7\%$ ,  $241,3 \pm 37,0\%$ ,  $212,5 \pm 17,9\%$ , respectivamente) (Figura 15).



**Figura 16. Efeito da injeção intratecal de endotelina-1 sobre a reatividade comportamental à estimulação da pata posterior de ratos 21 dias após a lesão medular.** Resposta de frequência e retirada (%) das patas posteriores após injeção (seta) com ET-1 (3 pmol; seta) após 10 sessões de estímulo por filamento de von Frey de 15 g, avaliados entre 30 min e 6 h 30 min após a injeção. Cada grupo representa a média  $\pm$  e.p.m. de 6 - 8 animais. # $P < 0,05$  indicam o nível de significância em comparação ao grupo falso-operado; \* $P < 0,05$ , indicam o nível de significância em comparação ao grupo veículo (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido com teste de Bonferroni).

## 5. DISCUSSÃO

A lesão medular traumática constitui uma lesão neurológica altamente incapacitante, a qual demanda elevados custos econômicos e traz impacto significativo na qualidade de vida, produtividade e longevidade dos pacientes. O lesado medular é afetado por diversas comorbidades, entre as quais se destaca a dor crônica, que resultam em baixa qualidade de vida e alto grau de desconforto ao paciente, além de provocar alterações emocionais e dificultar a socialização e a vida diária. Apesar de parecer contraditória a relação *cadeirante-dor*, a prevalência da dor, no lesado medular, é em torno de 69%, sendo que em um terço dessas pessoas a dor é caracterizada como severa (Siddall e Finnerup, 2006). Embora tenham ocorrido avanços importantes no tratamento e manejo da dor neuropática decorrente de lesão medular, seu tratamento continua sendo um desafio para a prática clínica devido aos efeitos adversos e/ou a estreita janela terapêutica dos medicamentos presentes na clínica. Desse modo, a elucidação dos mecanismos envolvidos e a busca por novos alvos terapêuticos para o tratamento de dores neuropáticas após traumas medulares são fundamentais. Assim, através da utilização de um modelo experimental de lesão medular traumática induzido por compressão, o presente estudo apresenta resultados moleculares e funcionais que apontam os receptores das endotelinas ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> como candidatos a constituírem novo alvo terapêutico com potencial para o tratamento eficaz da dor neuropática de animais com paraplegia.

Primeiramente, utilizou-se um modelo experimental de lesão medular traumática em ratos, de intensidade controlável e dependente do diâmetro do cateter Fogarty inflado no espaço epidural da medula espinhal, corroborando os estudos de Vanický e colaboradores (2001) e Andrade e colaboradores (2011). Com o intuito de obter uma lesão severa da medula espinhal, foi utilizado um cateter inflado até o diâmetro de 4,5 mm, correspondente ao volume de 15 µl de salina, o qual gerou um escore final pela escala BBB de aproximadamente 4 pontos. Nestes animais, após a paraplegia inicial, foi possível observar uma recuperação limitada e gradual da função motora, que não se completou ao longo das 4 semanas de observação. O déficit neurológico persistente caracterizou-se por recuperação parcial, com movimento discreto de todas as três articulações: quadril, joelho e tornozelo. Entretanto, severas anormalidades persistiram, tais como no posicionamento das patas posteriores e na coordenação motora.

Sabe-se que, após lesões parciais da medula espinhal, tanto

mecanismos supraespinhais quanto espinhais participam na recuperação da locomoção. Teoricamente, dependendo do nível e da extensão da lesão, as vias descendentes remanescentes podem assumir as funções da medula espinhal lesionada, relegando os mecanismos espinhais para uma via secundária. Uma possibilidade alternativa é a de que essas vias remanescentes promovam a reorganização do circuito espinhal, de maneira que o circuito espinhal gerador de padrão de passos (GPPs) assumam o papel primário na recuperação da locomoção após lesões parciais (Lundy-Ekman, 2008; Rossignol *et al.*, 2011; Martinez e Rossignol, 2013). Os GPPs espinhais constituem uma rede de neurônios capazes de gerar padrões rítmicos, que contribuem para a execução dos passos por ativarem neurônios motores inferiores ao nível da lesão, provocando flexão e extensão alternada nos quadris e joelhos, e que podem ser ativados por certas vias que se originam no tronco cerebral e descendem até a medula espinhal. Desse modo, como obtivemos uma paraplegia severa, porém com recuperação parcial de movimento e não realizamos uma interrupção total da medula espinhal por transecção, vias neuronais remanescentes podem estar contribuindo para a ativação dos GPPs e a consequente resposta de flexão e extensão observada nos animais.

Lesões espinhais por compressão são difusas e geralmente resultam em cavitação da medula espinhal. Normalmente, a recuperação locomotora está inversamente relacionada com o volume de cavitação e a severidade da lesão. A extensão do dano da substância branca, dependendo da intensidade da lesão, é fortemente relacionada à extensão, ao número e à localização dos tratos espinhais lesionados, resultando nos déficits locomotores. Lesões por compressão entre os segmentos vertebrais T<sub>13</sub> – L<sub>2</sub> podem prejudicar elementos críticos do GPP para a locomoção de membros posteriores, que parece estar localizado entre os segmentos vertebrais lombares L<sub>1</sub> – L<sub>2</sub>, no rato. A recuperação espontânea da locomoção reflete, sem dúvida, mudanças nas interações sensoriais-motoras dentro e entre o GPP espinhal, aferências descendentes supraespinhais e propioespinhais, bem como na retroalimentação sensorial periférica. Assim, embora haja déficits específicos decorrentes da inativação de determinadas vias funcionais, os animais podem, eventualmente, recuperar padrões locomotores funcionais, permitindo a locomoção (Rossignol *et al.*, 2008; Rossignol *et al.*, 2009).

A lesão secundária decorrente do trauma medular envolve mecanismos vasculares, iônicos, bioquímicos, inflamatórios e celulares.

Todos estes ocorrem concomitantemente, são inter-relacionados e potencializam um ao outro (Dumont *et al.*, 2001; Profyris *et al.*, 2004; Fleming *et al.*, 2006; Donnelly e Popovich, 2008). Através de análises histológicas, demonstramos alterações teciduais marcantes na medula espinhal decorrentes da lesão medular traumática.

Na análise histológica da medula espinhal dos animais lesionados sacrificados 2 e 7 dias após a lesão (fase aguda) observou-se que o epicentro é composto por restos celulares que correspondem à necrose de liquefação, histologicamente caracterizada por um fundo amorfo sem evidência de estruturas celulares, com áreas cavitadas imersas em fundo hemorrágico. Este processo necro-hemorrágico corresponde a um estágio agudo da lesão. Nesta fase, a isquemia da medula espinhal leva à redução imediata do seu fluxo sanguíneo, o qual se intensifica nas primeiras horas e dura por 24 horas, e é determinado por uma combinação de fatores locais e sistêmicos (Donnelly e Popovich, 2008). Esta interrupção sanguínea pode ser seguida por uma hiperemia ou reperfusão, ocasionada pela redução do pH, aumentando a área da lesão ao promover o influxo de radicais livres e outras substâncias citotóxicas. A hemorragia na substância cinzenta ocorre nos primeiros 5 minutos após o trauma e determina a redução na perfusão tecidual local. Ela afeta, inicialmente, a porção central da medula espinhal e, progressivamente, através da expansão do hematoma, atinge a substância branca. O edema vasogênico ocorre como resultado da lesão endotelial secundária, a qual determina o aumento da permeabilidade vascular. Este evento pode durar por mais de 15 dias, e está relacionado com o aparecimento da necrose não-hemorrágica da substância branca (Amaral, 2010). Com a expansão da hemorragia e do edema, as substâncias branca e cinzenta se dilatam, perdendo a definição. Neste estágio da lesão secundária, a necrose é acompanhada por apoptose com degeneração de diferentes tipos celulares (Profyris *et al.*, 2004).

Na análise histológica da medula espinhal dos animais lesionados sacrificados durante a fase crônica da lesão medular (14 e 28 dias) observou-se que a presença de áreas cavitadas foi a única característica histológica em comum com a medula dos animais sacrificados na fase aguda. Os cortes histológicos destes animais apresentaram grande quantidade de células balonizadas, envoltas por amplas áreas cavitadas, possivelmente relacionadas com processo necrótico em fase resolutive. A presença dessas células foi observada a partir do sétimo dia após a lesão da medula espinhal, o que sugere ser uma evidência do processo traumático. Marques e colaboradores (2009) descreveram que a medula

espinhal dos animais submetidos à lesão medular traumática apresenta um aumento importante da densidade celular, associado a edema e cavitações, no período de 7 a 56 dias após a indução da lesão. Nossos resultados também corroboram um estudo recente que descreveu o aparecimento de lesões cavitadas com células balonizadas na medula espinhal de animais sacrificados 7, 14, 21 e 28 dias após a indução da lesão medular traumática (Zhang *et al.*, 2011).

Uma vez obtida uma lesão medular traumática severa reprodutível e quantificável, avaliamos o perfil de resposta nociceptiva à estimulação mecânica repetida das patas, aplicada através de filamentos de von Frey. Desse modo, observou-se que os animais apresentaram hiperalgesia somente abaixo do nível da lesão, sugerindo que áreas supraespinhais não foram afetadas com o trauma medular. Interessantemente, no período de 2 dias após a lesão medular os animais têm uma queda significativa da resposta quando comparada à avaliação *a priori* da cirurgia, e isso se deve ao choque medular característico após uma lesão medular, correspondendo à suspensão transitória da função e reflexos abaixo do nível da lesão. Os sintomas são: a perda de sensibilidade, paralisia flácida, ausência de reflexos profundos e abolição da atividade somática reflexa, tendo também alteração térmica abaixo do nível da lesão (Tuli *et al.*, 2007; Popa *et al.*, 2010). O choque medular pode durar de dias a semanas, porém os seus efeitos precoces geralmente desaparecem dentro de 24 horas após a lesão. Corroborando esse conjunto de sintomas, observamos que o modelo utilizado neste estudo promoveu alteração locomotora severa, seguida de recuperação parcial gradual, de modo que os animais apresentaram ausência de sensibilidade nociceptiva térmica nos períodos agudos após o trauma e retornaram aos seus níveis basais nos períodos crônicos. Além disso, diversos estudos têm demonstrado alterações na nociceção mecânica e térmica após o trauma medular (Christensen *et al.*, 1996; Gwak *et al.*, 2004; Nakae *et al.*, 2011; Sandhir *et al.*, 2011; Barchini *et al.*, 2012; Watson *et al.*, 2014).

A lesão medular promove uma plasticidade medular caracterizada por alterações na responsividade neuronal através da ativação de fibras nociceptivas silenciosas e alterações anatômicas nas sinapses. Esses mecanismos contribuem para as mudanças nas características de resposta dos neurônios no corno dorsal da medula espinhal em ratos com alodinia (Siddall e Finnerup, 2006; Finnerup e Bastrup, 2012; Sharp *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013). Além disso, ocorre um brotamento de fibras sensoriais aferentes e uma disfunção do sistema inibitório de

neurotransmissão envolvendo GABA e glicina (Sorkin e Puig, 1996; Christensen e Hulsebosch, 1997; Baba *et al.*, 2003; Krassioukov *et al.*, 2003; Ehlers, 2004; Dubin e Patapoutian, 2010; O'callaghan *et al.*, 2011; Schomberg *et al.*, 2012). Adicionalmente, a lesão medular acarreta um aumento expressivo de células inflamatórias e de mediadores inflamatórios na medula espinhal (Profyris *et al.*, 2004). As alterações nociceptivas mecânicas e térmicas estão relacionadas, diretamente, ao aumento da liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, na região lombar da medula espinhal, local onde ocorre o processamento da alodinia mecânica, assim essas citocinas modulam a sensibilização dos neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal (Clark *et al.*, 2013).

Em relação aos receptores de endotelinas, sugere-se a participação do receptor ET<sub>A</sub> na promoção da isquemia medular pós-traumática (Dawson *et al.*, 1999; Barone *et al.*, 2000), enquanto o receptor ET<sub>B</sub> está envolvido com o processo de gliose reativa (Ishikawa *et al.*, 1997; Koyama *et al.*, 1999). Ambos os receptores estão expressos na medula espinhal de ratos submetidos à compressão medular em populações distintas de células vasculares, gliais e neuronais, sendo que o receptor ET<sub>B</sub> tem sua expressão aumentada em células gliais, enquanto a expressão vascular, tanto de receptores ET<sub>A</sub> quanto de ET<sub>B</sub>, parece não sofrer alterações (Peters *et al.*, 2003)

Nesse contexto, quando realizamos a avaliação dos níveis de RNAm para os ambos os receptores para endotelina nos segmentos torácicos T<sub>8</sub>-T<sub>11</sub> da medula espinhal, observamos um aumento significativo de RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> no grupo lesado medular do 7<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia. Em consonância com esses achados, observou-se ainda que os níveis de expressão do receptor ET<sub>A</sub> na medula espinhal de animais com lesão medular estavam significativamente aumentados no 21<sup>o</sup> dia após o procedimento cirúrgico. Esse aumento parece decorrer de elevação na taxa de transcrição de RNAm dos receptores ET<sub>A</sub>, uma vez que ele já foi significativo nos lesados medulares no 7<sup>o</sup> dia após o trauma medular e persistiu até o último período avaliado. Talvez seja pertinente ressaltar que, geralmente, os receptores ET<sub>A</sub> são internalizados e reciclados para a membrana, enquanto os receptores ET<sub>B</sub> são apenas internalizados (Bremnes *et al.*, 2000; Khimji e Rockey, 2010).

Apesar dos níveis de expressão do receptor ET<sub>B</sub> não estarem aumentados em quaisquer dos momentos examinados após a lesão, houve um aumento da taxa de transcrição do seu RNAm na medula

espinal 2, 7 e 28 dias após a lesão, sugerindo que o dano medular tenha reduzido a taxa de renovação desses receptores no tecido. Apesar de Peters e colaboradores (2003) relatarem uma maior distribuição dos receptores ET<sub>A</sub> do que ET<sub>B</sub> na medula espinal de ratos, observamos níveis semelhantes de expressão desses receptores nos animais que utilizamos neste estudo. No entanto, os níveis de RNAm encontrados para os receptores ET<sub>A</sub> foram aproximadamente cem vezes maiores do que para os receptores ET<sub>B</sub> na medula espinal, sugerindo uma maior transcrição daquele receptor.

Os receptores ET<sub>A</sub> estão distribuídos tanto em neurônios e células da glia, como também em células vasculares, incluindo as células musculares lisas e endoteliais (Vigne *et al.*, 1993; Stanimirovic *et al.*, 1994; De Oliveira *et al.*, 1995; Lysko *et al.*, 1995). Assim, o aumento de RNAm para receptor ET<sub>A</sub> detectado na medula espinal no momento agudo após o trauma sugere um aumento na transcrição do RNAm no processo inflamatório e hemorrágico inicial, já que o aumento de sua expressão está relacionado à hemorragia subaracnóide e à isquemia (Clozel e Watanabe, 1993; Macrae *et al.*, 1993). Já nos períodos crônicos pode-se sugerir que há um aumento nas células gliais, uma vez que é nessa fase mais tardia que se iniciam os processos de cicatrização glial e de degeneração Walleriana. Tal suposição é baseada em dados que demonstram o aumento da expressão de receptores ET<sub>A</sub> em astrócitos após lesões no sistema nervoso central e sua participação na degeneração axonal resultante do trauma, em especial através da entrada de cálcio nos axônios lesados e a consequente ativação de caspases, resultando em fragmentação axonal (Buki e Povlishock, 2006). Além disso, pode-se sugerir que a ativação das células gliais e consequentemente o aumento da expressão desses receptores contribui para a manutenção da dor crônica após dano medular.

Corroborando esses achados, nossos resultados demonstram que na substância cinzenta da medula espinal há um aumento da expressão do receptor ET<sub>A</sub> no 14º dia após o trauma medular, ainda que alterações dos receptores ET<sub>B</sub> não tenham sido detectadas. Além disso, é importante salientar que a expressão dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na substância branca da medula espinal foi semelhante um ao outro e não se apresentou modificada em quaisquer dos diferentes períodos avaliados após o trauma. Ademais, Peters e colaboradores (2003) já sugeriam que a vasoconstrição observada após lesões no SNC seria decorrência da baixa expressão de receptores ET<sub>B</sub>, que exercem, geralmente, ações vasodilatadoras.



Interessantemente, os níveis de RNAm para ET-1 foram alterados no período agudo após o trauma. A primeira evidência da participação das endotelinas na degeneração da medula espinhal após o trauma medular demonstrou o aumento na expressão de ET-1 ao longo da medula espinhal, o qual se relacionou diretamente com a ruptura da barreira hematoencefálica (McKenzie et al., 1995). Além disso, sabe-se que, durante o processo de regeneração do sistema nervoso central, o surgimento de astrócitos imaturos, que acaba por resultar em gliose, é fundamental para o processo de recuperação tecidual. Dessa forma, Uesugi e colaboradores (1996) demonstraram que a ET-1 parece ser um fator determinante no desenvolvimento astrocítico observado após a lesão medular.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram a importante participação das endotelinas e seus receptores no desenvolvimento de alterações na nocicepção mecânica em diferentes modelos. Werner e colaboradores (2010) demonstraram que as endotelinas podem alterar as respostas nociceptivas a estímulos térmicos no modelo de ligação do nervo espinhal L5/L6 e que o tratamento com o antagonista ET<sub>A</sub> (BQ-123), mas não ET<sub>B</sub> (BQ-788) foi capaz de reduzir a dor causada por injeção de ET-1. Por outro lado, Chichorro e colaboradores (2010) em um modelo de neuralgia do trigêmeo demonstraram que ambos os antagonistas dos receptores de endotelina reduziram a nocicepção induzida por injeção de ET-1 no lábio superior ou na articulação temporomandibular. Ademais, Motta e colaboradores (2006) relataram que injeções intraplantares de ET-1 nas patas posteriores de ratos causavam hiperalgesia mecânica e que isso é dependente das vias de sinalização que envolvem fosfolipase C, fosfoquinase C e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs; p38, ERK 1/2 e JNK).

Assim, em nosso modelo de lesão medular traumática observamos que os animais com lesão medular não desenvolveram aumento de frequência de respostas à estimulação mecânica dos membros anteriores com qualquer dos filamentos de von Frey utilizados (4 ou 15 gramas), sugerindo a ausência de hiperalgesia acima do nível da lesão medular. No entanto, os animais lesados medulares tiveram um aumento significativo em comparação ao grupo falso-operado nas respostas ao estímulo mecânico das patas posteriores, tanto com o filamento de 4 gramas quanto com o de 15. Essas alterações de sensibilidade foram significantes desde o dia 14 até o dia 28 após o procedimento cirúrgico. Porém, a maior frequência de retirada das patas

ocorreu com o filamento de 15 gramas no 21<sup>o</sup> dia quando comparado ao grupo falso-operado.

Desse modo, para verificar se as endotelinas participariam da hiperalgesia mecânica causada pela lesão medular traumática, os animais lesados medulares receberam um tratamento por injeção intratecal de BQ-123 (antagonista do receptor ET<sub>A</sub>), BQ-788 (antagonista do receptor ET<sub>B</sub>) ou veículo no 21<sup>o</sup> dia após o trauma medular e suas reatividade à estimulação mecânica foram avaliadas por um período de 4 horas e meia. Ao antagonizar os receptores ET<sub>A</sub>, observamos uma redução significativa na hiperalgesia mecânica entre 150 e 210 minutos, quando comparado ao veículo, com reversão gradual do efeito em períodos subsequentes. Por outro lado, apesar dos receptores ET<sub>B</sub> terem sido relacionados a mediação de respostas inflamatórias à ET-1 e dores centrais (Yamamoto *et al.*, 1994; Baamonde *et al.*, 2004; Da Cunha *et al.*, 2004; Hasue *et al.*, 2004), a redução da frequência de respostas observada após a administração do antagonista de ET<sub>B</sub> (BQ-788) não foi significativa em relação ao veículo, sugerindo que, de fato, os receptores ET<sub>A</sub> podem ter uma maior participação após o trauma medular, inclusive na resposta dolorosa. Esta possibilidade é reforçada pela demonstração de que houve maior expressão de receptores ET<sub>A</sub> na medula espinhal no 21<sup>o</sup> dia após a lesão medular traumática. Ademais, tem sido demonstrado que os receptores ET<sub>A</sub> estão presentes em fibras aferentes primárias que chegam às lâminas I e II do corno da medula espinhal (Peters, 2003), fibras estas que estão diretamente relacionadas à transmissão da dor da periferia para o SNC.

Como discutido anteriormente, há um aumento nas células gliais, uma vez que se inicia o processo de cicatrização glial e de degeneração Walleriana. Além disso, sabe-se que há um aumento da expressão de receptores ET<sub>A</sub> em astrócitos após lesões no sistema nervoso central e sua participação na degeneração axonal resultante do trauma. Sabe-se que a ativação das células gliais e a comunicação das mesmas com os neurônios têm sido considerado primordiais no desenvolvimento e manutenção da dor crônica. Estudos recentes implicam três tipos de células gliais no desenvolvimento e manutenção da dor crônica: as microglias e os astrócitos, no sistema nervoso central, e as células gliais satélites no gânglio da raiz dorsal (Berta *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014). Das células residentes no SNC, as primeiras a responder são as microglias, seguidas pelos astrócitos. Além disso, as síndromes dolorosas estão associadas com a reação glial, a

fosforilação de MAPKs e a síntese de mediadores gliais, como citocinas e quimiocinas, e sua liberação para o espaço extracelular (Gao e Ji, 2009; Gosselin *et al.*, 2010; Taves *et al.*, 2013).

Além disso, sugere-se que receptores ET<sub>A</sub> estejam envolvidos na dor neuropática após constrição do nervo ciático (Klass *et al.*, 2005). Em estudos prévios, demonstrou-se que a administração de antagonistas de receptores ET<sub>A</sub> atenua a alodinia em modelo de dor neuropática por diabetes, sugerindo uma interação endógena entre ET-1 e receptores ET<sub>A</sub> na sensibilização mecânica (Jarvis *et al.*, 2000).

Interessantemente, Guo e colaboradores (2014) demonstraram que o bloqueio dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> das endotelinas, com antagonistas peptídicos, reduz o número de neutrófilos circulantes e de monócitos na circulação periférica após o trauma medular em camundongos. O mesmo estudo demonstrou que o bloqueio dos receptores ET<sub>B</sub> pelo antagonista BQ-788 não foi capaz de reduzir os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6. No entanto, o antagonista do receptor ET<sub>A</sub>, BQ-123, foi capaz de não somente reduzir os níveis dessas citocinas, como também, de TNF- $\alpha$  e a expressão de iNOS no sítio da lesão medular. Além disso, a combinação de tratamento de BQ-123 e BQ-788 também reduziu os níveis desses mediadores inflamatórios. Assim, corroborando os resultados relatados por Guo e colaboradores, quando tratamos os animais lesados medulares do nosso modelo de estudo com BQ-123 obtivemos uma significativa redução na resposta à sensibilidade ao estímulo mecânico, enquanto não observamos alterações no tratamento com BQ-788.

Atualmente, antagonistas duais (ou mistos) de receptores ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub>, como o bosentan, ou seletivos de receptores ET<sub>A</sub> para endotelinas, estão aprovados para uso clínico no tratamento da hipertensão pulmonar e de ulcerações digitais em pacientes com Síndrome de Raynaud primária ou decorrente de esclerose múltipla. Nesses últimos, o tratamento reduz o surgimento de novas lesões e reduz a dor associada à condição (Steen *et al.*, 2009; Ichimura *et al.*, 2011; O'Callaghan *et al.*, 2011).

Quando os animais foram tratados por via oral com bosentan, observou-se uma redução significativa na frequência de resposta à estimulação mecânica na dose de 30 mg/kg apenas em 2 horas, enquanto que a maior dose reduziu entre 2 e 4 horas após o tratamento. O bosentan, que é um antagonista não peptídico tanto para receptores ET<sub>A</sub> quanto ET<sub>B</sub>, atravessa a barreira hematoencefálica (Patel *et al.*, 1994; Gabbay *et al.*, 2007) e atenua o rompimento da barreira hematoespinhal

provocado pela lesão medular traumática (McKenzie *et al.*, 1995). Além disso, este último estudo demonstrou ainda que, quando o bosentan foi administrado antes da indução do trauma medular, foi capaz de diminuir o dano adjacente (caudal e rostral) ao sítio da lesão. Assim, ficou demonstrado que as endotelinas, de fato, possuem um envolvimento na modulação da permeabilidade da medula espinhal após o trauma medular. Um possível mecanismo pelo qual as endotelinas podem contribuir para a alteração da permeabilidade hematoespinhal após a lesão medular é pela facilitação da isquemia secundária. Vários estudos realizados desde a década de 80 tem descrito alteração do fluxo sanguíneo na medula espinhal após o trauma medular, especialmente no sítio da lesão (Dow-Edwards *et al.*, 1980; Faden *et al.*, 1981; Young *et al.*, 1981).

Adicionalmente, McKenzie e colaboradores (1995) demonstraram aumento da expressão de receptores para endotelinas na área da lesão medular. Desse modo, as endotelinas podem contribuir para a permeabilidade anormal através da isquemia secundária pós-traumática e da vasoconstrição da microvascularização da medula espinhal, uma vez que há uma redução do fluxo sanguíneo espinhal no sítio da lesão medular. Ademais, o bloqueio dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> e dos receptores ET<sub>B</sub> localizados nos astrócitos após a lesão medular pode reduzir tanto a isquemia quanto a astrogliose, facilitando a sobrevivência neuronal, regeneração e, conseqüentemente, uma recuperação funcional neurológica (Peters *et al.*, 2003). Em um recente trabalho recente, Fingley e colaboradores (2014) sugeriram que o rompimento da barreira hemato-espinhoencefálica após o trauma medular pode gerar o influxo de mediadores inflamatórios e proteínas que não atuam fisiologicamente no SNC. Assim, esse rompimento promove uma oportunidade única para intervenções terapêuticas.

Além disso, pode-se sugerir que o bloqueio dual dos receptores endotelinérgicos pode reduzir o processo inflamatório, através da redução de citocinas pró-inflamatórias e infiltração leucocitária após a lesão medular, uma vez que, como discutido anteriormente, antagonistas peptídicos em tratamento conjunto produzem esse efeito, assim a relação entre os receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> após o dano medular possa ser de cooperação e não de antagonismo, tal como sugerido por Guo e colaboradores (2014). No entanto, quando realizamos o tratamento diário com bosentan durante 7 dias consecutivos, com início no primeiro dia após a lesão medular, não observamos qualquer efeito preventivo no desenvolvimento da dor crônica em qualquer dos períodos avaliados.

Do mesmo modo, não foi observado alterações na locomoção com o tratamento diário de bosentan. Assim, estes resultados sugerem que o bosentan não é capaz de prevenir o desenvolvimento da dor, mas, quando a mesma já é manifesta, é capaz de reduzir sua intensidade de forma transitória mas sistemática. Assim, demonstramos que há uma influência do sistema endotelinérgico no controle da dor neuropática após o trauma medular.

A pregabalina é, clinicamente, a droga de escolha para o tratamento de dores neuropáticas e dores espontâneas de lesados medulares (Siddall *et al.*, 2006). Após o trauma medular, há um aumento da expressão da subunidade  $\alpha 2\delta$ -1 dos canais de cálcio dependentes de voltagem, local de ligação da pregabalina, através do qual se pode mediar ações analgésicas (Gee *et al.*, 1996; Field *et al.*, 2006). Diante desses aspectos, nos experimentos com bosentan, incluímos uma avaliação dos efeitos antihiperálgicos da pregabalina, como um controle positivo dos nossos tratamentos. Observamos que a pregabalina não causou sedação nos animais lesados medulares quando administrado oralmente, mas reduziu significativamente a hiperálgia mecânica entre 1 e 5 horas após o tratamento. Desse modo, podemos sugerir que o tratamento com bosentan atenua a dor apenas em algumas horas por se ligar em receptores acoplados à proteína G, enquanto que a ação analgésica da pregabalina é observada logo após o tratamento, por estar associada a canal iônico.

Até o momento, diversos trabalhos tem relatado que a injeção central de ET-1 causa um efeito analgésico central, em contraste com a hiperálgia que este mediador causa quando administrado na periferia em modelos distintos de dor (Yamamoto *et al.*, 1994; Hasue *et al.*, 2004). No entanto, Tai e colaboradores (2013) demonstraram, através de um modelo de constrição do nervo ciático, que injeções intratecais de BQ-123 foram capazes de aumentar o limiar nociceptivo dos animais, sugerindo que a ET-1 e os receptores ET<sub>A</sub> interagem normalmente no SNC para a sensibilização à dor neuropática. Além disso, Tai e colaboradores (2013) também sugerem que ET-1 exerce seus efeitos analgésicos centrais somente quando há injeção em *bolus* no SNC, mas não em níveis fisiológicos em processo patológico. Corroborando os achados de Tai e colaboradores (2013), também observamos que a administração intratecal do antagonista de receptores ET<sub>A</sub> reduziu a hiperálgia mecânica no nosso modelo de lesão medular.

Além disso, Hung e colaboradores (2014) sugerem que o efeito antihiperálgico central de ET-1 em um modelo de constrição do nervo

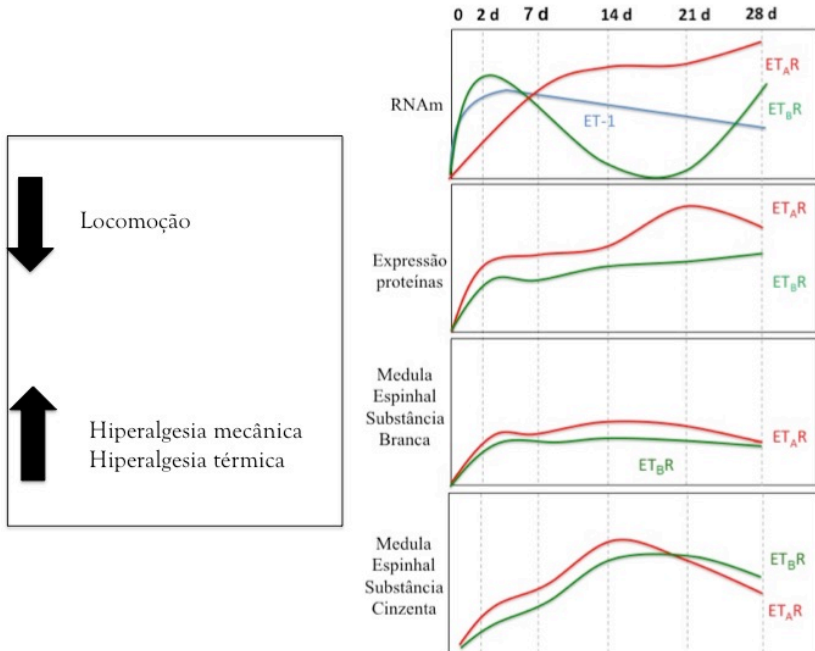
ciático pode ser através da inibição de ERK1/2 e Akt através da ativação do receptor ET<sub>A</sub>, assim nossos resultados podem sugerir que o efeito central de ET-1 na lesão medular traumática pode ser pela mesma via, no entanto, estudos mais aprofundados precisam ser realizados para elucidar tais mecanismos.

Estudos prévios demonstraram a indução de dor por ET-1, principalmente através de receptores ET<sub>A</sub>, em dores inflamatórias periféricas e centrais, sugerindo a existência de diferentes mecanismos envolvidos na modulação central da dor processada por ET-1. Nossos resultados demonstram que a injeção intratecal de BQ-123 foi capaz de reduzir a hiperalgesia nos animais, enquanto o mesmo não foi observado com o BQ-788, estando de acordo com os dados apresentados por Klass e colaboradores e Tai e colaboradores. Assim, observamos no nosso modelo que o bloqueio de receptores ET<sub>A</sub> atenua o desenvolvimento da dor neuropática após a lesão medular traumática.

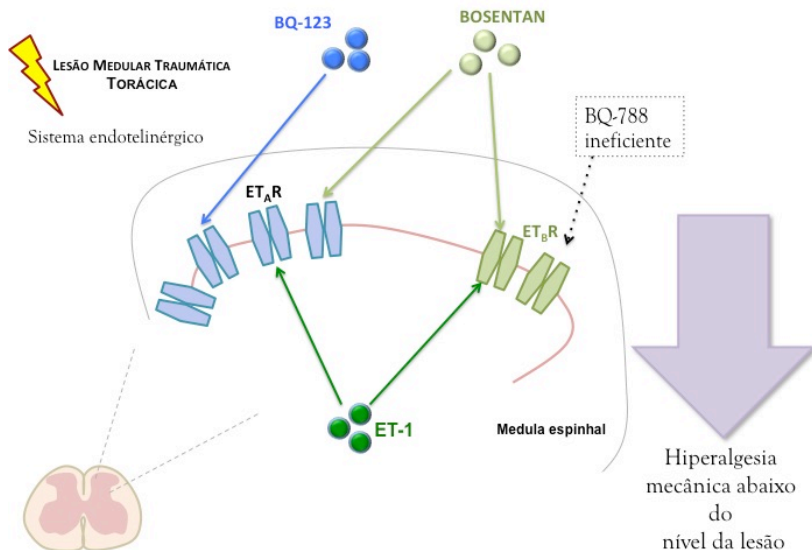
Por fim, a demonstração do desenvolvimento de dor neuropática após a lesão medular e o envolvimento do sistema endotelinérgico, em especial, dos receptores ET<sub>A</sub> no desenvolvimento e manutenção da dor após o traumatismo medular vem ao encontro de diversos estudos farmacológicos que têm demonstrado a participação desses receptores em outros processos dolorosos decorrentes de patologias distintas.

Apesar de não haver ainda uma vasta e atualizada literatura acerca do envolvimento desses receptores na dor neuropática decorrente de trauma medular, o presente estudo é um dos primeiros a demonstrar a importante participação de ambos os receptores endotelinérgicos, porém com uma participação mais pronunciada dos receptores ET<sub>A</sub>. Assim, podemos visualizar de maneira resumida as alterações desses receptores e do peptídeo ET-1 após o trauma medular nas figuras 16 e 17.

Por fim, este estudo abre novas possibilidades para tratamento da dor neuropática decorrente de lesão medular, em especial, uma investigação aprofundada sobre a utilização de bosentan, droga que já é usada na clínica para hipertensão arterial pulmonar.



**Figura 17. Diagrama esquemático das alterações do sistema endotelínico promovidos pela lesão medular traumática.** A lesão medular traumática promoveu aumento dos níveis de RNAm para os receptores ET<sub>A</sub> (ET<sub>A</sub>R), ET<sub>B</sub> (ET<sub>B</sub>R) e ET-1 na medula espinhal. Ocorreu um aumento da expressão de ET<sub>A</sub>R na medula espinhal 21 dias após o dano medular. Subsequentemente a lesão medular resultou em um aumento de ET<sub>A</sub>R na substância cinzenta, mas não na substância branca, na medula espinhal no 14º dia após o trauma.



**Figura 18. Mecanismos propostos para a participação dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> na dor neuropática decorrente da lesão medular.** A lesão medular traumática resulta em um aumento da expressão de receptores ET<sub>A</sub>, principalmente na substância cinzenta da medula espinal. O bloqueio destes receptores por antagonistas seletivos para esses receptores (BQ-123) e por um antagonista dual para receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> (bosentan) e administração de ET-1 no SNC reduzem significativamente a hiperalgisia mecânica decorrente do trauma medular.



## 6.CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que a lesão medular traumática decorrente de compressão por catéter de embolectomia em ratos é um modelo importante para avaliar as alterações histológicas, moleculares e funcionais dos receptores endotelinérgicos na dor neuropática em decorrente de trauma medular.

Apesar da translacionalidade para a clínica ser complexa, nossos resultados permitem apontar o sistema endotelinérgico como sendo importante no controle da dor crônica, constituindo portanto um potencial alvo terapêutico. Por fim, o entendimento acerca da participação dos receptores  $ET_A$  e  $ET_B$  na dor neuropática após lesão medular traumática pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento desta importante comorbidade.



## 7.REFERÊNCIAS

ABUL-KASIM, K.; STRÖMBECK, A.; SUNDGREN, P. C. Spinal Cord Injuries. In: BERKOVSKY, T. C. (Ed.). **Handbook of Spinal Cord Injuries**. New York: Nova Science Publishers, 2010.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v. 1000, n. 1-2, p. 40-56, Mar 12 2004.

AMARAL, S. H. Physiopathology of spinal cord injury. . In: (Ed.). **Handbook of Spinal Cord Injuries**. New York, NY: Nova Science Publishers, 2010. p.681-691.

ANDRADE, E. L. et al. TRPA1 receptor modulation attenuates bladder overactivity induced by spinal cord injury. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 300, n. 5, p. F1223-34, May 2011.

ARAI, H. et al. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature**, v. 348, n. 6303, p. 730-2, Dec 20-27 1990.

BAAMONDE, A. et al. Involvement of endogenous endothelins in thermal and mechanical inflammatory hyperalgesia in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 369, n. 2, p. 245-51, Feb 2004. I

BABA, H. et al. Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. **Mol Cell Neurosci**, v. 24, n. 3, p. 818-30, Nov 2003.

BAPTISTE, D. C.; FEHLINGS, M. G. Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 3-4, p. 318-34, Mar-Apr 2006.

BARCHINI, J. et al. Spinal segmental and supraspinal mechanisms underlying the pain-relieving effects of spinal cord stimulation: an experimental study in a rat model of neuropathy. **Neuroscience**, v. 215, p. 196-208, Jul 26 2012.

BARONE, F. C. et al. Selective antagonism of endothelin-A-receptors improves outcome in both head trauma and focal stroke in rat. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S357-61, Nov 2000.

BARR, T. P. et al. New perspectives on the endothelin axis in pain. **Pharmacol Res**, v. 63, n. 6, p. 532-40, Jun 2011.

BASBAUM, A. E.; JESSEL, T. M. The perception of pain. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H., *et al* (Ed.). **The principles of Neural Science**. New York: McGraw-Hill, 2000.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, Oct 16 2009. I

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J Neurotrauma**, v. 12, n. 1, p. 1-21, Feb 1995.

\_\_\_\_\_. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. **Exp Neurol**, v. 139, n. 2, p. 244-56, Jun 1996.

BEATTIE, M. S. et al. Cell death in models of spinal cord injury. **Prog Brain Res**, v. 137, p. 37-47, 2002.

BERGOUIGNAN, M. [Anti-epileptic drugs in the treatment of essential trigeminal neuralgia]. **Presse Med**, v. 78, n. 42, p. 1832-4, Oct 10 1970.

BERTA, T. et al. Acute morphine activates satellite glial cells and up-regulates IL-1beta in dorsal root ganglia in mice via matrix metalloprotease-9. **Mol Pain**, v. 8, p. 18, 2012.

BERTI-MATTERA, L. N. et al. Reduced expression of endothelin B receptors and mechanical hyperalgesia in experimental chronic diabetes. **Exp Neurol**, v. 201, n. 2, p. 399-406, Oct 2006.

BINGHAM, B. et al. The molecular basis of pain and its clinical implications in rheumatology. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 5, n. 1, p. 28-37, Jan 2009.

BOLAND, R. A. et al. Adaptation of motor function after spinal cord injury: novel insights into spinal shock. **Brain**, v. 134, n. Pt 2, p. 495-505, Feb 2011.

BREMNES, T. et al. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. **J Biol Chem**, v. 275, n. 23, p. 17596-604, Jun 9 2000.

BUKI, A.; POVLISHOCK, J. T. All roads lead to disconnection?--Traumatic axonal injury revisited. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 148, n. 2, p. 181-93; discussion 193-4, Feb 2006.

CARLSON, N. G. et al. Cyclooxygenase-2 expression in oligodendrocytes increases sensitivity to excitotoxic death. **J Neuroinflammation**, v. 7, p. 25, 2010.

CHEN, G. et al. Connexin-43 induces chemokine release from spinal cord astrocytes to maintain late-phase neuropathic pain in mice. **Brain**, v. 137, n. Pt 8, p. 2193-209, Aug 2014.

CHENG, J. K.; CHIOU, L. C. Mechanisms of the antinociceptive action of gabapentin. **J Pharmacol Sci**, v. 100, n. 5, p. 471-86, 2006.

CHICHORRO, J. G. et al. Endothelins as pronociceptive mediators of the rat trigeminal system: role of ETA and ETB receptors. **Brain Res**, v. 1345, p. 73-83, Jul 23 2010.

CHRISTENSEN, M. D. et al. Mechanical and thermal allodynia in chronic central pain following spinal cord injury. **Pain**, v. 68, n. 1, p. 97-107, Nov 1996.

CHRISTENSEN, M. D.; HULSEBOSCH, C. E. Spinal cord injury and anti-NGF treatment results in changes in CGRP density and distribution in the dorsal horn in the rat. **Exp Neurol**, v. 147, n. 2, p. 463-75, Oct 1997.

CLOZEL, M.; WATANABE, H. BQ-123, a peptidic endothelin ETA receptor antagonist, prevents the early cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage after intracisternal but not intravenous injection. **Life Sci**, v. 52, n. 9, p. 825-34, 1993.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **BMJ**, v. 348, p. f7656, 2014.

COLBURN, R. W.; DELEO, J. A. The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. **Brain Res Bull**, v. 49, n. 6, p. 419-27, Aug 1999.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p. 1-32, 2009.

CUNHA, T. M.; DIAS, Q. M. Glial modulation of pain: a step beyond. **J Neurosci**, v. 29, n. 11, p. 3340-2, Mar 18 2009.

D'AMICO, M. et al. Endothelin-1 in periaqueductal gray area of mice induces analgesia via glutamatergic receptors. **Pain**, v. 65, n. 2-3, p. 205-9, May-Jun 1996.

D'AMICO, M.; DI FILIPPO, C.; ROSSI, F. Selective and non-selective ET antagonists reveal an ET(A)/ET(B) receptor mediated ET-1-induced antinociceptive effect in PAG area of mice. **Life Sci**, v. 61, n. 25, p. PL 397-401, 1997. I

DA CUNHA, J. M. et al. Endothelins induce ETB receptor-mediated mechanical hypernociception in rat hindpaw: roles of cAMP and protein kinase C. **Eur J Pharmacol**, v. 501, n. 1-3, p. 87-94, Oct 6 2004.

DASARI, V. R.; VEERAVALLI, K. K.; DINH, D. H. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review. **World J Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 120-33, Apr 26 2014.

DAVENPORT, A. P.; MAGUIRE, J. J. Endothelin. **Handb Exp Pharmacol**, n. 176 Pt 1, p. 295-329, 2006.

DAVID, S.; KRONER, A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 7, p. 388-99, Jul 2011.

DAWSON, D. A. et al. Endothelin receptor antagonist preserves microvascular perfusion and reduces ischemic brain damage following

permanent focal ischemia. **Neurochem Res**, v. 24, n. 12, p. 1499-505, Dec 1999.

DE OLIVEIRA, A. M. et al. Characterization of endothelinA receptors in cerebral and peripheral arteries of the rat. **Peptides**, v. 16, n. 1, p. 139-44, 1995.

DETLOFF, M. R. et al. Acute and chronic tactile sensory testing after spinal cord injury in rats. **J Vis Exp**, n. 62, p. e3247, 2012.

DEVOR, M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. **J Pain**, v. 7, n. 1 Suppl 1, p. S3-S12, Jan 2006.

DITUNNO, J. F. et al. Spinal shock revisited: a four-phase model. **Spinal Cord**, v. 42, n. 7, p. 383-95, Jul 2004.

DONNELLY, D. J.; POPOVICH, P. G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 209, n. 2, p. 378-88, Feb 2008.

DOW-EDWARDS, D. et al. Effect of aminophylline and isoproterenol on spinal cord blood flow after impact injury. **J Neurosurg**, v. 53, n. 3, p. 385-90, Sep 1980.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3760-72, Nov 2010.

DUMONT, R. J. et al. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. **Clin Neuropharmacol**, v. 24, n. 5, p. 254-64, Sep-Oct 2001.

DUNHAM, K.; FLOYD, C. Contusion Models of Spinal Cord Injury in Rats. In: LANE, E. L. e DUNNETT, S. B. (Ed.). **Animal Models of Movement Disorders**: Humana Press, v.62, 2011. cap. 18, p.345-362. (Neuromethods).

DZAU, V. J.; PIZZO, P. A. Relieving pain in america: Insights from an institute of medicine committee. **JAMA**, v. 312, n. 15, p. 1507-1508, 2014.

EHLERS, M. D. Deconstructing the axon: Wallerian degeneration and the ubiquitin-proteasome system. **Trends Neurosci**, v. 27, n. 1, p. 3-6, Jan 2004.

FADEN, A. I. et al. Endorphins in experimental spinal injury: therapeutic effect of naloxone. **Ann Neurol**, v. 10, n. 4, p. 326-32, Oct 1981.

FAULKNER, J. R. et al. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 24, n. 9, p. 2143-55, Mar 3 2004.

FAWCETT, J. W.; ASHER, R. A. The glial scar and central nervous system repair. **Brain Res Bull**, v. 49, n. 6, p. 377-91, Aug 1999.

FEHLINGS, M. G.; WILSON, J. R.; CHO, N. Methylprednisolone for the treatment of acute spinal cord injury: counterpoint. **Neurosurgery**, v. 61 Suppl 1, p. 36-42, Aug 2014.

FERREIRA, S. H.; ROMITELLI, M.; DE NUCCI, G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 13 Suppl 5, p. S220-2, 1989.

FIELD, M. J. et al. Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 46, p. 17537-42, Nov 14 2006.

FIGLEY, S. A. et al. Characterization of vascular disruption and blood-spinal cord barrier permeability following traumatic spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 31, n. 6, p. 541-52, Mar 15 2014.

FINNERUP, N. B. Pain in patients with spinal cord injury. **Pain**, v. 154 Suppl 1, p. S71-6, Dec 2013.

FINNERUP, N. B.; BAASTRUP, C. Spinal cord injury pain: mechanisms and management. **Curr Pain Headache Rep**, v. 16, n. 3, p. 207-16, Jun 2012.



FITCH, M. T.; SILVER, J. Glial cells, inflammation, and CNS trauma. Modulation of the inflammatory environment after injury can lead to long-distance regeneration beyond the glial scar. In: KORDOWER, J. H. e TUSZYNSKI, M. H. (Ed.). **CNS Regeneration**. London: Academic Press, 2008.

FLEMING, J. C. et al. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. **Brain**, v. 129, n. Pt 12, p. 3249-69, Dec 2006.

FUKURODA, T. et al. Endothelin receptor subtypes in human versus rabbit pulmonary arteries. **J Appl Physiol (1985)**, v. 76, n. 5, p. 1976-82, May 1994.

FURLAN, J. C. et al. Global incidence and prevalence of traumatic spinal cord injury. **Can J Neurol Sci**, v. 40, n. 4, p. 456-64, Jul 2013.

GABBAY, E.; FRASER, J.; MCNEIL, K. Review of bosentan in the management of pulmonary arterial hypertension. **Vasc Health Risk Manag**, v. 3, n. 6, p. 887-900, 2007.

GAO, Y. J.; JI, R. R. Activation of JNK pathway in persistent pain. **Neurosci Lett**, v. 437, n. 3, p. 180-3, Jun 6 2008.

\_\_\_\_\_. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? **Open Pain J**, v. 2, p. 11-17, Jan 1 2009.

GEE, N. S. et al. The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel. **J Biol Chem**, v. 271, n. 10, p. 5768-76, Mar 8 1996. I

GERARDO-NAVA, J. et al. Differential pattern of neuroprotection in lumbar, cervical and thoracic spinal cord segments in an organotypic rat model of glutamate-induced excitotoxicity. **J Chem Neuroanat**, v. 53, p. 11-7, Nov 2013.

GERZANICH, V. et al. De novo expression of Trpm4 initiates secondary hemorrhage in spinal cord injury. **Nat Med**, v. 15, n. 2, p. 185-91, Feb 2009.

GIAID, A. et al. Topographical localisation of endothelin mRNA and peptide immunoreactivity in neurones of the human brain. **Histochemistry**, v. 95, n. 3, p. 303-14, 1991.

GISZTER, S. F. Spinal cord injury: present and future therapeutic devices and prostheses. **Neurotherapeutics**, v. 5, n. 1, p. 147-62, Jan 2008.

GOLD, M. S.; GEBHART, G. F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. **Nat Med**, v. 16, n. 11, p. 1248-57, Nov 2010.

GOSELIN, R. D. et al. Glial cells and chronic pain. **Neuroscientist**, v. 16, n. 5, p. 519-31, Oct 2010.

GRISWOLD, D. E. et al. Endothelin B receptor modulates inflammatory pain and cutaneous inflammation. **Mol Pharmacol**, v. 56, n. 4, p. 807-12, Oct 1999.

GUO, J. et al. Targeting endothelin receptors A and B attenuates the inflammatory response and improves locomotor function following spinal cord injury in mice. **Int J Mol Med**, v. 34, n. 1, p. 74-82, Jul 2014.

GUTH, L.; ZHANG, Z.; STEWARD, O. The unique histopathological responses of the injured spinal cord. Implications for neuroprotective therapy. **Ann N Y Acad Sci**, v. 890, p. 366-84, 1999.

GWAK, Y. S. et al. Locomotor recovery and mechanical hyperalgesia following spinal cord injury depend on age at time of injury in rat. **Neurosci Lett**, v. 362, n. 3, p. 232-5, May 27 2004.

HAGG, T.; OUDEGA, M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 3-4, p. 264-80, Mar-Apr 2006.

HAGGARD, P.; IANNETTI, G. D.; LONGO, M. R. Spatial sensory organization and body representation in pain perception. **Curr Biol**, v. 23, n. 4, p. R164-76, Feb 18 2013.

HALL, E. D.; SPRINGER, J. E. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 80-100, Jan 2004.

HANS, G.; SCHMIDT, B. L.; STRICHARTZ, G. Nociceptive sensitization by endothelin-1. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 36-42, Apr 2009.

HASUE, F. et al. Inhibitory actions of endothelin-1 on pain processing. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 44 Suppl 1, p. S318-20, Nov 2004.

HAWRYLUK, G. W. et al. Protection and repair of the injured spinal cord: a review of completed, ongoing, and planned clinical trials for acute spinal cord injury. **Neurosurg Focus**, v. 25, n. 5, p. E14, 2008.

HERRMANN, E. et al. The endothelin axis in urologic tumors: mechanisms of tumor biology and therapeutic implications. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 6, n. 1, p. 73-81, Jan 2006.

HORN, S. D. et al. Association of various comorbidity measures with spinal cord injury rehabilitation outcomes. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 94, n. 4 Suppl, p. S75-86, Apr 2013.

HOSODA, K. et al. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1267-76, Dec 30 1994.

0, V.K. et al. Over-expression of astrocytic ET-1 attenuates neuropathic pain by inhibition of ERK1/2 and Akt(s) via activation of ETA receptor. **Mol Cell Neurosci**, v. 60, p. 26-35, 2014.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 2, p. 83-91, Feb 2001.

IASP, I. A. F. T. S. O. P. **Spinal Cord Injury Pain: Assessment, Mechanisms, Management**. Seattle: IASP Press, 2002. 443 ISBN 0-931092-43-4.

\_\_\_\_\_. 2014. Disponível em: < <http://www.iasp-pain.org> >. Acesso em: 01 de Novembro.

ICHIMURA, Y. et al. Significant attenuation of macrovascular involvement by bosentan in a patient with diffuse cutaneous systemic sclerosis with multiple digital ulcers and gangrene. **Mod Rheumatol**, v. 21, n. 5, p. 548-52, Oct 2011.

INOUE, A. et al. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. **J Biol Chem**, v. 264, n. 25, p. 14954-9, Sep 5 1989.

ISHIKAWA, N. et al. Endothelins promote the activation of astrocytes in rat neostriatum through ET(B) receptors. **Eur J Neurosci**, v. 9, n. 5, p. 895-901, May 1997.

JI, R. R.; BERTA, T.; NEDERGAARD, M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? **Pain**, v. 154 Suppl 1, p. S10-28, Dec 2013.

JONES, L. L.; MARGOLIS, R. U.; TUSZYNSKI, M. H. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 182, n. 2, p. 399-411, Aug 2003.

JONES, L. L.; SAJED, D.; TUSZYNSKI, M. H. Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. **J Neurosci**, v. 23, n. 28, p. 9276-88, Oct 15 2003.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, Sep 13 2001.

KAMEI, J. et al. Antinociceptive effects of intrathecally administered endothelin-1 in mice. **Neurosci Lett**, v. 153, n. 1, p. 69-72, Apr 16 1993.

KANDEL, E. **Principles of Neural Science, Fifth Edition**. McGraw-Hill Education, 2013.

KARIMI-ABDOLREZAEE, S. et al. Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord. **J Neurosci**, v. 30, n. 5, p. 1657-76, Feb 3 2010.

KARIMI-ABDOLREZAEE, S. et al. Chondroitinase and growth factors enhance activation and oligodendrocyte differentiation of endogenous neural precursor cells after spinal cord injury. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37589, 2012.

KASEMSRI, T.; ARMSTEAD, W. M. Endothelin production links superoxide generation to altered opioid-induced pial artery vasodilation after brain injury in pigs. **Stroke**, v. 28, n. 1, p. 190-6; discussion 197, Jan 1997.

KEANE, R. W. et al. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 60, n. 5, p. 422-9, May 2001.

KEDZIERSKI, R. M.; YANAGISAWA, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 851-76, 2001.

KHIMJI, A. K.; ROCKEY, D. C. Endothelin--biology and disease. **Cell Signal**, v. 22, n. 11, p. 1615-25, Nov 2010.\

KHODOROVA, A. et al. Local injection of a selective endothelin-B receptor agonist inhibits endothelin-1-induced pain-like behavior and excitation of nociceptors in a naloxone-sensitive manner. **J Neurosci**, v. 22, n. 17, p. 7788-96, Sep 1 2002.

KHODOROVA, A.; MONTMAYEUR, J. P.; STRICHARTZ, G. Endothelin receptors and pain. **J Pain**, v. 10, n. 1, p. 4-28, Jan 2009.

KHODOROVA, A. et al. Endothelin-B receptor activation triggers an endogenous analgesic cascade at sites of peripheral injury. **Nat Med**, v. 9, n. 8, p. 1055-61, Aug 2003.

KIGUCHI, N. et al. Involvement of inflammatory mediators in neuropathic pain caused by vincristine. **Int Rev Neurobiol**, v. 85, p. 179-90, 2009.

KOHNO, T. et al. Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. **Pain**, v. 117, n. 1-2, p. 77-87, Sep 2005.

KOYAMA, Y. et al. BQ788, an endothelin ET(B) receptor antagonist, attenuates stab wound injury-induced reactive astrocytes in rat brain. **Glia**, v. 26, n. 3, p. 268-71, May 1999.

KRAMER, A. S. et al. Systematic review of induced pluripotent stem cell technology as a potential clinical therapy for spinal cord injury. **Cell Transplant**, v. 22, n. 4, p. 571-617, 2013.

KRASSIOUKOV, A. V.; FURLAN, J. C.; FEHLINGS, M. G. Medical co-morbidities, secondary complications, and mortality in elderly with acute spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 20, n. 4, p. 391-9, Apr 2003.

KUROKAWA, K.; YAMADA, H.; OCHI, J. Topographical distribution of neurons containing endothelin type A receptor in the rat brain. **J Comp Neurol**, v. 389, n. 2, p. 348-60, Dec 15 1997.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926, Sep 2009.

LEE, M. E. et al. Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. **J Clin Invest**, v. 86, n. 1, p. 141-7, Jul 1990.

LESKOVAR, A. et al. The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems. **J Exp Biol**, v. 203, n. Pt 12, p. 1783-95, Jun 2000.

LIU, C. et al. Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, p. CD004434, 2013.

LIU, M.; WOOD, J. N. The roles of sodium channels in nociception: implications for mechanisms of neuropathic pain. **Pain Med**, v. 12 Suppl 3, p. S93-9, Jul 2011.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-9, May 8 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, Jul 31 2008. I

LUNDY-EKMAN, L. **Neurociências: fundamentos para reabilitação**. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2008.

LYSKO, P. G. et al. Developmental expression of endothelin receptors in cerebellar neurons differentiating in culture. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 88, n. 1, p. 96-101, Aug 28 1995.

MACRAE, I. M. et al. Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 13, n. 2, p. 276-84, Mar 1993.

MARAIS, E.; KLUGBAUER, N.; HOFMANN, F. Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. **Mol Pharmacol**, v. 59, n. 5, p. 1243-8, May 2001.

MARQUES, S. A. et al. A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: morphological and functional assessment. **J Neurosci Methods**, v. 177, n. 1, p. 183-93, Feb 15 2009.

MARTINEZ, M.; ROSSIGNOL, S. A dual spinal cord lesion paradigm to study spinal locomotor plasticity in the cat. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1279, p. 127-34, Mar 2013.

MASAKI, T.; VANE, J. R.; VANHOUTTE, P. M. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. **Pharmacol Rev**, v. 46, n. 2, p. 137-42, Jun 1994.

MCCLEANE, G. Pharmacological strategies in relieving neuropathic pain. **Expert Opin Pharmacother**, v. 5, n. 6, p. 1299-312, Jun 2004.

\_\_\_\_\_. Antidepressants as analgesics. **CNS Drugs**, v. 22, n. 2, p. 139-56, 2008.

MCDONALD, J. W.; SADOWSKY, C. Spinal-cord injury. **Lancet**, v. 359, n. 9304, p. 417-25, Feb 2 2002.

MCKENZIE, A. L. et al. Immunolocalization of endothelin in the traumatized spinal cord: relationship to blood-spinal cord barrier breakdown. **J Neurotrauma**, v. 12, n. 3, p. 257-68, Jun 1995.

MEYER, F. et al. Alterações vesicais na lesão medular experimental em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. 3, 2003. ISSN 1678-2674.

MOTTA, E. M.; CALIXTO, J. B.; RAE, G. A. Mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in rats is mediated via phospholipase C, protein kinase C, and MAP kinases. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 231, n. 6, p. 1141-5, Jun 2006.

MYER, D. J. et al. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. **Brain**, v. 129, n. Pt 10, p. 2761-72, Oct 2006.

MYERS, J.; LEE, M.; KIRATLI, J. Cardiovascular disease in spinal cord injury: an overview of prevalence, risk, evaluation, and management. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 86, n. 2, p. 142-52, Feb 2007.

NAKAE, A. et al. The animal model of spinal cord injury as an experimental pain model. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 939023, 2011.

NOBLE, L. J. et al. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. **J Neurosci**, v. 22, n. 17, p. 7526-35, Sep 1 2002.

NORENBERG, M. D.; SMITH, J.; MARCILLO, A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. **J Neurotrauma**, v. 21, n. 4, p. 429-40, Apr 2004.

NSCISC, N. S. C. I. S. C. **Annual report for the spinal cord injury model system**. <http://www.nscisc.uab.edu>. 2013



NUSSDORFER, G. G. et al. Autocrine-paracrine endothelin system in the physiology and pathology of steroid-secreting tissues. **Pharmacol Rev**, v. 51, n. 3, p. 403-38, Sep 1999.

O'CALLAGHAN, D. S. et al. Endothelin receptor antagonists for the treatment of pulmonary arterial hypertension. **Expert Opin Pharmacother**, v. 12, n. 10, p. 1585-96, Jul 2011.

O'CALLAGHAN, J. P.; MILLER, D. B. Spinal glia and chronic pain. **Metabolism**, v. 59 Suppl 1, p. S21-6, Oct 2010.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3779-87, Nov 2010.

PATEL, T. R.; MCAULEY, M. A.; MCCULLOCH, J. Effects on feline pial arterioles in situ of bosentan, a non-peptide endothelin receptor antagonist. **Eur J Pharmacol**, v. 260, n. 1, p. 65-71, Jul 21 1994.

PETERS, C. M. et al. Endothelin receptor expression in the normal and injured spinal cord: potential involvement in injury-induced ischemia and gliosis. **Exp Neurol**, v. 180, n. 1, p. 1-13, Mar 2003.

PIOVEZAN, A. P. et al. Endothelin-1-induced ET(A) receptor-mediated nociception, hyperalgesia and oedema in the mouse hind-paw: modulation by simultaneous ET(B) receptor activation. **Br J Pharmacol**, v. 129, n. 5, p. 961-8, Mar 2000.

PLANT, T. D. et al. Endothelin potentiates TRPV1 via ETA receptor-mediated activation of protein kinase C. **Mol Pain**, v. 3, p. 35, 2007.

POMONIS, J. D. et al. Expression and localization of endothelin receptors: implications for the involvement of peripheral glia in nociception. **J Neurosci**, v. 21, n. 3, p. 999-1006, Feb 1 2001.

POPA, C. et al. Vascular dysfunctions following spinal cord injury. **J Med Life**, v. 3, n. 3, p. 275-85, Jul-Sep 2010.

PRESCOTT, S. A.; MA, Q.; DE KONINCK, Y. Normal and abnormal coding of somatosensory stimuli causing pain. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 2, p. 183-91, Feb 2014.

PROFYRIS, C. et al. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. **Neurobiol Dis**, v. 15, n. 3, p. 415-36, Apr 2004.

QUASTHOFF, S. et al. Calcium potentials and tetrodotoxin-resistant sodium potentials in unmyelinated C fibres of biopsied human sural nerve. **Neuroscience**, v. 69, n. 3, p. 955-65, Dec 1995.

RAGHAVENDRA, V.; TANGA, F.; DELEO, J. A. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 306, n. 2, p. 624-30, Aug 2003.

RASHID, A. J.; O'DOWD, B. F.; GEORGE, S. R. Minireview: Diversity and complexity of signaling through peptidergic G protein-coupled receptors. **Endocrinology**, v. 145, n. 6, p. 2645-52, Jun 2004.

REGAN, R. F.; GUO, Y. Toxic effect of hemoglobin on spinal cord neurons in culture. **J Neurotrauma**, v. 15, n. 8, p. 645-53, Aug 1998.

REIER, P. J.; HOULE, J. D. The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. **Adv Neurol**, v. 47, p. 87-138, 1988.

REMUZZI, G.; PERICO, N.; BENIGNI, A. New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, n. 12, p. 986-1001, Dec 2002.

REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nat Med**, v. 16, n. 11, p. 1267-76, Nov 2010.

ROSSIGNOL, S. et al. Re-expression of locomotor function after partial spinal cord injury. **Physiology (Bethesda)**, v. 24, p. 127-39, Apr 2009.

ROSSIGNOL, S. et al. Plasticity of locomotor sensorimotor interactions after peripheral and/or spinal lesions. **Brain Res Rev**, v. 57, n. 1, p. 228-40, Jan 2008.

ROSSIGNOL, S. et al. Chapter 16--spinal plasticity in the recovery of locomotion. **Prog Brain Res**, v. 188, p. 229-41, 2011.

ROWLAND, J. W. et al. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. **Neurosurg Focus**, v. 25, n. 5, p. E2, 2008.

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annu Rev Med**, v. 49, p. 123-33, 1998.

SAKURAI, T. et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. **Nature**, v. 348, n. 6303, p. 732-5, Dec 20-27 1990.

SAMADIKUCHAKSARAEI, A. An overview of tissue engineering approaches for management of spinal cord injuries. **J Neuroeng Rehabil**, v. 4, p. 15, 2007.

SANDHIR, R. et al. Upregulation of inflammatory mediators in a model of chronic pain after spinal cord injury. **Neurochem Res**, v. 36, n. 5, p. 856-62, May 2011.

SANTOS-BENITO, F. F.; MUNOZ-QUILES, C.; RAMON-CUETO, A. Long-term care of paraplegic laboratory mammals. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 3-4, p. 521-36, Mar-Apr 2006.

SCHMIDT, O. I. et al. ATLS(R) and damage control in spine trauma. **World J Emerg Surg**, v. 4, p. 9, 2009.

SCHOMBERG, D. et al. Neuropathic pain: role of inflammation, immune response, and ion channel activity in central injury mechanisms. **Ann Neurosci**, v. 19, n. 3, p. 125-132, Jul 2012.

SCHWAB, J. M. et al. Persistent accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/macrophages and upregulation by endothelium following spinal cord injury. **J Neuroimmunol**, v. 111, n. 1-2, p. 122-30, Nov 1 2000.

SCHWARTZ, G.; FEHLINGS, M. G. Secondary injury mechanisms of spinal cord trauma: a novel therapeutic approach for the management of

secondary pathophysiology with the sodium channel blocker riluzole. **Prog Brain Res**, v. 137, p. 177-90, 2002.

SCHWEIGREITER, R.; BANDTLOW, C. E. Nogo in the injured spinal cord. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 3-4, p. 384-96, Mar-Apr 2006.

SEKHON, L. H.; FEHLINGS, M. G. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 26, n. 24 Suppl, p. S2-12, Dec 15 2001.

SHARP, K. et al. A rat chronic pain model of spinal cord contusion injury. **Methods Mol Biol**, v. 851, p. 195-203, 2012.

SHEETS, P. L. et al. Differential block of sensory neuronal voltage-gated sodium channels by lacosamide [(2R)-2-(acetylamino)-N-benzyl-3-methoxypropanamide], lidocaine, and carbamazepine. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 326, n. 1, p. 89-99, Jul 2008.

SIDDALL, P. J. et al. Pregabalin in central neuropathic pain associated with spinal cord injury: a placebo-controlled trial. **Neurology**, v. 67, n. 10, p. 1792-800, Nov 28 2006.

SIDDALL, P. J.; FINNERUP, N. B. Chapter 46 Pain following spinal cord injury. **Handb Clin Neurol**, v. 81, p. 689-703, 2006.

SIDDALL, P. J.; YEZIERSKI, R. P.; LOESER, J. D. Taxonomy and Epidemiology of Spinal Cord Injury Pain. In: YEZIERSKI, R. P. e BURCHIEL, K. (Ed.). **Spinal Cord Injury Pain: Assessment, Mechanisms, Management**. Seattle: IASP Press, v.23, 2002. cap. 2, p.443.

SIDDIQUI, A. M.; KHAZAEI, M.; FEHLINGS, M. G. Translating Mechanisms of Neuroprotection, Regeneration, and Repair to Treatment of Spinal Cord Injury. **Progress in Brain Research**, p. 47, 2015.

SILLS, G. J. The mechanisms of action of gabapentin and pregabalin. **Curr Opin Pharmacol**, v. 6, n. 1, p. 108-13, Feb 2006.

SKOTT, O. Pain: new insights, new treatments? **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 285, n. 1, p. R30-1, Jul 2003.

SMITH, E. S.; LEWIN, G. R. Nociceptors: a phylogenetic view. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, v. 195, n. 12, p. 1089-106, Dec 2009.

SOKOLOVSKY, M. Endothelin receptor subtypes and their role in transmembrane signaling mechanisms. **Pharmacol Ther**, v. 68, n. 3, p. 435-71, 1995.

SORKIN, L. S.; PUIG, S. Neuronal model of tactile allodynia produced by spinal strychnine: effects of excitatory amino acid receptor antagonists and a mu-opiate receptor agonist. **Pain**, v. 68, n. 2-3, p. 283-92, Dec 1996.

STANIMIROVIC, D. B. et al. Endothelin-1 receptor binding and cellular signal transduction in cultured human brain endothelial cells. **J Neurochem**, v. 62, n. 2, p. 592-601, Feb 1994.

STEEN, V. et al. Digital ulcers: overt vascular disease in systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 48 Suppl 3, p. iii19-24, Jun 2009.

STEIN, C.; SCHAFER, M.; MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nat Med**, v. 9, n. 8, p. 1003-8, Aug 2003.

TAI, L. W. et al. Effects of repeated central administration of endothelin type A receptor antagonist on the development of neuropathic pain in rats. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 529871, 2013.

TAOKA, Y. et al. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. **Neuroscience**, v. 79, n. 4, p. 1177-82, Aug 1997.

TATOR, C. H.; FEHLINGS, M. G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. **J Neurosurg**, v. 75, n. 1, p. 15-26, Jul 1991.

TAVES, S. et al. Microglia and spinal cord synaptic plasticity in persistent pain. **Neural Plast**, v. 2013, p. 753656, 2013.

TCHEKHOV, A. O jardim das cerejeiras (peça, Ato I). 1904.

THURET, S.; MOON, L. D.; GAGE, F. H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 8, p. 628-43, Aug 2006.

TULI, S. et al. Hemodynamic parameters and timing of surgical decompression in acute cervical spinal cord injury. **J Spinal Cord Med**, v. 30, n. 5, p. 482-90, 2007.

TZEKOU, A.; FEHLINGS, M. G. Treatment of spinal cord injury with intravenous immunoglobulin G: preliminary evidence and future perspectives. **J Clin Immunol**, v. 34 Suppl 1, p. S132-8, Jul 2014.

TZELLOS, T. G. et al. Efficacy of pregabalin and gabapentin for neuropathic pain in spinal-cord injury: an evidence-based evaluation of the literature. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 64, n. 9, p. 851-8, Sep 2008.

UESUGI, M. et al. Endogenous endothelin-1 initiates astrocytic growth after spinal cord injury. **Brain Res**, v. 728, n. 2, p. 255-9, Jul 29 1996.

UESUGI, M. et al. SB209670, a potent endothelin receptor antagonist, prevents or delays axonal degeneration after spinal cord injury. **Brain Res**, v. 786, n. 1-2, p. 235-9, Mar 9 1998.

VAN DER VELDEN, M. W. et al. Prehospital interventions: time wasted or time saved? An observational cohort study of management in initial trauma care. **Emerg Med J**, v. 25, n. 7, p. 444-9, Jul 2008.

VAN MIDDENDORP, J. J.; SANCHEZ, G. M.; BURRIDGE, A. L. The Edwin Smith papyrus: a clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries. **Eur Spine J**, v. 19, n. 11, p. 1815-23, Nov 2010.

VANDERAH, T. W. et al. Dynorphin promotes abnormal pain and spinal opioid antinociceptive tolerance. **J Neurosci**, v. 20, n. 18, p. 7074-9, Sep 15 2000.

VANICKY, I. et al. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. **J Neurotrauma**, v. 18, n. 12, p. 1399-407, Dec 2001.

VAWDA, R.; FEHLINGS, M. G. Mesenchymal cells in the treatment of spinal cord injury: current & future perspectives. **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 8, n. 1, p. 25-38, Jan 2013.

VIGNE, P.; BREITTMAYER, J. P.; FRELIN, C. Competitive and non competitive interactions of BQ-123 with endothelin ETA receptors. **Eur J Pharmacol**, v. 245, n. 3, p. 229-32, May 15 1993.

VRANKEN, J. H. Mechanisms and treatment of neuropathic pain. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, v. 9, n. 1, p. 71-8, Mar 2009.

VRANKEN, J. H. et al. Pregabalin in patients with central neuropathic pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a flexible-dose regimen. **Pain**, v. 136, n. 1-2, p. 150-7, May 2008.

WANG, H. et al. Induced pluripotent stem cells for spinal cord injury therapy: current status and perspective. **Neurol Sci**, v. 34, n. 1, p. 11-7, Jan 2013.

WANG, K. C. et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 941-4, Jun 27 2002.

WATSON, J. L. et al. Persistent at-level thermal hyperalgesia and tactile allodynia accompany chronic neuronal and astrocyte activation in superficial dorsal horn following mouse cervical contusion spinal cord injury. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e109099, 2014.

WAXMAN, S. G. et al. Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain. **Muscle Nerve**, v. 22, n. 9, p. 1177-87, Sep 1999.

WEBB, M. L.; MEEK, T. D. Inhibitors of endothelin. **Med Res Rev**, v. 17, n. 1, p. 17-67, Jan 1997

WERNER, M. F. et al. Contribution of peripheral endothelin ETA and ETB receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. **Eur J Pain**, v. 14, n. 9, p. 911-7, Oct 2010. I

WILLIS, W. D. Possible Mechanisms of Central Neuropathic Pain. In: YEZIERSKI, R. P. e BURCHIEL, K. (Ed.). **Spinal Cord Injury Pain: Assessment, Mechanisms, Management**. Seattle: IASP Press, 2002. cap. 60-, p.443.

WILSON, J. R.; FEHLINGS, M. G. Emerging approaches to the surgical management of acute traumatic spinal cord injury. **Neurotherapeutics**, v. 8, n. 2, p. 187-94, Apr 2011.

WILSON, J. R.; FORGIONE, N.; FEHLINGS, M. G. Emerging therapies for acute traumatic spinal cord injury. **CMAJ**, v. 185, n. 6, p. 485-92, Apr 2 2013.

WOOLF, C. J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. **Life Sci**, v. 74, n. 21, p. 2605-10, Apr 9 2004.

\_\_\_\_\_. What is this thing called pain? **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3742-4, Nov 2010.

WU, Y.; SATKUNENDRARAJAH, K.; FEHLINGS, M. G. Riluzole improves outcome following ischemia-reperfusion injury to the spinal cord by preventing delayed paraplegia. **Neuroscience**, v. 265, p. 302-12, Apr 18 2014.

YAMADA, H.; KUROKAWA, K. Histochemical studies on endothelin and the endothelin-A receptor in the hypothalamus. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 31 Suppl 1, p. S215-8, 1998.

YAMAMOTO, H. et al. Endothelin-1 enhances capsaicin-evoked intracellular Ca<sup>2+</sup> response via activation of endothelin a receptor in a protein kinase Cepsilon-dependent manner in dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience**, v. 137, n. 3, p. 949-60, Feb 2006.

YAMAMOTO, T. et al. Analysis of the role of endothelin-A and endothelin-B receptors on nociceptive information transmission in the spinal cord with FR139317, an endothelin-A receptor antagonist, and sarafotoxin S6c, an endothelin-B receptor agonist. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 271, n. 1, p. 156-63, Oct 1994.



YANAGISAWA, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, n. 6163, p. 411-5, Mar 31 1988.

YEO, J. D. A review of experimental research in spinal cord injury. **Paraplegia**, v. 14, n. 1, p. 1-11, May 1976

YOSHIZAWA, T. et al. Endothelin localizes in the dorsal horn and acts on the spinal neurones: possible involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels and substance P release. **Neurosci Lett**, v. 102, n. 2-3, p. 179-84, Jul 31 1989.

YOUNG, W. Spinal cord regeneration. **Cell Transplant**, v. 23, n. 4-5, p. 573-611, 2014.

YOUNG, W. et al. Effect of naloxone on posttraumatic ischemia in experimental spinal contusion. **J Neurosurg**, v. 55, n. 2, p. 209-19, Aug 1981.

YU, D. et al. Alleviation of chronic pain following rat spinal cord compression injury with multimodal actions of huperzine A. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 8, p. E746-55, Feb 19 2013.

YU, W. R. et al. Involvement of mitochondrial signaling pathways in the mechanism of Fas-mediated apoptosis after spinal cord injury. **Eur J Neurosci**, v. 29, n. 1, p. 114-31, Jan 2009.

ZHANG, S. X. et al. Histological repair of damaged spinal cord tissue from chronic contusion injury of rat: a LM observation. **Histol Histopathol**, v. 26, n. 1, p. 45-58, Jan 2011.

ZHOU, Z.; DAVAR, G.; STRICHARTZ, G. Endothelin-1 (ET-1) selectively enhances the activation gating of slowly inactivating tetrodotoxin-resistant sodium currents in rat sensory neurons: a mechanism for the pain-inducing actions of ET-1. **J Neurosci**, v. 22, n. 15, p. 6325-30, Aug 1 2002.



## 8. ANEXOS

### A. Escala de atividade locomotora BBB (Basso et al., 1995)

Movimento do Membro Posterior						Posição do Tronco		Abdome	Movimento da Pata Dianteira				Pisada		C o o r d e n a ç ã o	Liberação dos Dedos		Posição Predominante da Pata		I n d o s t r a b i l i d a d e	Cauda			
Quadril		Joelho		Tornozelo		Lado	Apoio		Apoio da Pata				Dorsal	Plantar		Contato Inicial	Elevação							
E	D	E	D	E	D					Balanço	Sen Suporte de Peso	Com Suporte de Peso	E	D	E		D	E	D	E	D			
0	0	0	0	0	0	E	D	Arrastando	E	D	E	D	0	0	0	0	0*	0*	I	I	I	I	Para Cima (elevada)	
S	S	S	S	S	S			Paralelo	E	D	E	D	O	O	O	O	O	O	O	E	E	E	E	Para Baixo (abaixada)
E	E	E	E	E	E	Central		Alto					F	F	F	F	F	F**	F**	P	P	P	P	
													C	C	C	C	C	C	C					

Rato: \_\_\_\_\_ Data / / 200 \_\_\_\_\_ Dias Pós-Operatório \_\_\_\_\_ Pontuação Esquerdo: \_\_\_\_\_ Direito: \_\_\_\_\_

Movimento	+	Pisada Dorsal > 4 passos da pata posterior	0 Nuncas (0%)	I Rotação Interna
0 Nenhum	*	Liberação < 50%	O Ocasional (< 50%)	E Rotação Externa
S Suave (discreto)	**	Dedos Arrastando > 4 passos da pata posterior	F Freqüente (51-94%)	P Paralelo
E Extenso			C Consistente (95-100%)	

Pontuação	Definições operacionais de categorias e atributos
0	Nenhum movimento observável do membro posterior.
1	Movimento discreto (<50% da amplitude) de uma ou das duas articulações, geralmente, do quadril e/ou joelho.
2	Movimento extenso (>50% da amplitude) de uma articulação ou movimento extenso de uma articulação e discreto de uma outra.
3	Movimento extenso de duas articulações.
4	Movimento discreto de todas as três articulações do membro posterior.
5	Movimento discreto de duas articulações e extenso da terceira.
6	Movimento extenso de duas articulações e discreto da terceira.
7	Movimento extenso das três articulações do membro

	posterior.
8	Pedalada (movimento rítmico do membro posterior) sem suporte de peso <u>ou</u> apoio plantar da pata sem suporte de peso.
9	Apoio plantar da pata com suporte de peso somente em fase de apoio (i.e., quando estático) ou passada dorsal ocasional (0 – 50% do tempo), freqüente (50 – 94% do tempo) ou consistente (95 – 100% do tempo) com suporte de peso e nenhuma passada plantar.
10	Passo plantar com suporte de peso ocasional e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
11	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e nenhuma coordenação dos membros anterior e posterior.
12	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação ocasional dos membros anterior e posterior.
13	Passo plantar com suporte de peso freqüente a consistente e coordenação freqüente dos membros anterior e posterior.
14	Passo plantar com suporte de peso consistente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e posição predominante da pata rodada (interna ou externamente) durante a locomoção, no instante do contato inicial com a superfície bem como antes de liberar os dedos no final da fase de apoio <u>ou</u> passada plantar freqüente, coordenação consistente dos membros anterior e posterior e passada dorsal ocasional.
15	Passada plantar consistente e coordenação consistente dos membros anterior e posterior e nenhuma liberação dos dedos ou liberação ocasional durante o movimento do membro para frente, posição predominante da pata paralela ao corpo no instante do contato inicial.
16	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre freqüentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada no instante da liberação.
17	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre freqüentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é

	paralela ao corpo no instante do contato inicial e da liberação dos dedos.
18	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição é paralela ao corpo no instante do contato inicial e rodada na liberação dos dedos.
19	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e da liberação dos dedos e apresenta a cauda para baixo parte do tempo ou por todo o tempo.
20	Passada plantar consistente e coordenação dos membros anterior e posterior durante a marcha e a liberação dos dedos ocorre consistentemente durante o movimento do membro para a frente, a posição predominante da pata é paralela ao corpo no instante do contato inicial e da liberação dos dedos e apresenta a cauda consistentemente elevada e instabilidade do tronco.
21	Passada plantar consistente e marcha coordenada, liberação consistente dos dedos, a posição predominante da pata é paralela ao corpo durante toda a fase de apoio, estabilidade consistente do tronco, a cauda consistentemente elevada.

---

## DEFINIÇÕES

Discreta	Movimento parcial da articulação, inferior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Extensa	Movimento parcial da articulação, superior à metade da amplitude de movimento da articulação.
Pedalada	Movimento rítmico do membro posterior no qual suas três articulações estão estendidas, em seguida completamente flexionadas e novamente estendidas, o animal geralmente inclina-se lateralmente, a superfície plantar da pata pode ou não tocar o solo, nenhum suporte de peso corpóreo é evidente por toda a pata posterior.
Sem suporte de peso	Nenhuma contração dos músculos extensores do membro posterior durante pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa.
Com suporte de peso	Contração dos músculos extensores do membro posterior durante a pisada plantar da pata ou nenhuma elevação da coxa.
Passada plantar	A pata está em contato plantar com suporte de peso, em seguida ocorre o movimento do membro para frente até ser restabelecido o contato plantar com suporte de peso.
Passada dorsal	O peso é suportado pela superfície dorsal da pata em qualquer ponto do ciclo do passo.
Coordenação dos membros anterior e posterior	Para todo o passo do membro anterior ocorre um passo do membro posterior e os membros posteriores se alternam.
Ocasional	Menos do que ou igual à metade das vezes, < ou igual a 50%.
Freqüente	Mais do que a metade, mas não

---

Consistente	sempre, 51 – 94%.
Instabilidade do tronco	Quase sempre ou sempre, 95 – 100%. Lateralização do peso que causa oscilação de um lado a outro ou colapso parcial do tronco

---